

**Entwicklung einer  
computergesteuerten Robotikplattform für  
Life Science Applikationen  
am Beispiel des miniaturisierten  
Chlorophyll-Fluoreszenztests mit der Grünalge  
Desmodesmus subspicatus**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik und Physik  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von  
**Martin Hüttner**  
aus Tübingen

2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hanns Ruder
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Kern

Dekan: Prof. Dr. Peter Schmid

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2006

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit beschreibt die umfangreichen Arbeiten für die Entwicklung einer computergesteuerten Robotikplattform im Rahmen eines von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projekts mit dem Titel „Umweltschonendes, automatisches High-Throughput-Testing mit Algen“. Es handelt sich dabei um eine interdisziplinäre Arbeit der Gebiete Physik, Informatik, Biotechnologie, Ingenieurwesen und Umweltforschung. Während dem Leser ein grober Einblick in alle Bereiche gewährt wird, lag dem Autor abgesehen von der Darstellung der erzielten Resultate stets die Lesbarkeit und Verständlichkeit dieses Werks am Herzen.

Neben der Universität Tübingen waren an diesem Forschungsprojekt die Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH) Aachen, die Henkel KGaA in Düsseldorf, die Polygen GmbH in Langen und die Hölle & Hüttner AG in Tübingen beteiligt. Ohne das gute Zusammenspiel dieser verschiedenen Institutionen wären die vielversprechenden Ergebnisse nicht denkbar gewesen.

Als Produkt der erfolgreichen Umsetzung ist anzusehen, dass zusätzlich zur Projektvorgabe mit dem Erreichten in anderen wissenschaftlichen Bereichen „Luft geschnuppert“ werden konnte. Hier seien die Molekularbiologie, die Medizintechnik und die angewandte Physik genannt.

Zur besseren Illustration der technischen Verwirklichungen steht dem Leser auf Seite 57 dieser Arbeit zusätzlich ein Film in digitaler Form zur Verfügung.

Schließlich enthält die Arbeit einige Abschnitte die einer gestrafften Darstellung halber nicht in den eigentlichen Text, sondern in den Anhang gelegt wurden. Damit soll jedoch keineswegs ein geringeres Gewicht dieser Abschnitte zum Ausdruck gebracht werden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>Kapitel 2 Biologische Grundlagen.....</b>	<b>7</b>
2.1 Ökotoxikologie .....	7
2.1.1 Ökotoxikologische Untersuchungsmethoden .....	7
2.1.2 Prinzipien der Ökotoxikologie.....	8
2.1.3 Risikocharakterisierung und statistische Absicherung .....	9
2.2 Algen als Bioindikator für aquatische Testsysteme .....	12
2.3 Wachstumshemmtest mit <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	14
<b>Kapitel 3 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1 Miniaturisierung des Testsystems .....	17
3.2 Testdurchführung.....	18
3.2.1 Herstellung der Nährmedien .....	18
3.2.2 Kultivierung .....	21
3.2.3 Testansatz.....	22
3.2.4 Inkubation .....	25
3.2.5 Messwerterfassung und Messgeräte .....	26
3.2.6 Gültigkeitskriterien .....	27
3.3 Auswertungsmethoden .....	28
3.3.1 Berechnung der Wachstumshemmung .....	28
3.3.2 Berechnung der effektiven Konzentration.....	30
<b>Kapitel 4 Experimenteller Aufbau .....</b>	<b>35</b>
4.1 Systemkomponenten.....	35
4.1.1 Robotersystem.....	36
4.1.2 Inkubationseinheit.....	38
4.1.3 Fluoreszenzmessgerät .....	42
4.1.4 Liquid Handling .....	44
4.1.5 Roboterkabine .....	46
4.1.6 Steuerungs-PC.....	46
4.2 Gesamtsystem .....	48
4.3 Software-Module .....	49
4.3.1 Steuerungs-Software .....	49
4.3.2 Software zur Optimierung des Liquid-Handlings .....	50
4.3.3 Auswertungs-Software.....	52
4.3.4 Interaktion der Software-Module .....	54
4.4 „Vollautomatisierter High-Throughput-Algentest“ .....	56

<b>Kapitel 5 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1 Voruntersuchungen.....	59
5.1.1 Quantifizierung der Algen .....	59
5.1.2 Problematik der Verdunstung .....	62
5.1.3 Inkubationsparameter und Kontrollwachstum.....	73
5.2 Verschiedene Ansatzgrößen .....	75
5.2.1 Variation der Auswertungsparameter .....	75
5.2.2 Reproduzierbarkeit (Präzision) .....	80
5.2.3 Substanzen verschiedener Stoffgruppen.....	82
5.3 Validierung des HT-Algentests .....	87
5.3.1 Reproduzierbarkeit (Präzision) beim HT-Algentest.....	87
5.3.2 Substanzen verschiedener Stoffgruppen.....	91
5.4 Quantitative Untersuchungen .....	94
5.5 Weitere Messergebnisse des HT-Algentests .....	100
5.5.1 Umweltproben.....	100
5.5.2 Screening mit Proben der Henkel KGaA.....	102
5.6 Einsatzgebiete des HT-Algentests .....	107
<b>Kapitel 6 Weitere Anwendungsmöglichkeiten .....</b>	<b>111</b>
6.1 Genotoxizitätstests.....	111
6.1.1 umu-Test .....	112
6.1.2 NM2009-Test.....	112
6.1.3 SOS-Test .....	113
6.1.4 Methodenoptimierung.....	113
6.2 Zellvermehrungshemmtests.....	114
6.2.1 Pseudomonas putida-Zellvermehrungshemmtest .....	114
6.2.2 Vibrio fischeri-Zellvermehrungshemmtest.....	115
6.3 Diskussion.....	115
<b>Kapitel 7 BioLane™ Supervisor.....</b>	<b>117</b>
7.1 Software Design .....	117
7.1.1 Dispatcher Technologie .....	117
7.1.2 Supervisor Technologie .....	119
7.1.3 Netzwerkfähigkeit.....	122
7.2 Applikationen .....	122
7.2.1 Blot-Prozessor BioLane™ HTI .....	124
7.2.2 Minimal invasive Chirurgie .....	134
7.2.3 Schwingquarz-Blutgruppen-Bestimmung .....	137
<b>Kapitel 8 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>143</b>
<b>Anhang 1 Schnittstellen.....</b>	<b>145</b>
A 1.1 Allgemeines .....	145
A 1.2 Mitsubishi Movemaster RV-2AJ.....	146
A 1.3 PolyShake .....	147
A 1.4 Tecan SpectraFluor .....	148
A 1.5 Eppendorf EDOS 5222 .....	149
A 1.6 Spezifikationen .....	151

---

<b>Anhang 2 Konstruktionszeichnungen.....</b>	<b>153</b>
<b>Anhang 3 Peltier-Kühlung .....</b>	<b>161</b>
A 3.1 Thermoelektrische Kühlung .....	161
A 3.2 Peltier-Effekt.....	161
A 3.3 Materialien für die Peltier-Kühlung .....	168
A 3.4 Peltier-Module .....	170
<b>Anhang 4 Extensible Markup Language (XML).....</b>	<b>173</b>
A 4.1 Einführung .....	173
A 4.1.1 Herkunft und Ziele .....	174
A 4.1.2 Terminologie.....	174
A 4.2 XML-Dokumente .....	176
A 4.2.1 Logische Strukturen .....	176
A 4.2.2 Physische Strukturen.....	176
A 4.2.3 XML-Syntax .....	177
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>181</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Belastung unserer Umwelt durch chemische Verunreinigungen stellt nach wie vor ein akutes Problem des Umweltschutzes dar. Industrialisierung und Urbanisierung bringen ökologische Probleme mit sich, die auf toxische Aktivitäten zahlreicher Umweltgifte zurückzuführen sind. Derzeit werden jährlich weltweit ca. 300 Millionen Tonnen Chemikalien produziert [1].

Der Umstand, dass mit ausgewählten Organismen Reaktionen auf Umweltstörungen unmittelbar zu erfassen sind, hat dazu geführt, sie gezielt zur Detektion von Schadwirkungen einzusetzen. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind die Einzelspezietest. Sie sind zum großen Teil in Richtlinien standardisiert und dienen zur Untersuchung der Wirkung eines Fremdstoffes oder einer Umweltprobe auf einen ausgewählten Organismus. Im Gegensatz zur chemischen Analytik, welche nur die Schadstoffe nach denen aktiv gesucht wird erfasst und quantifiziert, wird mit diesen biologischen Testverfahren die integrale Wirkung aller in der Probe vorhandenen und bioverfügbaren Schadstoffe auf den Testorganismus erfasst.

Einzellige Algen gehören dabei zu den wichtigsten Primärproduzenten in limnischen und marinen Ökosystemen. In den Weltmeeren produzieren Algen auf  $\frac{2}{3}$  der Erdoberfläche immerhin 31,9 % der Welt-Jahres-Primärproduktion [2] und 70 % des atmosphärischen Sauerstoffs [3]. Dadurch besitzen sie eine Schlüsselfunktion innerhalb der Organismengruppen [4]. Ihre Stoffumsätze werden stark durch anthropogene Emissionen beeinflusst. Dabei handelt es sich einerseits um Nährstoffe (Eutrophierung) und andererseits um wachstumshemmend wirkende Schadstoffe. Diese Effekte haben nicht nur Auswirkungen auf höhere Organismen der Nahrungskette, sondern sie können auch zu Störungen in globalen Stoffkreisläufen ( $O_2/CO_2$ -Gleichgewicht) beitragen. Aufgrund ihrer ökologischen Relevanz und ihrer hohen Empfindlichkeit werden Algen daher für die Testung von Chemikalien und Umweltproben in biologischen Testverfahren (z. B.: DIN 38412 L9 u. L33) verwendet. Das weitverbreitete Vorkommen, das schnelle Wachstum und die leichte Kultivierbarkeit machen Algen als Vertreter der Pflanzen zu einem geeigneten Werkzeug für Toxizitätstests [5]. Die anfängliche Auffassung, dass Toxizitätstests mit Algen im Gegensatz zu

Toxizitätstests mit Tieren oder Bakterien weniger empfindlich sind, musste revidiert werden. Inzwischen hat man herausgefunden, dass die Sensibilität verschiedener Pflanzen und Tiere substanz- und artspezifisch ist [6]. Aus diesem Grund sind Daten zur Phytotoxizität für die Umweltgefährdungsabschätzung unerlässlich.

Algentests beruhen meist auf der Erfassung der Photosyntheseleistung der Algen. Da es sich um einen zentralen Vorgang des pflanzlichen Zellstoffwechsels handelt, wirken sich Störungen durch Umweltgifte direkt auf den Zuwachs der Algenzellen aus. Als Indikator für eine toxische Wirkung bieten sich daher mehrere Möglichkeiten an: der Zellzuwachs, der Chlorophyllgehalt der Algenkulturen oder die Sauerstoffproduktion [7].

Der Algentest mit der einzelligen Alge *Desmodesmus subspicatus*<sup>1</sup> nach DIN 38412 Teil 9 und Teil 33 wird zur toxikologischen Bewertung von Wasser, Abwasser und Bodenproben sowie Chemikalien herangezogen. Im Chemikaliengesetz vom 25. Juli 1994 wird er zur Bewertung der aquatischen Toxizität für Stoffe gefordert, die in einer Menge über 100 t in die Staaten der EU eingeführt oder in ihnen hergestellt werden. Entsprechend wird er auch in der neuen „Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zum Wasserhaushaltsgesetz über die Einstufung wassergefährdender Stoffe in Wassergefährdungsklassen“ von 1999 („R-Satz-Konzept“) weiterhin berücksichtigt.

In den letzten Jahren hat zudem das Interesse an miniaturisierten Testsystemen, die Anwendung auf dem Gebiet der aquatischen Toxizitätsbestimmung finden, stark zugenommen [8]. In der Literatur finden sich, gemessen an den Vorteilen miniaturisierter Verfahren, die z. B. im Mikrotitrationsplattenformat und nicht im Schüttelkolben- oder Reagenzglasmaßstab durchgeführt werden, allerdings nur wenige Hinweise auf standardisierbare Testsysteme. Die Übertragung von Toxizitätstests auf den Mikrotitrationsplattenmaßstab konnte für einige bakterielle Testverfahren bereits aufgezeigt werden [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Miniaturisierte Testsysteme mit Algen sind hingegen so gut wie nicht bekannt. Das liegt u. a. daran, dass Algen im Gegensatz zu Bakterien eine längere Generationszeit besitzen und deshalb zur Messung von Wachstumshemmungen längere Inkubationszeiten benötigt werden. Durch eine längere Versuchszeit bei gleichzeitiger Beleuchtung ist es jedoch schwierig, die Verdunstung der Nährlösung in den Testansätzen, deren Gesamtvolumen in einer 96-Well-Mikrotitrationsplatte nur 200 µl beträgt, in Grenzen zu halten. Die Folge ist eine Aufkonzentrierung der Algen in den Testgefäßen. Technische Probleme bei der gleichmäßigen Belüftung und Durchmischung der Ansätze [16] wurden ebenso beschrieben wie Temperaturunterschiede zwischen den einzelnen Wells der Mikrotitrationsplatte [17].

Die Miniaturisierung und nachfolgende Automatisierung biologischer Testverfahren ermöglicht eine methodische Angleichung und Standardisierung

---

<sup>1</sup> Ehemals bezeichnet als *Scenedesmus subspicatus*

der Systeme. Die Vorteile liegen unter anderem in der Reduzierung des Chemikalien- und Probenmaterials, des zeitlichen Aufwandes (Erhöhung des Probenumsatzes), des Platzanspruches und der Kosten [18, 19]:

- Die methodische Angleichung unterschiedlicher Testverfahren ermöglicht eine Bewertung diverser Probengruppen mit einer begrenzten Zahl von Messgeräten und miteinander kompatiblen Datenaufnahme- und Auswertungsprogrammen. Dem hohen anfänglichen Investitionsaufwand steht unter anderem der hohe Probenumsatz entgegen. Die methodische Angleichung, Miniaturisierung und Automatisierung der Verfahren ermöglichen es insbesondere kleineren Untersuchungslabors, die Kosten für die Testung von Umweltproben erheblich zu reduzieren und mit wenigen Mitarbeitern ein breites Spektrum toxikologischer Untersuchungen durchzuführen.
- Eine Miniaturisierung und Automatisierung ist ideal für ein breites Screening von Umweltproben, ermöglicht aber auch eine wissenschaftliche fundierte Interpretation von Testergebnissen, die über die Angabe toxikologischer Kenndaten hinausgeht. Dies ist mit den derzeit verfügbaren Verfahren nur unter großem Aufwand möglich.
- Die höheren Zahlen an Parallel- und Kontrollansätzen verbessern die statistische Absicherung der Messergebnisse. Bei vielen Schüttelkolbenverfahren (z. B. dem Algentest) sind bislang Doppelbestimmungen üblich. Im Rahmen der Bewertung komplexer Umweltmedien und Ökosysteme, z. B. von Bodenproben ermöglicht allein die Testung von mehr Einzelproben pro Flächeneinheit zu bewertender Umweltmedien eine Reduktion von Standardabweichung und Varianz der Messdaten. Längere Verdünnungsfolgen, und damit die erhöhten Zahlen an Datenpunkten in bestimmten Hemmbereichen, sichern eine lineare Regression und den Einsatz mathematischer Auswertungsmodelle (z. B. der Probitanalyse) ab.
- Eine kinetische Datenaufnahme ermöglicht die Ergänzung der bislang üblichen Endpunktauswertung durch Integralanalyse. Sie lässt eine differenzierte Kurvendiskussion und Aussagen über antagonistische und synergetische Effekte von Inhaltsstoffen komplexer Proben zu. Die Erfassung spezifischer Hemmkurven erweitert das Verständnis toxikokinetischer und toxikodynamischer Zusammenhänge zwischen Organismus und Probe.
- Eine deutliche Reduktion des Testvolumens (vom Schüttelkolbenmaßstab auf Mikrotitrationsplattenmaßstab um den Faktor 500) ermöglicht die Bewertung kleinster Probenolumina. Entsprechend sinken die Kosten für Laborchemikalien und Entsorgung.
- Eine kinetische Datenaufnahme mit testbedingt definierten Messintervallen ermöglicht die Schachtelung einer Vielzahl von unabhängigen Einzeltests.

Die derzeit verfügbaren aquatischen Ökotoxizitätstests, Messgeräte und Datenaufnahmeprogramme entsprechen allerdings nur bedingt den Anforderungen, die die Fülle an Einsatzgebieten und die Vielzahl an Einzelproben fordern. Zusammenfassend ist festzustellen, dass bislang kein Messverfahren beschrie-

ben wurde, mit dem in Übereinstimmung mit den DIN-Normen der Algentest automatisiert in Mikrotitrationsplatten durchgeführt werden kann.

Zielsetzung bei diesem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projekts „Umweltschonendes, automatisches High-Throughput-Testing mit Algen“ war die Umsetzung der oben genannten Miniaturisierung und Automatisierung. Ein wichtiger Aspekt war dabei neben der Volumenreduzierung und der damit verbundenen Validierung des Testverfahrens vor allem die Entwicklung und der Aufbau der Testplattform. Dabei wurde von vornherein Wert darauf gelegt, dass die im Projekt zu gestaltende Plattform mit diversen Messgeräten und Robotikkomponenten schnell und einfach auch für andere biologische Testverfahren eingesetzt werden kann. Noch größere Flexibilität sollte an die Software-Architektur gestellt werden: Die Software zur Auswertung der anfallenden Daten wurde speziell an das jeweilige Testsystem angepasst, die Steuerungssoftware hingegen sollte unabhängig von der Anzahl und der Art (Kommunikations-Protokolle) der verschiedenen Geräte programmiert werden. Ziel war es, eine Client-Server-Architektur mit einer eigenen Skript-Sprache zu realisieren.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt:

In **Kapitel 2** werden Grundbegriffe der Ökotoxikologie sowie Grundlagen des Wachstumshemmtests erläutert.

In **Kapitel 3** werden Überlegungen zur Miniaturisierung angestellt. Ferner werden alle Methoden und Materialien zur Testdurchführung bei verschiedenen Ansatzgrößen vorgestellt.

**Kapitel 4** liefert einen Überblick über den experimentellen Aufbau des neu entwickelten Prototypen. Hierzu zählt auch die gesamte Software-Umgebung bestehend aus Steuerungs- und Auswertungs-Software.

Ausgesuchte Ergebnisse des neuen Testsystems im Vergleich mit anderen Testanordnungen werden schließlich in **Kapitel 5** vorgestellt. Hierbei steht die Validierung des neuen Systems im Vordergrund. Zusätzlich werden auch Resultate von ausgewählten Umweltproben sowie von Proben der Henkel KGaA betrachtet.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Robotikplattform werden in **Kapitel 6** vorgestellt. Hier kommen Genotoxizitätstests und andere Zellvermehrungshemmtests in Frage.

Aufgrund der erfolgreichen Umsetzung der geplanten Software-Architektur, wurde die neu entstandene Software „BioLane™ Supervisor“ während der Projektlaufzeit auch in anderen Forschungsprojekten eingesetzt. Zu diesem Zweck wird die Struktur der Software in **Kapitel 7** noch etwas genauer beleuchtet. Außerdem werden ausgewählte mit ihr realisierte technische Applikation vorgestellt.

In **Kapitel 8** wird eine Zusammenfassung über die bisher erreichten Ziele gegeben.

---

Im Anhang werden schließlich technische Details zu den Schnittstellen der eingesetzten Geräte, Grundlagen zur thermoelektrischen Kühlung (Peltier-Effekt) und zur Extensible Markup Language (XML) behandelt. Ferner sind die erstellten Konstruktionszeichnungen dort zu finden.



# Kapitel 2

## Biologische Grundlagen

### 2.1 Ökotoxikologie

Die Ökotoxikologie als multidisziplinäre Umweltwissenschaft untersucht primär die Wirkungen von Umweltchemikalien auf allen biologischen Ebenen, vom Molekül bis zum Ökosystem. Dies kann nicht losgelöst vom umweltchemischen Verhalten der Stoffe erfolgen. Dabei wird die Exposition an Umweltchemikalien eng mit deren Wirkung verknüpft. Das Auftreten von indirekten Wirkungen, die sich aus ökologischen Wechselwirkungen ergeben, ist ein Unterscheidungsmerkmal zur Toxikologie [20].

#### 2.1.1 Ökotoxikologische Untersuchungsmethoden

Obwohl Wirkungen von Umweltchemikalien auf allen biologischen Ebenen auftreten, sind Untersuchungen auf der Ebene des einzelnen Organismus von zentraler Bedeutung. Auf dieser Ebene lassen sich die toxikologischen Wirkungen mit standardisierten Methoden erforschen und interpretieren. Stellvertretend für die Organismen eines Ökosystems werden wenige typische Vertreter (Bioindikatoren) untersucht. Anforderungen, die an Testorganismen gestellt werden, sind deren leichte Haltung und Anzucht im Labor, ubiquitäre Verbreitung in den betrachteten Ökosystemen, zentrale ökologische Bedeutung und eine hohe bis mittlere Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von Proben.

Ziel und Nutzen dieser Toxizitätstests mit Bioindikatoren sind unter anderem:

- Erfassung, Charakterisierung und Bewertung der Ökotoxizität von einzelnen Chemikalien, Chemikaliengemischen und Umweltproben
- Definition von Gefährdungsklassen für die Umwelt
- Basis für die Risikocharakterisierung und Risikoanalyse zur Chemikalienbewertung

## 2.1.2 Prinzipien der Ökotoxikologie

Im Folgenden sollen die grundlegenden Konzepte und Begriffe der Toxikologie und Ökotoxikologie besprochen werden.

- *Toxizität*

Toxizität ist die Giftwirkung einer Substanz, gemessen am Grad der Schädigung des Organismus. Die Ökotoxizität schließt auch die Folgen von Umweltchemikalien auf Population, Gemeinschaften und Ökosysteme mit ein.

Toxische Wirkungen sind die Folge von komplexen Vorgängen, in denen der Fremdstoff Wechselwirkungen mit dem Organismus eingeht [21].

- *Wirkungsarten*

Man unterscheidet prinzipiell zwei Wirkungsarten: Chronische und akute Toxizität. Unter akuter Toxizität versteht man die Schädigung, die aus einer einmaligen Einwirkung eines Stoffes resultiert. Chronische Toxizität ist dagegen die nichtletale Schädigung, die aus einer andauernden Exposition mit einem Stoff entsteht [22].

- *Dosis und Konzentration*

Dosis steht in der Toxikologie als Synonym für die Konzentration. Die Konzentration eines gelösten Stoffes ist der Quotient aus der Stoffmenge der gelösten Stoffportion und dem Volumen der Lösung [23].

Bei der ökotoxikologischen Betrachtung von aquatischen Systemen ist eine Definition der Dosis beziehungsweise der Konzentration schwieriger, da die Testsubstanz im Medium verabreicht wird. Um die tatsächliche Konzentration der Testsubstanz im Organismus zu ermitteln, wäre eine chemisch-analytische Untersuchung des Organismus notwendig [24].

Die Bezeichnung „Konzentration“ gibt nachfolgend die Konzentration des Toxins in der Umwelt beziehungsweise im Medium an.

- *Dosis-Wirkungs-Beziehungen*

Alle toxischen Wirkungen von Chemikalien sind nicht nur von deren spezifischen Eigenschaften, sondern auch von der Dosis beziehungsweise der Konzentration des Stoffes abhängig. Für die quantitative Erfassung der Wirkung eines Stoffes dient die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Stoffen beschreiben den Zusammenhang zwischen aufgenommener Dosis beziehungsweise Konzentration des Toxins im Medium und dem Ausmaß der toxischen Wirkung. Dabei wird die prozentuale Häufigkeit einer Wirkung bei einem Organismus beziehungsweise einer Population gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Aus dieser Beziehung lassen sich über statistische Methoden verschiedene toxikologische Richtgrößen ermitteln.

- *Rezeptortheorie*

Die Rezeptortheorie ist die molekulare Grundlage der Dosis-Wirkungs-

Beziehung. Die molekularen Wechselwirkungen in der toxikodynamischen Phase beruhen auf Bindungen des Fremdstoffs an Makromoleküle (Rezeptoren) des Organismus. Die Besetzung dieser Rezeptoren bewirkt Veränderungen in physiologischen Regelmechanismen der betroffenen Zelle [22]. Schlussfolgerung der Rezeptortheorie ist, dass die Konzentration des Stoffes am Rezeptor proportional zur aufgenommenen Konzentration ist.

- *Effektive Konzentration*

Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke eines Toxins wird unter anderem die effektive Konzentration verwendet. Die effektive Konzentration  $EC_x$  ist diejenige Konzentration bei der x Prozent der Testorganismen den betrachteten Effekt zeigen. Üblicherweise gibt man die effektive Konzentration für 20 %, 50 % und 80 % Effekt an ( $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{80}$ ). Die effektive Konzentration ist nicht die Konzentration am Rezeptor der Zelle, sondern die Konzentration in der Umwelt beziehungsweise dem Medium, welche proportional zur Konzentration am Rezeptor ist.

In Testsystemen bei denen eine Verdünnung der Toxinkonzentration im Testansatz stattfindet, wird aus der eingesetzten Toxinkonzentration die effektive Konzentration bestimmt.

- *Wirkungsstärke eines Toxins*

Die Wirkungsstärke eines Toxins, also die Empfindlichkeit des Organismus gegenüber einem Toxin, lässt sich nicht allein durch die Angabe eines  $EC_x$ -Wertes ermitteln. Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke benötigt man ebenso die Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Je steiler die Kurve, desto empfindlicher reagiert der Organismus auf Veränderungen der Toxinkonzentration [20].

### **2.1.3 Risikocharakterisierung und statistische Absicherung**

Die Abschätzung des Umweltrisikos von Chemikalien und deren Bewertung gewinnt zunehmend an Bedeutung im praktischen Umweltschutz und in der Umwelthaftung.

Bisher unterliegen nur neue chemische Stoffe einem Anmeldeverfahren. Eine Vermarktung eines Stoffes mit mehr als 10 Kilogramm jährlich erfordert ein Anmeldeverfahren bei der zuständigen Behörde anmelden. Ab 1 Jahrestonne muss einen Grunddatensatz übermitteln werden, der eine erste Beurteilung von Umwelt- und Gesundheitsgefahren ermöglicht. Ab einer Vermarktungsmenge von mehr als 100 Tonnen pro Jahr sind Untersuchungen erforderlich, die auch eine Beurteilung von langfristig schädigenden Wirkungen wie krebserzeugend oder erbgutschädigend ermöglichen.

Die Bewertung der Gefährlichkeit eines Stoffes für die Gesamtheit der in einer Lebensgemeinschaft vorkommenden Organismen ist aufgrund der wenigen verfügbaren Toxizitätsdaten nur schwer möglich. Weitere Probleme sind die Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit, die Verschiedenheit von akuten und

chronischen Wirkungen, sowie die Unterschiede zwischen der Empfindlichkeit einer Laborspezies und derjenigen von ganzen Lebensgemeinschaften.

Um diese Unterschiede in der Wirkungsanalyse und der Risikobeurteilung einzubeziehen, werden Extrapolationsfaktoren verwendet. Hierzu wird eine „predicted no effect concentration“ (PNEC) und eine „predicted environmental concentration“ (PEC) ermittelt. Bei der PNEC handelt es sich um eine sogenannte „unschädliche“ Konzentration, während die PEC die tatsächliche oder prognostizierte Konzentration einer Chemikalie, die in der Umwelt des betrachteten Organismus beziehungsweise der betrachteten Population vorhanden ist [20]. PEC und PNEC ergeben sich aus

$$PNEC = \frac{\textit{niedrigste Wirkkonzentration im Organismus}}{\textit{Sicherheitsfaktor}} \quad (2.1)$$

bzw.

$$PEC = \frac{\textit{tatsächlich gefundene Umweltkonzentration}}{\textit{Sicherheitsfaktor}} \quad (2.2)$$

Die Sicherheitsfaktoren werden dabei von der Organisation for Economic Co-operation an Development (OECD) und der Europäischen Union (EU) sowie dem European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECE-TOC) vorgegeben. Ergibt sich bei der Division von PEC durch PNEC ein Wert, der größer als eins ist, so muss eine Risikoanalyse erfolgen.

Einer der Hauptpfeiler der Risikoanalyse ist die Gefährlichkeitsabschätzung oder Risikocharakterisierung. Die Risikocharakterisierung basiert auf den Ergebnissen der Grundlagenforschung, sowie denen der angewandten, risikoorientierten Forschung. Bei der Risikocharakterisierung eines Stoffes spielt die quantitative Risikoabschätzung, also die Ermittlung von Richtgrößen wie dem  $EC_x$ -Wert, aus der Dosis-Wirkungs-Beziehung eine große Rolle (Abbildung 2.1).

In der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments („Biozidgesetz“) wird die Risikocharakterisierung einer Chemikalie durch vier Schritte realisiert [25]:

- i) Gefahrenidentifizierung: Ermittlung und Festlegung der durch die Freisetzung einer Chemikalie gefährdeten Organismen und Ökosysteme.
- ii) Effektabschätzung: Abschätzung von Konzentrationen, die keine nachteiligen Effekte bei den in der Gefahrenidentifizierung festgelegten Organismen beziehungsweise Ökosystemen hervorrufen.
- iii) Belastungsabschätzung: Berechnung von Dosen beziehungsweise Konzentrationen und damit der Belastungen durch anthropogene Stoffe.
- iv) Risikoabschätzung: Bestimmung des Risikos für die als potentiell gefährdet identifizierten Organismen und Ökosysteme auf der Grundlage eines Vergleichs der Ergebnisse der Effekt- und der Belastungsabschätzung.

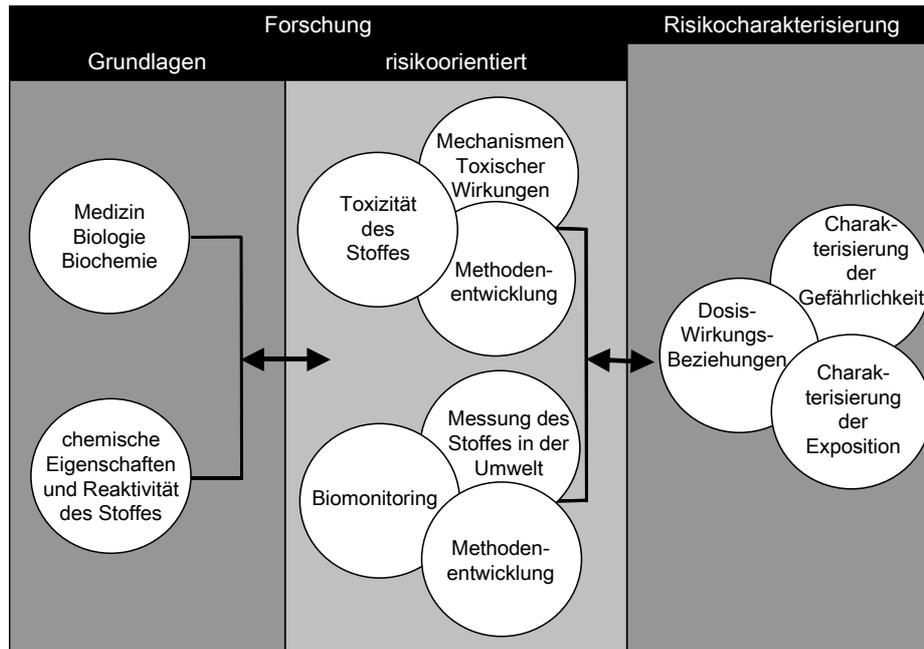


Abbildung 2.1: Bestandteile der toxikologischen Risikocharakterisierung.

Eine möglichst exakte Bestimmung der effektiven Konzentration ist also wichtig, um Fehleinschätzungen dieser Richtgröße, die sowohl umweltgefährdende, gesundheitliche als auch finanzielle Auswirkungen haben können, zu vermeiden.

Um standardisierte und reproduzierbare Informationen über den Ausgang einer Untersuchung zu erhalten, ist es notwendig, die erhaltenen Messwerte auf statistische Modelle zu übertragen und diese innerhalb dieser Modelle mathematisch abzusichern.

Die Ermittlung von  $EC_x$ -Werten basiert auf der Erhebung toxikologischer Daten, wie der prozentualen Wachstumshemmung, und anschließender Anwendung dieser Daten in mathematischen Modellen.

Während die Ermittlung hoher toxischer Effekte wenig problematisch ist, stellt diese bei geringen toxischen Effekten ( $< 10\%$ ) aufgrund der starken Abhängigkeit vom statistischen Modell ein Hauptproblem dar [26].

Die mathematischen Modelle gehen von der Funktion  $y = f(x, \beta)$  aus, wobei  $y$  der Effekt,  $x$  die Konzentration und  $\beta$  ein Regressionsparameter ist.  $\beta$  kann jedoch nicht exakt bestimmt werden. Ziel mathematischer Modelle ist es,  $\beta$  zu ermitteln. Es gibt jedoch keine universelle Methode, die alle möglichen Datensituationen beschreibt.

Die in der Ökotoxikologie üblichen Methoden beruhen alle auf der Annahme bestimmter Verteilungen. Die Probitanalyse basiert auf der Normalverteilung, während die Logitanalyse auf einer Logistischen Verteilung und die Weibitanalyse auf einer Weibit Verteilung beruhen (siehe Abschnitt 3.3.2).

## 2.2 Algen als Bioindikator für aquatische Testsysteme

Mögliche toxische Wirkungen von Stoffen manifestieren sich in der Regel selektiv auf einzelne Organismengruppen. Deshalb werden vier Organismengruppen unterschiedlicher Trophieebenen (Abbildung 2.2) als Standard-Testorganismen betrachtet, die zugleich ökosystematische Funktionen repräsentieren [27]:

- Bakterien (zum Beispiel: *Pseudomonas putida*)
- Grünalgen (zum Beispiel: *Desmodesmus subspicatus*)
- Krebstiere (zum Beispiel: *Daphnia magna*)
- Fische (zum Beispiel: *Leuciscus idus*)

Algen stehen in der aquatischen Nahrungskette als Primärproduzenten an erster Stelle, gefolgt von den Bakterien über die Krebstiere bis zu den Fischen (Abbildung 2.2).

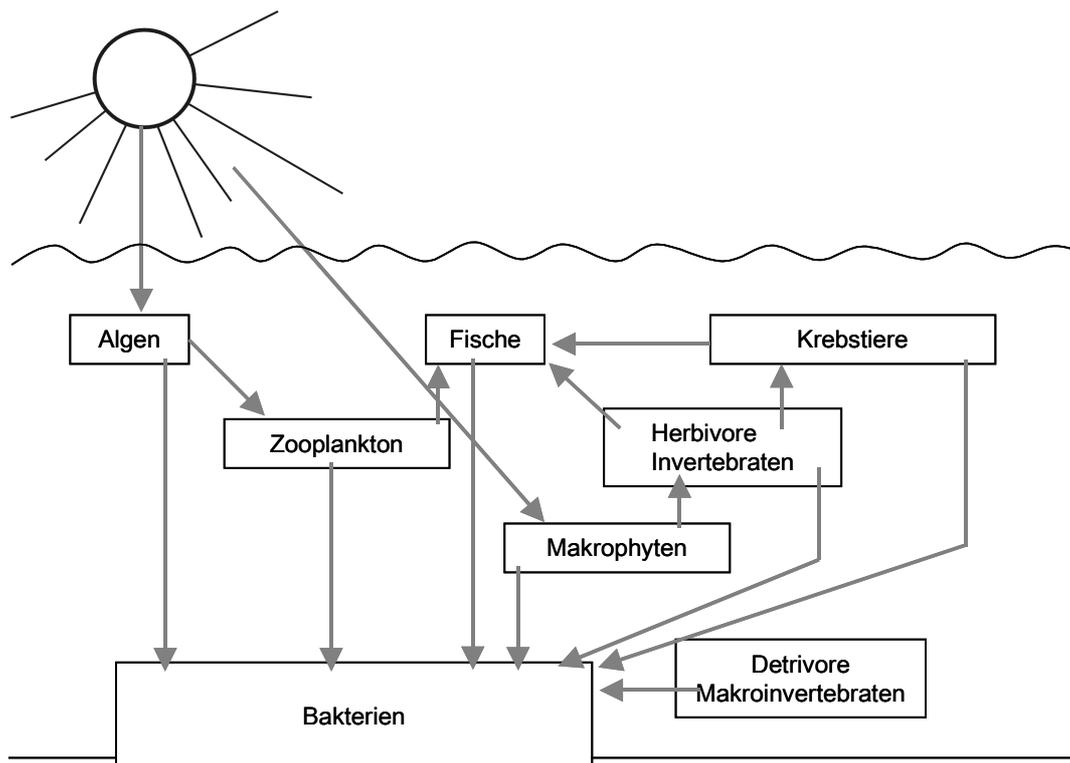


Abbildung 2.2: Trophiestufen im aquatischen Ökosystem.

Grünalgen spielen als Primärproduzenten eine wichtige Rolle im aquatischen Ökosystem. Das Wachstum dieser Algen stellt einen guten Parameter für die Erfassung toxischer Wirkungen dar, da die Photosynthesereaktion eine spezifische Leistung des pflanzlichen Stoffwechsels ist [28]. Störungen des Zu-

wachses der Zellen gehen mit einer leicht quantifizierbaren Minderung der photosynthetischen Leistung einher. Diese Minderung der photosynthetischen Leistung ist eine Reaktion aller photosynthetisch aktiven Zellen. Chlorophyll *a* besitzt im Tetrapyrrolring zehn delokalisierte Doppelbindungen in zwei Resonanzformen (Abbildung 2.3) [28].

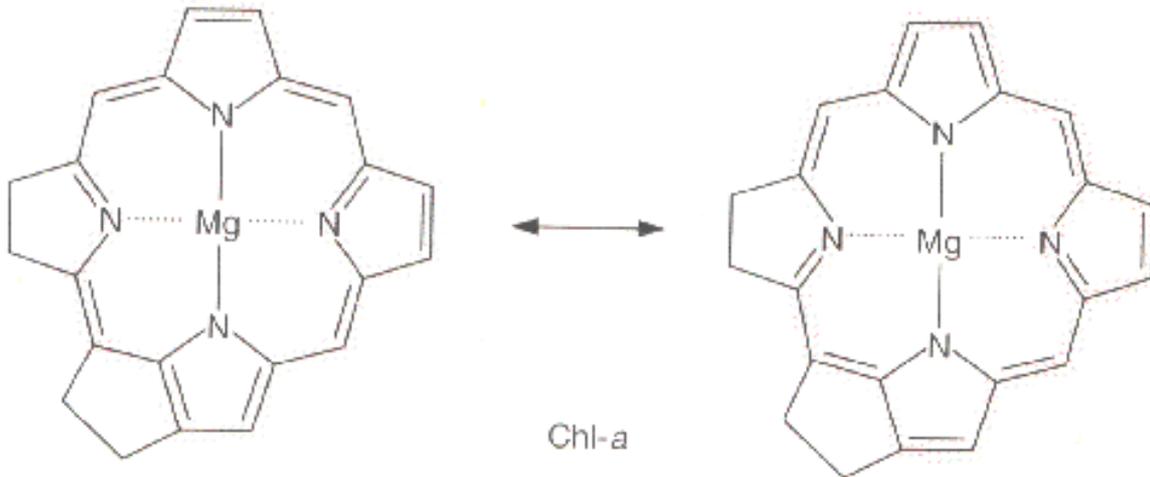


Abbildung 2.3: Resonanzstrukturen von Chlorophyll *a* (Chl *a*).

Nach Anregung durch Photonen kann ein Elektron dieses konjugierten Systems in höhere Orbitale angehoben werden. Bei der Rückkehr von diesem ersten Singulettzustand in den Grundzustand laufen verschiedene Prozesse ab (Abbildung 2.4).

Als wichtigster Prozess ist die chemische Arbeit zu nennen, bei der die Energie über eine Elektronentransportkette auf Adenosin-5'-triphosphat (ATP) übertragen wird. Daneben wird ein Teil der Energie auch als Fluoreszenz abgegeben. Die Quantifizierung dieser In-vivo-Fluoreszenz ist leicht möglich und lässt einen Rückschluss auf die Menge der vorhandenen Chlorophyll *a* Moleküle zu.

Das Wachstum der Algenpopulation lässt sich anhand der Messung der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgen.

Da die Toxinwirkungen organismenspezifisch sind [27], wurden Standardtestorganismen festgelegt. Die DIN 38412 L33 und die DIN 38412 L9 schreiben als Testorganismen die einzelligen Algen *Selenastrum capricornutum* und *Desmodesmus subspicatus* vor. Die Alge *Desmodesmus subspicatus* der Ordnung Chlorococcales (Chlorophyta, Chlorophyceae) ist ein Stellvertreter für Primärproduzenten im Plankton des Süßwassers, welche leicht kultivierbar ist und eine kurze Generationszeit besitzt.

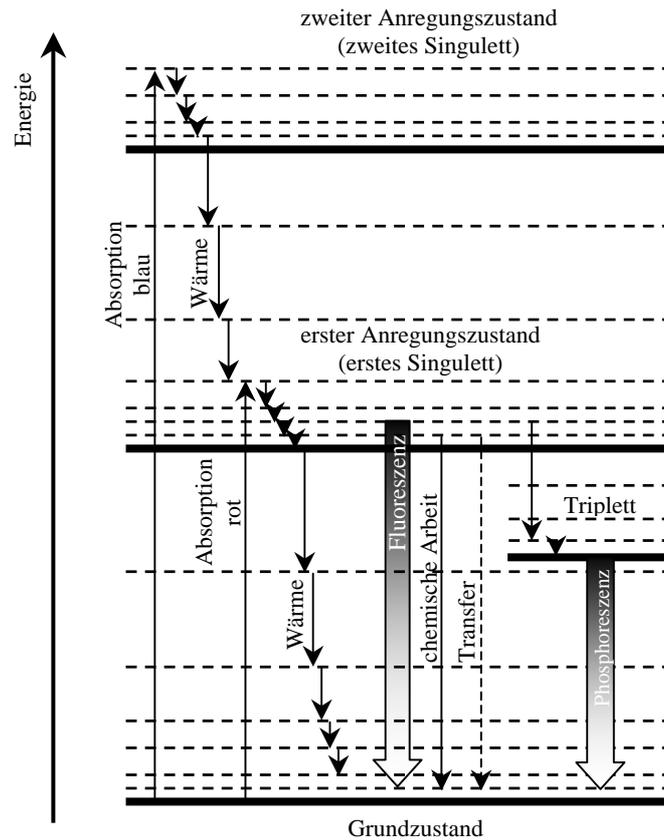


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Anregungszustände und Übergänge von Chlorophyll *a*.

## 2.3 Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*

Der *Desmodesmus subspicatus*-Wachstumshemmtest wird unter Einhaltung der DIN 38412 L33 und der DIN 38412 L9 (identisch mit DIN EN 28692 und ISO 8692) durchgeführt [29, 30].

Die Algen werden unter Aufschütteln, Rühren oder Drehen bei Dauerlicht und 23°C über drei Tage inkubiert. Das Inokulum für die Testansätze muss während der exponentiellen Phase des Wachstums aus der Vorkultur entnommen werden.

Die Testansätze werden mit verschiedenen definierten Toxinkonzentrationen beschickt. Es erfolgt dann die Messung der Biomasse zu verschiedenen Zeitpunkten, mindestens zum Beginn und zum Ende der Messung. Als Biomasse der Algen können Zellzahl, Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz, ATP-Konzentration und ähnliche Parameter verwendet werden [27]. In dieser Arbeit wird die Zellzahl über die in-vivo-Chlorophyll-Fluoreszenz quantifiziert. Die Wachstumshem-

mung wird gemessen als Verminderung des Wachstums beziehungsweise der Wachstumsrate im Verhältnis zu einer unter identischen Bedingungen inkubierten Wachstumskontrolle. Die Auswertung erfolgt alternativ über drei verschiedene Methoden zur Hemmwertberechnung (Endpunktmethode, Wachstumsraten- und Biomasseintegralmethode) und anschließender Regressionsanalyse (Probitanalyse).

Die Testdauer von 72 h beinhaltet verschiedene Generationen von Algen (Wachstumsrate von *Desmodesmus subspicatus*: 1,2 - 2 d<sup>-1</sup> [31], entsprechend einem Vermehrungsfaktor 12 bis 64), und die Exposition mit dem Toxin ist auch nicht kurzfristig. Der Wachstumshemmtest ist also laut Definition ein chronischer Toxizitätstest. Für die Anwendung bei der Chemikalienrisikoanalyse wird der Wachstumshemmtest allerdings als akuter Test betrachtet [32] und somit eine Berechnung des EC<sub>x</sub>-Wertes ermöglicht.

Aus statistischer Sicht haben Versuche mit biologischen Systemen, wie mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus*, den Charakter von Zufallsereignissen. Diese Zufallsabhängigkeit begründet sich durch die Kombination folgender variabler Einflussfaktoren: biologische Reaktionsnorm, stichprobenhafte Untersuchung, umweltbedingte Faktorenkombination, technisch bedingte Unzulänglichkeiten und zufällige Messfehler.

Dadurch bedingt ergeben sich hohe Anforderungen an die zur Ermittlung von EC<sub>x</sub>-Werten genutzten statistischen Modelle. Eines der genutzten Modelle ist die unter Kapitel 3.3.2.1 vorgestellte Probit-Analyse.

Der schematische Ablauf der angewendeten statistischen Methoden zur Ermittlung von EC<sub>x</sub>-Werten, der Konfidenzintervallen und Steigungen der Dosis-Wirkungskurve ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

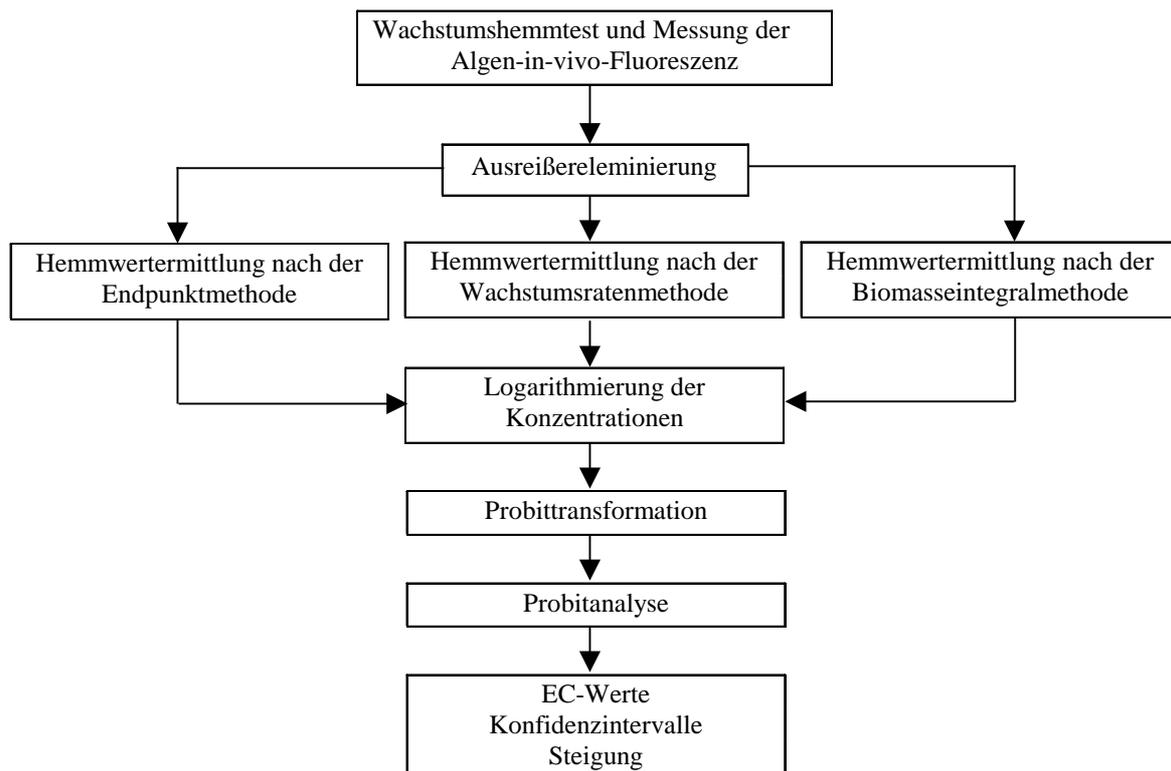


Abbildung 2.5: Schematischer Ablauf des Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* zur Ermittlung von  $EC_x$ -Werten, deren Konfidenzintervallen und Steigungen der Dosis-Wirkungskurve.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Miniaturisierung des Testsystems

Eine Miniaturisierung des Algentests auf kleinere Ansatzvolumina ist grundsätzlich möglich, da die Auswertungsparameter (Zellkonzentration bzw. Chlorophyll-Fluoreszenz) Volumen-unabhängige Größen darstellen. Die Fluoreszenzmessung, die in der DIN 38412 L33 explizit vorgeschrieben ist und in der DIN 38412 L9 als Maß für die Zelldichte optional zugelassen wird, kann zudem bei Wahl geeigneter Kulturgefäße (Mikrotitrationsplatten) direkt im Testansatz vorgenommen werden, so dass die Probenahme zur Messung entfallen kann.

Erste Ansätze zur Miniaturisierung des Testsystems kommen bereits aus den 80er und 90er Jahren [33, 34, 35]. 1997 führten Rojickova et al. [36] systematische Vergleichsuntersuchungen mit 20 verschiedenen Substanzen durch und fanden bereits eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

Am vielversprechendsten erscheint eine Durchführung des Tests in Mikrotitrationsplatten (siehe Abbildung 3.1) in Kombination mit fluorimetrischer Messung. Das Prinzip des miniaturisierten Algentests ist bereits beschrieben und patentiert [37, 38].

In dieser Arbeit wird der *Desmodesmus subspicatus*-Zellvermehrungshemmtest in Übereinstimmung mit den Standards unter Beibehaltung der Gültigkeitskriterien vom Erlenmeyerkolbenmaßstab (100 ml Ansatzvolumen) auf 24-Well-Mikrotitrationsplatten (2 ml Ansatzvolumen) und letztendlich auf 96-Well-Mikrotitrationsplatten (200 µl Ansatzvolumen) übertragen. Die Validierung des miniaturisierten Testverfahrens und seine Übereinstimmung mit den Standards soll durch vergleichende parallele Messungen von Referenztoxinen belegt werden. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel 5 vorgestellt.

Die Verwendung von Mikrotitrationsplatten ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Integration in den automatisierten biotechnologischen Arbeitsprozess.

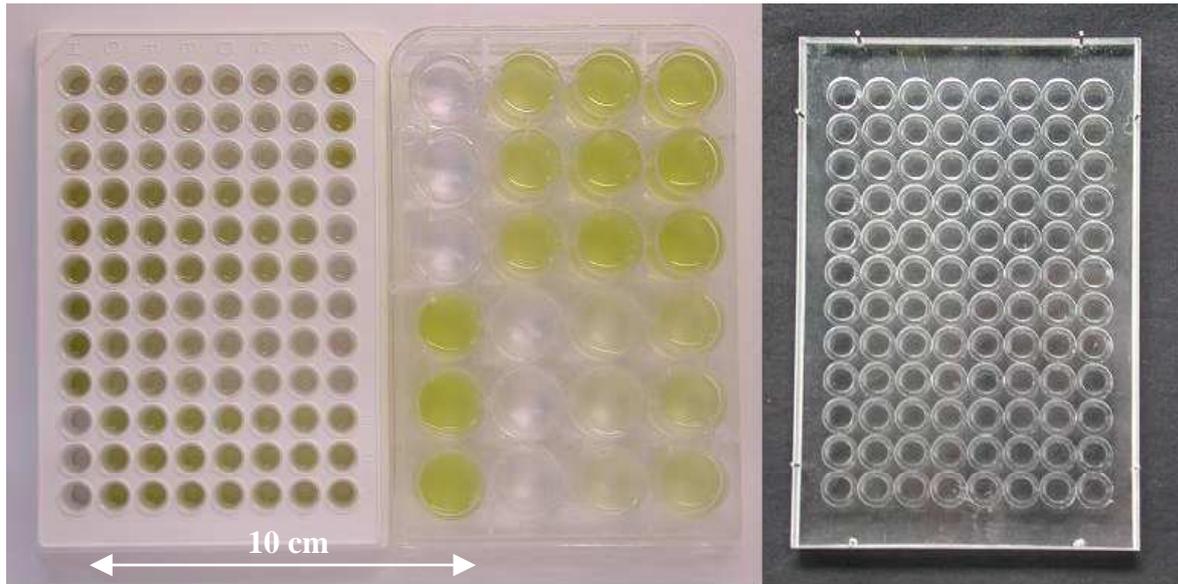


Abbildung 3.1: 96-Well-Mikrotitrationsplatte (links), 24-Well-Mikrotitrationsplatte (Mitte) und speziell angefertigter Deckel zur Reduzierung von Verdunstungsverlusten (rechts).

## 3.2 Testdurchführung

### 3.2.1 Herstellung der Nährmedien

#### 3.2.1.1 Flüssiges Nährmedium

Das in der DIN-Vorschrift [29] vorgeschlagene Nährmedium für die Testansätze, Vorkulturen und Stammkulturhaltung setzt sich aus den Bestandteilen der Tabelle 3.1 zusammen. Dabei werden drei Stammlösungen (Nährsalz-, Eisen-Komplex- und Spurenelement-Lösung) unterschieden.

Alle Lösungen werden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Weiterhin wird eine 3%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung hergestellt, die durch Filtration (Minisart<sup>®</sup>-Fliter, 0,2  $\mu\text{m}$  Porenweite, Sartorius) sterilisiert wird. Diese Lösung muss alle drei Wochen neu angesetzt werden, da sich bei Luftkontakt ein Gleichgewicht zwischen Lösung und umgebender Luft einstellt und  $\text{CO}_2$  aus der Lösung ausgast. (Von dem in der DIN 38412 L33 vorgeschlagenen Auflösen des festen Natriumhydrogencarbonates wird aufgrund der teilweise nur sehr kleinen Volumina der Nährlösung und der erhöhten Gefahr der Kontaminierung abgewichen.)

Aus diesen Stammlösungen werden die Nährmedien unter sterilen Bedingungen nach Tabelle 3.2 hergestellt.

*Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Stammlösungen für den Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* nach DIN 38412, L 33 [g/l].*

Chemikalie	Lösung I (Nährsalz)	Lösung II (Eisen-Komplex)	Lösung III (Spurenelemente)
NH <sub>4</sub> Cl	1,5		
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,2		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,8		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16		
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0,08	
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O		0,1	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			0,185
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			0,415
ZnCl <sub>2</sub>			0,003*)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O			0,0015*)
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O			0,00001 *)
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O			0,007*)

\*) Ansatz dieser Lösungen erfolgt über einen zusätzlichen Verdünnungsschritt

*Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Nährmedien aus den Stammlösungen für den Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*.*

	Lösung I	Lösung II	Lösung III	NaHCO <sub>3</sub> -Lsg. (3 %ig)
Medium für Stammkultur (flüssig)	100 ml/l	10 ml/l	1 ml/l	10 ml/l
10fach konzentriertes Medium	100 ml/l	10 ml/l	10 ml/l	100 ml/l

Die Medien werden mit Hilfe eines Magnetrührstabes mindestens 30 min gerührt. Dadurch stellt sich das Gleichgewicht der in der Flüssigkeit gelösten Gase und der pH-Wert ein. Dieser sollte anschließend etwa  $8,2 \pm 0,2$  betragen. Bei kleineren Abweichungen wird der pH-Wert mit 1 M NaOH<sub>aq</sub> oder 1 M HCl<sub>aq</sub> eingestellt. Bei stärkeren Abweichungen sollte die Medienzusammensetzung überprüft werden.

### 3.2.1.2 Festes Nährmedium

Zusätzlich zur Flüssigkultur werden die Algen auf Schrägagarröhrchen gehalten, von denen im Rhythmus von zwei Monaten jeweils ein Neues angeimpft wird.

Das Nährmedium setzt sich aus den Bestandteilen der Tabelle 3.3 zusammen, wobei zwischen fünf verschiedenen Stammlösungen unterschieden wird. Der benötigte Bodenextrakt wird folgendermaßen hergestellt: Es wird Garten- oder Waldboden mit geringem Humusgehalt verwendet, der wenig Lehm enthält und frei von Pflanzenschutzmitteln bzw. Düngemitteln ist. Eine 2 l Duranglasflasche wird zu einem Drittel mit Boden befüllt. Man gibt soviel  $H_2O_{\text{bidest}}$  zu, dass die Flasche bis 5 cm über dem Boden befüllt ist. Es wird zweimal im Abstand von 24 h mit Dampf sterilisiert und die erhaltene Lösung anschließend zentrifugiert. Der Überstand der Lösung wird zu 30 ml portioniert, 20 min bei 121°C autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Das Nährmedium wird darauf nach den Verhältnissen aus Tabelle 3.4 hergestellt. Anschließend wird es 15 min bei 121 °C autoklaviert, je 10 ml werden in Reagenzröhrchen abgefüllt. Dann folgt erneutes Autoklavieren und man erhält letztendlich festen Schrägagar. Diesem Medium wird im Gegensatz zum Flüssigansatz keine C-Quelle zugesetzt, da die Algen in diesem Fall das  $CO_2$  ausschließlich aus der Luft entnehmen.

*Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Stammlösungen für die Kulturhaltung von *Desmodesmus subspicatus* [Göttingen, Sammlung von Algenkulturen; <http://www.gwdg.de/~epsag/Web/index.htm>] [g/l].*

Chemikalie	Lösung I	Lösung II	Lösung III	Lösung IV	Lösung V
$KNO_3$	10				
$K_2HPO_4$		1			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$			1		
Bodenextrakt				s. Text	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$					1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$					1
$H_3BO_3$					2
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$					0,2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$					0,2
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$					0,005
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$					7*)
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$					4*)

\*) Diese Komponenten werden in einer separaten Lösung hergestellt, autoklaviert und unter sterilen Bedingungen zu den anderen Bestandteilen von Lösung V zugegeben.

Tabell 3.4: Zusammenstellung des Mediums aus den Stammlösungen und dem Agar-Agar für die Stammkulturhaltung von *Desmodesmus subspicatus* auf festem Nährmedium [Sammlung von Algenkulturen, Göttingen; <http://www.gwdg.de/~epsag/Web/index.htm>].

Lösung I	Lösung II	Lösung III	Lösung IV	Lösung V	Agar-Agar
20 ml/l	20 ml/l	20 ml/l	30 ml/l	5 ml/l	15 g/l

### 3.2.2 Kultivierung

Die Kultivierung der Testalge *Desmodesmus subspicatus* wird gemäß der DIN-Vorschrift [29] durchgeführt. Die Stammkultur wird jede Woche in frisches Medium überimpft. Für die Kulturhaltung werden sterile 250-ml-Enghals-Erlenmeyerkolben verwendet, die mit Biosilkstopfen verschlossen sind. In 100 ml des frischen Nährmediums werden 1 ml der 7 Tage alten Stammkultur überführt. Alle drei Monate werden neue Stammkulturen durch Beimpfen des Mediums mit Algen aus einer Schrägagarröhrchenkultur gewonnen.

Im Abstand von acht Wochen werden die Stammkulturen auf eine mögliche Bakterienkontamination überprüft. Dazu werden 0,1 mL der alten Stammkultur auf R2A-Agar (Difco, Art.-Nr. 1826-17-1) ausgespatelt und bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. Ist nach ca. 5 bis 10 Tagen keine Kolonie auf den Agarplatten gewachsen, wird angenommen, dass die Algensuspension bakterienfrei ist.

Drei Tage vor Beginn eines Tests wird die Anzucht des Impfmateri als vorbereitet, damit sich die Algen beim Einsatz in den Test in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Zu diesem Zweck wird die Zellzahl der Stammkultur mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer bestimmt. Die Kammer wird mit der Algensuspension befüllt. Es werden 6 Zentralquadrate bestehend aus je 16 Gruppenquadraten ausgezählt. Die Neubauer-Zählkammer ist 0,1 mm tief, und ein Gruppenquadrat hat eine Seitenlänge von 0,2 mm, d. h. eine Fläche von 0,04 mm<sup>2</sup>. Das Volumen eines Gruppenquadrates beträgt also 4·10<sup>-6</sup> ml.

Die Formel für die Berechnung der Algendichte lautet daher wie folgt:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\sum Z_Z}{n_Z \cdot n_G \cdot V_G} \quad (3.1)$$

- $Z_Z$ : Zellzahl in den Zentralquadraten
- $n_Z$ : Anzahl der Zentralquadrate
- $n_G$ : Anzahl der Gruppenquadrate pro Zentralquadrat
- $V_G$ : Volumen eines Gruppenquadrates

Die Stammkulturen (beim Ansetzen von Vorkulturen) bzw. Vorkulturen (zum Einsatz in den Test) werden mit Millipore®-Wasser auf eine Algendichte von  $10^5$  Zellen/ml verdünnt.

Die Vorkulturen werden in sterilen 250 ml Erlenmeyer-Kolben, die mit sterilen Wattestopfen verschlossen werden, wie folgt angesetzt:

- 10 ml 10fach konzentriertes Nährmedium (siehe Kapitel 3.2.1.1)
- 80 ml steriles Millipore®-Wasser
- 10 ml Algeninokulum aus einer Stammkultur mit  $10^5$  Zellen/ml

Alternativ zu den 10 ml ausgezählte Algensuspension können erfahrungsgemäß 0,8 - 1,0 ml einer ca. 1 Woche alten Stammkultur zugegeben werden. Die Millipore - Menge muss dann entsprechend auf 90 ml erhöht werden, um auf ein Gesamtvolumen von 100 ml zu kommen.

Die Inkubationsbedingungen der Vorkultur sollen denen der späteren Testansätze entsprechen, d. h. die Ansätze werden 3 Tage bei 23 °C, unter Dauerbeleuchtung bei einer vorgegebenen Raumbestrahlungsstärke von 60 bis  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Die Schüttelfrequenz ist im Wechsel auf 50 min bei 100 rpm und 10 min bei 130 rpm eingestellt.

### 3.2.3 Testansatz

Als Testansatz bezeichnen wir eine Mischung aus Wasser, Nährstoffmedium, Algenkultur und der zu untersuchen Probe (z. B. Abwasser). Es werden Testansätze unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Dabei sollen die Verdünnungsstufen so gewählt werden, dass man Zwischenwerte im Bereich von 10 % bis 90 % Hemmung des Wachstums erhält. Ein angemessener Konzentrationsbereich kann u.U. in einem Vortest ermittelt werden, bei dem mehrere Größenordnungen von Testkonzentrationen geprüft werden.

Zusätzlich werden bei jedem Algentest sogenannte Blindwerte (Wasser und Nährmedium) sowie Wachstumskontrollen (Wasser, Nährmedium und Algenkultur) mitgeführt.

Die DIN-Vorschriften verlangen zudem jeweils mindestens 3 Parallelen der Testansätze sowie 6 Parallelen der Kontrollansätze.

Die Volumina der einzelnen Ansatztypen setzen sich nach Tabelle 3.5 zusammen.

*Tabelle 3.5: Allgemeine Zusammensetzung von Algenkultur, Nährmedium, Wasser und Probe im Algentest.*

Ansatztyp	Algenkultur	Nährmedium	Wasser	Probe
Testansatz	10 Vol. %	10 Vol. %	80 Vol. % – Probenvol.	80 Vol. % – Wasservol.
Wachstumskontrolle	10 Vol. %	10 Vol. %	80 Vol. %	
Blindwert		10 Vol. %	90 Vol. %	

Darin sind alle Größenangaben auf das Gesamtvolumen der Ansatzgröße (Erlenmeyerkolben: 100 ml; 24-Well-Platte: 2 ml; 96-Well-Platte: 200  $\mu$ l) bezogen. Die Summe aus Proben- und Wasser-Volumen (Verdünnungsstufe) ergibt in allen Fällen 80 % des Ansatzvolumens.

### 3.2.3.1 Erlenmeyerkolben-Maßstab

Im Erlenmeyerkolben beträgt die Ansatzgröße 100 ml. Der Testansatz setzt sich somit aus 10 ml Algenkultur, 10 ml Nährmedium und 80 ml verdünnter Probe zusammen.

Bei sechs Kontrollansätzen, einem Blindwert, drei Parallelen für jede Verdünnungsstufe und üblichen fünf bis acht Verdünnungsstufen, werden pro Test 22 bis 31 Erlenmeyerkolben eingesetzt.

### 3.2.3.2 24-Well-Mikrotitrationsplatten-Maßstab

Es werden 24-Well-Platten mit 2 ml-Wells (24-Well-Gewebekulturplatten, Best.-Nr. 662102, Greiner GmbH, Solingen) verwendet. Es handelt sich um einzeln steril verpackte Mikrotitrationsplatten mit Deckel. Die Deckel sind mit Kondensationsringen ausgestattet, die verhindern, dass zuviel Flüssigkeit aus dem Testansatz verdunstet. Zusätzlich wird während der Inkubation der Spalt zwischen Mikrotitrationsplatte und Deckel mit Parafilm abgedichtet.

Die Belegung der Mikrotiterplatten ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Je Platte wird eine Probe in 5 Konzentrationen (V1 bis V5) getestet.

	1	2	3	4	5	6
A	Wachstumskontrollen			Blindwerte		
B	V1	V1	V1	V4	V4	V4
C	V2	V2	V2	V5	V5	V5
D	V3	V3	V3	Wachstumskontrollen		

Abbildung 3.1: Belegung der 24-Well-Mikrotitrationsplatte für den Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*. Testansätze (V1 bis V5): Probe, Algeninokulum und Nährmedium, Wachstumskontrollen: ohne Testgut, Blindwert: ohne Testgut und Algen.

### 3.2.3.3 96-Well-Mikrotitrationsplatten-Maßstab

Beim nicht-automatisierten 96-Well-Algentest werden nicht-transparente Polystyrol Mikrotitrationsplatten mit transparentem Boden (Optiplate II, Kat.-Nr. POR 301012, Labsystems OY, Helsinki, Finnland) verwendet. Die Ansatzgröße beträgt hier 200  $\mu$ l.

Die Abbildung 3.2 zeigt die Belegung einer 96-Well-Platte zur Durchführung des miniaturisierten Algen-Zellvermehrungshemmtests. Bis zu 28 Versuchsansätze in drei Parallelen können somit je Mikrotitrationsplatte getestet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Wachstumskontrollen			Nullwert			V15	V15	V15	V22	V22	V22
B	V1	V1	V1	V8	V8	V8	V16	V16	V16	V23	V23	V23
C	V2	V2	V2	V9	V9	V9	V17	V17	V17	V24	V24	V24
D	V3	V3	V3	V10	V10	V10	V18	V18	V18	V25	V25	V25
E	V4	V4	V4	V11	V11	V11	V19	V19	V19	V26	V26	V26
F	V5	V5	V5	V12	V12	V12	V20	V20	V20	V27	V27	V27
G	V6	V6	V6	V13	V13	V13	V21	V21	V21	V28	V28	V28
H	V7	V7	V7	V14	V14	V14	Wachstumskontrollen			Nullwert		

Abbildung 3.2: Belegung der 96-Well-Mikrotitrationsplatte für den Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*. Testansätze (V1 bis V28): Probe, Algeninokulum und Nährmedium, Wachstumskontrollen: ohne Testgut, Nullwert: ohne Testgut und Algen.

Beim automatisierten High-Throughput-96-Well-*Desmodesmus subspicatus*-Zellvermehrungs-Hemmtest werden transparente Polystyrol Mikrotitrationsplatten (96 Well-Gewebekulturplatte KO 96K F, Best.-Nr. 655163, Greiner GmbH, Solingen) verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Wachstumskontrollen						Nullwerte					
B	V1	V1	V1	V1	V1	V1	V7	V7	V7	V7	V7	V7
C	V2	V2	V2	V2	V2	V2	V8	V8	V8	V8	V8	V8
D	V3	V3	V3	Wachstumskontrollen						V3	V3	V3
E	V4	V4	V4	V4	V4	V4	V9	V9	V9	V9	V9	V9
F	V5	V5	V5	V5	V5	V5	V10	V10	V10	V10	V10	V10
G	V6	V6	V6	V6	V6	V6	V11	V11	V11	V11	V11	V11
H	Nullwerte						Wachstumskontrollen					

Abbildung 3.3: Belegung der 96-Well-Mikrotitrationsplatte für den automatisierten Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*. Testansätze (V1 bis V11): Probe, Algeninokulum und Nährmedium, Wachstumskontrollen: ohne Testgut, Nullwert: ohne Testgut und Algen.

Die Abbildung 3.3 zeigt die Belegung einer 96-Well-Platte zur Durchführung des automatisierten miniaturisierten Algen-Zellvermehrungshemmtests.

Zur Verbesserung der Variabilität werden die Parallelen pro Testkonzentration auf sechs erhöht und Wachstumskontrollen zur Berechnung der Hemmwerte in der Mitte der Platte eingesetzt. Somit können bis zu 11 Versuchsansätze je Mikrotitrationsplatte getestet werden.

### 3.2.4 Inkubation

Die Algenzellen sollen in beiden DIN-Normen während des Versuches durch Schütteln, Rühren oder durch Belüften in Suspension gehalten werden. Die Versuchsdauer beträgt drei Tage. Außerdem wird eine Temperatur von  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und Dauerbeleuchtung mit weißem Licht vorgeschrieben. Richtwert für die Beleuchtung ist eine photosynthetisch wirksame Photonenraumbestrahlungsstärke von  $0,72 \cdot 10^{20}$  Photonen je  $(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . (Siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.2.)

#### 3.2.4.1 Erlenmeyerkolben-Maßstab

Die Inkubation erfolgt in einem beleuchteten Infors MULTITRON™ Schüttelschrank (Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Um eine Adsorption der Algen am Kolben zu verhindern, werden folgende Einstellungen gewählt: Schüttelintervalle von 130 rpm für 10 min und 100 rpm für 50 min bei einem Hub von 25 mm und einer Temperatur von  $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Der verwendete Inkubationsschrank ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Die Höhe des Schrankes beträgt ca. 1,80 m.



Abbildung 3.4: Fotografie des Infors MULTITRON™ -Schüttelschrank-Inkubators.

### 3.2.4.2 Mikrotitrationsplatten-Maßstab

Für die herkömmliche Inkubation der Mikrotitrationsplatten (24-Well und 96-Well) wurde der oben erwähnte Inkubationsschrank zusätzlich mit einem Vibrationsschüttler (IKA<sup>®</sup> VIBRAX VXR, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen) ausgestattet. Zur Optimierung der Beleuchtung wird die Oberfläche des Vibrationsschüttlers, auf dem die Mikrotiterplatten mit Spezialhaftband befestigt werden, mit Spiegelfolie beklebt.

Für die automatisierte Version des Algentests musste ein eigener Mikrotitrationsplatten-Inkubator entwickelt werden. Eine ausführliche Beschreibung der Entwicklungsarbeiten ist in Abschnitt 4.1.2 zu finden.

## 3.2.5 Messwerterfassung und Messgeräte

Mindestens alle 24 Stunden soll die Zellzahl in jedem Testgefäß (einschließlich der Kontrollansätze) gemessen werden. Der Versuch an sich muss dabei eine Mindestdauer von 72 h haben.

### 3.2.5.1 Erlenmeyerkolben-Maßstab

Das Algenwachstum wird über die Chlorophyll-Fluoreszenz der Zellsuspensionen verfolgt. Diese wird unter folgenden Bedingungen ermittelt: Fluoreszenz Spectrophotometer F 4500 (Hitachi Ltd., Japan) mit den folgenden Messeinstellungen: 1. Instrument Parameter: excitation slit: 10,0 nm, emission slit: 10,0 nm, PMT Voltage: 700 V; 2. Scan Parameters: scan mode: concentration, Excitationswellenlänge: 450 nm, Emissionswellenlänge: 685 nm, Delay Time: 20 s, Integration Time: 1,0 s, Data Mode: fluorescence, Sample Number: 1, Maximum: 1500,0, Minimum: 0,0000, Digital after Decimal Point: 3. Mindestens 2 ml Probe werden verwendet und direkt in 1 cm Küvetten gemessen. Direkt vor der Messung werden die Kolben per Hand geschüttelt.

### 3.2.5.2 Mikrotitrationsplatten-Maßstab

Die Chlorophyll-Fluoreszenz der Zellsuspensionen wird als Emission bei 690 nm nach Anregung bei 440 nm mit dem rechnergesteuerten Mikrotitrationsplatten-Photometer (TECAN SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup>, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mit Inkubations- und Schüttelmöglichkeit gemessen. Zur Gerätesteuerung und Datenaufnahme wird das von der Tecan Group Ltd. entwickelte Programm *XFluor* eingesetzt. Im späteren automatisierten Testbetrieb wird die neu entwickelte Software diese Aufgaben übernehmen.

Die testspezifischen Einstellungen des Fluorometers sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

*Tabelle 3.6: Einstellungen des SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup> zur Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenzabnahme im Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*.*

Mess-Parameter	Einstellung
Temperatur:	RT
Excitationsfilter :	440 nm (Bandbreite 40 nm)
Emissionsfilter :	690 nm (Bandbreite 8,5 nm)
Messmodus (read mode)	von oben
lag-Zeit:	0 $\mu$ s
Integrationszeit:	40 $\mu$ s
Gain:	150
Anzahl der Blitze:	50
<b>Mikrotitrationsplatten-Parameter:</b>	
Messrichtung :	in Reihen
Mehrfachmessungen :	aus
<b>Schüttel-Parameter:</b>	
Schütteldauer vor der Messung:	30 s
Schüttelmodus:	orbital
Schüttelintensität:	normal

Zusätzlich wird für den Gerätevergleich bei einigen Proben die Chlorophyll-Fluoreszenz der Zellsuspensionen mit dem Fluoroskan Ascent (Labsystems Oy, Helsinki, Finnland) mit folgenden Einstellungen ermittelt: Measurement Typ: Monitor, Step Time: 0, Lag Time: 0 meas., Count: 90, Excitationsfilter: 444 nm, Emissionsfilter: 680 nm, Monitor Mode: all data, Beam: normal; Shake: total time: 1, Diameter: 1, On Time: 1, Off Time: 0; Plate Acceleration: 1, Integration Time: 20 ms, Area Definition: ein Messpunkt in der Mitte des Wells ist gewählt.

### 3.2.6 Gültigkeitskriterien

Es gilt das Kriterium, das von der DIN 38412 Teil 33 [29] gefordert wird:

1. Die Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz muss innerhalb von 72 h mindestens um den Faktor 30 zunehmen.

Zusätzlich wird von der DIN 38412 Teil 9 [30] gefordert:

2. Der pH-Wert der Kontrolle darf nicht um mehr als 1,5 Einheiten während des Tests vom pH-Wert des Wachstumsmediums abweichen.

Zusätzlich fordern wir für den Mikrotitrationsplattentest:

3. Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den hohen Konzentrationen sollte vergleichbar sein mit dem Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den niedrigen Konzentrationen.
4. Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen sollte mindestens so hoch sein wie die Vermehrungsfaktoren der Proben. Wenn dies nicht der Fall ist, also eine Wachstumsförderung durch die Proben stattfindet, dann sollte sie sich mit der Verdünnung der Proben reduzieren.

## 3.3 Auswertungsmethoden

Die Algen werden in den Testansätzen durch Fluoreszenzmessung quantifiziert und die Wachstumshemmungen über verschiedene Auswertungsmethoden berechnet. Die Messwerte liegen höchstens 24 h auseinander. Dadurch ist es möglich, den gesamten Wachstumsverlauf in die Auswertung mit einzubeziehen, indem z. B. die Fläche unter der Wachstumskurve (Biomasseintegral) berechnet wird. Zusätzlich zur Berechnung des Biomasseintegrals werden die mittlere Wachstumsrate der Testansätze und die Zellzahl in einer Endpunktbestimmung ermittelt. Die Hemmung der Biomasseproduktion macht sich in der Verminderung der Chlorophyll-Fluoreszenz bemerkbar.

### 3.3.1 Berechnung der Wachstumshemmung

#### 3.3.1.1 Endpunktmethode

Die Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion  $H_F$ , ausgedrückt als Minderung der Chlorophyll-Fluoreszenz, wird für jede Verdünnungsstufe  $i$  durch Vergleich der Chlorophyll-Fluoreszenz des Testansatzes  $F_i$  mit der eines Kontrollansatzes  $F_K$  nach folgender Gleichung berechnet:

$$H_{Fi} = \frac{F_K - F_i}{F_K} \cdot 100. \quad (3.2)$$

Hierin bedeuten:

- $H_{Fi}$  Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion in %, ausgedrückt als Minderung der Chlorophyll-Fluoreszenz für die Testkonzentration  $i$
- $F_K$  gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz
- $F_i$  gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz im Testansatz  $i$

Falls die Probe in den unbeimpften Verdünnungsstufen eine Eigenfluoreszenz aufzeigt, ist der entsprechende Eigenfluoreszenzwert  $F_E$  von  $F_{K,i}$  zu subtrahieren.

### 3.3.1.2 Wachstumsrate

Für jede Testkultur wird die Wachstumsrate  $\mu$  nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}. \quad (3.3)$$

Hierin bedeuten:

- $t_n$  die Zeit der letzten Messung nach Testbeginn
- $N_0$  die nominale Ausgangszellzahl
- $N_n$  die am Testende gemessene Zellzahl

Alternativ kann die Wachstumsrate aus der Steigung der Regressionsgeraden in einer graphischen Darstellung des Logarithmus der Zellzahl gegen die Zeit ermittelt werden.

Für jede Testkonzentration und Kontrolle werden die Durchschnittswerte  $\mu$  berechnet. Hieraus wird die prozentuale Hemmung für jede Testkonzentration nach folgender Gleichung ermittelt:

$$H_{\mu i} = \frac{\mu_K - \mu_i}{\mu_K} \cdot 100. \quad (3.4)$$

Hierin bedeuten:

- $H_{\mu i}$  die prozentuale Hemmung (Wachstumsrate) für die Testkonzentration  $i$
- $\mu_i$  die durchschnittliche Wachstumsrate für die Testkonzentration  $i$
- $\mu_K$  die durchschnittliche Wachstumsrate für den Kontrollansatz

### 3.3.1.3 Biomasseintegral

Die Beurteilung der Wachstumshemmung basiert hier auf der Berechnung der Flächenintegrale der Testansätze.

Die Fläche  $A$  unter der doppelt linearen Wachstumskurve der Form  $N(t)$  wird für jede Testkultur mittels numerischer Integration berechnet. Mit Hilfe der Sehnen-Trapezregel lässt sich die Fläche  $A$  in einzelne Intervalle zerlegen und wie folgt berechnen:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \cdot t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2 \cdot N_0}{2} \cdot (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2 \cdot N_0}{2} \cdot (t_n - t_{n-1}). \quad (3.5)$$

Hierin bedeuten:

- $t_1$  die Zeit der ersten Messung
- $t_n$  die Zeit der n-ten Messung
- $N_0$  die nominale Ausgangszellzahl
- $N_1$  die gemessene Zellzahl zur Zeit  $t_1$
- $N_n$  die gemessene Zellzahl zur Zeit  $t_n$

Für jede Testkonzentration und Kontrolle werden die Durchschnittswerte für  $A$  berechnet. Hieraus wird die prozentuale Hemmung für jede Testkonzentration nach folgender Gleichung berechnet:

$$H_{Ai} = \frac{A_K - A_i}{A_K} \cdot 100. \quad (3.6)$$

Hierin bedeuten:

- $H_{Ai}$  die prozentuale Hemmung (Fläche) für die Testkonzentration  $i$
- $A_i$  das Flächenintegral für die Testkonzentration  $i$
- $A_K$  das Flächenintegral der Kontrolle

### 3.3.2 Berechnung der effektiven Konzentration

Erfahrungsgemäß kann man davon ausgehen das die Verteilung der Toleranzwerte von Populationen auf einer sogenannten schiefen Normalverteilung beruhen. Durch die Logarithmierung der Abszisse erhält man eine Annäherung an die Normalverteilung (Gauß-Verteilung) [39].

Eine log-normalverteilte Dosis-Wirkungs-Beziehung hat in vielen Fällen einen sigmoiden Verlauf. Aus einem solchen Kurvenverlauf lässt sich ein EC-Wert aber nur schwer ermitteln (siehe Abbildung 3.5). Daher ist eine Transformation zur graphischen Linearisierung notwendig.

#### 3.3.2.1 Probit-Transformation

Mit Hilfe einer Transformationsfunktion kann der sigmoide Verlauf der Konzentrations-Hemm-Kurve dargestellt werden:

$$H_i = F(a + b \cdot \log(k_i)). \quad (3.7)$$

Hierin bedeuten:

- $F$  Transformationsfunktion
- $H_i$  Geschätzte Hemmung des Ansatzes  $i$
- $k_i$  Konzentration im Ansatz  $i$
- $a, b$  Parameter

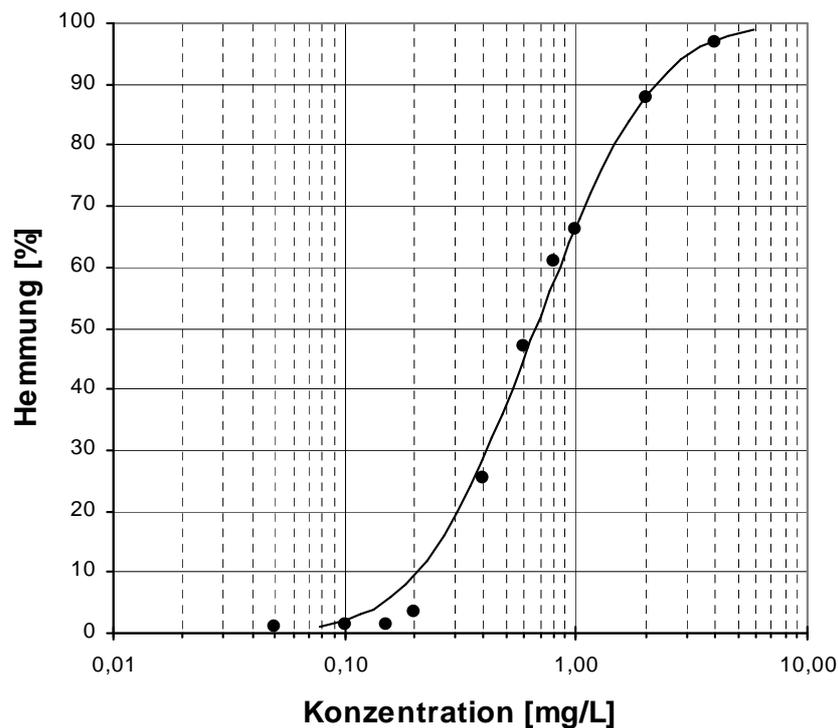


Abbildung 3.5: Halblogarithmische Darstellung einer typischen Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Die Probit-Transformation stellt eine Integration der Fläche unter der Gauß-Verteilung dar [22]. Das Integral der Normalverteilung („Glockenkurve“) ergibt den erwähnten sigmoiden Kurvenverlauf.

In Gleichung (3.7) wird daher die Funktion  $F$  durch die Probit-Funktion (Normalform der Normalverteilung) beschrieben:

$$F(Y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^Y e^{-\frac{u^2}{2}} du, \quad (3.8)$$

wobei  $Y$  den sogenannten Probit-Wert repräsentiert.

Bei der Auswertung von Tests mittels Probit-Analyse [39] wurde stets davon ausgegangen, dass der Anteil der „gehemmten“ Individuen über den logarithmierten Konzentrationsbereich normalverteilt war.

Mittels der Probit-Transformation soll die sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehungs-Kurve in eine Gerade umgewandelt werden. Dafür werden auf der Ordinate der Dosis-Wirkungs-Kurve äquidistante NED-Einheiten (NED = normal equivalent deviation) aufgetragen, deren Abstand durch den Wert der Standardabweichung  $\sigma$  der Toleranzwerte auf der Abszisse gegeben ist. Die

NED-Einheiten entsprechen in ihrem numerischen Wert den  $1\sigma$ ,  $2\sigma$ ,  $3\sigma$ ,  $-1\sigma$ ,  $-2\sigma$ ,  $-3\sigma$ -Bereichen der Normalverteilung. Um negative NED-Werte zu vermeiden, wird die Zahl 5 addiert. Dadurch entsteht die sogenannte Probit-Skala. Definitionsgemäß wird der 50 %- Wert als NED 0, beziehungsweise als Probit 5 bezeichnet (Abbildung 3.6).

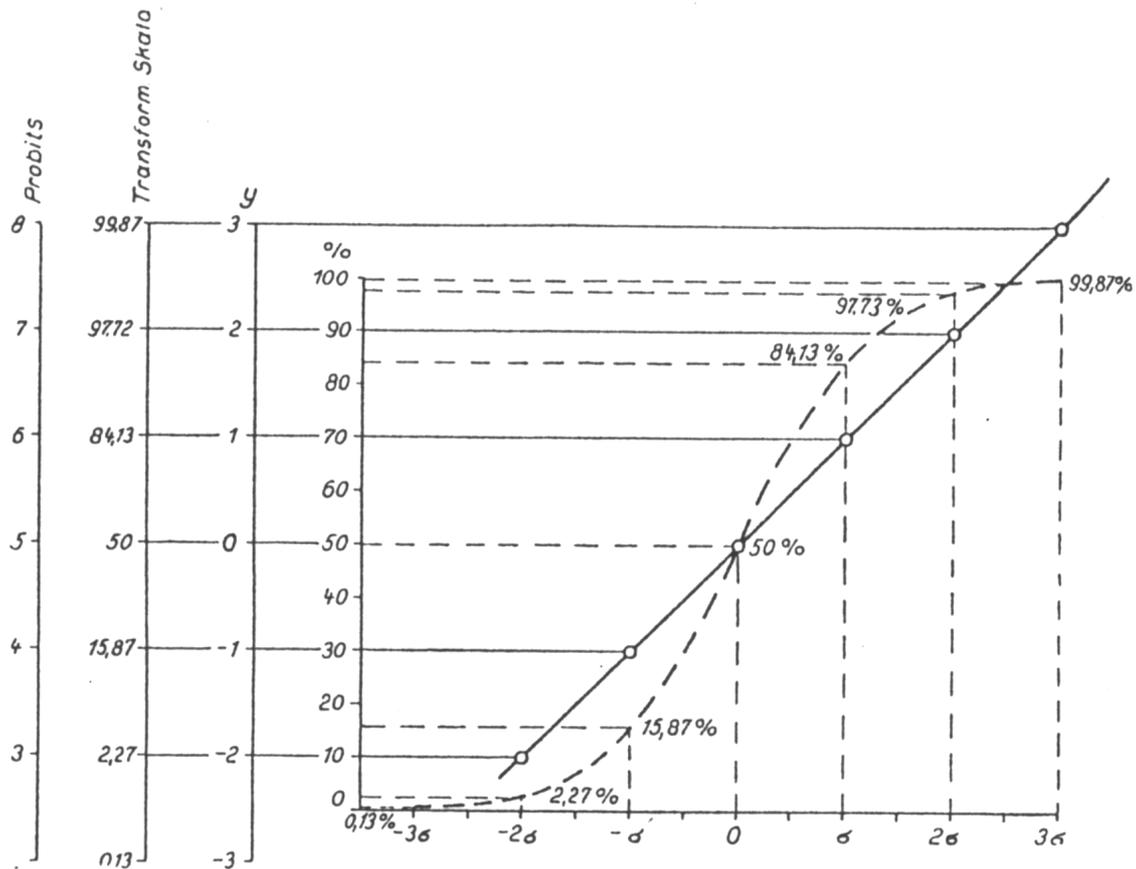


Abbildung 3.6: Konstruktion der transformierten Ordinatenkala [44].

Neben der Probit-Transformation sind in der Literatur noch weitere Modelle beschrieben die sich z. T. einfacher berechnen lassen als das Probit-Modell und deshalb für bestimmte Anwendungen dem Probit-Modell vorgezogen werden. Die Funktion  $F$  in Gleichung (3.7) wird dabei wie folgt beschrieben.

Im Logit-Modell [40, 41] lautet die Funktion  $F$ :

$$F(x) = \frac{1}{1 + e^x}. \quad (3.9)$$

Das Weibull-Modell [42] ist nicht symmetrisch bezüglich des Wendepunktes:

$$F(x) = 1 - e^{(-e^x)}. \quad (3.10)$$

Da das Logit- und das Weibull-Modell empirische Modelle sind und die Berechnung von Probit-Werten uns keine Schwierigkeiten bereitet, wird im Weiteren auf die Berechnung der effektiven Konzentration mit den beiden erstgenannten Modellen verzichtet.

Im Anschluss an die Probit-Transformation erfolgt die Probit-Analyse. Hierbei wird unter Einbeziehung einer mathematischen Wichtungsmethode (Maximum-Likelihood-Lösung [43]) die Probit-Regressionskurve ermittelt und daraus verschiedene  $EC_x$ -Werte ermittelt.

Alternativ dazu kann nach der Transformation der Hemmwerte in den Probit-Maßstab mittels einfacher linearer Regression die Ausgleichsgerade bestimmt werden.

Der Probit-Wert für 50 % Effekt ist 5. Weitere Probit-Werte für gängige  $EC_x$ -Werte sind Tabelle 3.7 zu entnehmen.

*Tabelle 3.7: Probit-Werte für gängige  $EC_x$ -Werte.*

<b><math>EC_x</math>-Wert</b>	<b>Probit-Wert</b>
$EC_{20}$	4,15908
$EC_{50}$	5,0
$EC_{80}$	5,94092

Die gesuchten  $EC_x$ -Werte sind diejenigen Konzentrationen, bei denen die Regressionsgerade die entsprechenden Probit-Werte schneidet.



# Kapitel 4

## Experimenteller Aufbau

Ziel war es, eine computergesteuerte Anlage zu entwickeln, die den miniaturisierten Algen-Zellvermehrungshemmtests mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* automatisch durchführen kann. Ein Großteil der Entwicklungsarbeiten betraf dabei die Erstellung der Software zur Ansteuerung der einzelnen Komponenten sowie zur Weitergabe und Protokollierung der Versuchsdaten bei den verschiedenen Testschritten.

### 4.1 Systemkomponenten

Aufgrund der beabsichtigten Miniaturisierung und der damit verbundenen Reduzierung der Ansatzvolumina (200  $\mu\text{l}$ , 96-Well-Mikrotitrationsplatten) konnte man beim Aspekt der Messwerterfassung auf bereits etablierte Messgeräte zurückgreifen (siehe Kapitel 3.2.5.2). Hinsichtlich des gesamten Testablaufs war man aber nur an die Vorgaben der DIN-Vorschriften gebunden. Das Design der Anlage sowie die Umsetzung der einzelnen automatisch ablaufenden Testschritte orientierte sich an technologischen Standards der Biotechnologie-Branche. Es sollte nicht nur eine Versuchsanlage zur effektiveren Messwerterfassung und Durchführung wissenschaftlicher Versuchsreihen entwickelt werden, es sollte von vornherein auch auf eine eventuelle kommerzielle Nutzung der Anlage Wert gelegt werden.

Die zu automatisierenden Schritte beinhalten die Pipettierung der Substanzen, den Transport der Mikrotiterplatten in den beleuchteten Inkubator und in definierbaren Zeitabständen den Transport der Platten zum Fluoreszenz-Messgerät und wieder in den Inkubator zurück. Diese Arbeiten sollen von einem zentral angeordneten Roboter übernommen werden.

Bei der Auswahl der verschiedenen Hardware-Komponenten musste vor allen Dingen die Möglichkeit der softwaretechnischen Ansteuerung beachtet werden. Das heißt sämtliche Geräte mussten geeignete Schnittstellen besitzen, um das komplexe System via PC steuern und anfallende Messdaten auswerten

zu können. Die einzelnen System-Komponenten der Robotik-Plattform werden in diesem Kapitel detailliert beschrieben.

### 4.1.1 Robotersystem

Bei der Auswahl des Roboters musste zwischen verschiedenen Roboter-Kinematiken gewählt werden. Die Roboter-Kinematik beschreibt den mechanischen Aufbau eines Roboters. Sie kann nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden: Bewegungsform der Achsen, Anordnung der Achsen und Anzahl der Achsen.

Roboterachsen können rotatorisch oder linear ausgelegt sein. In Abhängigkeit davon wie mehrere dieser Achsen miteinander verbunden werden, ergeben sich unterschiedliche Arbeitsräume (die gebräuchlichsten sind Kubus, Zylinder und Kugel) und Bezeichnungen der Roboter. Generell unterscheidet man aufgrund der obigen Kriterien zwischen 3 verschiedenen Robotertypen: Linear-Roboter, SCARA-Roboter und Knickarm-Roboter [45].

Die Anforderungen an die Testumgebung, insbesondere das neue Konzept des Liquid-Handlings (siehe Abschnitt 4.1.4), werden am besten von einem sogenannten Vertikal-Knickarm-Roboter erfüllt. Im Unterschied zu Linear-Robotern (oder auch Kartesischen Robotern) und SCARA-Robotern zeichnen sich diese durch mehr Freiheitsgrade aus und erlauben daher eine flexiblere Positionierung des Greifwerkzeugs.

Der 5-Achs-Roboter vom Typ Movemaster RV-2AJ aus dem Hause Mitsubishi Electric (Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen, Deutschland) ist leistungsstark bei relativ kleiner Dimensionierung. Es handelt sich um einen hochwertigen Industrie-Roboter, der Handlings- und Bestückungsaufgaben bis zu 2 kg übernehmen kann. Durch seine schlanke Bauweise findet er in kleinen Kabinen problemlos Platz und ist somit auch für unsere Anwendungszwecke bestens geeignet. Der Antrieb des Roboters erfolgt durch AC-Servomotoren. Die Absolut-Encoder-Technik garantiert nach einer Spannungsunterbrechung die Wiederaufnahme der Roboterbewegungen von der Ist-Position her ohne zeitraubendes Referieren und vermeidet damit auch eventuell entstehende Crash-Situationen [46].

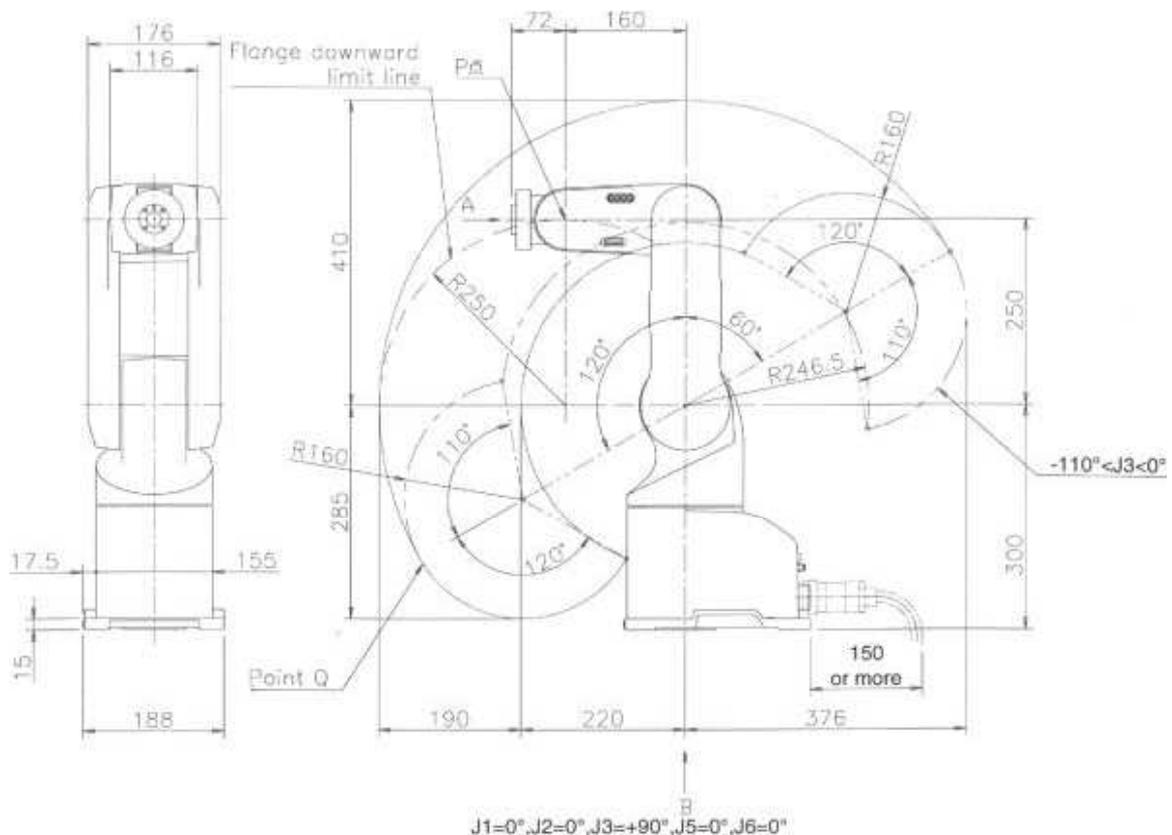
Der Controller des Roboters verfügt über eine 64 Bit CPU, die im Multitasking bis zu 32 parallele Tasks steuern kann. Der Controller kann über Optionskarten weitere Achsen ansteuern, so dass die Reichweitenbegrenzung des RV-2AJ keine generelle Beschränkung des Handlings bedeutet. Der Arbeitsbereich könnte sich z. B. über die Montage des Roboters auf einer Linearachse beliebig erweitern lassen. Zur Kommunikation des Roboters stehen standardmäßig eine RS232-Schnittstelle sowie 16 digitale Ein- und Ausgänge zur Verfügung.

Tabelle 4.1 fasst noch einmal die wichtigsten Leistungsmerkmale des Mitsubishi Movemaster RV-2AJ zusammen.

*Tabelle 4.1: Leistungsmerkmale des Vertikal-Knickarm-Roboters Mitsubishi Movemaster RV-2AJ.*

Anzahl der Achsen	5
Antrieb	AC-Servo
Wiederholgenauigkeit	$\pm 0,02$ mm
Reichweite	410 mm (Greifer nach unten)
Geschwindigkeit max.	2100 mm/s
Greifer	Elektrisch oder pneumatisch
Robotergewicht	17 kg

In den Abbildungen 4.1 und 4.2 sind der vertikale bzw. horizontale Arbeitsbereich des Mitsubishi Movemaster RV-2AJ dargestellt. Aus den Abbildungen werden die Bewegungsmöglichkeiten des Roboters ersichtlich. Mit Hilfe von drei Hauptachsen werden die sogenannten Kopf- oder Handachsen 4 und 5 im Arbeitsraum positioniert. Durch die zusätzliche Bewegungsmöglichkeit der Handachsen kann der Greifer oder das Werkzeug im Raum so orientiert werden, wie es für die zu bewerkstellenden Handhabungsaufgaben erforderlich ist.



*Abbildung 4.1: Vertikaler Arbeitsbereich des Mitsubishi RV-2AJ (Länge [mm], Winkel [°]).*

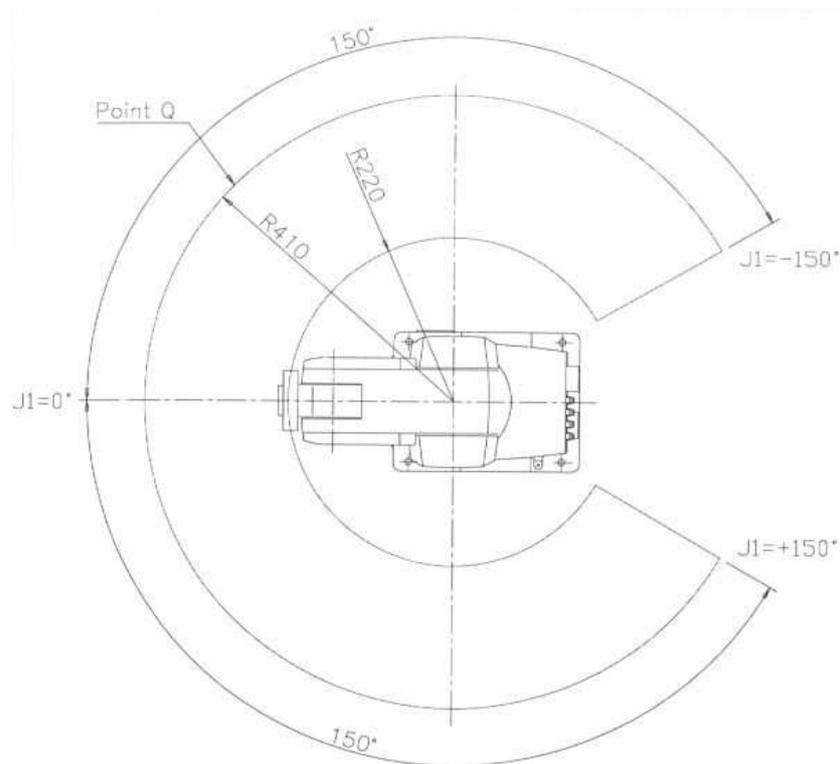


Abbildung 4.2: Horizontaler Arbeitsbereich des Mitsubishi RV-2AJ (Länge [mm], Winkel [°]).

## 4.1.2 Inkubationseinheit

### 4.1.2.1 Mikrotitrationsplattenschüttler

In Zusammenarbeit mit der Firma Polygen GmbH (Langen, Deutschland) wurde ein Mikrotitrationsplattenschüttler entwickelt, der den Anforderungen der DIN-Normen gerecht werden sowie die Möglichkeit der Automatisierung bieten sollte.

Das Schüttelsystem verfügt über eine temperierbare Aufnahmeplatte aus Aluminium, die speziell an die Unterseite der im Algentest eingesetzten 96-Wellplatten angepasst ist. Eine hohe Passgenauigkeit ist für einen geringen Wärmewiderstand zwingend notwendig, um so äußere Temperatureinflüsse auf die einzelnen Wells zu minimieren. Ein Prototyp des Schüttlers ist in Abbildung 4.3 zu sehen.

Die Temperierung selbst erfolgt durch 6 Peltier-Elemente, die eine schnelle und exakte Temperierung ermöglichen. Die an der Warmseite der Peltier-Elemente entstehende Wärmemenge muss mittels eines Kühlwasserkreislaufs abgeführt werden. Die Temperaturschwankungen von Well zu Well liegen bei  $\pm 0,1$  °C, über die ganze Platte verteilt bei  $\pm 0,3 - 0,4$  °C. Der an der Oberflä-

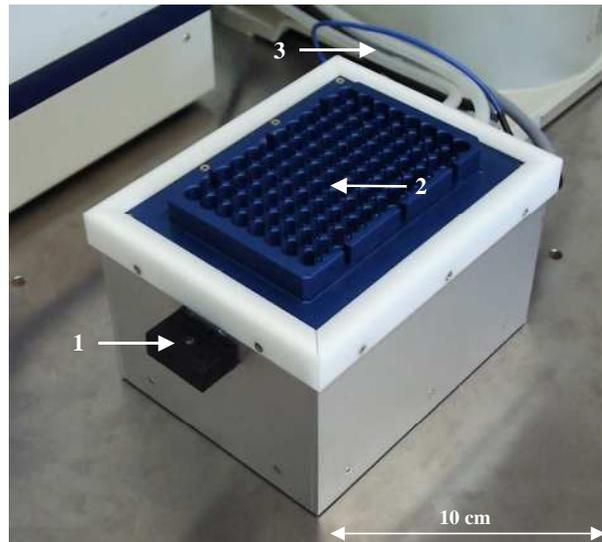


Abbildung 4.3 : Prototyp des temperierbaren Mikrotitrationsplattenschüttler. (1): Lichtsensor, (2): Aufnahmeplatte für 96-Wellplatten, (3): Wasseranschlüsse.

che des Schüttlers erreichbare Temperaturbereich geht von  $-20\text{ °C}$  bis  $+60\text{ °C}$ . Ein typisches Temperaturprofil bei einer Temperatur  $T_{\text{Soll}} = 23\text{ °C}$  ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

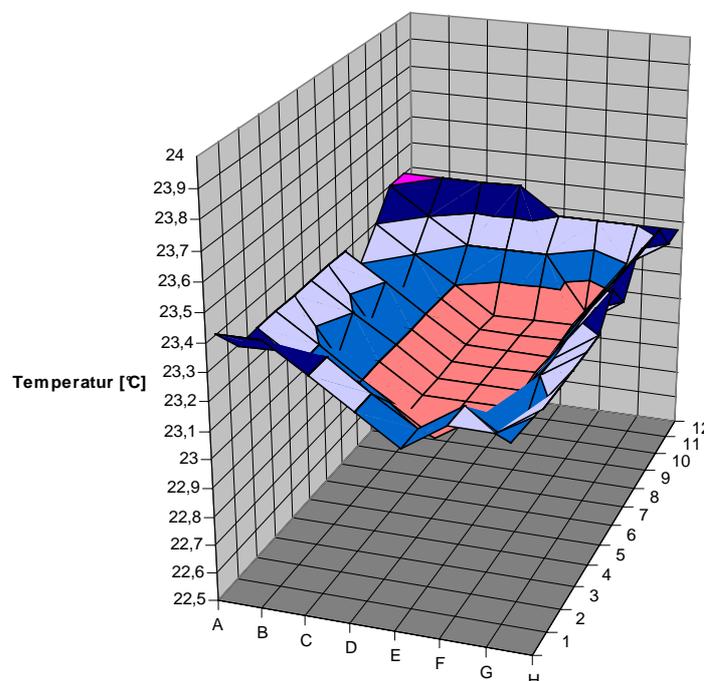
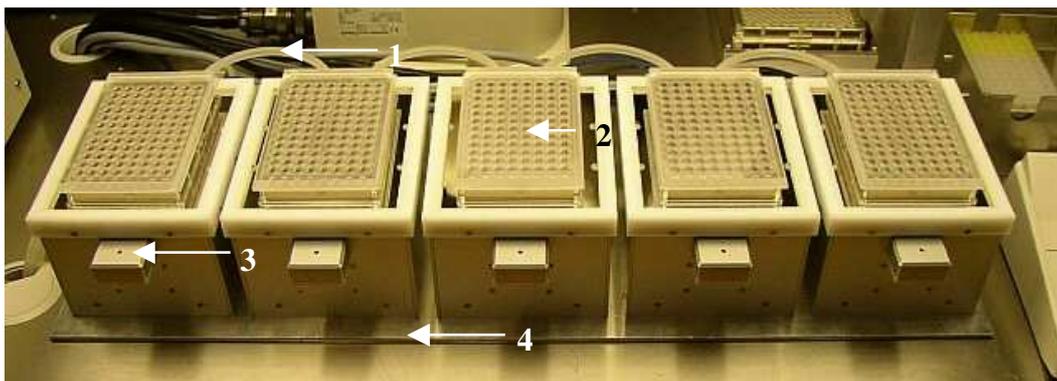


Abbildung 4.4: Temperaturprofil des Mikrotitrationsplattenschüttler in den einzelnen Wells einer 96-Wellplatte bei  $T_{\text{Soll}} = 23\text{ °C}$ . Die tatsächlich erreichte Temperatur  $T_{\text{Ist}}$  ist dabei über den einzelnen Positionen der Mikrotiterplatte aufgetragen.

Um eine vollständige Durchmischung der Probenansätze zu garantieren, muss in der als Orbitalschüttler konzipierten Inkubationseinheit eine hohe Schüttelfrequenz bei kleiner Schüttelamplitude gewährleistet sein. Der im Schüttler befindliche Motor ist zudem mit einem Sensor ausgestattet, der die exakte Positionierung der Aufnahmeplatte gewährleistet. Dadurch steht einem Roboter bei jedem Greifvorgang der Mikrotiterplatte die identische Teachposition zur Verfügung. Die maximale Drehzahl des Motors liegt bei 1600 U/min.

Mit Hilfe eines Kryostaten (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) konnte für die Anlage ein eigener Kühlwasserkreislauf geschaffen werden, welcher für die Wärmeabfuhr der Peltier-Elemente der einzelnen Schüttler verantwortlich ist.

Die komplette Inkubationseinheit besteht aus 5 Mikrotitrationsplattenschüttlern, die auf einer speziellen Adapterplatte befestigt sind (Abbildung 4.5).



*Abbildung 4.5: Inkubationseinheit bestehend aus 5 Mikrotitrationsplattenschüttlern. (1): Kühlwasserleitungen, (2): 96-Well-Mikrotitrationsplatte, (3): Sensor zur Regelung der Beleuchtungsstärke, (4): Adapterplatte zur Fixierung auf der Automatenoberfläche.*

#### **4.1.2.2 Beleuchtungseinheit**

Um die Algen gemäß DIN zu beleuchten, wurde am Schüttler ein Lichtsensor angebracht, der für die Messung der Beleuchtungsstärke verantwortlich ist (siehe Abbildung 4.3). Die Beleuchtung selbst erfolgt durch 6 regelbare Leuchtstoffröhren, die an einer speziellen Halterung in einem Abstand von ca. 45 cm über der Schüttleroberfläche befestigt sind (siehe Abbildung 4.12, S. 48).

In der DIN-Vorschrift 38412 L33 ist als Richtwert für die Beleuchtung eine photosynthetisch wirksame Photonenraumbestrahlungsstärke von  $0,72 \cdot 10^{20}$  Photonen je  $(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  angegeben. Die angegebene Photonenraumbestrahlungsstärke

entspricht einer photosynthetisch wirksamen Raumbestrahlungsstärke im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm von 120  $\mu\text{mol}$  Quanten je ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ). Bewertet nach der mittleren spektralen Wirkungsfunktion der Photosynthese lässt sich für den verwendeten Leuchtstofflampentyp eine Raumbeleuchtungsstärke (sphärische Messung) von etwa 8000 Lux errechnen [29].

Die Regelung der Beleuchtungseinheit und die Steuerung der Mikrotitrationsplattenschüttler erfolgt schließlich über einen gemeinsamen Controller (via RS232).

#### 4.1.2.3 Weiterentwicklung der Inkubationseinheit

Im gesamten Projektzeitraum wurden an den neuentwickelten Schüttler- und Beleuchtungseinheiten Verbesserungen und Weiterentwicklungen vorgenommen, um eine bessere Integration in den Automatenprototypen zu gewährleisten, die Lebensdauer zu verlängern und die Betriebssicherheit zu erhöhen. Zusätzlich musste die Sicherheit der Übertragung der Programmparameter erhöht werden.

Eine erste Version des Leuchttisches musste im Laufe des Projekts verändert werden, da die regelbaren Leuchtstoffröhren inklusive Steuereinheit nicht in einer kompakten Konstruktion untergebracht werden konnten. Dabei war die Beleuchtungseinheit in bestimmten Arbeitsvorgängen des Automaten im Kollisionsbereich des Roboters. Deshalb wurde eine überarbeitete Version mit minimalen Außenabmessungen konstruiert. Dafür wurden spezielle Halterungen für jede einzelne Leuchtstoffröhre gefertigt.

Die erste Version des Schüttlers musste ebenfalls komplett überarbeitet werden. Dabei wurde ein stärkerer Motor eingebaut, um verschiedene Schüttelfrequenzen realisieren zu können. Dieser besitzt ein größeres Drehmoment und ist damit auch in der Lage, kleinere Drehzahlen auf die Mikrotitrationsplatten zu übertragen. Ebenso wurde der bereits oben erwähnte Sensor zur genauen Positionsermittlung in die Mechanik des Schüttlers integriert. Des Weiteren musste die Oberfläche der Aufnahmeplatte nachträglich verchromt werden, um Lichtabsorption und damit Hemmungen im Algenwachstum zu vermeiden.

Aufgrund der Dauerbelastung durch Langzeitläufe ergaben sich mechanische Probleme des Schüttlers. Erstens traten Undichtigkeiten im Kühlwasserkreislauf auf. Deshalb wurde die Bodenabdeckung des Wärmetauschers neu konstruiert, angefertigt und integriert. Daneben wurde die Abdichtung des Wärmetauschers auf Dichtungen aus Silikon umgestellt. Zweitens fiel der Antrieb der Schüttler aus, da er der Belastung nicht standhielt. Der 90°-Stirnantrieb wurde folglich ausgetauscht, wobei von einem kommerziell erhältlichen Bauteil auf eine eigene Neuentwicklung umgestellt werden musste. Dabei wurden die Antriebswellen von einer Gleitlagerführung auf Kugellager umgerüstet, um eine höhere Lebensdauer bzw. eine größere Laufruhe zu erreichen.

Im Bereich der Elektronik musste die Leistungsendstufe höher dimensioniert werden, da, wie oben beschrieben, die Motorleistung des Antriebes erhöht wurde. Daneben wurde an der Mikrotitrationsplatten-Aufnahme eine aktive Übertemperatursicherung eingebaut, die bei einer Temperatur von 118 °C die Stromzufuhr zu den Peltier-Elementen aktiv unterbricht. Des Weiteren wurde für die Schüttlereinheiten eine zusätzliche elektronische Baugruppe entwickelt und eingebaut, die bei einer Messkreisunterbrechung zwischen Schüttlereinheit und dem Controller eine automatische und eigenständige Temperaturbegrenzung vornimmt.

Neben den mechanischen und elektronischen Optimierungen wurde auch die Eingabemöglichkeiten der Kalibrierfunktion für die Temperatur in die Firmware bzw. Software eingeschränkt bzw. auf ihre Plausibilität überprüft. Die Übertragungsprotokolle zwischen den Controllern und der neu erstellten Steuerungs-Software wurden mehrmals angepasst bzw. geändert, um die Abläufe zu optimieren.

### 4.1.3 Fluoreszenzmessgerät

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mittels des seriell ansteuerbaren Instruments TECAN SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup> (Tecan AG, Herbikon, Schweiz). Das multifunktionelle Detektionssystem ermöglicht neben Standard-Fluoreszenz-Messungen (Top oder Bottom, VIS und UV) auch zeitverzögerte Fluoreszenzmessungen („time resolved“-Messungen) sowie Absorptionsmessungen (VIS und UV). Das Gerät ist zudem kompatibel mit Mikroplattenformaten von 6-Well bis 96-Well, was somit Voruntersuchungen mit größeren Ansatzvolumina ermöglicht. Sämtliche Messparameter (Messrichtung, Messgeschwindigkeit, Messempfindlichkeit, usw.) können testspezifisch definiert werden (siehe Kapitel 3.2.5). Die Messgeschwindigkeit liegt für 96-Well-Platten unter 30 s. Die Lichtquelle ist eine Hochenergie-Xenon-Blitzlampe und es kann ein Wellenlängenbereich von 340 – 700 nm abgedeckt werden [47]. Die Übergabe der Mikrotiterplatten erfolgt über ein CD-ähnliches Ein-/Ausgabemodul, wodurch die Integration in eine Robotik-Anlage ermöglicht wird. In Abbildung 4.6 ist eine Fotografie des Gerätes zu sehen.

Da für die Testdurchführung transparente 96-Well-Mikrotitrationsplatten aus Polystyrol (siehe auch Kapitel 3.2.3.3) verwendet werden, musste für das im Automaten eingesetzte Fluorimeter eine spezielle Aufnahmeplatte angefertigt werden, die verhindert, dass bei den Fluoreszenz-Messungen Interferenzen mit benachbarten Wells auftreten. Der massive Aluminium-Einsatz ist in Abbildung 4.7 zu sehen. Jedes Well ist dabei von den benachbarten Wells durch eine fast das ganze Well umgebende Aluminiumwand abgeschirmt.

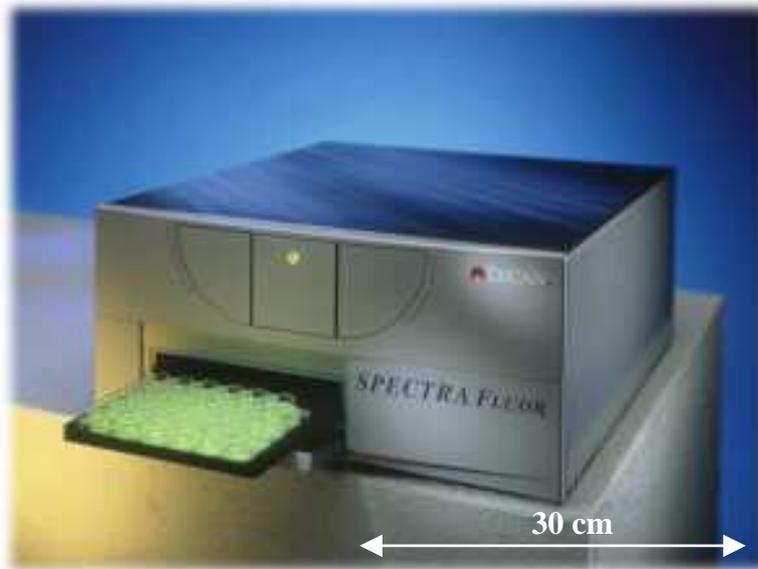


Abbildung 4.6: Fotografie des Fluoreszenz-Messgerätes *TECAN SPECTRAFluorPlus*<sup>®</sup>. Durch den einfachen Öffnungsmechanismus und die Möglichkeit der softwareseitigen Ansteuerung ist das Gerät prädestiniert für die Einbindung in High-Throughput-Systeme.

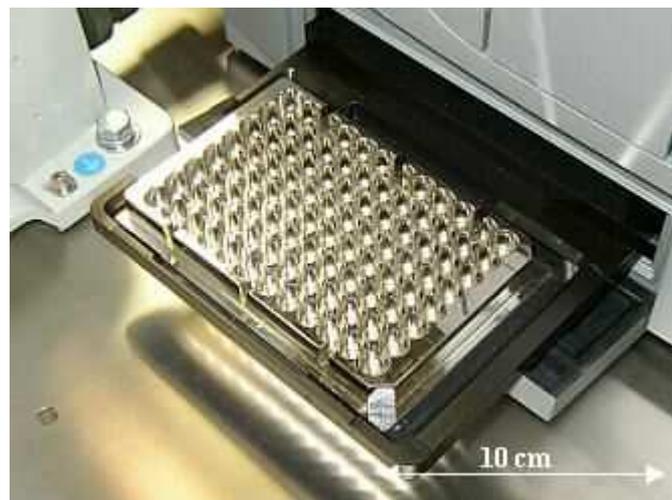


Abbildung 4.7: Aufnahmeplatte für 96-Well-Mikrotitrationsplatten, die Interferenzen mit benachbarten Wells bei der Fluoreszenzmessung verhindert.

### 4.1.4 Liquid Handling

Die Pipettierung der Substanzen soll nicht wie bei anderen Systemen durch einen eigenständigen Pipettierroboter erfolgen. Es soll hingegen eine elektronische Pipette benutzt werden, die direkt vom Greifer des zentral angeordneten 5-Achs-Roboters Mitsubishi RV-2AJ bewegt wird. Der Roboter übernimmt dabei direkt die Funktion der menschlichen Hand.

Bei dieser Variante der Pipettierung muss lediglich die spezielle Geometrie des Greifers berücksichtigt werden. Vorteile gegenüber der Verwendung eines eigenständigen Pipettierautomaten sind die geringeren Platzbedürfnisse und der deutlich geringere Preis (Faktor 10). Schwierigkeiten bei der Positionierung werden durch die extrem gute Wiederholgenauigkeit ( $\pm 0,02$  mm) des verwendeten Roboters ausgeschlossen. Ein geeignetes Dosiersystem mit serieller Schnittstelle stellt die elektronische Pipette EDOS 5222 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) dar.

Um die Pipette erfolgreich in den Automaten integrieren zu können, musste ein spezielles Stativ angefertigt werden, das die Pipette in einer fest vorgegebenen Position hält (siehe Abbildung 4.8). Zudem mussten die automatische Pipettenspitzenaufnahme durch geeignete Spitzenhalterungen realisiert werden.

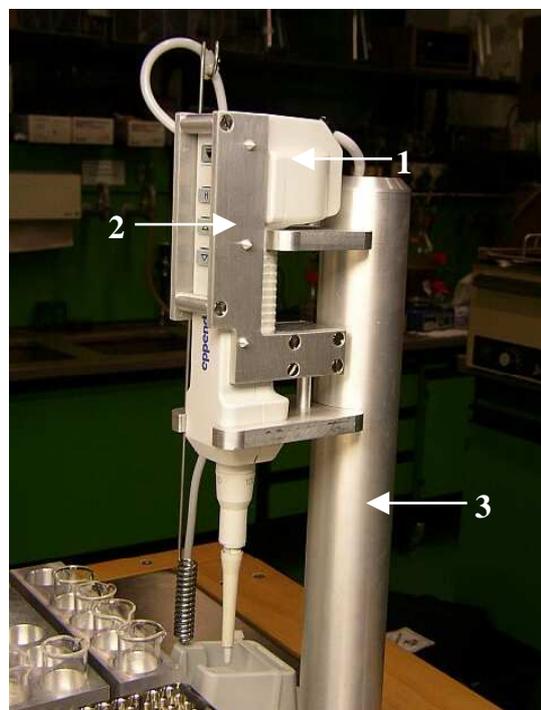


Abbildung 4.8: Elektronische Pipette EDOS mit speziellem Adapter in der Ruheposition. (1): Pipette, (2): Adapter, (3): Stativ.

Zur Verbesserung der Transport-Sicherheit und zur Optimierung der Positioniergenauigkeit wurde für die Pipette ein spezieller Adapter entwickelt, der mit den weiterentwickelten Greiferbacken des Roboters nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip arbeitet.

Für die Pipette selbst stehen mehrere Adapter zur Verfügung mit deren Hilfe das zu pipettierende Volumen über verschiedene Spitzen variiert werden kann (1  $\mu\text{l}$  – 1000  $\mu\text{l}$ ). Für eine Optimierung des Liquid Handlings sind für spätere Applikationen (siehe Abschnitt 6.3) auch Mehrkanal-Adapter (8-Kanal) für die Pipette erhältlich. Neben einem Dispensiermodus verfügt die Pipette über einen automatischen Spitzenabwurf. Zusätzlich ist die Kolbengeschwindigkeit bei der Flüssigkeitsaufnahme und -abgabe einstellbar.

Die wichtigsten Komponenten des Liquid-Handling-Systems sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

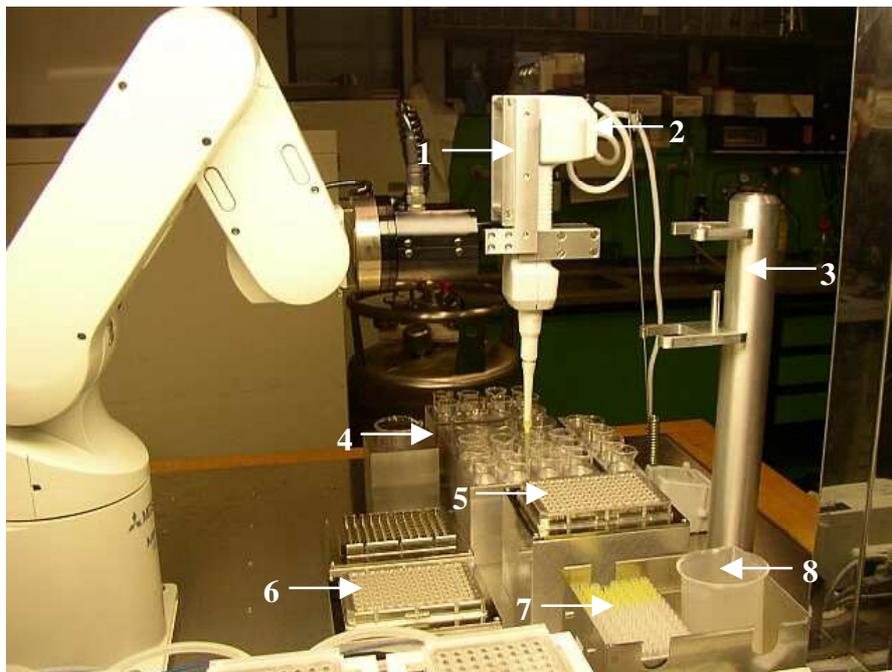


Abbildung 4.9: Hauptkomponenten des Liquid-Handlings. (1): Modifizierte Greiferbacken, (2): Pipette, (3): Stativ, (4): Substanz-Gefäße, (5): Positionseinheit für 96-Well-Mikrotitrationsplatten, (6): 96-Well-Deckelablage, (7): Pipetenspitzen, (8): Behälter für benutzte Spitzen.

Damit die Algen während des Pipettiervorgangs in Suspension gehalten werden, wurde zusätzlich eine spezielle Gefäßhalterung konstruiert, die mit einem Magnetrührer ausgestattet werden kann (siehe Abbildung 4.10).

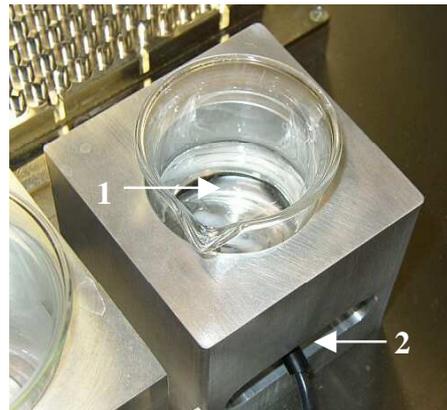


Abbildung 4.10: Gefäßhalterung mit integriertem Magnetrührer. (1): Algensuspension, (2): Schacht für Magnetrührer.

### 4.1.5 Roboterkabine

Das Untergestell der Roboterkabine ist aus einem Aluprofilsystem der Kemmler & Riehle GmbH (Reutlingen, Deutschland) gefertigt, welches seitlich mit Blechkassetten bzw. Schiebetüren versehen ist. Als Arbeitsfläche dient eine 40 mm starke Multiplex-Tischplatte mit V2A-Überzug. Die Platte besitzt dabei ein rasterförmiges Bohrbild, was die flexible Fixierung der verschiedenen Komponenten gewährleistet. Der später an das System adaptierbare Aufbau ist mit Sicherheitsglas und Schiebetüren aus Polycarbonat ausgestattet, womit die Sicherheitsbestimmungen des Maschinenrichtliniengesetzes eingehalten werden können. Die Integration eines Sicherheitsschalters in das System ist ebenfalls möglich, wobei der Türtaster über den Roboter-Controller mit dessen Not-Aus-Schalter kommunizieren kann.

In Abbildung 4.11 ist schematisch die Front- und Seitenansicht der Roboterkabine dargestellt.

### 4.1.6 Steuerungs-PC

Sämtliche Geräte werden momentan über serielle RS232-Schnittstellen angesteuert. Der Steuerungs-PC (Pentium IV, 2200 MHz) wurde dazu mittels National-Instruments-Steckkarten auf 10 Com-Ports aufgerüstet.

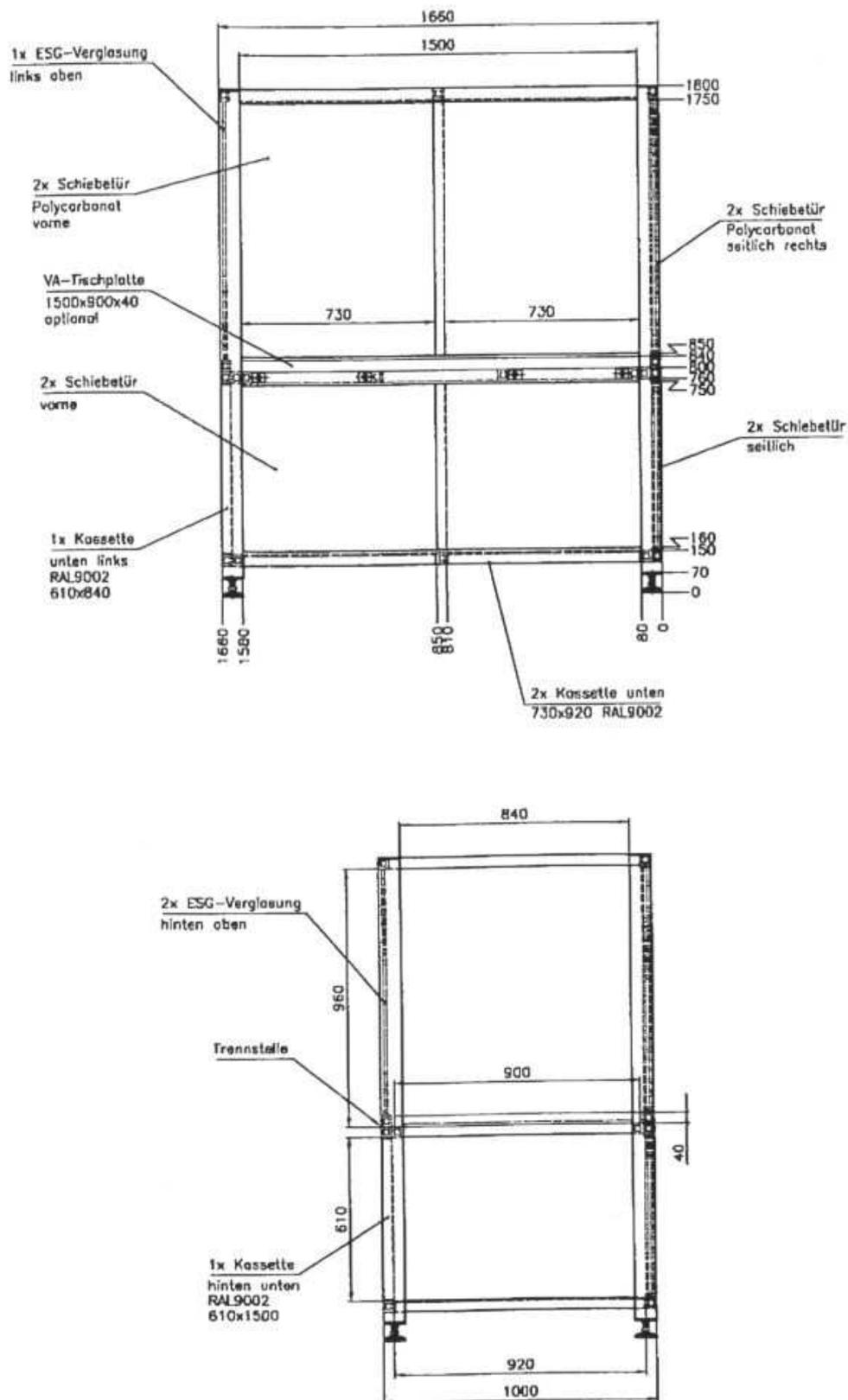


Abbildung 4.11: Schematische Front- (oben) und Seitenansicht (unten) der Roboterkabine (Länge [mm]).

## 4.2 Gesamtsystem

Das Gesamtsystem („Prototyp des HT-Algentest“) ist in Abbildung 4.12 zu sehen. Der Steuerungs-PC, die Controller der Mikrotitrationsplattenschüttler, der Kryostat sowie die elektrische Verkabelung und die Wasserzuführungen sind im Unterbau der Anlage untergebracht.



Abbildung 4.12: Aktueller Aufbau des Algentest-Automaten im Labor des Uniklinikums der RWTH Aachen. (1): Beleuchtungseinheit, (2): Roboter-Controller, (3): Fluoreszenz-Messgerät, (4): Roboterarm, (5): Liquid-Handling Station, (6): Mikrotitrationsplattenschüttler, (7): Controller der elektronischen Pipette.

Die Anordnung der verschiedenen Komponenten auf der Plattform wird aus der schematischen Abbildung 4.13 ersichtlich. Der horizontale Arbeitsbereich des Automaten misst 900 mm x 1500 mm.

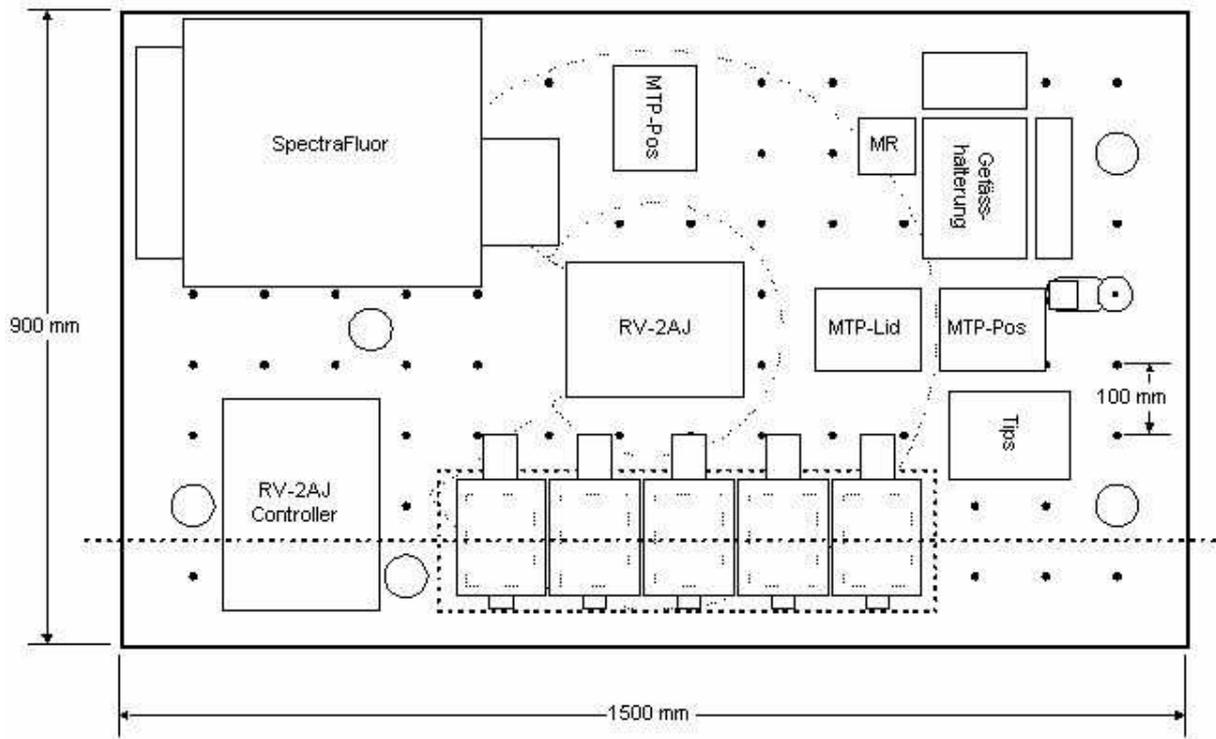


Abbildung 4.13: Draufsicht (horizontaler Arbeitsbereich) des Algentest-Automaten mit den wichtigsten Komponenten.

## 4.3 Software-Module

### 4.3.1 Steuerungs-Software

Die unter der objektorientierten Programmiersprache Delphi 5 erstellte Software „BioLane™ Supervisor“ musste in erster Linie über höchste Flexibilität verfügen, da die verschiedenen Schnittstellen-Protokolle der im Test eingesetzten Geräte verwendet werden müssen.

„BioLane™ Supervisor“ übernimmt die Ansteuerung sämtlicher Geräte und ermöglicht zudem durch eine intelligente Programmstruktur die Interaktion der Komponenten untereinander. Durch das Einbinden verschiedener programmiertypischen Strukturen (Schleifen, Bedingungen) konnte eine einfache Skriptsprache entwickelt werden, die ein schnelles Erstellen von Programmabläufen ermöglicht.

Der Programmablauf kann durch den Benutzer selbst definiert werden. Der Komplexität der Anwendung und möglichen Veränderungen der Hardware-Topologie wurde dadurch Rechnung getragen, dass dem Benutzer verschiedene Parameter- und Befehls-Editoren zur Verfügung stehen, die für jeden Applikati-

onsfall frei konfigurierbar sind. Durch einfache Konfiguration sind auf diese Weise sämtliche Versuchsparameter wie Schüttelfrequenz, Messintervall, Inkubationstemperatur usw. jederzeit modifizierbar. Hervorzuheben ist, dass die Anzahl der physischen und virtuellen Komponenten keinerlei Beschränkung unterliegt. Dadurch stellen spätere Hardware-Erweiterungen der Testplattform kein Problem dar.

Eine allgemeinere Beschreibung der Steuerungs-Software folgt in Kapitel 7. Hier soll im Weiteren nur auf die konkrete Umsetzung des HT-Algentests eingegangen werden.

Für den Testbetrieb der Anlage und den späteren Dauereinsatz wurde eine Fülle an Skripten erstellt. Ein Skript stellt dabei einen definierten Programmablauf dar, der vom einfachen Initialisieren der Inkubationseinheit bis hin zu einem kompletten 72 Stunden dauernden Algentest reichen kann. So kann zu Testzwecken jedes Gerät einzeln angesprochen werden, es stehen dem Anwender aber auch verschiedene Hauptprogramme zur Verfügung (Algentest mit verschiedenen Messintervallen, diverse Inkubationsprogramme, verschiedene Pipettiersequenzen, usw.).

Das Algentest-Hauptskript mit Liquid-Handling setzt sich schließlich aus 360 000 (!) Programm-Zeilen zusammen. Das vorliegende Werk besteht im Vergleich dazu aus 6 500 Zeilen.

Die Software überwacht außerdem ständig den Wasserfluss des Kryostaten sowie die Temperatur der in den Inkubationseinheiten integrierten Peltier-Elemente.

Sämtliche Inkubationsparameter (Temperatur, Beleuchtungsstärke, Schüttelfrequenz) werden online in mehrdimensionalen Diagrammen angezeigt. Darüber hinaus werden alle Messdaten regelmäßig über eine Datenbank-Schnittstelle exportiert.

Durch das direkte Speichern sämtlicher Teach-Positionen des Roboters als mehrdimensionale Konstanten innerhalb der Software und nicht wie üblich im Speichermodul des Roboter-Controllers, konnte zudem einen deutlich bessere Performance erreicht werden.

Über ein spezielles Kommunikations-Modul (Dispatcher) kann die gesamte Anlage letztendlich auch via Internet ferngesteuert werden.

Eine typische Benutzeroberfläche bei laufendem Programm ist in Abbildung 4.14 zu sehen.

### **4.3.2 Software zur Optimierung des Liquid-Handlings**

Da bei der Durchführung des Algentests verschiedene Proben getestet werden müssen, sind auch unterschiedliche Verdünnungsreihen mit verschiedenen Konzentrationen erforderlich.

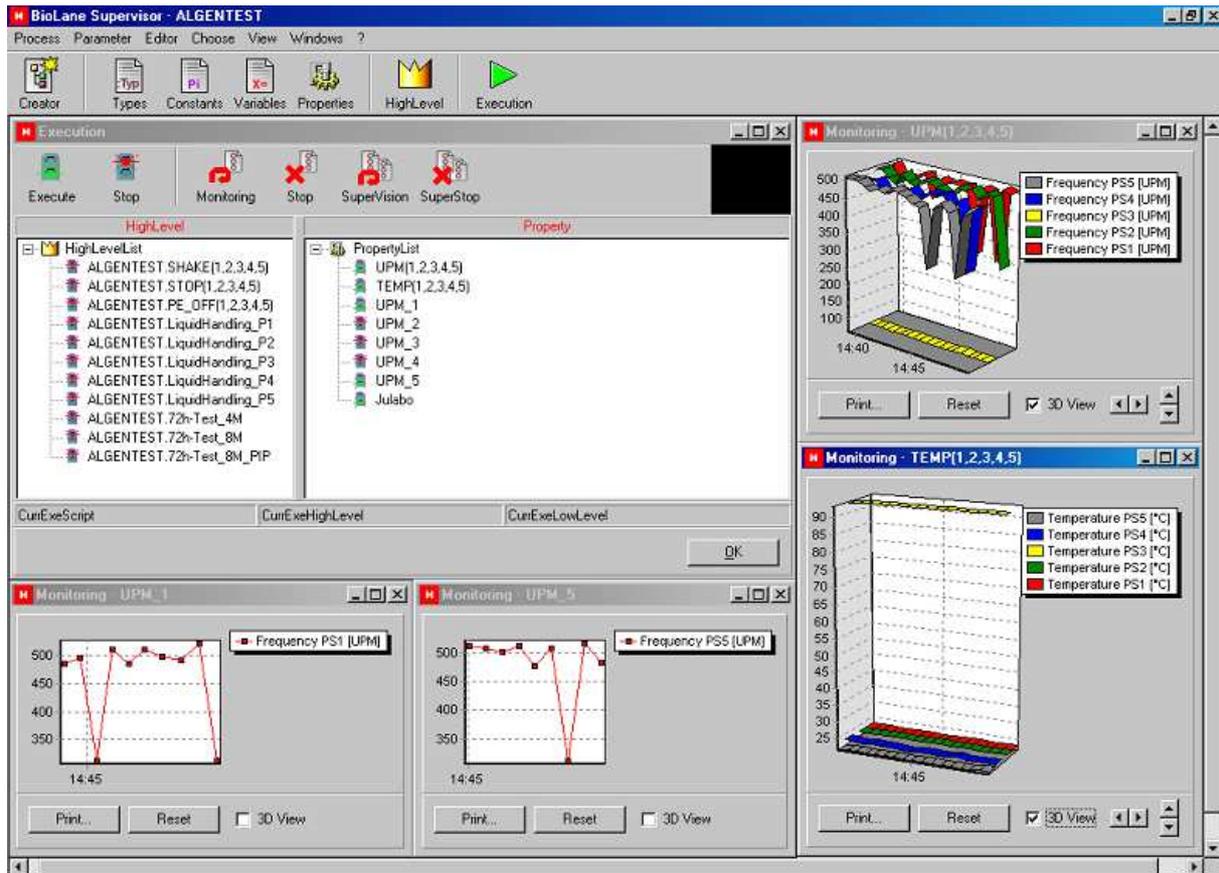


Abbildung 4.14: Benutzeroberfläche der Software „BioLane™ Supervisor“ bei laufendem Programm. Die Anzahl der darzustellenden Prozessparameter unterliegt dabei keinerlei Beschränkung.

Um ein flexibles Liquid-Handling-System zu gewährleisten, ist daher eine Berechnungs-Software entwickelt worden, die dem Benutzer erlaubt, die für die jeweilige Probe gewünschten Verdünnungsreihen einzugeben. Diese Software ist speziell auf die in Abschnitt 4.1.4 vorgestellte elektronische Pipette „Eppendorf EDOS 5222“ abgestimmt. Als Output erhält der Anwender dann die errechnete Konzentration der vorzulegenden Proben-Stammlösung. Sind mit dem verwendeten Pipettiersystem nicht alle eingegebenen Konzentrationen mit einer Stammlösung zu erreichen, wird dem Benutzer automatisch die Konzentration einer zweiten zusätzlichen Stammlösung angezeigt.

Anschließend wird vom „BioLane™ FileGenerator“ ein Dateisystem erzeugt, das sämtliche Substanz-Volumina enthält und exklusiv über die Schnittstelle der Pipettiereinheit eingelesen werden kann.

Um dem Prinzip der modularen Software-Entwicklung gerecht zu werden, ist der „BioLane™ FileGenerator“ ein eigenständiges Executable, das bei Bedarf aber auch in die Programmstruktur der Steuerungs-Software „BioLane™

Supervisor“ integriert werden kann. Hierbei wird der „BioLane™ FileGenerator“ dann automatisch an der gewünschten Stelle im Hauptprogramm (Skript) gestartet.

In Abbildung 4.15 ist die Benutzeroberfläche der „BioLane™ FileGenerator“-Software zu sehen.

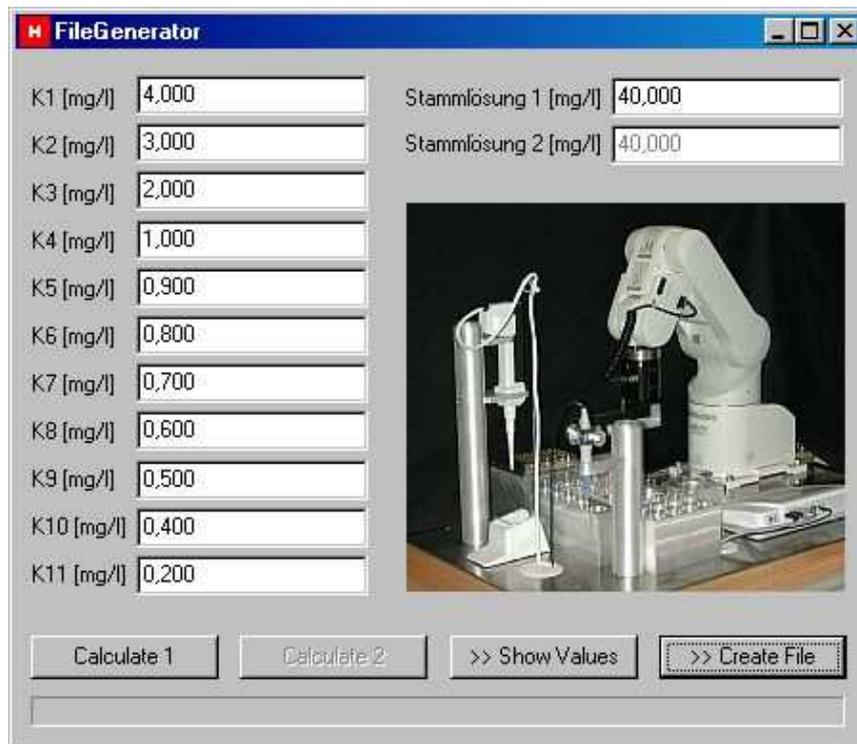


Abbildung 4.15: Benutzeroberfläche der Software „BioLane™ FileGenerator“ zur Erzeugung eines Dateisystems für die Pipettiereinheit Eppendorf EDOS 5222.

### 4.3.3 Auswertungs-Software

Grundlage für die Auswertungs-Software war eine von der RWTH Aachen erstellte Excel®-Maske. Aufgrund der damit gewonnenen Erfahrungen der verschiedenen statistischen Verfahren konnte die Software „BioLane™ Manager HTT“ erstellt werden.

Basierend auf der Open Source Datenbank Interbase® ermöglicht die Software die tabellarische Verwaltung aller Messdaten und den dazugehörigen Reports und liefert zudem eine detaillierte Übersicht über alle durchgeführten Tests.

Die von der Steuerungs-Software in die Datenbank importierten Messdaten sind die Grundlage für die dann vom Anwender vorzunehmende Auswer-

tung. Neben der grafischen Darstellung von Wachstumskurven ermöglicht die Software die statistische Auswertung der Testdaten nach den in Kapitel 3.3 vorgestellten Methoden (Endpunkt, Biomasseintegral, Wachstumsrate) mit anschließender Probitanalyse.

In Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17 sind Aufnahmen der Software bei der Auswertung eines Algentests mit Kaliumdichromat zu sehen.

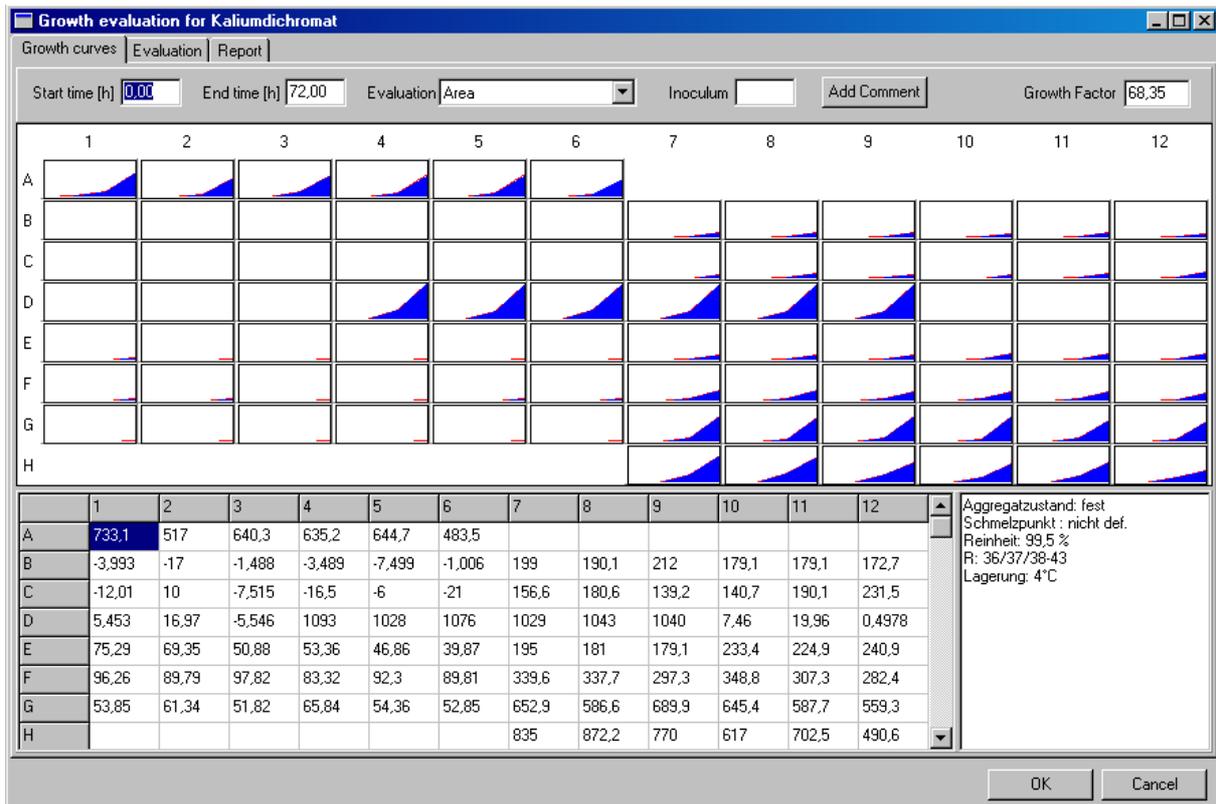


Abbildung 4.16: Datenauswertung mit der Software „BioLane™ Manager HTT“ am Beispiel eines Algentests mit Kaliumdichromat über das Biomasseintegral.

Als Ergebnis erhält der Anwender einen Report, der die ermittelten Hemmwerte, die  $EC_x$ -Werte, die Dosis-Wirkungsbeziehung und sämtliche versuchsspezifischen Daten enthält. Damit werden alle nach den entsprechenden Normen notwendigen Daten aufgezeichnet und protokolliert. Dies entspricht somit den allgemein anerkannten GLP Richtlinien.

Um auch mit alternativen Auswertungs-Programmen Test-Analysen durchführen zu können, ist jederzeit ein anderes Programm an die Interbase®-Datenbank koppelbar bzw. es kann auch direkt mit den in ASCII-Dateien vorliegenden Rohdaten gearbeitet werden.

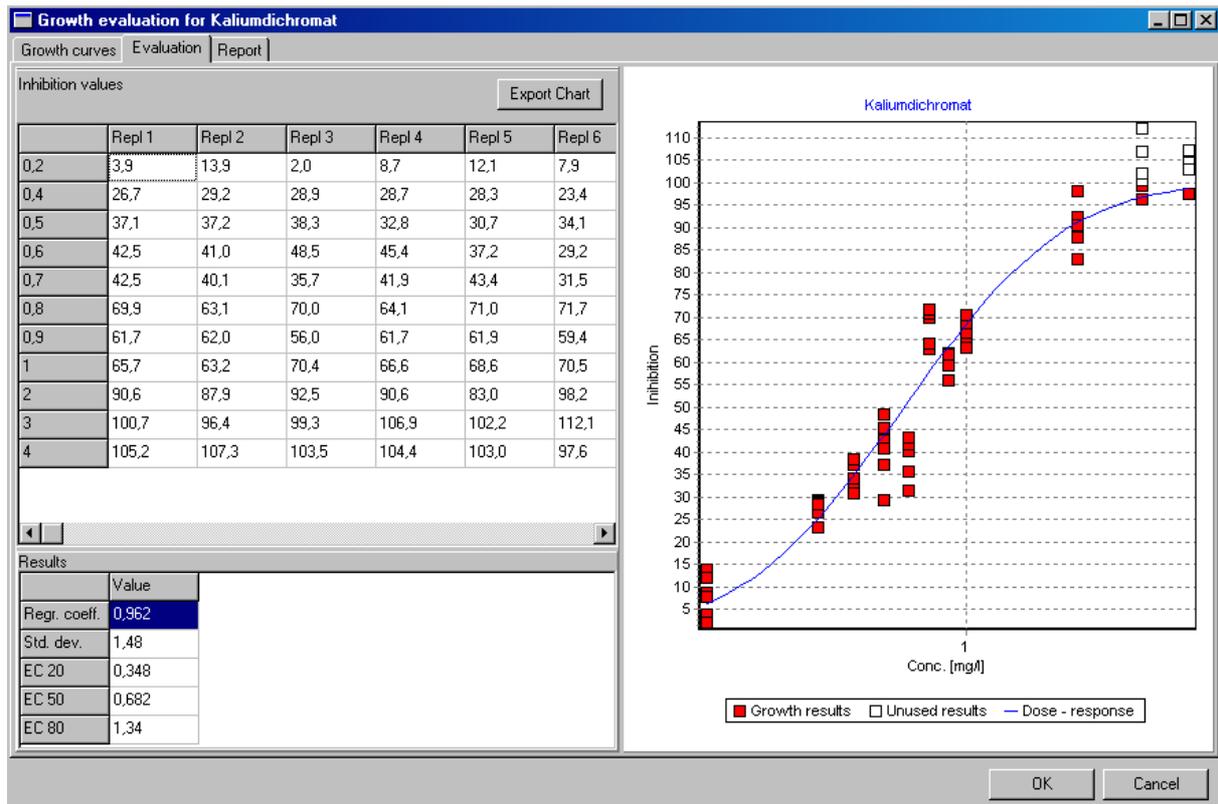


Abbildung 4.17: Ergebnisse bei der Auswertung eines Algentests mit Kaliumdichromat. Rechts ist die grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zu sehen, „Inhibition values“ in % und EC-Werte in mg/l.

Die verschiedenen Komponenten der Auswertungs-Software und deren Zusammenspiel sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

#### 4.3.4 Interaktion der Software-Module

Das Zusammenspiel zwischen Auswertungs- und Steuerungs-Software ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Über eine binäre Datei (\*.cpl) erhält die Steuerungs-Software sämtliche benötigte Informationen zur Kommunikation mit den verschiedenen Geräten. Die eigentliche Steuerung läuft dabei über das integrierte Dispatcher-Modul (siehe auch Abschnitt 7.1.1). Dieses ist dann auch für den Datenfluss in die Datenbank verantwortlich. Auf die Datenbank wiederum hat die Auswertungs-Software Zugriff, die nach erfolgreicher Messdatenverarbeitung die Daten wieder in die Datenbank zurückschreibt.

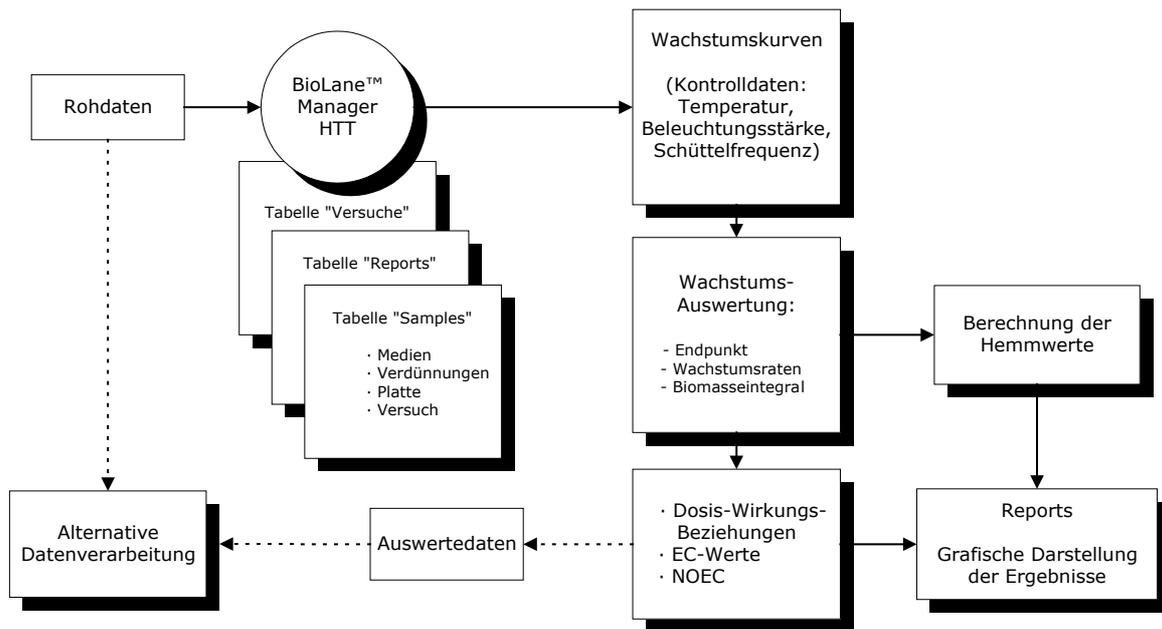


Abbildung 4.18: Gesamt-Konzept der Auswertungs-Software „BioLane™ Manager HTT“.

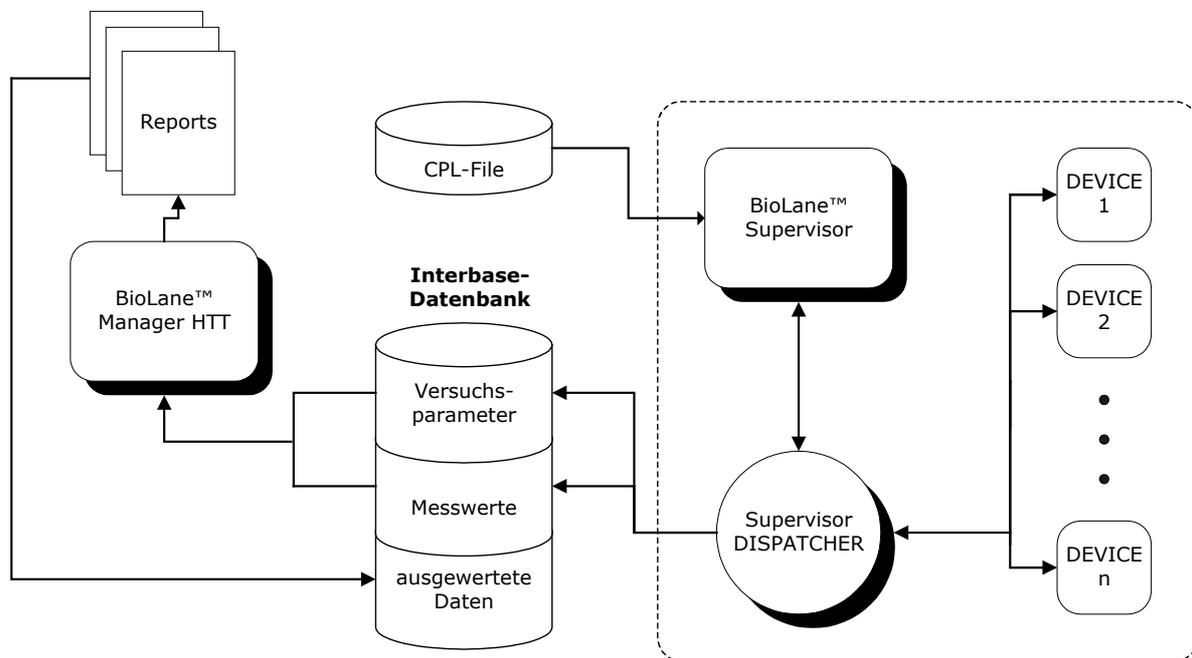


Abbildung 4.19: Zusammenspiel zwischen Auswertungs- und Steuerungs-Software. Das Dispatcher-Modul ist für die eigentliche Kommunikation mit den Geräten sowie der Datenbank verantwortlich.

## **4.4 „Vollautomatisierter High-Throughput-Algentest“**

Zur Demonstration des Automaten sei hier auf den Film „Vollautomatisierter High-Throughput-Algentest“ verwiesen, der in Zusammenarbeit mit dem audiovisuellen Medienzentrum der RWTH Aachen entstanden ist. Dem Leser steht hier eine digitalisierte Form im \*.mpg-Format zur Verfügung (CD 4.1).



*CD 4.1: „Vollautomatisierter High-Throughput-Algentest“.*



# Kapitel 5

## Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Voruntersuchungen

#### 5.1.1 Quantifizierung der Algen

Das Wachstum der Algen muss vor, während und nach der Inkubation bestimmt werden. Diese Quantifizierung kann direkt durch Auszählung der Algen oder durch indirekte Verfahren wie die Bestimmung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz erfolgen. Im Hinblick auf eine sinnvolle Automatisierung des Testverfahrens, kommt eigentlich nur eine Quantifizierung der Algen durch Fluoreszenz- oder Absorptions-Messung (Photometrie) mittels eines geeigneten Detektionssystems in Frage.

Für die Übertragung der Testansätze auf 96-Well-Mikrotitrationsplatten und den Vergleich der Ergebnisse mit den anderen Ansatzgrößen wurden zunächst einige grundlegende Untersuchungen zur Quantifizierung von Algen über die Chlorophyll-Fluoreszenz durchgeführt: Es wurden bei hohen Algenkonzentrationen die Linearität und die Standardabweichungen bei der Quantifizierung der Algen mittels Fluoreszenz und Photometrie miteinander verglichen. In Abbildung 5.1 ist die Beziehung zwischen der Fluoreszenz bzw. der optischen Dichte (Extinktion) und der Algenkonzentration für 24-Well-Mikrotitrationsplatten und zwei Arten von 96-Well-Mikrotitrationsplatten dargestellt. Bei den 96-Well-Mikrotitrationsplatten handelt es sich um Optiplate II-Mikrotitrationsplatten, die von der Firma Labsystems leicht modifiziert worden sind („alte“ Platte und „neue“ Platte).

Die Daten belegen die annähernd lineare Abhängigkeit sowohl der Fluoreszenz als auch der optischen Dichte von der Algenkonzentration bei hohen Konzentration bis  $10^6$  Algen/mL. Es zeigt sich aber auch, dass die Standardabweichung der Messwerte in 96-Well-Platten wesentlich geringer ist als in den 24-Well-Platten. Die 96-Well-Mikrotitrationsplatten scheinen gut

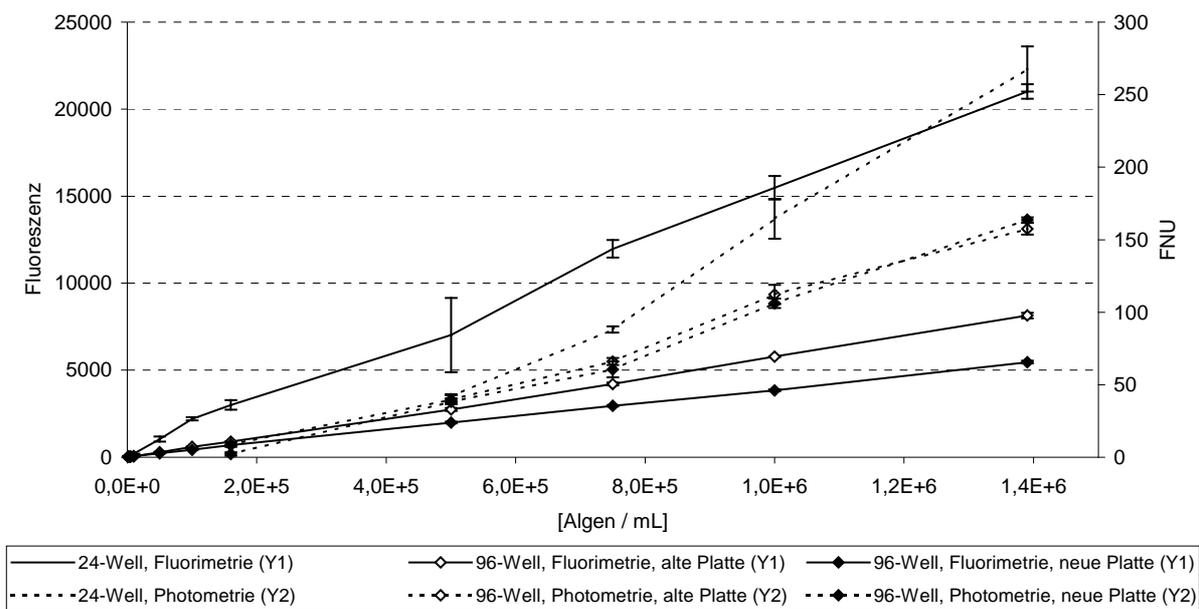


Abbildung 5.1: Abhängigkeit der Fluoreszenz bzw. Extinktion (angegeben als FNU) von der Algenkonzentration; Messwerterfassung mittels Tecan SPECTRAFluorPlus®.

24-Well-Platten. Die 96-Well-Mikrotitrationsplatten scheinen gut geeignet zur Quantifizierung der Algen.

Nach DIN 32645 können die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der Algenbestimmung ermittelt. Dabei wurden in Abweichung von der DIN-Norm nur die Algenkonzentrationen eingesetzt, die für den Test relevant sind ( $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Algen/ml für die Photometrie,  $1 \times 10^4$  bis  $7 \times 10^5$  Algen/ml für die Fluorimetrie). Es wurde hier zusätzlich auch das Küvettenverfahren („Erlenmeyertest“) untersucht.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte sich, dass sich die photometrische Quantifizierung der Algen in Mikrotitrationsplatten nicht eignet, um die Algenkonzentrationen zu Beginn des Tests zu quantifizieren. Dies gilt auch für den photometrischen Nachweis in 10 mm Küvetten. Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der Photometrie lassen sich nur bedingt interpretieren, da nach dem DIN-Verfahren höhere Algenkonzentrationen eingesetzt werden müssten und die angegebenen Werte nur als Näherungswerte anzusehen sind. Die höheren Algenkonzentrationen sind für den Test jedoch nicht relevant.

Bei der Quantifizierung der Algen über die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz werden um den Faktor 1000 höhere Steigungen erfasst, und die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen sind dadurch wesentlich niedriger. Dabei zeigt sich auch, dass die Mikrotitrationsplattenverfahren hinsichtlich der Empfindlichkeit vergleichbar mit dem Küvettenverfahren sind. Die am Anfang ein-

gesetzten Algenkonzentrationen können problemlos erfasst werden. Das Tecan SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup>-Messgerät ist dabei etwas empfindlicher als der Fluorocan Ascent.

Unterschiede in den Ergebnissen können entstehen, wenn die in-vivo-Fluoreszenz als indirekte Methode nicht mit der Zellzahlbestimmung (direkte Methode) übereinstimmt. Dieser Vergleich ist in Abbildung 5.2 für das Kontrollwachstum im Erlenmeyerkolben (100 ml) dargestellt.

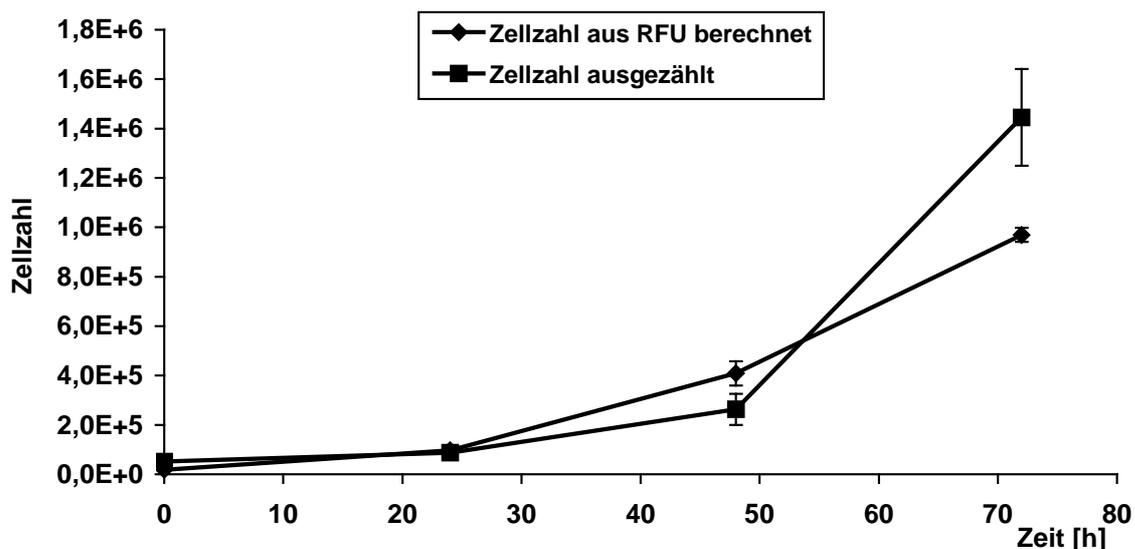


Abbildung 5.2: Wachstumskurven der Kontrollen im herkömmlichen „Erlenmeyertest“ in Abhängigkeit der Detektionsmethode über Zellzahl- und Fluoreszenzbestimmung.

Die Fluoreszenz-Werte sind über eine Kalibrierung in Zellzahlen umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Beide Kurven weisen ein exponentielles Wachstum der Algen auf, wobei das der Zellzahlbestimmung ausgeprägter ist. Die Unterschiede deuten dabei auf eine verringerte Fluoreszenzaktivität der Algen nach 72 h hin. Die Fluoreszenzbestimmung ermöglicht aber eine deutlich geringere Standardabweichung der Daten. Dadurch ist eine höhere Genauigkeit in der Berechnung der Hemmwerte möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Algentest in Mikrotitrationsplatten nicht mit photometrischer Quantifizierung der Algen durchgeführt werden kann, aber dass sich die fluorimetrische Methode hierzu sehr gut eignet. Eine Auszählung der Algen in den Mikrotitrationsplatten ist aus technischen Gründen bei der Automatisierung des Algentests nicht einsetzbar und weist auch

keine signifikanten Vorteile auf. Somit ist die Quantifizierung der Algen über die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz die Methode der Wahl.

## 5.1.2 Problematik der Verdunstung

Während der Testdauer von 72 h kann durch natürliche Evaporation, Wärmeeinstrahlung und Konvektion ein Teil der eingesetzten Mineralsalzlösung verdunstet. Dadurch ergibt sich eine Aufkonzentrierung schwerflüchtiger Verbindungen wie anorganischer Salze oder bei flüchtigen Verbindungen ein Verlust der Testsubstanz. Als Folge kann das Testergebnis verfälscht werden. Diese Verdunstung kann bei einer Verringerung der Testansatzgröße von 100 ml auf 200  $\mu$ l prozentual zum Gesamtansatz ebenfalls große Ausmaße annehmen.

Im Folgenden werden quantitative Überlegungen zu den verschiedenen Verdunstungsvorgängen angestellt.

### 5.1.2.1 Natürliche Evaporation

Die Evaporationsrate  $E$  (Rate der Wasserdampfabgabe pro Quadratmeter pro Stunde), die infolge eines Unterschieds der Feuchtigkeitsgehalte der gesättigten Luft  $X_s$  an der Oberfläche und dem Feuchtigkeitsgehalt in großer Entfernung  $X_\infty$  zustande kommt, wird wie folgt beschrieben [48]:

$$E = \sigma \cdot (X_s - X_\infty). \quad (5.1)$$

$\sigma$  [ $\text{kg}/\text{m}^2\text{h}$ ] ist der Verdunstungskoeffizient oder Wasserdampfübergangskoeffizient.

Da bei Zustandsänderungen feuchter Luft im Allgemeinen die Masse  $m_L$  der trockenen Luft konstant bleibt, die Wassermasse (Dampfmasse)  $m_D$  sich jedoch durch Kondensieren und Verdampfen ändert, ist der Wassergehalt durch die Gleichung

$$X = m_D / m_L \quad (5.2)$$

definiert. Solange der Partialdruck  $p_D$  des Wasserdampfes kleiner als der Sättigungsdruck  $p_s$  bei der Temperatur der feuchten Luft ist, lassen sich die Partialdrücke nach der Zustandsgleichung idealer Gase berechnen:

$$p_D = m_D R_D \frac{T}{V} \quad (5.3)$$

und

$$p_L = m_L R_L \frac{T}{V}. \quad (5.4)$$

$T$  ist die Temperatur und  $V$  das Volumen der feuchten Luft. Daraus folgt, da im Gemisch Wasserdampf und trockene Luft die gleiche Temperatur haben und den gleichen Raum einnehmen:

$$m_D = p_D / R_D \quad (5.5)$$

und

$$m_L = p_L / R_L . \quad (5.6)$$

Aus den Gleichungen (5.2), (5.5) und (5.6) errechnet sich der Wassergehalt zu

$$X = \frac{m_D}{m_L} = \frac{R_L}{R_D} \frac{p_D}{p_L} . \quad (5.7)$$

Die Gaskonstanten sind  $R_L = 287,14 \text{ J/kg K}$  und  $R_D = 461,65 \text{ J/kg K}$ . Damit folgt:

$$X = \frac{287,14}{461,65} \frac{p_D}{p_L} = 0,622 \frac{p_D}{p_L} . \quad (5.8)$$

Mit  $p = p_L + p_D$  ergibt sich allgemein:

$$X = 0,622 \frac{p_D}{p - p_D} . \quad (5.9)$$

Mit  $p_D = p_s$  errechnet sich der Wassergehalt  $X_s$  der gesättigten feuchten Luft an der Wasseroberfläche zu

$$X_s = 0,622 \frac{p_s}{p - p_s} . \quad (5.10)$$

Um den Verdunstungskoeffizienten  $\sigma$  in Gleichung (5.1) zu bestimmen, verwenden wir das Gesetz von Lewis. Demzufolge ist das Verhältnis aus Wärmeübergangskoeffizient  $\alpha$  und Verdunstungskoeffizient  $\sigma$  eine konstante Größe und entspricht der mittleren Wärmekapazität feuchter Luft  $c_{pL}$ . Dieses Gesetz gilt für die Verdunstung von Wasser in Luft; die mittlere Wärmekapazität feuchter Luft  $c_{pL}$  beträgt  $1,05 \text{ kJ/g K}$  [48]:

$$\frac{\alpha}{\sigma} = c_{pL} = 1,05 \text{ kJ / kg K} . \quad (5.11)$$

Wir bestimmen den Verdunstungskoeffizienten  $\sigma$  indirekt mit Hilfe von Gleichung (5.11). Der gesuchte Wärmeübergangskoeffizient  $\alpha$  ist zusammen mit der

Wärmeleitfähigkeit  $\kappa$  und einer charakteristischen Länge  $l$  eines Körpers (Rohrdurchmesser, Wandhöhe, etc.) mit der Nußelt-Zahl  $Nu$  verknüpft [49]:

$$Nu = \frac{\alpha \cdot l}{\kappa}. \quad (5.12)$$

Beschränken wir uns auf den Fall der freien Konvektion so gilt

$$Nu = f(Gr, Pr). \quad (5.13)$$

Dabei ist  $Pr$  die Prandtl-Zahl. Sie enthält die Stoffwerte kinematische Viskosität  $\nu$  und die Temperaturleitzahl  $a$ :

$$Pr = \frac{\nu}{a}. \quad (5.14)$$

Die Grashof-Zahl  $Gr$  gibt das Verhältnis der Auftriebskräfte zu den Zähigkeitskräften in der Strömung wieder. Sie lautet

$$Gr = \frac{gl^3 \frac{\rho_\infty - \rho_w}{\rho_w}}{\nu^2}. \quad (5.15)$$

Hierin bedeuten

$$l \frac{\rho_\infty - \rho_w}{\rho_w} \quad (5.15a)$$

die spezifische Auftriebsenergie eines wandnahen Massenelements mit  $l$  als der charakteristischen Länge des betrachteten Körpers,  $\rho_w$  als der Dichte des Mediums unmittelbar an der Körperoberfläche  $\rho_\infty$  und als der Dichte des wandfernen unbeeinflussten Mediums. Die kinematische Viskosität ist wieder mit  $\nu$  bezeichnet,  $g$  steht für die Fallbeschleunigung.

Im Grenzfall schleichender Bewegung, wenn für die Ausbildung der Grenzschicht nur Auftrieb und Viskosität maßgeblich sind, gilt

$$Nu = f(Gr \cdot Pr). \quad (5.16)$$

Für den Wärmeübergang an einer Platte der Seitenlänge  $l$  mit konstanter Oberflächentemperatur ergibt sich als Lösung der Grenzschichtgleichungen bei laminarer Luftbewegung allein durch Temperaturunterschiede nach *E. Schmidt* und *W. Beckmann* [50]:

$$Nu = 0,517 (Gr \cdot Pr)^{1/4}. \quad (5.17)$$

Die Grashofzahl ist hier

$$Gr = \frac{gl^3 \beta (T_W - T_\infty)}{\nu^2} \quad (5.18)$$

mit  $\beta$  als der räumlichen Wärmeausdehnungszahl (für ideale Gase ist  $\beta = 1/T_\infty$ ) und den Temperaturen  $T$  in weitem Anstand von der Körperoberfläche und in ihrer unmittelbaren Nähe.

Es soll nun die Verdunstungsmenge, verursacht durch die natürliche Evaporation, bei einer 96-Well-Mikrotitrationsplatte in unserer Versuchsumgebung abgeschätzt werden. Wir betrachten dazu die freie Wasseroberfläche der Mikrotitrationsplatte, die bei einem Well-Durchmesser von 6 mm in etwa einem Quadrat mit der Kantenlänge  $l = 52$  mm entspricht.

Die folgenden Stoffwerte der Luft sind auf eine Temperatur  $T = 21$  °C und einen Druck  $p = 1$  bar bezogen. Die benötigten Stoffwerte lauten nach [49]:  $\nu = 15,2 \cdot 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s;  $\beta = 3,41 \cdot 10^{-3}$  1/K;  $\kappa = 26,1 \cdot 10^{-3}$  W/m K;  $Pr = 0,70$ . Die Temperatur des Wassers beträgt während der Versuchsdurchführung konstant  $T_W = 23$  °C. Zusammen mit  $g = 9,81$  m/s<sup>2</sup> ergibt sich so für die Grashof-Zahl nach Gleichung (5.18)

$$Gr = \frac{9,81 \cdot (52 \cdot 10^{-3})^3 \cdot 3,41 \cdot 10^{-3} \cdot 2}{(15,2 \cdot 10^{-6})^2} = 40717,04. \quad (5.19)$$

Aus Gleichung (5.17) folgt damit für die Nußelt-Zahl

$$Nu = 0,517 (40717,04 \cdot 0,70)^{1/4} = 6,72. \quad (5.20)$$

Für die Wärmeübergangszahl  $\alpha$  erhält man somit nach Gleichung (5.12)

$$\alpha = \frac{6,72 \cdot 26,1 \cdot 10^{-3}}{52 \cdot 10^{-3}} \frac{W}{m^2 K} = 3,37 \frac{W}{m^2 K}. \quad (5.21)$$

Mit Hilfe von Gleichung (5.11) erhält man den gesuchten Verdunstungskoeffizienten  $\sigma$ :

$$\sigma = \frac{3,37}{1050} \frac{kg}{m^2 s} = 11,55 \frac{kg}{m^2 h}. \quad (5.22)$$

Der Sättigungsdampfdruck  $p_s$  von Wasser bei 23 °C bzw. bei 21 °C beträgt 29 mbar bzw. 25 mbar [49]. Die relative Feuchtigkeit  $\varphi$  ist definiert als Quotient aus Partialdruck  $p_D$  des Wasserdampfes und des Sättigungsdampfdruckes  $p_s$ :

$$\varphi = \frac{p_D}{p_s}. \quad (5.23)$$

Die Abhängigkeit der Evaporationsrate  $E$  von der relativen Feuchtigkeit  $\varphi$  und der Lufttemperatur ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Man erkennt eine Abnahme der Evaporationsrate mit steigender Luftfeuchtigkeit und steigender Temperatur.

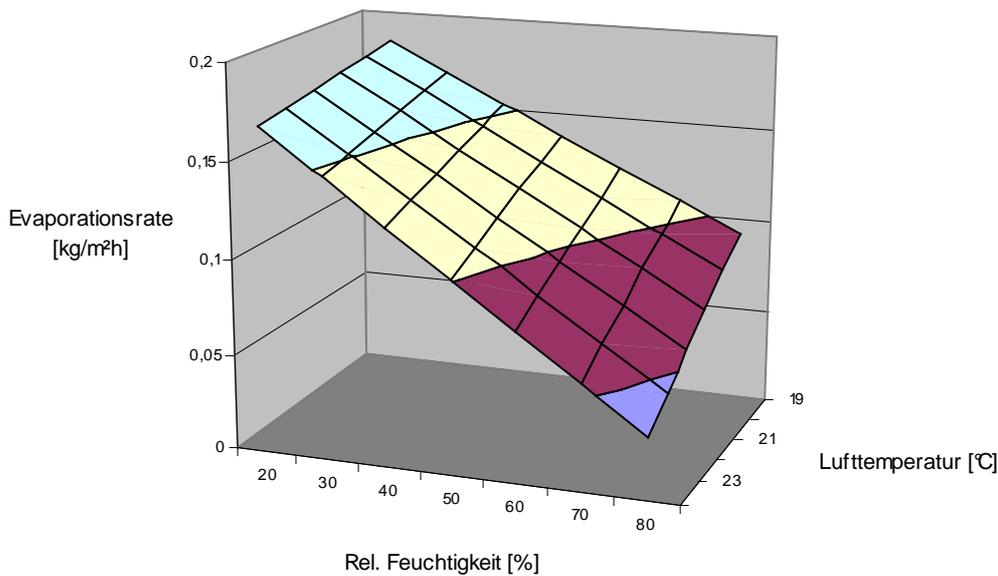


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Evaporationsrate von der relativen Feuchtigkeit und der Lufttemperatur.

Bei einer gemessenen relativen Feuchtigkeit von 60 % können mit Hilfe der Gleichungen (5.9), (5.10) und (5.22) die Feuchtigkeitsgehalte  $X_s$  und  $X_\infty$  berechnet werden:

$$X_s = 0,622 \cdot \frac{29 \cdot 10^{-3}}{1 - 29 \cdot 10^{-3}} = 0,0186; \quad (5.24)$$

$$X_\infty = 0,622 \cdot \frac{0,6 \cdot 25 \cdot 10^{-3}}{1 - 0,6 \cdot 25 \cdot 10^{-3}} = 0,0095. \quad (5.25)$$

Wir können jetzt die Evaporationsrate  $E$  mit Hilfe von Gleichung (5.1) bei unseren Versuchsbedingungen für eine 96-Well-Mikrotitrationsplatte angeben:

$$E = 11,55 \cdot (0,0186 - 0,0095) \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \text{h}} = 0,105 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \text{h}} . \quad (5.26)$$

Bei einer Versuchsdauer von 72 Stunden und einer Fläche von  $96\pi(3 \cdot 10^{-3})^2 \text{ m}^2 = 2,71 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$  ergibt sich eine Verdunstungsmenge  $V$  von

$$V = 0,105 \cdot 72 \cdot 2,71 \cdot 10^{-3} \text{ kg} = 0,0205 \text{ kg} = 20,5 \text{ g} . \quad (5.27)$$

Dies bedeutet eine vollständige Verdunstung der Testansätze während der Versuchsdurchführung.

Zusätzlich wollen wir noch den Einfluss der Wärmeströme der Wärmestrahlung und der Konvektion betrachten, die aufgrund der in Abschnitt 4.1.2.2 besprochenen Beleuchtungseinheit entstehen.

### 5.1.2.2 Verdunstung durch Wärmestrahlung

Bei der Wärmestrahlung verwandelt sich die innere Energie eines Körpers an seiner Oberfläche in elektromagnetische Energie, die sich in Form elektromagnetischer Wellen in den umliegenden Raum ausbreitet. Man nennt diesen Vorgang die Emission der Wärmestrahlung. Da jeder Festkörper bei einer Temperatur  $T \neq 0 \text{ K}$  Energie durch Strahlung emittiert und absorbiert, ergibt sich zwischen Oberflächen fester Körper mit verschiedenen Temperaturen ein durch Strahlung hervorgerufener Wärmefluss.

Nach dem Gesetz von *Stefan-Boltzmann* ist der Wärmestrom, der von der Fläche  $A$  eines absolut schwarzen Körpers mit der Temperatur  $T$  ausgestrahlt wird:

$$\dot{Q} = C_S A T^4 . \quad (5.28)$$

Hierbei ist  $C_S = 5,67 \cdot 10^{-8} \text{ W/m}^2 \text{K}^4$  die Strahlungskonstante des absolut schwarzen Körpers.

Nach dem Kirchhoffschen Gesetz gilt für die im Temperaturgleichgewicht mit der Umgebung stehende Oberfläche, dass der Emissionsgrad  $\varepsilon$  gleich dem Absorptionsgrad  $\alpha$  ist. Im Nichtgleichgewicht gilt dieses Gesetz auch für schwarze und graue Oberflächen. Für einen schwarzen Körper ist der Emissionsgrad  $\varepsilon = 1$ . Die Strahlung wirklicher Oberflächen hat im Allgemeinen eine andere Verteilung über die Wellenlängen als die des grauen Körpers. Für die Berechnung der Wärmeübertragung genügt es jedoch in vielen Fällen, Körper als grau zu betrachten, also das Emissionsverhältnis für jede Wellenlänge als gleich anzusehen.

Bei Wärmeaustausch durch Strahlung haben wir es in der Regel mit zwei Körpern zu tun, von denen nicht nur der wärmere den kälteren, sondern auch der

kältere den wärmeren bestrahlt. Die übertragene Wärme ist die Differenz der jeweils absorbierten Anteile dieser beiden Strahlungsbeträge. Der zwischen der Fläche  $A_1$  und der Fläche  $A_2$  ausgetauschte Wärmestrom ergibt sich bei Vernachlässigung wechselseitiger Reflexionen zu

$$\dot{Q}_{12} = \varphi_{12} \varepsilon_1 \varepsilon_2 A_1 C_S T_1^4 - \varphi_{21} \varepsilon_1 \varepsilon_2 A_2 C_S T_2^4 . \quad (5.29)$$

Die dimensionslosen Größen  $\varphi_{12}$  bzw.  $\varphi_{21}$  werden Einstrahlzahlen genannt, die definiert sind zu

$$\varphi_{12} = \frac{1}{\pi A_1} \iint_{A_1 A_2} \frac{\cos \beta_1 \cos \beta_2}{s^2} dA_1 dA_2; \quad \varphi_{21} = \frac{A_1}{A_2} \varphi_{12} . \quad (5.30)$$

Hierin sind  $\beta_1$  und  $\beta_2$  die Winkel zwischen der Verbindungslinie der Länge  $s$  zwischen zwei Elementen  $dA_1$  und  $dA_2$  beider Oberflächen und deren Flächennormalen. Mit Hilfe von den Gleichungen (5.30) lässt sich für  $\dot{Q}_{12}$  auch schreiben

$$\dot{Q}_{12} = \varphi_{12} A_1 \varepsilon_1 \varepsilon_2 C_S (T_1^4 - T_2^4) . \quad (5.31)$$

Eines der Hauptprobleme von Strahlungsaustauschrechnungen liegt in der Beschaffung dieser Einstrahlzahlen. Da es sich dabei um die Auswertung rein geometrischer Beziehungen handelt, liegen für verschiedene geometrische Konfigurationen berechnete Winkelverhältnisse in großer Zahl vor. So gilt für den einfachen Fall einer Ebene, die parallel zu einem Flächenelement  $\Delta A_1$  und groß im Verhältnis zum Abstand ist [49]:

$$\varphi_{12} = 1 . \quad (5.32)$$

Zusammen mit den Temperaturen  $T_1 = 23 \text{ }^\circ\text{C}$  (Wassertemperatur) und  $T_2 = 40 \text{ }^\circ\text{C}$  (Oberflächentemperatur der Leuchtstoffröhren), den dazugehörigen Emissionsverhältnissen  $\varepsilon_1 = 0,97$  (Wasser) und  $\varepsilon_2 = 0,88$  (Glas) bei den jeweiligen Temperaturen [49] sowie mit den oben gemachten Annahmen können wir den Wärmefluss nach Gleichung (5.31) berechnen. Die Fläche  $A_1$  ist hier wieder  $2,71 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ .

$$\begin{aligned} \dot{Q}_{12} &= 1 \cdot 2,71 \cdot 10^{-3} \cdot 0,97 \cdot 0,88 \cdot 5,67 \cdot 10^{-8} (296^4 - 313^4) \text{ W} \\ &= -0,252 \text{ W} . \end{aligned} \quad (5.33)$$

Das negative Vorzeichen gibt an, dass der Wärmestrom auf die Wasseroberfläche gerichtet ist.

Da die spezifische Verdunstungsenthalpie einer Flüssigkeit bei gleichen Druckverhältnissen genauso groß ist wie die spezifische Verdampfungsenthal-

pie, können wir zusammen mit der spezifischen Verdampfungsenthalpie  $r_{H_2O} = 2,45 \cdot 10^6 \text{ J/kg}$  von Wasser bei einem Druck  $p = 1 \text{ bar}$  und einer gegebenen Versuchsdauer  $t$ , die während des Versuchs verdunstete Wassermenge berechnen. Für die Verdunstungsmenge  $V$  gilt in unserem Fall:

$$V = \frac{\int \dot{Q}_{12} dt}{r_{H_2O}} = \frac{0,252 \cdot 72 \cdot 3600}{2,45 \cdot 10^6} \text{ kg} = 0,0267 \text{ kg} = 26,7 \text{ g} . \quad (5.34)$$

### 5.1.2.3 Verdunstung durch freie Konvektion

Der häufigste Anwendungsfall für den Wärmeübergang ist die Wärmeübertragung zwischen einem Flüssigkeits- oder Gasraum und einem festen Körper, der diesen Raum begrenzt. Berührt beispielsweise ein Stoff (Gas oder Flüssigkeit) eine wärmere Wand, so nimmt die unmittelbar an der Wandfläche anliegende Schicht des Stoffes Wärmeenergie von der Wand auf. Durch die Strömung des Stoffes wird diese thermische Bewegungsenergie in kürzerer Zeit den entfernten Gebieten des Stoffes zugeführt, als dies ohne Bewegung des Stoffes geschehen würde (reine Wärmeleitung). Man beobachtet, dass die Temperatur von der Temperatur des Stoffraumes, der Freistromtemperatur  $T_\infty$ , in einer dünnen Grenzschicht auf die Temperatur der Wandoberfläche  $T_W$  ansteigt.

Wird das Gas oder die Flüssigkeit durch einen Ventilator oder eine Pumpe an der Wand vorbeigeführt, so spricht man vom Wärmeübergang durch erzwungene Konvektion.

Bewegt sich dagegen das Gas oder die Flüssigkeit allein durch Dichteunterschiede, so bezeichnet man diese Art des Wärmeübergangs als Wärmeübergang durch freie Konvektion. An einem Heizkörper z. B. nimmt die angrenzende Luftschicht Wärmeenergie auf und steigt infolge der Dichteunterschiede zwischen erwärmter und kühler Luft auf.

Wichtige Einflussgrößen des Wärmeübergangs sind: Strömungszustand (laminar oder turbulent), Druck, Temperatur des Stoffes, Form und Abmessungen der Wand u. a. m.

Der übertragene Wärmestrom  $\dot{Q}_{Konvektion}$  ist proportional der Temperaturdifferenz von Freistromtemperatur  $T_\infty$  und Wandtemperatur  $T_W$ , der übertragenden Fläche  $A$  und der Wärmeübergangszahl  $\alpha$ , die alle übrigen Einflussfaktoren umfasst [48]:

$$\dot{Q}_{Konvektion} = \alpha A (T_\infty - T_W) . \quad (5.35)$$

Für die Bestimmung der Wärmeübergangszahl  $\alpha$  gelten hier die gleichen Überlegungen wie in den Gleichungen (5.12) bis (5.18).

Die benötigten Stoffwerte der Luft sind hierbei auf eine mittlere Temperatur  $\bar{T}$  (Gleichung (5.36)) und einen Druck  $p = 1 \text{ bar}$  bezogen:

$$\bar{T} = \frac{T_{\infty} + T_W}{2} = \frac{313 + 296}{2} \text{ K} = 304,5 \text{ K} . \quad (5.36)$$

Die benötigten Stoffwerte sind dann:  $\nu = 16,16 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ;  $\beta = 3,29 \cdot 10^{-3} \text{ 1/K}$ ;  $\kappa = 26,9 \cdot 10^{-3} \text{ W/m K}$ ;  $Pr = 0,70$  [49]. Für die Grashofzahl ergibt sich betragsmäßig somit:

$$Gr = \frac{9,81 \cdot (52 \cdot 10^{-3})^3 \cdot 3,29 \cdot 10^{-3} \cdot 17}{(16,16 \cdot 10^{-6})^2} = 295420,85 . \quad (5.37)$$

Mit Gleichung (5.17) folgt damit für die Nußelt-Zahl

$$Nu = 0,517 (295420,85 \cdot 0,70)^{1/4} = 11,02 . \quad (5.38)$$

Für die Wärmeübergangszahl  $\alpha$  ergibt sich nach Gleichung (5.12)

$$\alpha = \frac{11,02 \cdot 26,9 \cdot 10^{-3}}{52 \cdot 10^{-3}} \frac{\text{W}}{\text{m}^2 \text{K}} = 5,70 \frac{\text{W}}{\text{m}^2 \text{K}} . \quad (5.39)$$

Um den gesuchten Wärmestrom berechnen zu können, setzen wir in Gleichung (5.34) für die umströmte Fläche wieder  $A = 2,71 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$  ein. Damit erhalten wir schließlich für den Wärmefluss der aufgrund freier Konvektion entsteht und auf die Mikrotitrationsplatte gerichtet ist:

$$\dot{Q}_{\text{Konvektion}} = 5,70 \cdot 2,71 \cdot 10^{-3} \cdot 17 \text{ W} = 0,263 \text{ W} . \quad (5.40)$$

Für die Verdunstungsmenge  $V$  gilt analog zu Abschnitt 5.1.2.2:

$$V = \frac{\int \dot{Q}_{\text{Konvektion}} dt}{r_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{0,263 \cdot 72 \cdot 3600}{2,45 \cdot 10^6} \text{ kg} = 0,0278 \text{ kg} = 27,8 \text{ g} . \quad (5.41)$$

#### 5.1.2.4 Gesamtverdunstung

Die Gesamt-Evaporationsrate  $E_{\text{Gesamt}}$  errechnet sich zu:

$$\begin{aligned} E_{\text{Gesamt}} &= \frac{V_{\text{nat. Evaporation}} + V_{\text{Wärmestrahlung}} + V_{\text{Konvektion}}}{A \cdot t} \\ &= \frac{0,0205 + 0,0267 + 0,0278}{2,71 \cdot 10^{-3} \cdot 72} \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \text{h}} = 0,38 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \text{h}} . \end{aligned} \quad (5.42)$$

Dabei wurden die oben berechneten Verdunstungsmengen, die freie Wasseroberfläche  $A$  sowie die Versuchsdauer  $t$  eingesetzt.

Bei unseren 96-Well-Mikrotitrationsplatten mit 200  $\mu\text{l}$ -Ansätzen, haben wir es mit einer Ausgangs-Flüssigkeitsmenge von ca. 19 g zu tun. Betrachten wir die ermittelte Gesamt-Evaporationsrate  $E_{\text{Gesamt}}$ , kommen wir zu dem Ergebnis, dass bereits nach ungefähr 18 Stunden Versuchsdurchführungen unsere komplette Einwaage verdunstet ist.

Dies deckt sich in etwa mit unseren empirischen Resultaten, wonach je nach Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit) nach 15-30 Stunden bereits eine totale Verdunstung vorlag.

Die Ansätze müssen daher unerlässlich gegen die Verdunstung durch Stopfen, Deckel oder Abdichtungen geschützt werden. Gleichzeitig muss aber der Gasaustausch für die Photosynthese der Algen gewährleistet sein.

Anzumerken ist, dass sämtliche quantitative Überlegungen sich jeweils auf Wasser als eingesetzte Flüssigkeit bezogen haben. Auch die im Folgenden gemachten Untersuchungen zu verschiedenen Abdichtungsmethoden sind der Einfachheit halber mit Wasser unternommen worden.

#### 5.1.2.5 Reduzierung der Verdunstungsmenge

Für 96-Well Mikrotitrationsplatten wurden verschiedene Abdichtungsmethoden auf die Verdunstung von Wasser getestet (Tabelle 5.1). Es wurde dabei der standardmäßig mitgelieferte Deckel aus Polystyrol eingesetzt.

*Tabelle 5.1: Verdunstung von Wasser innerhalb von drei Tagen im miniaturisierten Algentest.*

Eigenschaften der Abdichtung von 96-Well Mikrotitrationsplatten (Greiner, transparent)	Verdunstung [Gew. % H <sub>2</sub> O]
mit Deckel ohne Abdichtung	26
mit Deckel ohne Abdichtung und nach Entfernung der Abstandhalter zwischen Mikrotitrationsplatte und Deckel	16
mit Silikon zwischen Deckel und Mikrotitrationsplatte	24
mit Gummiring zwischen Deckel und Mikrotitrationsplatte	21
Spalt zwischen Deckel und Mikrotitrationsplatte mit Durapore umwickelt	19
Spalt zwischen Deckel und Mikrotitrationsplatte mit Teflonband (0,1 mm) umwickelt	16
Spalt zwischen Deckel und Mikrotitrationsplatte mit Parafilm umwickelt (im nicht automatisierten Test benutzte Methode)	3

Die Ergebnisse belegen, dass die Verdunstung bei der Verwendung von Parafilm, wie sie im nicht-automatisierten Verfahren routinemäßig erfolgt, mit 3 % sehr gering ist.

Beim automatisierten Verfahren ist diese Möglichkeit aber nicht gegeben, da der Roboterarm den Deckel zur Messung abnehmen muss. Aus diesem Grund wurden verschiedene Deckel auf Basis von Plexiglasplatten, die vom Roboterarm transportiert werden können, entwickelt, die sich im Gewicht (Höhe der Platten) und in der Art der Fräsungen zur Abdichtung der Wells in den Mikrotitrationsplatten unterscheiden. Untersuchungen zur Verdunstung und der Vermehrung der Algen wurden direkt mit dem Mikrotitrationsplattenschüttler „PolyShake“ durchgeführt und anschließend die optimalen Deckel (Abbildung 5.4) ausgewählt.



Abbildung 5.4: 96-Well-Mikrotitrationsplatte mit optimiertem Deckel für den Prototypen des HT-Algentests.

Mit diesen Deckeln wurden weitere Parameter des automatisierten HT-Algentests optimiert. Dazu zählen die Auswirkungen der Schüttlergeschwindigkeit und der Anzahl der Messpunkte auf die Verdunstung und das Algenwachstum, die in den Tabellen 6.2 und 6.3 dargestellt sind.

Tabelle 5.2: Verdunstung von Wasser innerhalb von drei Tagen mit dem Prototypen des HT-Algentests, 96-Well Mikrotitrationsplatten (Greiner, transparent) mit optimierten Deckeln in Abhängigkeit von der Schüttelgeschwindigkeit.

	Schüttler-Nr.				
	1	2	3	4	5
Geschwindigkeit [ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	300	400	500	600	700
Verdunstung [Gew. % $\text{H}_2\text{O}$ ]	4,0	4,3	2,8	4,0	4,1

*Tabelle 5.3: Vermehrungsfaktor und Gewichtsverlust innerhalb von drei Tagen mit dem Prototypen des HT-Algentests, 96-Well Mikrotitrationsplatten (Greiner, transparent) mit optimierten Deckeln in Abhängigkeit von den Einstellungen am Automaten.*

	Vermehrungs- Faktor	Verdunstung [Gew. %]
0 U·min <sup>-1</sup> , Messpunkte nach 0, 24, 48, 72 h	50 – 70	3,3
500 U·min <sup>-1</sup> , Messpunkte nach 0, 24, 48, 72 h	> 30	3,1
500 U·min <sup>-1</sup> , Messpunkte nach 0, 24, 36, 48, 54, 60, 66, 72 h	30 – 40	4,0

Zwischen Schüttlergeschwindigkeiten von 300 bis 700 U·min<sup>-1</sup> sind keine signifikanten Unterschiede in der Verdunstung zu beobachten. Alle Werte liegen in einem tolerablen Bereich von < 5 %.

Sowohl ohne als auch mit Schütteln sind ausreichende Vermehrungsfaktoren bei geringen Verdunstungsraten erreichbar. Auf das Schütteln sollte aber aus Gründen der Verteilung der Testsubstanzen und des Gasaustausches nicht verzichtet werden. Des Weiteren erhöhen zusätzliche Messpunkte nur geringfügig die Verdunstung. Deshalb wird der automatisierte HT-Algentest in der folgenden Validierungsphase bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 U·min<sup>-1</sup> und 8 Messpunkten durchgeführt.

### 5.1.3 Inkubationsparameter und Kontrollwachstum

Bezüglich der Inkubationsbedingungen müssen die Parameter Lichtintensität und Temperatur betrachtet werden, da selbst geringe Unterschiede zu Abweichungen im Wachstum identischer Ansätze führen können. Dafür sollen nach DIN 38412 L33 [29] die Abweichungen über die Stellplätze der Inkubationseinrichtung mit Kontrollansätzen überprüft werden. Die Standardabweichung darf dabei nicht mehr als 5 % betragen.

Des Weiteren darf die Temperatur während des Tests nicht mehr als  $\pm 1$  °C schwanken; der Sollwert beträgt  $(23 \pm 2)$  °C. Die Lichtintensität muss 60-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  betragen, gemessen im photosynthetisch wirksamen Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm [30].

Für die Bestimmung der Lichtintensität wurde ein LI-189 Quantum/Radiometer/Photometer mit Lichtsensor LI-190 SZ (LI-COR inc., Lincoln, NE, USA) verwendet. Dabei wurde für den „Erlenmeyeransatz“ die Lichtintensität an 13 ausgewählten Messpunkten bestimmt, die sich statistisch über den Inkubationsraum des INFORS Schüttelinkubators verteilen. Der Mittelwert betrug 71,4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  mit einem Variationskoeffizient von 12,5 %. Beim miniaturisierten Testverfahren im INFORS Schüttelinkubator wurden ebenfalls 13 Messpunkte ausgewählt, die statistisch über die zwei Schüttler verteilt sind. Dabei ergab sich ein Mittelwert von 77,5  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  mit einem Variationskoeffi-

zient von 8,8 %. Im Prototypen des HT-Algentests wurde die Lichtintensität auf der Höhe der Mikrotitrationsplatten gemessen; zusätzlich ohne den Deckel, um den Verlust durch Lichtabsorption zu erfassen. Es wurden durchschnittlich  $68,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  ohne und  $63,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  mit Deckel gemessen, wobei hier die Schwankungen über den ganzen Inkubationsbereich (fünf Schüttler) 4,6 % ohne Deckel und 4,8 % mit Deckel betragen.

Die Temperatur im Inkubationsraum der INFORS Inkubatoren ist über die Displaysteuerung auf  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt. Zur Kontrolle wurde die Temperatur innerhalb des Inkubators mit einem Thermometer gemessen. Sie betrug für den „Erlenmeyeransatz“ bei 43 Stellplätzen im Mittel  $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und schwankte um 1,1 %. Entsprechende Werte ergaben sich für den INFORS Inkubator des miniaturisierten Tests. Die Inkubationseinheit im Prototypen des HT-Algentests besteht neben der Lichtquelle aus fünf temperierbaren Schüttlern (vgl. Kap. 4.1.2). Die Schüttler sind auf  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt und weisen über die gesamte Platte eine Temperaturschwankung von  $\pm 0,3 - 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf.

Das Kontrollwachstum über den gesamten Inkubationsraum schwankt um 9,3 % beim „Erlenmeyertest“ (42 Kontrollansätze). Bei den miniaturisierten Testansätzen wurde zunächst die Pipettiergenauigkeit untersucht. Eine Algen-suspension mit ungefähr der Konzentration, die nach 72 h Wachstum vorliegt, wurde auf den Platten verteilt. Bei der 24-Well-Mikrotitrationsplatte tritt bei der Fluoreszenzmessung eine Schwankung von 2,6 % auf, bei der 96-Well-Mikrotitrationsplatte liegt diese bei 4,7 %. Anschließend wurden Wachstumskontrollen auf den Mikrotitrationsplatten angesetzt. Für 24-Well- bzw. 96-Well-Mikrotitrationsplatten traten Schwankungen der Fluoreszenz der Kontrollen nach 72 h von 5,9 % bzw. 11 % auf. Am Prototypen des HT-Algentests wurden bei Wachstumskontrollen über alle fünf Schüttler Schwankungen der Fluoreszenz nach 72 h von jeweils 8-18 % gemessen.

Nach einem weiteren Gültigkeitskriterium des AQS-Merkblatts [51] der DIN 38412 L33 darf im Test die Abweichung der 2 Kontrollansätze vom Mittelwert nicht mehr als  $\pm 7,5 \%$  betragen. Werden mehr als 2 Kontrollansätze angesetzt, so muss der Variationskoeffizient  $v \leq 0,075 \cdot \sqrt{n/(n-1)}$  sein; bei 6 Kontrollen entspricht dies 8,2 %. In dem Entwurf ISO/DIS 8692 [52] soll zukünftig der Variationskoeffizient der Wachstumsrate der Kontrollen  $< 5 \%$  sein. Eine Verschärfung der Kontrollmesswerte auf  $< 5 \%$  nach 72 h ist in Diskussion. Die Variationskoeffizienten der Fluoreszenzwerte der Kontrollen, die in die Berechnung eingehen, betragen am Beispiel ausgewählter Tests für den „Erlenmeyertest“ 2,9 %, für den 24-Well-Test 8,2 %, für den 96-Well-Test 17,8 % und für den Prototypen 12,3 %.

Die genannten Kriterien werden größtenteils eingehalten. Die Lichtintensität liegt für alle Inkubationsbereiche zwischen 60 und  $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , auch bei den Ansätzen am Automaten, wo durch die relativ massiven Mikrotitrationsplat-

tendeckel eine Lichtabsorption stattfindet. Ebenso entspricht die Temperatur den normativen Vorgaben und ist sehr konstant über die Inkubationsräume. Die Schwankungen im Verlauf eines Tests wurden nicht gemessen. Trotz dieser homogenen Bedingungen zeigen die Kontrollansätze über die gesamten Inkubationsbereiche Abweichungen, die über den Vorgaben der DIN 38412 L33 [29] liegen. Dies trifft auch für den Erlenmeyerkolbenansatz zu. Bereits bei der Messung einer Algensuspension einer Konzentration treten relativ große Schwankungen der Fluoreszenz auf, so dass bei dem Kontrollwachstum nach 72 h ein Variationskoeffizient kleiner 5 % nicht eingehalten werden kann.

## 5.2 Verschiedene Ansatzgrößen

Im Folgenden werden Dosis-Wirkungs-Beziehungen und EC-Werte von Referenztoxinen bei Variation der Ansatzgröße (100 ml im Erlenmeyerkolben, 2 ml in 24-Well-Mikrotitrationsplatten und 200  $\mu$ l in 96-Well-Mikrotitrationsplatten) vergleichend dargestellt. Die zusammen dargestellten Ergebnisse stammen jeweils aus zeitgleich hergestellten und damit identischen Testkulturen und gleichen Stammlösungen der Referenztoxinen.

### 5.2.1 Variation der Auswertungsparameter

Neben der Variation der Ansatzgrößen wurde die Fluoreszenz zum Teil parallel im Labsystems-Ascent- und im Tecan Spectrafluorplus-Fluorimeter erfasst, um den Einfluss des Messgerätes aufzuzeigen. Generell wurden die Daten über die Endpunktbestimmung, die Wachstumsrate sowie über das Biomasseintegral ausgewertet. In Abbildung 5.5 ist die Dosis-Wirkungsbeziehung von Zinkchlorid gemessen im 100 mL-Ansatz (Erlenmeyerkolben) für die verschiedenen Auswertungen dargestellt.

Deutlich ist eine Verschiebung der Ausgleichskurve nach geringeren Hemmwerten für die Auswertung über die Wachstumsrate gegenüber den Auswertungen Endpunkt und Biomasseintegral, die keine signifikanten Unterschiede aufweisen, zu beobachten. Die Steigung der Kurven sind ungefähr gleich, wobei aber die Hemmkurve berechnet über die Wachstumsrate die Tendenz hat, etwas flacher zu verlaufen. Betrachtet man dagegen die verschiedenen Ansatzgrößen bei gleicher Auswertungsmethode (Abbildung 5.6), so ist kaum ein Unterschied zwischen den Dosis-Wirkungs-Beziehungen festzustellen.

Es ergeben sich somit erhebliche Unterschiede in den Dosis-Wirkungsbeziehungen von Zinkchlorid in Abhängigkeit von der Auswertungsmethode. Diese sind größer als die, die bei der Variation der Ansatzgröße auftreten. Aus den Ausgleichskurven lassen sich stoffspezifische toxikologische Parameter, wie zum Beispiel der  $EC_{50}$ -Wert, berechnen. Diese sind Grundlage zur Beurteilung von Chemikalien gemäß der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV)

und zur Simulation von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR). Für Zinkchlorid sind in Tabelle 5.4 die  $EC_{50}$ -Werte mit Konfidenzintervallen zusammengefasst.

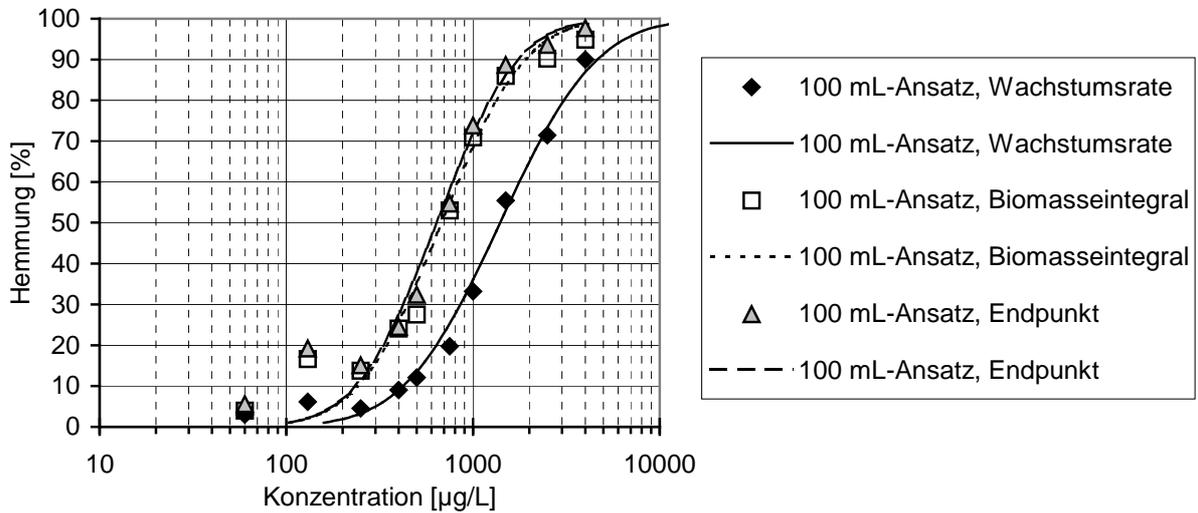


Abbildung 5.5: Sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung von Zinkchlorid bei Variation der Auswertungsparameter (Erlenmeyeransatz).

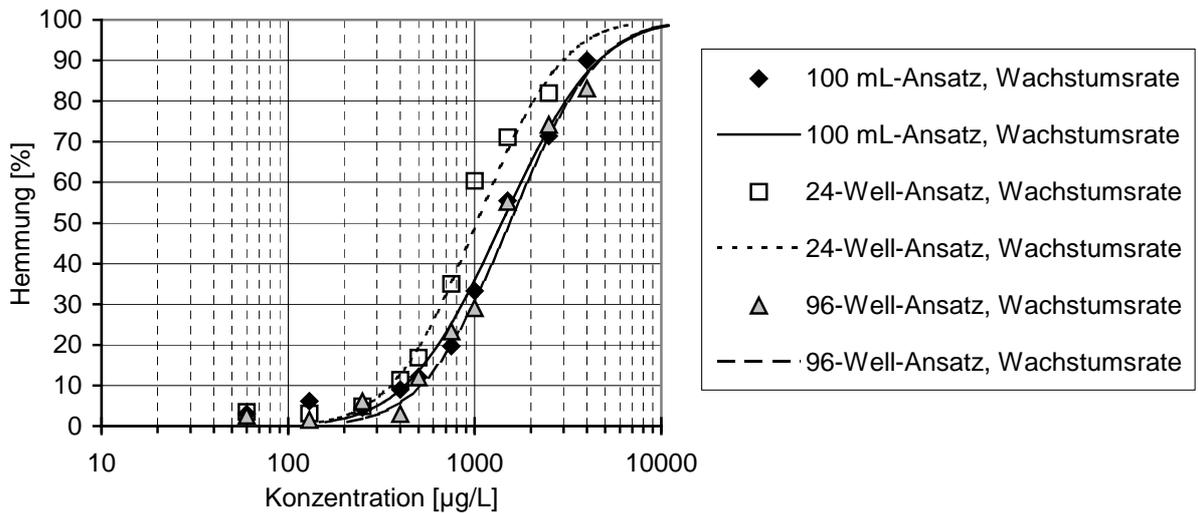


Abbildung 5.6: Sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung von Zinkchlorid bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).

*Tabelle 5.4: EC<sub>50</sub>-Werte von Zinkchlorid bei Variation von Ansatzgröße (minia-turisierte Tests und Erlenmeyeransatz) und Auswertungsparameter.*

	Endpunkt EC <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	Biomasseintegral E <sub>b</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	Wachstumsrate E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)
100 ml-Ansatz	0,64 (0,55 – 0,73)	0,68 (0,67 – 0,69)	1,40 (0,76 – 2,58)
24-Well Tecan (2 ml)	0,43 (0,42 – 0,45)	0,51 (0,50 – 0,52)	1,03 (0,54 – 1,92)
96-Well Tecan (200 µl)	0,65 (0,64 – 0,67)	0,70 (0,69 – 0,70)	1,54 (0,85 – 2,80)
96-Well Ascent (200 µl)	0,60 (0,41 – 0,86)	0,63 (0,62 – 0,65)	1,24 (0,71 – 2,13)

Die größten Unterschiede der EC-Werte sind entsprechend den Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Auswertungsparametern festzustellen. Zwischen den Ansatzgrößen ergeben sich kaum Unterschiede, wobei der 24-Well-Test die niedrigsten Werte vorweist. Die Wahl des Messgerätes hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die toxikologischen Daten. Das Fluorimeter TECAN SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup> ist aber empfindlicher gegenüber der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz der Algen als der Fluoroscan Ascent (siehe Abschnitt 5.1.1). Deshalb wurden die Messung mit dem Fluoroscan Ascent im Laufe des Projekts eingestellt. Auf die Darstellung der Ergebnisse mit dem Fluoroscan Ascent wird im Weiteren verzichtet.

In den standardisierten Testverfahren ist Kaliumdichromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) als Referenzsubstanz vorgeschlagen. Diese wurde in einem Ringtest zwischen 16 Laboratorien eingehend untersucht [53]. In Abbildung 5.7 sind die Dosis-Wirkungsbeziehungen gemessen im 100 ml-Ansatz (Erlenmeyerkolben) für die verschiedenen Auswertungen dargestellt.

Wie beim Zinkchlorid (Abbildung 5.5) verlaufen die Dosis-Wirkungs-Beziehungen berechnet über den Endpunkt und über das Biomasseintegral ungefähr gleich. Die Kurve berechnet über die Wachstumsrate ist dagegen bei geringerer Steigung nach niedrigeren Hemmwerten verschoben. Somit können die Erkenntnisse aus den Dosis-Wirkungs-Beziehungen des Zinkchlorids bestätigt werden. Dazu sind die Unterschiede zwischen den Ansatzgrößen wiederum geringer (Abbildung 5.8).

Entscheidend sind wie beim Zinkchlorid die EC-Werte als toxikologische Parameter der Chemikalie. Für Kaliumdichromat sind diese in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

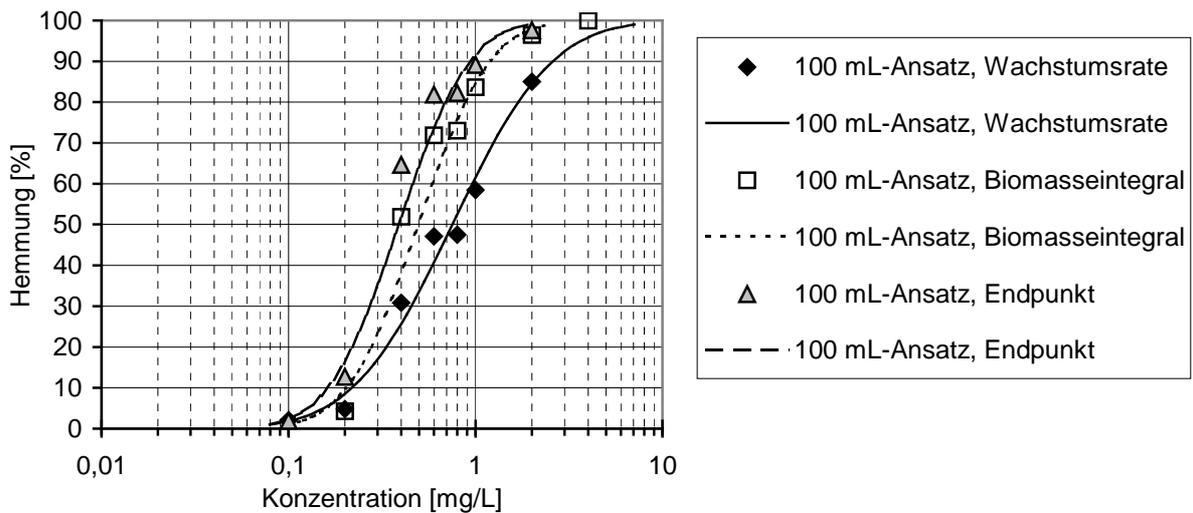


Abbildung 5.7: Sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung von Kaliumdichromat bei Variation der Auswertungsparameter (Erlenmeyeransatz).

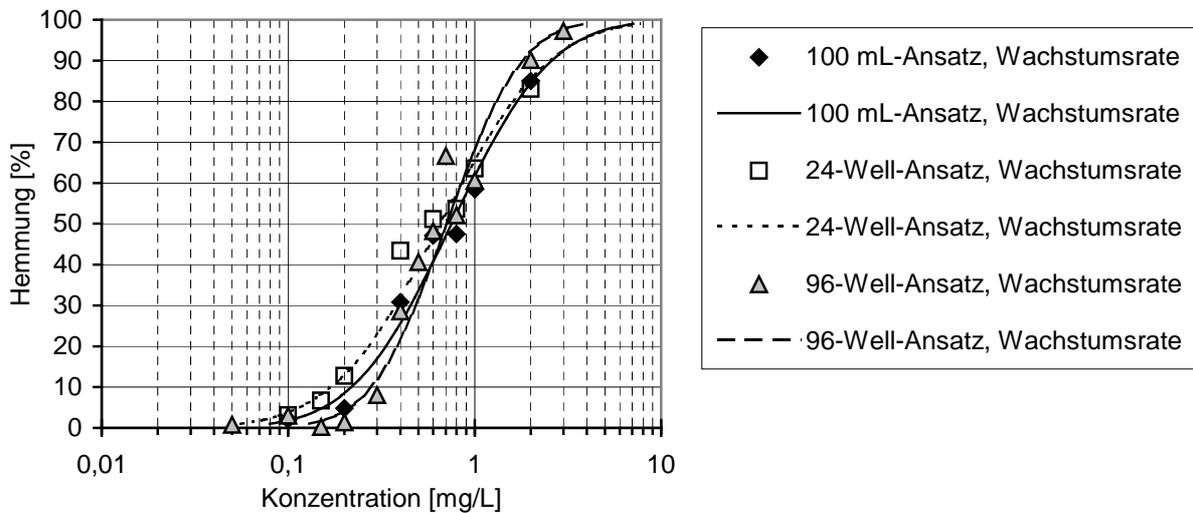


Abbildung 5.8: Sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung von Kaliumdichromat bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).

Aus den Dosis-Wirkungs-Beziehungen lassen sich  $EC_{50}$ -Werte ableiten, die für die Bestimmung über den Endpunkt und das Biomasseintegral deutlich kleiner sind als über die Wachstumsrate. Dagegen sind die Werte über die verschiedenen Ansatzgrößen annähernd gleich.

*Tabelle 5.5: EC<sub>50</sub>-Werte von Kaliumdichromat bei Variation von Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz) und Auswertungsparameter.*

	Endpunkt EC <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	Biomasseintegral E <sub>b</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	Wachstumsrate E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)
100 ml-Ansatz	0,39 (0,34 – 0,44)	0,49 (0,46 – 0,51)	0,75 (0,36 – 1,60)
24-Well Tecan (2 ml)	0,29 (0,28 – 0,29)	0,31 (0,30 – 0,32)	0,65 (0,33 – 1,33)
96-Well Tecan (200 µl)	0,33 (0,32 – 0,34)	0,34 (0,33 – 0,35)	0,71 (0,47 – 1,06)

Aus dem Ringversuch [53] ergab sich ein Mittelwert des E<sub>r</sub>C<sub>50</sub> von 0,84 mg/l ± 0,13 mg/l (E<sub>b</sub>C<sub>50</sub> von 0,53 mg/l ± 0,20 mg/l). Dabei wurden ein E<sub>r</sub>C<sub>50</sub>-Bereich von 0,60 – 1,03 mg/l (E<sub>b</sub>C<sub>50</sub>-Bereich von 0,20 – 0,75 mg/l) abgedeckt. In diesem Bereich liegen auch die mit den miniaturisierten Testsystemen erhaltenen Werte. Somit ist kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Ansatzgröße vorhanden und daher sind diese Ergebnisse mit denen des Ringversuchs vergleichbar.

Zwischen der Bestimmung über das Auszählen (direktes Verfahren) und über die Fluoreszenz (indirektes Verfahren) könnten allerdings noch Unterschiede auftreten. Tabelle 5.6 zeigt diesen Vergleich für Kaliumdichromat.

*Tabelle 5.6: EC<sub>50</sub>-Werte von Kaliumdichromat bei Variation von Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz) und Quantifizierung der Algen.*

	Fluoreszenzmessung E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	Zellzahlbestimmung (Neubauer) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)
Erlenmeyer (100 ml)	0,85 (0,41 – 1,73)	0,61 (0,32 – 1,12)
24-Well MTP (2 ml)	0,60 (0,31 – 1,15)	nicht gültig <sup>a</sup>
96-Well MTP (200 µl)	0,68 (0,36 – 1,26)	0,54 (0,31 – 0,93)

<sup>a</sup> = Vermehrungsfaktor < 16

Die Fluoreszenzmessung reagiert etwas unempfindlicher als die Zellzahlbestimmung, wobei die Werte aber in derselben Größenordnung liegen. Die Unterschiede dürften auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieses biologischen Messsystems zurückzuführen sein.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die miniaturisierten Testsysteme in 24-Well (2 ml) und 96-Well (200  $\mu$ l) gegenüber dem Erlenmeyeransatz (100 ml) vergleichbare toxikologische Parameter für Zinkchlorid und Kaliumdichromat liefern. Größere Unterschiede ergeben sich aufgrund der Auswertungsparameter der verschiedenen standardisierten Testsysteme. Deshalb ist eine Harmonisierung wünschenswert. Diesem Sachverhalt trägt die neue ISO/DIS 8692 [52] Rechnung, indem eine Norm zur Messung von Chemikalien und Abwasser mit der Akzeptanz direkter und indirekter Detektionsmethoden und nur einer einheitlichen Auswertung über die Wachstumsrate als Entwurf vorliegt. Deshalb wird in den folgenden Kapiteln ausschließlich die Wachstumsrate zur Validierung der miniaturisierten Testsysteme herangezogen und die  $E_rC_{50}$ -Werte verglichen.

### 5.2.2 Reproduzierbarkeit (Präzision)

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Reproduzierbarkeit der Testsysteme.

Für Kaliumdichromat sind vergleichende Untersuchungen über 2 Jahre in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Die  $E_rC_{50}$ -Mittelwerte weisen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ansatzgrößen auf. Die einzelnen Mittelwerte liegen dabei im Bereich der Ergebnisse des Ringversuchs für den Standard DIN EN 28692 [53]. Einzelne Werte können aber außerhalb des damals festgestellten Bereichs liegen. Die Standardabweichungen sind relativ gering und zwischen den Ansatzgrößen nicht signifikant unterschiedlich. Damit weisen die miniaturisierten Testverfahren eine vergleichbare Präzision wie der herkömmliche „Erlenmeyertest“ auf.

Problematischer hinsichtlich der Reproduzierbarkeit sind Tests mit leichtflüchtigen Verbindungen. Dazu zählt unter anderem 3,5-Dichlorphenol, für das ebenfalls über den Ringversuch der DIN EN 28692 [53] Daten vorliegen. In Tabelle 5.8 ist die Reproduzierbarkeit für leichtflüchtige Verbindungen anhand von 3,5-Dichlorphenol und Formaldehyd aufgezeigt.

Auch bei diesen leichtflüchtigen Verbindungen ist zwischen den Ansatzgrößen eine sehr gute Übereinstimmung der  $E_rC_{50}$ -Werte zu beobachten. Die Abweichungen über die Ansatztage halten sich für ein biologisches Testsystem ebenfalls im Rahmen. Bemerkenswert ist dabei aber, dass die Werte beim 3,5-Dichlorphenol zum Teil vom Sollwert ( $6,42 \pm 2,38$  mg/l) des Ringversuchs [53] abweichen.

Allerdings wird bei der Testdurchführung gemäß dieser Norm im Testansatz eine Karbonatkonzentration von 50 mg/l eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurde bei den hier beschriebenen Untersuchungen das Nährmedium der DIN 38412 L33 [29] mit einer Karbonatkonzentration von 300 mg/l verwendet. Deshalb könnten die Differenzen auf diesen Unterschied zurückzuführen sein.

*Tabelle 5.7: Laborinterne Reproduzierbarkeit anhand Kaliumdichromat bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).*

Testbeginn	Erlenmeyer (100 mL) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/L] (95%iger VB)	24 well MTP (2 mL) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/L] (95%iger VB)	96 well MTP (200 μL) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/L] (95%iger VB)
2001-01-15	—	0,73 (0,48-1,08)	0,90 (0,60-1,34)
2001-08-24	0,78 (0,36-1,67)	0,66 (0,32-1,35)	0,78 (0,47-1,31)
2001-08-31	0,53 (0,21-1,35)	0,45	0,81 (0,35-1,89)
2001-09-07	0,55 (0,22-1,36)	0,51 (0,13-1,97)	0,58 (0,19-1,72)
2001-09-14	0,62 (0,29-1,35)	0,69 (0,28-1,70)	0,83 (0,44-1,55)
2001-09-28	0,79 (0,42-1,49)	0,70 (0,35-1,42)	0,76 (0,45-1,29)
2001-10-05	0,74 (0,32-1,73)	0,64 (0,28-1,47)	0,70 (0,27-1,80)
2001-10-08	0,57 (0,32-0,99)	0,56 (0,25-1,29)	0,70 (0,37-1,34)
2001-10-12	0,63 (0,33-1,22)	0,60 (0,32-1,11)	0,67 (0,31-1,42)
2001-10-19	0,58 (0,25-1,31)	0,60 (0,32-1,13)	—
2001-10-22	0,59 (0,26-1,35)	0,60 (0,26-1,40)	0,66 (0,29-1,49)
2001-10-26	0,66 (0,17-2,55)	0,69 (0,34-1,41)	0,61 (0,30-1,24)
2002-01-21	0,67 (0,37-1,23)	0,57 (0,29-1,13)	0,61 (0,34-1,10)
2002-03-04	0,77 (0,38-1,56)	0,67 (0,31-1,44)	0,76 (0,40-1,42)
2002-04-26	—	—	0,70 (0,32-1,52)
2002-04-29	—	—	0,68 (0,23-2,00)
2002-05-10	—	—	0,68 (0,40-1,16)
2002-06-14	—	—	0,75 (0,18-2,94)
2002-07-19	—	—	0,69 (0,28-1,74)
2002-08-12	0,98 (0,33-2,88)	0,69 (0,19-2,47)	0,87 (0,47-1,60)
2002-09-16	0,85 (0,41-1,73)	0,60 (0,31-1,15)	0,68 (0,36-1,27)
2002-11-29	—	—	0,59 (0,36-0,97)
2002-11-29	—	—	0,62 (0,37-1,04)
2002-12-09	—	—	0,75 (0,49-1,15)
2003-01-13	—	—	0,56 (0,33-0,96)
2003-01-20	0,75 (0,36-1,60)	0,65 (0,33-1,33)	0,71 (0,47-1,06)
MW ± SD	0,68 ± 0,12	0,62 ± 0,07	0,71 ± 0,09

*Tabelle 5.8: Laborinterne Reproduzierbarkeit anhand leichtflüchtiger Verbindungen bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyersatz).*

Testsubstanz	Testbeginn	Erlenmeyer (100 ml) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 %iger VB)	24 well MTP (2 ml) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 %iger VB)
3,5-Dichlorphenol	2001-06-11	10,8 (6,75-17,2)	—	10,9 (6,26-19,0)
3,5-Dichlorphenol	2001-07-13	11,0 (6,74-18,0)	9,02 (3,71-22,0)	11,1 (3,18-39,1)
3,5-Dichlorphenol	2002-07-22	—	—	7,60 (3,90-15,1)
3,5-Dichlorphenol	2002-07-29	—	—	7,10 (1,50-33,0)
3,5-Dichlorphenol	2003-02-04	—	—	9,40 (7,70-11,6)
Formaldehyd	2001-07-02	6,76 (4,99-9,15)	6,72 (5,12-8,83)	7,96 (5,83-10,9)
Formaldehyd	2001-09-10	5,20 (2,50-10,6)	5,90 (4,00-8,70)	7,80 (4,60-13,3)

### 5.2.3 Substanzen verschiedener Stoffgruppen

Zur weiteren Validierung der Testsysteme wird nun auf die vergleichenden Untersuchungen von Chemikalien verschiedener Substanzklassen eingegangen. Dabei wird mit den ausgewählten Substanzen ein großer Bereich einerseits der Toxizität und andererseits der Wasserlöslichkeit und Hydrophilie abgedeckt. Zuerst sind in Tabelle 5.9 die E<sub>r</sub>C<sub>50</sub>-Werte mit Konfidenzintervallen von anorganischen Salzen dargestellt.

Sowohl mit dem 24-Well-Mikrotitrationsplatten-Test als auch mit dem 96-Well-Mikrotitrationsplatten-Test sind dem „Erlenmeyertest“ entsprechende toxikologische Daten der Chemikalien erhältlich. Dabei wird ein sehr großer Toxizitätsbereich von 10 µg/L bis 13,2 g/L abgedeckt. Diese getesteten, leicht wasserlöslichen anorganische Salze liegen in Lösung vollständig dissoziiert vor, wobei die Toxizität auf die Metallkationen zurückzuführen ist. Da die Kationen aufgrund ihrer Polarität eine größere Affinität zu Glas als zu unpolarem Polystyrol besitzen, treten daher keine zusätzlichen Adsorptionseffekte bei den miniaturisierten Testverfahren im Vergleich zum „Erlenmeyertest“ auf. Dementsprechend zeigen die E<sub>r</sub>C<sub>50</sub>-Werte zwischen den Ansatzgrößen keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit wasserlöslichen polaren hydrophilen Verbindungen die Toxizität der Chemikalien mit den miniaturisierten Testverfahren im Rahmen der Messgenauigkeit richtig wiedergegeben werden.

*Tabelle 5.9:  $E_rC_{50}$ -Werte von wasserlöslichen anorganischen Salzen bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).*

Testsubstanz	Erlenmeyer (100 ml) (95 %iger VB)	24 well MTP (2 ml) (95 %iger VB)	96 well MTP (200 $\mu$ l) (95 %iger VB)
AgNO <sub>3</sub> [ $\mu$ g/l]	12,1 (8,0-17,7)	10,4 (7,7-14,0)	14,7 (9,1-23,9)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> [mg/l]	0,75 (0,36-1,60)	0,65 (0,33-1,33)	0,71 (0,47-1,06)
ZnCl <sub>2</sub> [mg/l]	1,40 (0,75-2,58)	1,02 (0,54-1,92)	1,54 (0,85-2,80)
AlCl <sub>3</sub> [mg/l]	10,9 (9,40-12,7)	13,9 (10,7-17,9)	13,7 (11,8-15,9)
MnCl <sub>2</sub> [mg/l]	15,5 (7,50-31,7)	13,3 (6,70-26,7)	21,9 (6,70-70,9)
LiCl [g/l]	1,36 (0,41-4,52)	1,21 (0,40-3,61)	1,35 (0,31-5,79)
KCl [g/l]	13,2 (9,54-18,2)	12,5 (7,34-21,3)	11,9

Problematischer hinsichtlich der Übereinstimmung zwischen den Ansatzgrößen dürften leichtflüchtige, unpolare, hydrophobe und oberflächenaktive Verbindungen sein, die verstärkt mit der Polystyroloberfläche in Wechselwirkung treten oder sich aus dem Testansatz verflüchtigen. Diese Chemikalien sind hauptsächlich im Bereich der organischen Verbindungen zu suchen.

In Tabelle 5.10 sind die  $E_rC_{50}$ -Werte mit Konfidenzintervallen von wasserlöslichen organischen Verbindungen zusammengefasst.

Die größte Toxizität im  $\mu$ g/L-Bereich weisen dabei die Pestizide Terbutryn und Diuron auf. Diuron zeigt eine spezifische, hemmende Wirkung auf die Photosynthese der Algen, indem es die Elektronenabgabe durch den Photosynthese II Komplex blockiert. Diese Reaktion lässt Diuron als sehr wirksames Herbizid fungieren [54]. Die leichtflüchtigen Verbindungen sind bereits oben unter dem Thema Reproduzierbarkeit beschrieben. Als oberflächenaktive Verbindungen können die untersuchten stickstoffhaltigen Substanzen, die Phosphorsäureester und die Carbonsäuren bzw. deren Derivate angesehen werden. Bei den Stickstoffverbindungen fungiert das Heteroatom als Elektronendonator und adsorbiert daher im Gegensatz zu den Metallkationen eher auf kationischen Oberflächen.

Die Phosphorsäureester sind strukturell aus einer polaren Gruppe mit unpolaren Kohlenstoffketten zusammengesetzt. Diese Verbindungen besitzen somit eine Affinität sowohl zu Wasser, wodurch ihre Löslichkeit begründet ist, als auch zur Polystyroloberfläche der Mikrotitrationsplatten. Ähnliche Eigenschaften haben die Carbonsäuren und deren Derivate. Des Weiteren sind die Algentoxizitäten von Antibiotika und des relativ untoxischen Lösungsmittels DMSO dargestellt.

*Tabelle 5.10:  $E_rC_{50}$ -Werte von wasserlöslichen organischen Verbindungen bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).*

Testsubstanz	Erlenmeyer (100 ml) (95 %iger VB)	24 well MTP (2 ml) (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) (95 %iger VB)
<i>Pestizide</i>			
Terbutryn [µg/l]	6,7 (5,2-8,5)	8,4 (6,0-11,8)	7,8 (6,1-9,8)
Diuron [µg/l]	19,6 (9,7-39,8)	43,8 (27,8-69,0)	35,7 (24,3-52,5)
<i>leichtflüchtige Verbindungen</i>			
Formaldehyd [mg/l]	6,76 (4,99-9,15)	6,72 (5,12-8,83)	7,96 (5,83-10,9)
3,5-Dichlorphenol [mg/l]	11,0 (6,74-18,0)	9,02 (3,71-22,0)	11,1 (3,18-39,1)
<i>stickstoffhaltige Verbindungen</i>			
Cyanamid [mg/l]	5,29 (1,17-23,8)	6,21 (1,15-33,4)	7,77 (3,22-18,8)
Ethanolamin [mg/l]	14,6 (9,71-22,1)	14,0 (9,92-19,8)	16,0 (9,29-27,6)
Benzotriazol [mg/l]	—	242 (191-305)	253 (194-330)
Benzotriazol (techn.) [mg/l]	305 (234-397)	228 (165-314)	253 (197-324)
<i>Phosphorsäureester</i>			
Tributylphosphat [mg/l]	2,64 (1,37-5,11)	2,35 (1,48-3,73)	3,11 (1,73-5,61)
Tributylphosphat (techn.) [mg/l]	2,30 (0,99-5,34)	2,49 (1,57-3,94)	2,81 (1,51-5,23)
Butylphosphat [mg/l]	—	—	276 (183-417)
<i>Carbonsäuren und Carbonsäurederivate</i>			
Monochloressigsäure [mg/l]	0,16 (0,02-0,95)	0,08 (0,02-0,28)	0,22 (0,05-0,98)
Benzoessäure [g/l]	2,33 (1,44-3,76)	2,66 (1,50-4,73)	—
<i>sonstige Verbindungen</i>			
Chloramphenicol [mg/l]	0,78 (0,21-2,89)	0,52 (0,21-1,32)	1,01 (0,22-4,57)
Penicillin [g/l]	8,32 (6,71-10,4)	7,40 (5,79-9,46)	7,34 (4,17-13,0)
Dimethylsulfoxid [g/l]	—	—	37,3 (26,9-51,7)

Wie bei den anorganischen Salzen können trotz dieser Vielzahl verschiedenster Eigenschaften der untersuchten wasserlöslichen organischen Verbindungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den EC-Werten der Chemikalien mit den unterschiedlichen Ansatzgrößen ermittelt werden. Damit ist der miniaturisierte Test auch für wasserlösliche organische Verbindungen mit dem konventionellen Testverfahren vergleichbar.

Diese Übertragbarkeit der  $E_rC_{50}$ -Werte der wasserlöslichen anorganischen und organischen Verbindungen vom „Erlenmeyermaßstab“ auf die miniaturisierten Testsysteme lässt sich, entsprechend den Untersuchungen der Henkel KGaA, mit folgender Korrelationsanalyse (Abbildung 5.9) veranschaulichen.

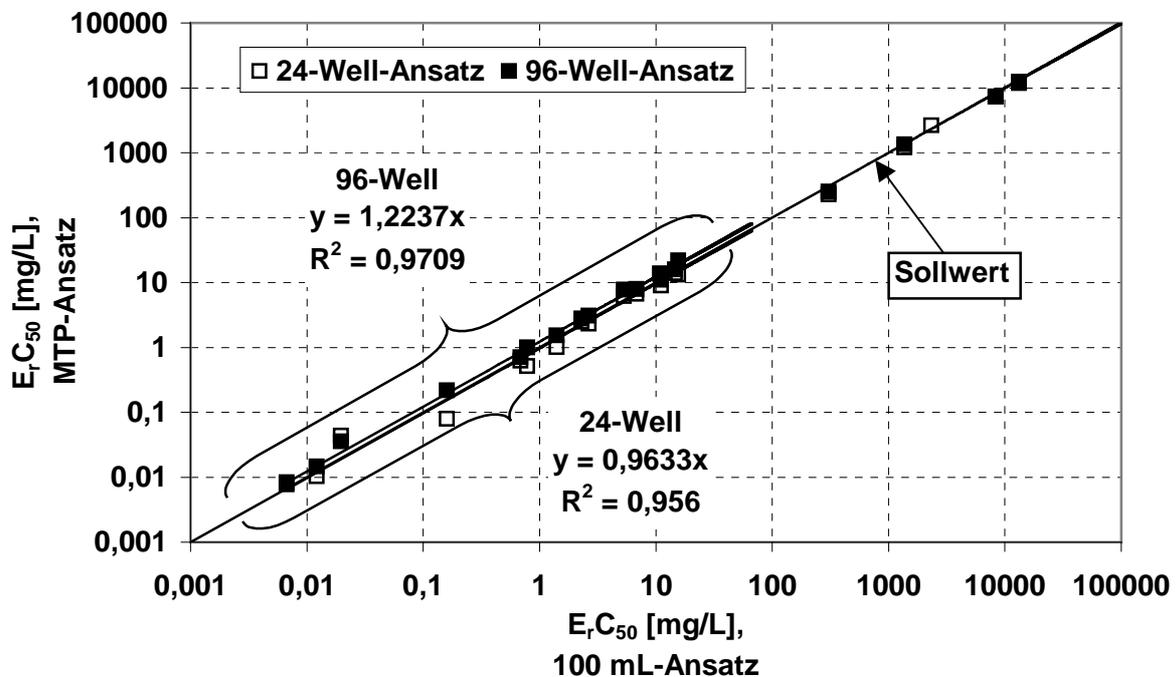


Abbildung 5.9: Korrelation der  $E_rC_{50}$ -Werte wasserlöslicher Stoffe für die miniaturisierten Algentests gegenüber dem Erlenmeyeransatz.

Die Algentoxizitäten der untersuchten wasserlöslichen Substanzen liegen in einem Bereich von  $1 \mu\text{g/l}$  bis zu  $100 \text{ g/l}$ . Dabei liegen alle Ergebnisse der Substanzen in der Nähe der Diagonalen, welche den Sollwert angibt. Über eine lineare Regression durch den Nullpunkt ergeben sich für die miniaturisierten Tests Koeffizienten von  $R^2 > 0,95$ . Auf eine Einbeziehung der Konzentrationen größer  $100 \text{ g/l}$  wurde dabei verzichtet, da diese ansonsten die Regression bestimmen würden. Der 96-Well-Test scheint etwas unempfindlicher zu sein als der 24-Well-Test oder der 100 ml-Ansatz. Eine signifikante Über- oder Unterbewertung der Toxizitäten mit den miniaturisierten Tests ist aber nicht festzustellen. Insgesamt ist eine sehr gute Übereinstimmung der Testverfahren für wasserlösliche Substanzen über einen weiten Toxizitätsbereich gegeben.

Sollen hydrophobere Substanzen untersucht werden, kommt man in den Bereich der schlecht wasserlöslichen Substanzen (Löslichkeit  $< 100 \text{ mg/l}$ ) oder sogar der sehr schlecht wasserlöslichen Substanzen (Löslichkeit  $< 1 \text{ mg/l}$ ). Diese sind aufgrund ihrer Löslichkeit schwierig in biologischen Testsystemen einzusetzen, und die Ergebnisse können in Abhängigkeit der Probenaufbereitung

stark variieren. Als Probenaufbereitung stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung: als gesättigte Lösung, den sogenannten „water soluble fractions (WSF)“ oder „water accommodated fractions (WAF)“, mit Lösungsmittel oder als Dispersion (mit Emulgatoren) [55].

In Tabelle 5.11 sind die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen für schlecht wasserlösliche Substanzen dargestellt.

*Tabelle 5.11:  $E_rC_{50}/E_rL_{50}$ -Werte schlecht wasserlöslicher organischer Verbindungen bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz).*

Testsubstanz		Erlenmeyer (100 ml) (95 %iger VB)	24 well MTP (2 ml) (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) (95 %iger VB)
<i>Verdünnungsreihen der water soluble fraction (WSF) von 100 mg/L</i>				
Antiwear-Additiv	[%]	0,1 (0,0-2,2)	0,2 (0,1-0,)	0,5 (0,2-0,9)
Geschwefelter KWSt	[%]	13 (0,0-756)	22 (5,0-8)	58 (37-90)
Tolyltriazol (techn.)	[%]	4,2 (2,2-8,0)	4,5 (3,0-6,	— <sup>a</sup>
Phenylnaphtylamin (techn.)	[%]	12 (5,0-26)	16 (6,0-4	29 (14-58)
Butylhydroxyanisol	[%]	—	8,8 (6,5-1	7,9 (6,4-9,6)
<i>Elution der einzelnen Konzentrationen als water soluble fraction (WSF) und mit Emulgator</i>				
1-Dodecanol (WSF)	[mg/l]	10 – 50 <sup>b</sup>	≈ 33 <sup>b</sup>	> 50 <sup>b</sup>
1-Dodecanol (E1)	[mg/l]	≈ 1,8 <sup>b</sup>	≈ 5,9 <sup>b</sup>	≈ 6,1 <sup>b</sup>
1-Dodecanol (E10)	[mg/l]	≈ 1,5 <sup>b</sup>	≈ 2,7 <sup>b</sup>	≈ 1,3 <sup>b</sup>
Tetraethylthiuramdisulfid (WSF)	[mg/l]	—	4,3 (2,1-9,	3,4 (1,4-8,0)
Tetraethylthiuramdisulfid (E1)	[mg/l]	—	—	6,9 (2,8-18)

KWSt = Kohlenwasserstoff, WSF = water soluble fraction, E1 = gleiche Konzentration an Emulgator (ethoxyliertes Rhizinusöl), E10 = 10fache Konzentration an Emulgator (ethoxyliertes Rhizinusöl);

— = nicht durchgeführt, a = nicht valide, da kein exponentielles Wachstum der Algen, b = zu wenig Punkte im moderaten Hemmbereich für die Probitanalyse

Die Ergebnisse lassen sich in Abhängigkeit der Probenaufbereitung in zwei Bereiche unterteilen: Einerseits die Untersuchung von Verdünnungsreihen gesättigter Lösungen und andererseits die Untersuchung von Eluaten und Emulsionen verschiedener, getrennt eluierter Konzentrationen.

Bezüglich des ersten Bereichs sind die EC-Werte in der Einheit % der WSF angegeben, da auf eine chemische Analyse der tatsächlich vorhandenen

Konzentration in der Stammlösung verzichtet wurde und damit keine Konzentrationsangabe in mg/l möglich ist. Beim „Antiwear-Additiv“ und dem „geschwefelten Kohlenwasserstoff“ ist zudem die genaue Zusammensetzung der Verbindung nicht bekannt, so dass eine ausreichende chemische Analyse auch nicht möglich ist. Beim Vergleich der EC-Werte kann festgestellt werden, dass die Testsysteme mit abnehmendem Testvolumen unempfindlicher werden. Dies könnte auf das Verhältnis zwischen Testvolumen und Kontaktoberfläche der Inkubationsgefäße zurückzuführen sein, so dass sich beim 96-Well-Test die Adsorptionen auf die toxikologischen Parameter stärker auswirken als beim „Erlenmeyertest“.

Im Gegensatz dazu können im Bereich der Eluate, deren Konzentrationen getrennt hergestellt wurden, „effektive loadings (EL)“ als toxikologische Parameter angegeben werden. Auch bei diesen Proben ist eine relativ gute Übereinstimmung der Ergebnisse zu beobachten.

Insgesamt geben die Ergebnisse der miniaturisierten Testverfahren im Vergleich zu den „Erlenmeyeransätzen“ sowohl für gesättigte Lösungen als auch beim Einsatz von Emulgatoren die richtige Größenordnung der toxikologischen Eigenschaften der schwer wasserlöslichen hydrophoben Substanzen wieder. Die Abweichungen zwischen den Testsystemen sind kleiner als die bei biologischen Testsystemen tolerierbare Schwankungsbreite (Faktor 2 bis 3).

## 5.3 Validierung des HT-Algentests

Im folgenden Abschnitt werden Ergebnisse vorgestellt, die mit dem Prototypen des HT-Algentests erhalten wurden. Damit handelt es sich um die Validierung der Inkubation der in Kapitel 4 vorgestellten Anlage. Zusätzlich wird auf den Einfluss der Karbonatkonzentration des Mediums eingegangen. Die Konzentration an Natriumhydrogencarbonat ist mit 300 mg/l [29] und 50 mg/l [30] in den relevanten Normen unterschiedlich angesetzt, soll aber über die ISO/DIS 8692 [52] auf 50 mg/l vereinheitlicht werden. Dies könnte sich auf die EC-Werte auswirken.

### 5.3.1 Reproduzierbarkeit (Präzision) beim HT-Algentest

Beginnend mit der Präzision des HT-Algentest-Prototypen sind in Tabelle 5.12 und 5.13 die EC-Werte von Kaliumdichromat bei verschiedenen Testansätzen zusammengefasst. In Abbildung 5.10 werden die erhaltenen Ergebnisse schließlich graphisch gegenübergestellt.

Wie beim miniaturisierten 96-Well-Test konnte auch beim Prototypen eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des HT-Algentests über die verschiedenen Testansätze erreicht werden. Zudem ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Schüttlern (gleicher Testbeginn) zu beobachten. Die Ein-

zelwerte und damit auch der Mittelwert liegen im Bereich der Ergebnisse des Ringversuchs basierend auf der DIN EN 28692 [53].

*Tabelle 5.12: Laborinterne Reproduzierbarkeit des HT-Algentest-Prototypen anhand von Kaliumdichromat, NaHCO<sub>3</sub> 300 mg/l.*

Testbeginn	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	
2002-07-19	0,63	(0,42-0,97)
2002-07-19	0,68	(0,45-1,02)
2002-07-19	0,63	(0,40-0,99)
2002-07-19	0,67	(0,44-1,03)
2002-07-19	0,78	(0,53-1,16)
2002-08-02	0,64	(0,39-1,04)
2002-08-02	0,72	(0,48-1,10)
2002-08-02	0,64	(0,38-1,08)
2002-08-02	0,72	(0,44-1,19)
2002-08-02	0,78	(0,49-1,25)
2002-09-09	0,74	(0,43-1,28)
2002-09-16	0,97	(0,67-1,42)
2003-01-24	0,56	(0,32-0,99)
MW ± SD	0,70 ± 0,10	

*Tabelle 5.13: Laborinterne Reproduzierbarkeit des HT-Algentest-Prototypen anhand von Kaliumdichromat, NaHCO<sub>3</sub> 50 mg/l.*

Testbeginn	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 % iger VB)	
2002-09-16	1,12	(0,64-2,02)
2002-09-20	0,86	(0,57-1,29)
2002-09-24	1,14	(0,70-1,85)
2002-09-27	0,88	(0,64-1,23)
2003-01-27	0,70	(0,44-1,12)
2003-03-07	0,90	(0,60-1,36)
MW ± SD	0,93 ± 0,17	

Die EC-Werte für Kaliumdichromat mit 50 mg/l  $\text{NaHCO}_3$  im Testansatz liegen im Mittel etwas höher als die mit höherer Karbonatkonzentration (Abbildung 5.10). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist dieser Unterschied aber nicht signifikant.

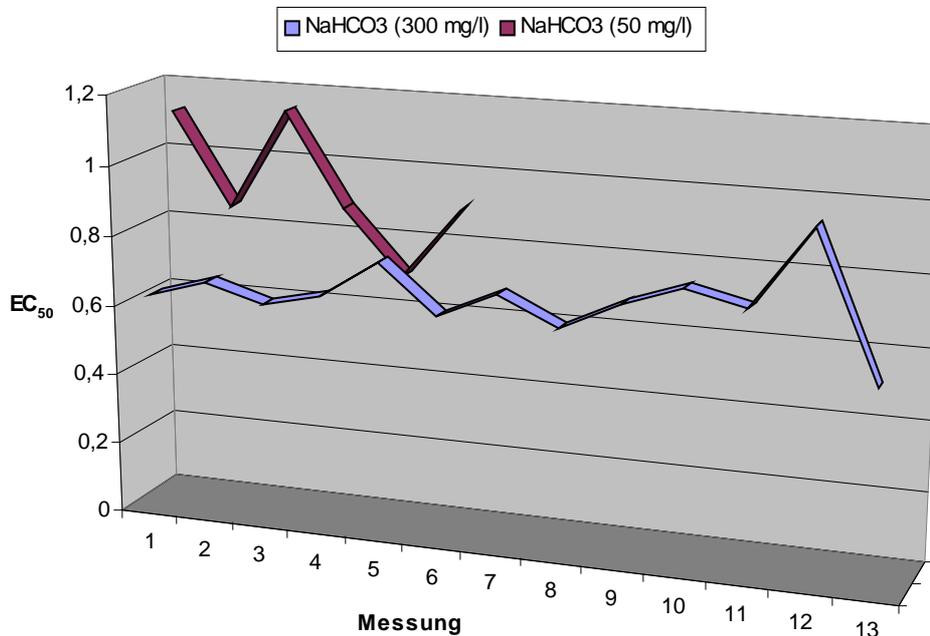


Abbildung 5.10: EC-Werte von Kaliumdichromat mit 50 mg/l  $\text{NaHCO}_3$  und 300 mg/l  $\text{NaHCO}_3$ .

In Tabelle 5.14 und 5.15 sind die EC-Werte für die zweite Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol dargestellt.

Sowohl zwischen den Schüttlern bei gleicher Vorkultur als auch über verschiedene Testtage (Vorkulturen) sind keine signifikanten Unterschiede auszumachen. Die Werte entsprechen den im manuellen Test erhaltenen Werten (Tabelle 5.8). Bei Reduzierung des Karbonatgehalts sinkt der EC-Wert deutlich (siehe Abbildung 5.11).

Damit ist für 3,5-Dichlorphenol ein größerer Einfluss der Karbonatkonzentration zu beobachten als für Kaliumdichromat. Die Mittelwerte bei 50 mg/l  $\text{NaHCO}_3$  im Testansatz entsprechen annähernd den im Ringversuch für die DIN EN ISO 28692 [53] erhaltenen Werten ( $6,42 \pm 2,38$  mg/l).

Als oberflächenaktive Substanz wurde zur Überprüfung der Präzision Tri-n-butylphosphat ausgewählt (Tabelle 5.16). Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei Einsatz der verschiedenen Schüttler zu detektieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Präzision im Prototypen des HT-Algentests für die zwei Referenzsubstanzen Kaliumdichromat und 3,5-Dichlorphenol sowie für Tri-n-butylphosphat gegeben ist. Signifikante Unterschiede können aufgrund der Karbonatkonzentration im Testansatz auftreten, was im Weiteren näher untersucht werden sollte.

*Tabelle 5.14: Laborinterne Reproduzierbarkeit des HT-Algentest-Prototypen anhand von 3,5-Dichlorphenol, NaHCO<sub>3</sub> 300 mg/l.*

Testbeginn	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 %iger VB)	
2002-08-12	9,42	(7,92-11,2)
2002-08-12	9,92	(8,27-11,9)
2002-08-12	9,74	(8,12-11,7)
2002-08-12	10,2	(8,32-12,5)
2002-08-12	10,5	(8,78-12,6)
2002-09-09	10,7	(9,24-12,5)
2002-09-16	11,4	(8,81-14,8)
2003-01-27	10,9	(9,16-13,1)
2003-03-14	9,11	(7,54-11,1)
MW ± SD	10,2 ± 2,7	

*Tabelle 5.15: Laborinterne Reproduzierbarkeit des HT-Algentest-Prototypen anhand von 3,5-Dichlorphenol, NaHCO<sub>3</sub> 50 mg/l.*

Testbeginn	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95 %iger VB)	
2002-09-16	4,84	(1,86-12,6)
2003-01-27	4,34	(0,89-19,2)
2003-02-17	4,22	(3,48-5,11)
2003-03-14	3,69	(3,05-4,48)
MW ± SD	4,27 ± 0,47	

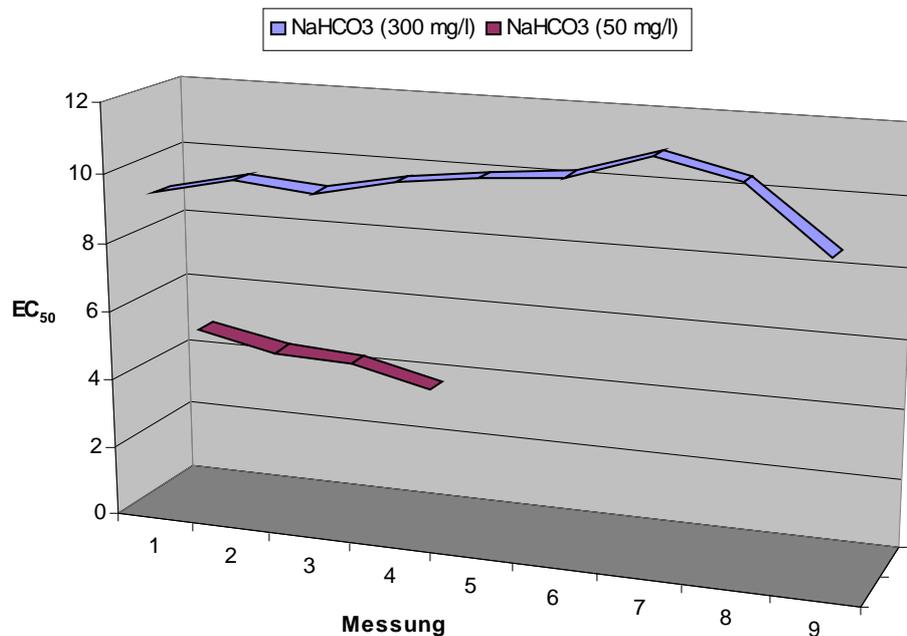


Abbildung 5.11: EC-Werte von 3,5-Dichlorphenol mit 50 mg/l NaHCO<sub>3</sub> und 300 mg/l NaHCO<sub>3</sub>.

Tabelle 5.16: Variabilität über die Schüttler des HT-Algentest-Prototypen anhand von Tributylphosphat, NaHCO<sub>3</sub> 300 mg/l.

Schüttler-Nr.	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> [mg/l] (95% iger VB)	
1	3,39	(2,13-5,42)
2	3,02	(1,95-4,70)
3	3,08	(1,91-4,97)
4	3,12	(2,02-4,80)
5	3,36	(2,15-5,24)
MW ± SD	3,19 ± 0,17	

### 5.3.2 Substanzen verschiedener Stoffgruppen

In Tabelle 5.17 sind für anorganische Verbindungen die Ergebnisse des Prototypen den Ergebnissen des „Erlenmeyeransatzes“ gegenübergestellt.

*Tabelle 5.17:  $E_r C_{50}$ -Werte wasserlöslicher Substanzen (Erlenmeyeransatz und HT-Algentest-Prototyp): anorganische Salze und Säuren.*

Testsubstanz	Erlenmeyer (100 ml) NaHCO <sub>3</sub> 300 mg/l (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) NaHCO <sub>3</sub> 300 mg/l (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) NaHCO <sub>3</sub> 50 mg/l (95 %iger VB)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> [mg/l]	0,68 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>
ZnCl <sub>2</sub> [mg/l]	1,40 (0,75-2,58)	1,17 (0,47-3,71)	1,79 (1,03-3,11)
AlCl <sub>3</sub> [mg/l]	10,9 (9,40-12,7)	13,1 (11,9-14,3)	—
MnCl <sub>2</sub> [mg/l]	15,5 (7,50-31,7)	12,9 (8,53-19,6)	39,8 (18,4-86,1)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> [g/l]	—	—	0,34 (0,01-9,31)
LiCl [g/l]	1,36 (0,41-4,52)	1,59 (0,48-6,19)	1,28 (0,68-2,37)
NaNO <sub>2</sub> [g/l]	—	—	3,77 (1,46-9,68)

— = nicht durchgeführt, a = Mittelwert aus 17 Tests, b = Mittelwert aus 13 Tests, c = Mittelwert aus 6 Tests

Entsprechend den Ergebnissen der manuellen miniaturisierten Testsysteme (Tabelle 5.9) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den 100 ml-Ansätzen und den 200 µl-Ansätzen zu beobachten. Dabei sind nur geringe Differenzen in Abhängigkeit der Karbonatkonzentration in für biologischen Testsystemen tolerierbaren Schwankungsbreiten festzustellen. Zusätzlich wurden mit dem Prototypen die Algentoxizität von Borsäure und Natriumnitrit bestimmt.

Auch für wasserlösliche organische Verbindungen sind keine signifikanten Abweichungen zwischen den Ergebnissen des konventionellen Testsystems im Erlenmeyerkolben und denen des Prototypen aufgetreten (Tabelle 5.18). Ein Einfluss der Karbonatkonzentration des Mediums ist bislang lediglich bei der schon oben erwähnten Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol auszumachen.

Als zusätzliche organische Substanzen wurden mit dem Prototypen weitere stickstoffhaltige Verbindungen und Phosphorsäureester gemessen. Diese Messungen sollen deutlich machen, dass mit dem miniaturisierten Testsystem Möglichkeiten bestehen, bei minimalen Probenvolumina in kurzer Zeit Wirkungsuntersuchungen zu Stoffgruppen vorzunehmen und Korrelationsstudien zu weiteren stoffspezifischen Eigenschaften durchzuführen. Zum Beispiel hängt die Wirkung der Phosphorsäureester primär nicht von der Phosphorgruppe ab, da mit dem Tri-n-butylphosphat das größte und schwerste Molekül die höchste Toxizität aufweist. Auf eine Untersuchung im 100 mL-Ansatz wurde dabei verzichtet.

*Tabelle 5.18: E<sub>r</sub>C<sub>50</sub>-Werte wasserlöslicher Substanzen (Erlenmeyeransatz und HT-Algentest-Prototyp): organische Verbindungen.*

Testsubstanz	Erlenmeyer (100 ml) NaHCO <sub>3</sub> 300 mg/l (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) NaHCO <sub>3</sub> 300 mg/l (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) NaHCO <sub>3</sub> 50 mg/l (95 %iger VB)
<i>Pestizide</i>			
Terbutryn [µg/l]	6,7 (5,2-8,5)	7,4 (6,2-8,9)	7,4 (6,2-8,8)
Diuron [µg/l]	19,6 (9,7-39,8)	19,7 (13,1-29,7)	19,0 (12,9-28,0)
<i>leichtflüchtige Verbindungen</i>			
Formaldehyd [mg/l]	6,76 (4,99-9,15)	6,19 (4,73-8,10)	—
3,5-Dichlorphenol [mg/l]	11,0 (6,74-18,0)	10,22 <sup>a</sup>	4,27 <sup>c</sup>
<i>stickstoffhaltige Verbindungen</i>			
Cyanamid [mg/l]	5,29 (1,17-23,8)	4,06 (5,54-6,49)	4,50 (2,77-7,30)
Ethanolamin [mg/l]	14,6 (9,71-22,1)	—	19,9 (13,5-29,1)
Diethanolamin [mg/l]	—	—	187 (66-524)
Anilin [mg/l]	—	—	164 (45-588)
Benzotriazol [mg/l]	—	245 (155-386)	148 (99-219)
<i>Phosphorsäureester</i>			
Tributylphosphat [mg/l]	2,64 (1,37-5,11)	3,19 <sup>b</sup>	4,61 <sup>d</sup>
Triisobutylphosphat [mg/l]	—	83,4 (60,6-115)	80,5 (61,3-106)
Butylphosphat [mg/l]	—	382 (255-571)	336 (219-515)
Dibutylphosphat [mg/l]	—	561 (389-811)	572 (379-861)
<i>Carbonsäuren und Carbonsäurederivate</i>			
Monochloressigsäure [mg/l]	0,16 (0,02-0,95)	—	0,03 (0,01-0,15)
Benzoessäure [g/l]	2,33 (1,44-3,76)	1,34 (1,10-1,6)	2,05 (1,24-3,38)
<i>sonstige Verbindungen</i>			
Chloramphenicol [mg/l]	0,78 (0,21-2,89)	0,83 (0,27-2,49)	—
Penicillin [g/l]	8,32 (6,71-10,4)	11,7 (9,41-14,7)	—
Dimethylsulfoxid [g/l]	—	—	38,1 (31,7-45,8)

— = nicht durchgeführt, a = Mittelwert aus 9 Tests, b = Mittelwert aus 5 Tests, c = Mittelwert aus 4 Tests, d = Mittelwert aus 2 Tests

Für die wasserlöslichen Verbindungen ist die Übereinstimmung der Testverfahren mit einer Korrelationsanalyse der Ergebnisse des Prototypen mit dem „Erlenmeyeransatz“ in Abbildung 5.12 veranschaulicht.

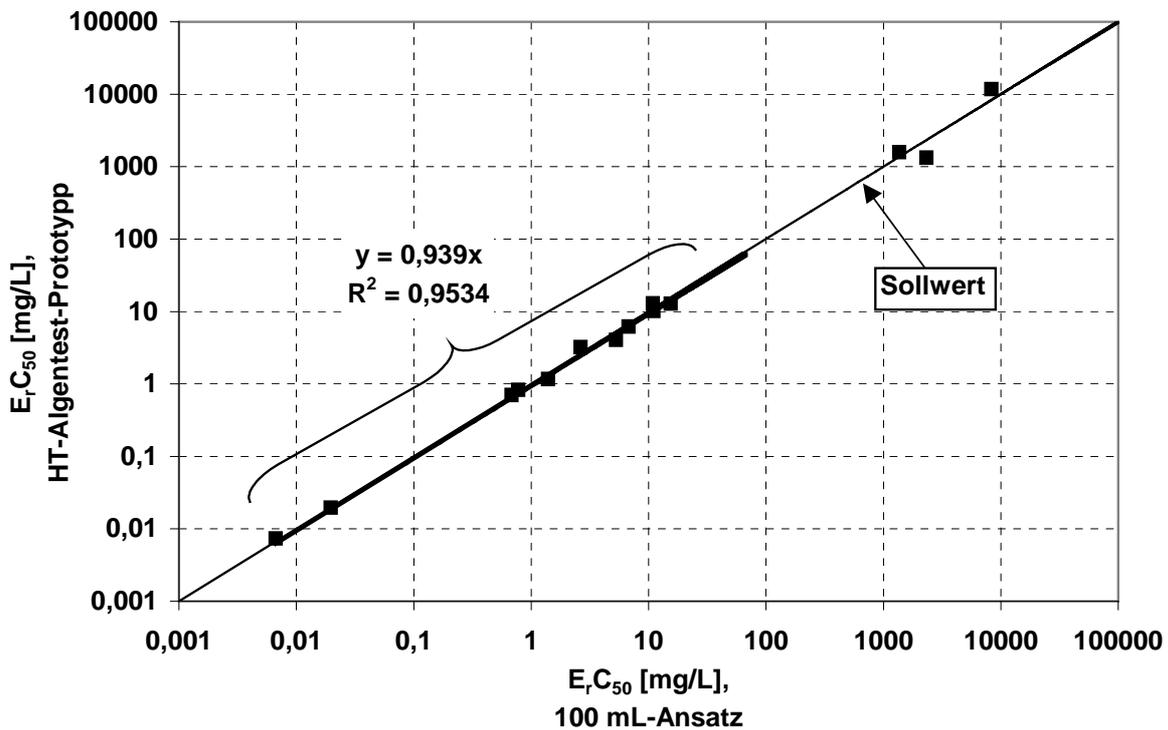


Abbildung 5.12: Korrelation der  $E_rC_{50}$ -Werte wasserlöslicher Stoffe für den HT-Algentest-Prototypen gegenüber dem Erlenmeyerkolbenansatz,  $\text{NaHCO}_3$  300 mg/l (bei Mehrfachmessungen Mittelwert).

Alle Ergebnisse des HT-Algentest-Prototypen liegen in der Nähe der durch den 100 ml-Ansatz vorgegebenen Sollwerte. Wiederum unter Vernachlässigung der niedrig toxischen Verbindungen wird eine lineare Regression durch den Nullpunkt berechnet. Das Bestimmtheitsmaß ist dabei mit  $R^2 > 0,95$  ausreichend und die Steigung annähernd bei 1.

Insgesamt ist damit eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse des Prototypen mit dem konventionellen Testsystem über einen weiten Toxizitätsbereich wasserlöslicher Substanzen gegeben.

## 5.4 Quantitative Untersuchungen

Nach der EU-Richtlinie 92/69/EWG [56] muss der Nachweis erbracht werden, dass die Konzentration der Prüfsubstanz über den gesamten Prüfzeitraum bei bis zu 80 % der Anfangskonzentration liegt. Diese Grenze kann zum Beispiel überschritten werden, falls sich die Substanzen zersetzen, zu leicht verflüchtigen o-

der sich an die Gefäßwände anlagern (adsorbieren) und dadurch den Algen nicht zur Verfügung stehen. Zur Überprüfung der Validität der Ergebnisse ist es deshalb notwendig, eine chemische Analytik der Substanzen in den Testansätzen durchzuführen.

Die meisten heutzutage verwendeten instrumentellen Verfahren wie AAS, ICP, GC und HPLC erreichen bei den Methoden in Abhängigkeit von der Probenaufbereitung Nachweisgrenzen im Bereich von ng/l bis mg/l. Dabei können immer kleinere Probenmengen analysiert werden. Deshalb ist es prinzipiell möglich, die Konzentration der Testsubstanzen in den Lösungen aus den Mikrotitrationsplatten zu bestimmen.

Für die Analytik der Testsubstanzen aus dem Algenzellvermehrungshemmtest sind Methoden, mit denen wässrige Matrices analysiert werden können, anderen Methoden vorzuziehen. Zum Beispiel lassen sich Schwermetalle wie Zink oder Chrom mit AAS und ICP quantifizieren. Da diese Metalle eine Toxizität im mg/l-Bereich aufweisen, die Messung aber im µg/l-Bereich vorgenommen wird, ist sogar eine Verdünnung der Proben von ca. 1:1000 notwendig. Dadurch löst sich auch die Problematik der zu geringen Probenmenge in den Mikrotitrationsplatten von 200 µl. Für organische Substanzen ist die HPLC das Verfahren der Wahl, da auch hier wässrige Proben analysiert werden können. Als Beispiel für eine Quantifizierung in Mikrotitrationsplatten sind die Ergebnisse der chemischen Analytik mittels HPLC-DAD von 3,5-Dichlorphenol in Tabelle 5.19 aufgeführt.

*Tabelle 5.19: Konzentrationen von 3,5-Dichlorphenol in Lösung während des Wachstumshemmtests mit *Desmodesmus subspicatus* in 96-Well-Mikrotitrationsplatten; Analytik mit HPLC-DAD; Mittelwert und Standardabweichung aus drei Parallelen.*

Eingesetzte Konzentration [mg/l]	t = 0 h, ohne Algen [mg/l]	t = 72 h, ohne Algen [mg/l]	t = 72 h, mit Algen [mg/l]
8,00	7,5 ± 0,9	7,6 ± 0,7	8,4 ± 0,2
4,25	4,9 ± 0,5	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,1
2,00	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,1

Dabei wurden jeweils die Proben aus zwei Wells der Mikrotitrationsplatten zusammengefügt, um ausreichend Messlösung (400 µl) zur Verfügung zu haben. Damit ergibt sich aus sechs Wells eine Dreifachbestimmung. Mit Ausnahme der Proben mit Algen ist für die Analyse keine weitere Probenaufbereitung notwendig. Die Proben mit Algen konnten nach Filtration (SPARTAN 13/0,2 RC Filtereinheit, Braunrand D, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) ebenfalls direkt analysiert werden. Somit treten in dieser chemisch-

analytischen Methode kaum systematische Fehlerquellen auf. Die Verluste durch Filtration wurden in einem Vorversuch ermittelt und lagen für eine Konzentration von 20 mg/L 3,5-Dichlorphenol bei 1,2 %, was als vernachlässigbar betrachtet werden kann und nicht in die Quantifizierung einberechnet wurde. Über die Ergebnisse der Messungen ohne Algen kann man die Konzentrationsänderungen der Substanz über den zeitlichen Verlauf des Tests feststellen. Ein Verlust der Chemikalie oder eine Aufkonzentrierung sind erfassbar. Zudem sind leichte Schwankungen durch Pipettiergenauigkeit zu berücksichtigen, da die Tests separat angesetzt werden. Bei der Konzentration von 8 mg/l ist keine Veränderung feststellbar, wohingegen bei den niedrigeren Konzentrationen Verluste auftreten. So sind von 4,9 mg/l nach 72 h im Mittel 84 % vorhanden, was tolerierbar ist; von 2,3 mg/l bleiben jedoch im Mittel nur 77 % übrig, womit die Grenze der EU-Richtlinie überschritten wäre. Niedrigere Konzentrationen scheinen hier also eher problematisch zu sein. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung, d. h. der Messgenauigkeit, sind diese Abweichungen von der eingesetzten Konzentration aber als nicht signifikant einzuordnen. Entscheidend für die Testgültigkeit ist der Ansatz mit Algen. Hierbei werden sowohl für die Konzentration 7,5 mg/l, bei der nach 72 h mit Algen 112 % 3,5-Dichlorphenol wiedergefunden werden, als auch für 4,9 mg/l (nach 72 h mit Algen 88 %) und für 2,3 mg/L (nach 72 h mit Algen 90 %) die Grenzen eingehalten. Insgesamt kann festgehalten werden, dass am Beispiel von drei gemessenen Konzentrationen der Gehalt an 3,5-Dichlorphenol während des Algentests nicht um mehr als 20 % von der Ausgangskonzentration abweicht. Für 3,5-Dichlorphenol spielen also weder Adsorptionseffekte noch Zersetzung oder Flüchtigkeit im Testverlauf eine Rolle und folglich stellt der 96-Well-Mikrotitrationsplattenansatz für diese Substanz eine sehr gut geeignete Alternative zum Erlenmeyeransatz dar.

Damit wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, die Konzentrationen von Testsubstanzen in geringen Probenmengen, wie sie in den Mikrotitrationsplatten vorliegen, chemisch-analytisch zu bestimmen und somit die Validität der Ergebnisse gemäß den Forderungen der EU-Richtlinie zu überprüfen. Dabei ist jedoch Voraussetzung, dass geeignete Analysemethoden für die Testsubstanzen vorhanden sind.

Wie oben beschrieben, muss prinzipiell für Chemikalien berücksichtigt werden, dass Zersetzungen, Adsorptionen und Verflüchtigung der Testsubstanzen zu ungültigen Tests führen können. Zersetzungen der Testsubstanzen können zum Beispiel durch Reaktionen mit dem Medium (z. B. Hydrolyse) und bei photochemischen Reaktionen durch Einwirkung der Lichtenergie auftreten. Diese Reaktionen finden sowohl bei den konventionellen als auch bei den miniaturisierten Testverfahren statt, d. h. sie stellen einen generellen Limitierungsfaktor für den Algenzellvermehrungshemmtest dar.

Da im konventionellen Testverfahren mit Erlenmeyerkolben und in den miniaturisierten Testverfahren unterschiedliche Oberflächenmaterialien und

-größen verwendet werden, können unterschiedliche Adsorptionen der Testsubstanzen an den Inkubationsbehältern auftreten. Falls dies signifikant verschieden ist, müssen die Messergebnisse voneinander abweichen. Bei den in den Kapiteln 5.2 und 5.3 dargestellten Ergebnissen liegt eine gute Übereinstimmung der EC-Werte in den drei Ansatzgrößen vor, so dass keine signifikanten Hinweise auf Adsorptionen ableitbar sind. Die Untersuchungen mit dem miniaturisierten Algentest bei der Henkel KGaA geben ebenfalls keine Hinweise auf das Auftreten verstärkter Oberflächeneffekte [57].

Um dies zusätzlich zu belegen, wurden Vergleichsuntersuchungen mit 96-Well-Mikrotitrationsplatten aus Glas und aus Polystyrol durchgeführt. Hierbei unterscheidet sich nur das Oberflächenmaterial bei gleicher Größe der Oberfläche. Zu berücksichtigen ist aber, dass bei den Glasplatten zur Messung die Testansätze und Kontrollen in nicht-transparente Polystyrol-Platten pipettiert werden müssen, um Interferenzen zwischen den Wells zu vermeiden. Damit können Verluste der Testsubstanzen durch Adsorptionen auftreten, die nicht auf die Glasplatte sondern auf die Zwischenschritte Pipettierung und Messung in einer Polystyrolplatte zurückzuführen sind. Der Vergleich zwischen Glas und Polystyrol für 96-Well-Mikrotitrationsplatten ist anhand der EC-Werte in Tabelle 5.20 zu entnehmen.

Tabelle 5.20:  $E_rC_{50}$ -Werte in Abhängigkeit des Plattenmaterials (Glas bzw. Polystyrol).

Testsubstanz	c (NaHCO <sub>3</sub> ) [mg/l]		MTP aus <b>Glas</b> <sup>a</sup>	MTP aus <b>Polystyrol</b> <sup>b</sup>
			96 well MTP (200 µl) (95 %iger VB)	96 well MTP (200 µl) (95 %iger VB)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	[mg/l]	300	0,53 (0,29-0,95)	0,59 (0,36-0,97)
3,5-Dichlorphenol	[mg/l]	50	2,45 (1,96-3,06)	3,59 (3,01-4,28)

a = transparent (Mikrotestplatte aus Quarzglas, HELMA GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland); b = nicht-transparent (Optiplat II, Labsystems OY, Helsinki, Finnland)

Für Kaliumdichromat ist eine sehr gute Übereinstimmung der  $E_rC_{50}$ -Werte zwischen Glas- und Polystyrolplatte zu beobachten. Hier treten keine Adsorptionsverluste auf. Die Unterschiede bei Dichlorphenol sind dagegen größer, aber immer noch im Bereich der Messgenauigkeit.

Die Konzentrationen, die durch Adsorptionen an den Gefäßwänden den Algen nicht zur Verfügung stehen, dürften somit relativ zu den Testkonzentrationen eine untergeordnete Rolle spielen. Die Gefahr, dass im Test die 80 %-Grenze aus der EU-Richtlinie nicht eingehalten werden kann, ist durch das Auftreten von Adsorptionen nicht gegeben. Dazu werden Mikrotitrationsplatten aus Polystyrol üblicherweise auch bei den genormten Bakterien-Testverfahren mit *Vibrio fischeri* oder *Pseudomonas putida* und auch für die Genotoxizitätsprüfung mit dem umuC-Test zugelassen und akzeptiert,

ohne dass das Problem der Substanzadsorption ein Ausschlusskriterium wäre. Falls Adsorptionen auftreten sollten und dadurch die Ergebnisse verfälscht würden, wären auch diese Testverfahren nicht valide (vgl. Kapitel 6.3).

Des Weiteren kann sich die Ausgangskonzentration der Testsubstanzen während der Inkubationszeit durch Verflüchtigung verringern. Um Limitierungen des miniaturisierten Testverfahrens ableiten zu können, sind deshalb mit dem Prototypen, neben den in Tabelle 5.18 genannten, weitere leichtflüchtige Verbindungen untersucht worden. Dies sind Acetaldehyd [mg/l] sowie einwertige Alkohole [g/l] (Ethanol, 1-Propanol, 1-Pentanol). Dabei trat ein „Übersprechen“ der Verbindung zwischen den Wells auf. Dieses Phänomen lässt sich aus den Messdaten des 96-Well-Tests sehr leicht erkennen und der Test als ungültig deklarieren. Als Beispiel sind in den Abbildung 5.13 und 5.14 die Messdaten der Chlorophyll-Fluoreszenz für Acetaldehyd nach der Inkubation von 72 h dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>572</b>	<b>323</b>	<b>209</b>	<b>247</b>	<b>161</b>	<b>128</b>	6	14	9	12	10	12
B	290	343	231	233	223	228	207	220	286	587	897	1063
C	234	230	194	201	200	191	190	244	265	378	655	798
D	230	256	232	<b>217</b>	<b>215</b>	<b>206</b>	<b>251</b>	<b>255</b>	<b>261</b>	335	455	651
E	205	200	192	171	165	170	196	218	273	357	596	744
F	206	211	188	191	186	216	254	297	431	689	905	1038
G	311	164	196	170	197	194	252	384	<b>656</b>	917	1064	1152
H	11	11	9	16	16	16	<b>826</b>	<b>912</b>	<b>1412</b>	<b>1282</b>	<b>1328</b>	<b>1085</b>

Abbildung 5.13: Fluoreszenzmesswerte eines Testansatzes mit Acetaldehyd nach 72 h Inkubation, Belegung der Platte nach Abb. 3.3: Wachstumskontrollen: A1-A6, D4-D9 und H7-H12; Probenkonzentrationen: B1-B6 = 15 mg/l; G7-G12 = 4 mg/l.

Die Kontrollen in der Nähe der hohen Konzentrationen an Acetaldehyd (A1-A6) weisen deutlich kleinere Fluoreszenzwerte auf als die Kontrollen in der Nähe der niedrigen Konzentrationen (H7-H12). Zusätzlich ist von Spalte 7 zur Spalte 12 eine deutliche Zunahme der Werte zu verzeichnen. Somit ist anzunehmen, dass sich das Acetaldehyd während des Tests aus den hohen Konzentrationen in die Gasphase verflüchtigt und sich über die Platte verteilt.

Aus diesem Grunde wurde für den miniaturisierten Test folgende zusätzlichen Gültigkeitskriterien eingeführt:

- Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den hohen Konzentrationen sollte vergleichbar sein mit dem Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den niedrigen Konzentrationen.

- Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen sollte mindestens so hoch sein wie die Vermehrungsfaktoren der Proben. Wenn dies nicht der Fall ist, also eine Wachstumsförderung durch die Proben stattfindet, dann sollte sie sich mit der Verdünnung der Proben reduzieren.

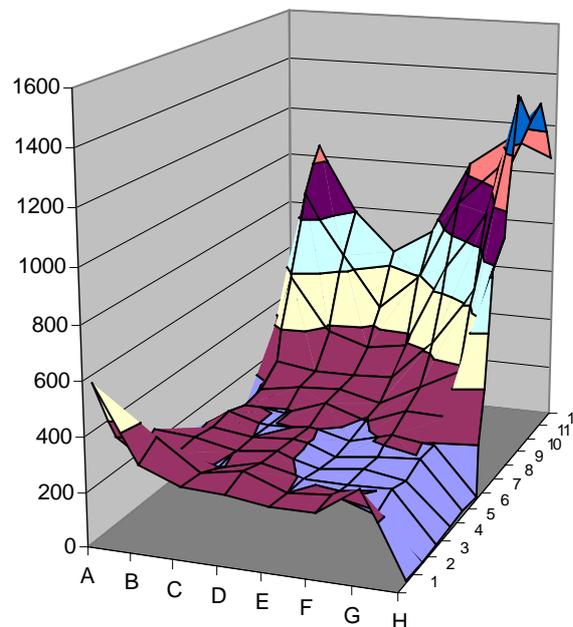


Abbildung 5.14: Fluoreszenzmesswerte einer 96-Well-Mikrotitrationsplatte mit Acetaldehyd nach 72 h Inkubation über alle Wells aufgetragen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass leichtflüchtige Verbindungen nur bedingt mit den entwickelten miniaturisierten Testsystemen untersucht werden können. Diese leichtflüchtigen Verbindungen können aber auch bei den konventionellen Testverfahren nur mit entsprechenden apparativen Voraussetzungen (siehe ISO 14442 [55]) untersucht werden. Der Limitierungsfaktor ist das Verteilungsgleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase, die als dimensionsloses Luft-zu-Wasser-Konzentrationsverhältnis ausgedrückt werden kann. Für einige gemessene Substanzen ist diese in Tabelle 5.21 aus der Literatur zusammengestellt.

Aus diesen Daten und den Ergebnissen des Algentests ist ersichtlich, dass der Grenzbereich etwa bei einem Wert von  $H_{cc} = 5E-04$  bis  $H_{cc} = 5E-06$  liegt. Flüchtigere Verbindungen ( $H_{cc} > 5E-04$ ) sind mit dem miniaturisierten Test nicht messbar.

Tabelle 5.21: Luft-zu-Wasser-Konzentrationsverhältnis  $H_{cc}$  [58].

Substanz	$H_{cc}@20\text{ °C}$
Acetaldehyd	2,21E-03
1-Propanol	2,01E-04
Ethanol	1,48E-04
Formaldehyd	8,61E-06
Monochloressigsäure	2,20E-07

## 5.5 Weitere Messergebnisse des HT-Algentests

### 5.5.1 Umweltproben

Neben der Chemikalienbewertung wird der Algenwachstumshemmtest auch zur ökotoxikologischen Bewertung von Umweltproben wie Boden und Abwasser eingesetzt. In Tabelle 5.22 sind ausgewählte Untersuchungen für Boden- und Grundwasserproben dargestellt.

Die Bodenproben werden zur Messung nach [59] wässrig eluiert und diese Eluate in Verdünnungsreihen in den Test eingesetzt. Dementsprechend werden die EC-Werte in % Eluat angegeben. Aus den Ergebnissen sind keine größeren Unterschiede zwischen den Ansatzgrößen festzustellen. Die Abweichungen sind dabei in einem tolerablen Bereich. Vergleichbare Werte konnten auch für die beiden 96-Well-Tests, Durchführung im Infors-Inkubator und mit dem Prototypen des HT-Algentests, bestimmt werden. Weitere Resultate zur Bewertung von Bodenproben mit dem miniaturisierten Algentest wurden mit einem Ringversuch erhalten [60]. Dabei konnte ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des 24-Well-Algentests und des „Erlenmeyeransatzes“ festgestellt werden. Des Weiteren ist eine Übereinstimmung zwischen den Laboratorien gegeben.

Die Grundwasserproben stammen aus der Region Bitterfeld und wurden, da sie einen erhöhten Anteil an leichtflüchtigen Verbindungen aufwiesen, vor dem Test gestrippt. Es zeigte sich, dass der Algentest dabei zu unempfindlich ist, die relativ geringe Konzentration an Kontaminanten nachzuweisen. Für Grundwasserproben ist jedoch noch nicht geklärt, inwieweit es sinnvoll ist, die Substanzen mittels Festphasenextraktion aufzukonzentrieren. Eine Vorschrift zur Untersuchung und Bewertung von Grundwasserproben existiert zur Zeit noch nicht.

*Tabelle 5.22:  $E_rC_{50}$ -Werte von Boden- und Grundwasserproben bei Variation der Ansatzgröße (miniaturisierte Tests und Erlenmeyeransatz),  $NaHCO_3$  300 mg/l.*

Probe	Erlenmeyer (100 ml) (95 %iger VB)	24 well MTP (2 ml) (95 %iger VB)	96 well MTP (200 $\mu$ l) (95 %iger VB)
<i>Bodenproben</i>			
CTNT4a-I [%]	2,40 (0,50-13,0)	4,40 (0,10-220)	5,60 (0,10-411)
CTNT4a-II [%]	18,9 (11,4-31,4)	17,2 (2,50-119)	14,6 (2,90-73,4)
CTNT4a-III [%]	19,1 (9,10-39,7)	22,2 (2,60-188)	23,8 (11,8-48,2)
BG 1 [%]	—	—	> 80
BG 1 <sup>a</sup> [%]	—	—	> 80
CTNT2002 [%]	—	—	1,43 (0,21-12,7)
CTNT2002 <sup>a</sup> [%]	—	—	1,40 (0,99-1,96)
<i>Grundwasserproben (vor Test gestrippt)</i>			
HB3 Referenz [%]	—	> 50	> 80
GOI 875 [%]	—	> 50	> 80
BVV 1250 [%]	—	> 50	> 80
BVV 3050 [%]	—	> 50	> 80

CTNT4a gemessen nach 18 Monaten Lagerung des Bodens in Flaschen aus: I = Polyethylen bei 4 °C, II = Polyethylen bei 20 °C, III = Glas bei 20 °C; a = gemessen mit dem Prototypen des HT-Algentests; — = nicht durchgeführt

In Tabelle 5.23 ( $E_rC_{50}$ -Werte) und Tabelle 5.24 (Endpunkt  $G_{20}$ ) sind die toxikologischen Parameter für Abwasserproben dargestellt, die vom Landesumweltamt NRW zur Verfügung gestellt wurden.

*Tabelle 5.23: Toxikologische Parameter von Abwasserproben berechnet über die Wachstumsrate,  $NaHCO_3$  300 mg/l.*

Probe	24 well MTP (2 ml)		96 well MTP (200 $\mu$ l)		HT-Algentest 96 well MTP (200 $\mu$ l)	
	$E_rC_{50}$ [%] (95 %iger VB)		$E_rC_{50}$ [%] (95 %iger VB)		$E_rC_{50}$ [%] (95 %iger VB)	
2738	55	(22-133)	> 80		> 80	
2739	6,5	(2,5-18)	10	(4,9-21)	6,5	(3,1-14)
2754	9,1	(3,9-22)	15	(4,2-55)	9,7	(4,5-21)
2778	> 80		> 80		> 80	

Auch hier sind die Ergebnisse bei der Berechnung über die Wachstumsrate zwischen den Ansatzgrößen 24-Well, 96-Well und des HT-Algentest-Prototypen miteinander vergleichbar. Die Probe 2778 wies dabei eine Eigenfluoreszenz auf, die bei den höchsten Konzentrationen beachtet werden musste. Nach DIN 38412 L33 [29], die zur Zeit entscheidende Norm für Abwasser in Deutschland, wird jedoch die Hemmung mit der Endpunktmethode berechnet und die Toxizität des Abwassers als G-Wert angegeben.

Der G-Wert ist die reziproke Verdünnung einer vorgegebenen Verdünnungsreihe, bei der erstmals eine Hemmung von 20 % unterschritten wird.

Diese G-Werte sind für die oben genannten Abwasserproben in Tabelle 5.24 zusammengestellt. Wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansatzgrößen auszumachen sind.

*Tabelle 5.24: Toxikologische Parameter von Abwasserproben nach DIN 38412 L33 [29], NaHCO<sub>3</sub> 300 mg/l.*

Probe	24 well MTP (2 ml)	96 well MTP (200 µl)	HT-Algentest 96 well MTP (200 µl)
	G <sub>20</sub>	G <sub>20</sub>	G <sub>20</sub>
2738	4	2	2
2739	> 32	32	> 48
2754	> 32	24	48
2778	6	6	6

Damit konnte gezeigt werden, dass die miniaturisierten Algentests sehr gut zur Bewertung von Umweltproben geeignet sind. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, muss bei Umweltproben darauf geachtet werden, wie bei dem herkömmlichen Verfahren für Abwasser nach DIN 38412 L33 [29], dass eventuell auftretende Eigenfluoreszenzen sowie Färbungen berücksichtigt werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass der miniaturisierte Algentest eine preisgünstige Alternative zur Bewertung von Umweltproben im Vergleich zum konventionellen „Erlenmeyeransatz“ ist. Dies rechnet sich gerade bei Sanierungen, da hier große Probenzahlen auftreten können. Dabei stellte sich für die Bewertung von Grundwasserproben ein weiterer Bedarf an Forschung und Entwicklung heraus.

### 5.5.2 Screening mit Proben der Henkel KGaA

Der HT-Algentest bietet die Möglichkeit, bei geringen Probenmengen eine große Anzahl von Proben zu untersuchen. Deshalb können die miniaturisierten Testverfahren oder der Prototyp zur Bestimmung der Algentoxizität bereits in

der Entwicklungsphase von Chemikalien und Zubereitungen eingesetzt werden. Die Testverfahren können somit einen Beitrag zum vorsorgenden und nachhaltigen Umweltschutz leisten. Um diesen Sachverhalt aufzuzeigen, sollten Proben aus der Pilotanlage der kombinatorischen Chemie der Henkel KGaA untersucht werden. Folgende wasserlösliche Tenside wurden mit dem Ziel der Untersuchung von Mischungstoxizitäten ausgewählt:

- A: anionisches Tensid,
- B: nichtionisches Tensid 1,
- C: nichtionisches Tensid 2,
- D: kationisches Tensid.

Aus diesen vier Tensiden wurden mit der Pilotanlage der kombinatorischen Chemie der Henkel KGaA 36 verschiedene binäre und tertiäre Mischungen hergestellt, die anschließend zusammen mit den vier Tensiden zur Verfügung gestellt wurden. Dabei liegen diese Tenside, die teilweise bereits als Ausgangssubstanz einen geringen Anteil an Wasser besitzen, und deren Mischungen zur besseren Verarbeitung als 50 Gew. %-Lösung in Wasser (50A, 50B, 50C, 50D) vor. Zur einfacheren Berechnung sind die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse auf die Menge dieser 50 %-Lösungen bezogen.

Zuerst wurden die Toxizitäten der vier Einzelsubstanzen mit den verschiedenen Testverfahren bestimmt. Diese werden mit den Vorgaben der Henkel KGaA verglichen, die aus den Toxizitäten der aktiven Substanzen auf die Lösungen umgerechnet wurden. Die  $EC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 5.25 zusammengefasst.

*Tabelle 5.25:  $E_rC_{50}$ -Werte der Tenside bezogen auf 50 Gew. %-Lösung in Wasser erhalten mit dem HT-Algentest,  $NaHCO_3$  50 mg/l.*

Testsubstanz	Angaben der Henkel KGaA	HT-Algentest 96 well MTP (200 $\mu$ l) (95%iger VB)
50A [mg/l]	22,2 <sup>a</sup>	130 (57,7-292)
50B [mg/l]	> 200 <sup>b, c</sup>	372 (295-467)
50C [mg/l]	0,2 - 2 <sup>b</sup>	8,51 (0,87-88,8)
50D [mg/l]	3,9 <sup>a</sup>	77,9 (20,6-295)

a = Angaben der Henkel KGaA aus eigenen Messungen, b = Angaben der Henkel KGaA aus Sicherheitsdatenblätter, c = Test mit *Selenastrum capricornutum*

Aus den Angaben der Henkel KGaA über die Toxizitäten der reinen Tenside folgt: Mit den untersuchten Tensiden wird ein relativ großer Bereich an Toxizitäten abgedeckt. Wenn die Massenkonzentration als Bezugspunkt herange-

zogen wird, wirkt das nichtionische Tensid 2 (Tensid C) am stärksten auf das Algenwachstum und das nichtionische Tensid 1 (Tensid B) am schwächsten.

Die Ergebnisse aus den HT-Algentest weisen eine bis zu 20fache geringere Toxizität der Tenside im Vergleich zu den Angaben der Henkel KGaA auf. Wobei der Unterschied bei dem kationischen Tensid (50D) am größten und für das nichtionische Tensid 2 (50C) am geringsten ist. Dieser EC-Wert für das Tensid C gemessen mit den miniaturisierten Testverfahren ist im tolerablen Bereich (3-fache Abweichung), aber gegenüber dem Toxizitätsbereich des Sicherheitsdatenblatts doch deutlich erhöht. Insgesamt würde der 96-Well-Test die Toxizität der Tenside mehr oder weniger unterbewerten. Dies deutet auf Oberflächeneffekte hin, die aber im Weiteren noch genauer zu untersuchen sind, da ansonsten, wie in Kapitel 6.4 gezeigt, keine signifikanten Hinweise auf Adsorptionen vorliegen.

Aus diesen Toxizitäten können nun nach dem Konzept der additiven Toxizität die EC-Werte der Mischungen berechnet werden. Ein Vergleich mit den tatsächlich vorhandenen, gemessenen Toxizitäten zeigt, inwieweit das Konzept zur Modellierung anwendbar ist oder ob Synergismen bzw. Antagonismen auftreten.

Die Algentoxizitäten der Mischungen lassen sich mit folgendem Layout der Mikrotitrationsplatten (Abbildung 5.15) screenen. Dabei werden pro Platte 8 Proben in je drei Konzentrationen bei je drei parallelen Testansätzen untersucht, so dass die zu erwartenden Toxizitäten der Proben möglichst eng abgedeckt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrolle			Nullwert			K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 2 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 2 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 2 mg/L
B	Probe 1a	Probe 1a	Probe 1a	Probe 3a	Probe 3a	Probe 3a	Probe 5a	Probe 5a	Probe 5a	Probe 7a	Probe 7a	Probe 7a
C	Probe 1b	Probe 1b	Probe 1b	Probe 3b	Probe 3b	Probe 3b	Probe 5b	Probe 5b	Probe 5b	Probe 7b	Probe 7b	Probe 7b
D	Probe 1c	Probe 1c	Probe 1c	Probe 3c	Probe 3c	Probe 3c	Probe 5c	Probe 5c	Probe 5c	Probe 7c	Probe 7c	Probe 7c
E	Probe 2a	Probe 2a	Probe 2a	Probe 4a	Probe 4a	Probe 4a	Probe 6a	Probe 6a	Probe 6a	Probe 8a	Probe 8a	Probe 8a
F	Probe 2b	Probe 2b	Probe 2b	Probe 4b	Probe 4b	Probe 4b	Probe 6b	Probe 6b	Probe 6b	Probe 8b	Probe 8b	Probe 8b
G	Probe 2c	Probe 2c	Probe 2c	Probe 4c	Probe 4c	Probe 4c	Probe 6c	Probe 6c	Probe 6c	Probe 8c	Probe 8c	Probe 8c
H	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,2 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,2 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,2 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,6 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,6 mg/L	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,6 mg/L	Kontrolle			Nullwert		

Abbildung 5.15: Belegung der 96-Well-Mikrotitrationsplatte für den Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* bei dem Screening von 8 Proben in drei Konzentrationen und je drei Parallelen.

Mit diesem Plattenlayout können somit bei 5 Mikrotitrationsplatten (Anzahl der Schüttler beim Prototypen des HT-Algentests) bis zu 40 verschiedene

Proben gleichzeitig untersucht werden. Als Kontrolle wird dabei Kaliumdichromat in 4 Konzentrationen auf jeder Mikrotitrationsplatte mituntersucht und kann somit als zusätzliches Gültigkeitskriterium eingesetzt werden.

Die  $E_rC_{50}$ -Werte der Kaliumdichromat-Kontrollen liegen für alle Mikrotitrationsplattentests – sowohl für den Test im Infors-Inkubator als auch mit dem Prototypen – zwischen 0,6 und 1,3 mg/L, wobei mit einer Ausnahme mindestens zwei Konzentrationen eine Hemmung zwischen 20 % und 80 % vorweisen. Dies stimmt mit den Erfahrungen für Kaliumdichromat aus den laborinternen Reproduzierbarkeitsuntersuchungen überein (Tabelle 5.7 und Tabelle 5.12). Damit können die Messungen als vergleichbar und gültig angesehen werden.

In Tabelle 5.26 sind die nach dem Konzept der additiven Toxizität berechneten und die aus den Messdaten berechneten EC-Werte der vier Tenside und der binären Mischungen zusammengestellt. Die Bezeichnungen der Testsubstanzen geben die prozentualen Anteile der Tenside im Gemisch wieder.

Die Toxizität der reinen Tenside C und D (50C und 50D) konnte im Vergleich zu den vorhergehenden Messungen mit beiden 96-Well-Testverfahren annähernd bestätigt werden. Auch wenn aus drei Konzentrationen nicht immer eine EC-Wert-Bestimmung möglich ist, lässt sich der Toxizitätsbereich doch hinreichend genau angeben. Dagegen traten für die Tenside A und B (50A und 50B) nicht nachvollziehbare Abweichungen auf, deren Ursache im Rahmen des Projektes nicht geklärt werden konnte.

Bei den binären Gemischen ist eine überraschend gute Übereinstimmung zwischen den aus den Einzelsubstanzen berechneten und den bestimmten Ergebnissen festzustellen. Dabei ist der 96-Well-Test mit dem Infors-Inkubator genauer als der HT-Algentest Prototyp. Bedeutende Abweichungen zur Theorie der additiven Toxizität in Richtung höherer Toxizität sind beim Einsatz relativ großer Mengen an Tensid C zu beobachten. Dies deutet auf einen synergistischen Effekt hin. Die Mischungen mit einem hohen Gehalt an Tensid C (25 bis 45 Gew. %) waren aber zudem problematisch in der Handhabung, da sie eine erhöhte Viskosität aufwiesen, wodurch sich die beobachteten Abweichungen ebenfalls erklären lassen könnten.

Für die tertiären Gemische sind die Ergebnisse in Tabelle 5.27 dargestellt.

Bei den tertiären Gemischen sind die Differenzen zwischen der Theorie und der Praxis größer als bei den binären Gemischen. Die theoretische Berechnung führte dazu, dass für die Testung im Nachhinein nicht der richtige Toxizitätsbereich verwendet wurde. Die gemessenen EC-Werte lassen generell höhere Toxizitäten feststellen, als vorher berechnet worden war. Diese synergistischen Effekte könnten, wie auch bei den binären Gemischen, durch das Tensid C verursacht werden.

*Tabelle 5.26:  $E_rC_{50}$ -Werte der Einzelsubstanzen und binärer Gemische der Tenside bezogen auf 50 Gew. %-Lösung in Wasser,  $\text{NaHCO}_3$  50 mg/l.*

Testsubstanz		berechnet nach dem Konzept der additiven Toxizität	96 well MTP (200 $\mu$ l)	HT-Algentest 96 well MTP (200 $\mu$ l)
50A	[mg/l]	130	< 50	> 250
50B	[mg/l]	372	< 100	< 100
50C	[mg/l]	8,51	5 < x < 10	5 < x < 10
50D	[mg/l]	77,9	$\approx$ 50	100 < x < 250
5A/45B	[mg/l]	314	309	> 500
25A/25B	[mg/l]	193	180	> 250
45A/5B	[mg/l]	139	152	> 250
5A/45C	[mg/l]	9,39	< 5	< 5
25A/25C	[mg/l]	16,0	< 5	< 5
45A/5C	[mg/l]	53,6	46,9	16,6
5B/45C	[mg/l]	9,43	< 5	< 5
25B/25C	[mg/l]	16,6	< 5	5 < x < 10
45B/5C	[mg/l]	70,6	78,2	> 250
5D/45B	[mg/l]	270	221	> 500
25D/25B	[mg/l]	129	91,3	100 < x < 250
45D/5B	[mg/l]	84,6	32,0	100 < x < 250
5D/45C	[mg/l]	9,34	> 25	> 25
25D/25C	[mg/l]	15,34	6,7	8,5
45D/5C	[mg/l]	42,91	< 25	< 25
40A/10D	[mg/l]	115	68,1	> 250
10A/40D	[mg/l]	84,7	51,7	> 250

Die Untersuchungen zeigen, dass die miniaturisierten Testsysteme sehr gut geeignet sind, viele Proben aus der kombinatorischen Chemie gleichzeitig in sehr kurzer Zeit auf ihre Algentoxizität zu screenen. Dadurch können in Zukunft bereits in der Entwicklungsphase für strukturell ähnliche Chemikalien oder Zubereitungen Umweltgefährdungsprüfungen vorgenommen werden, die bei der Anmeldung zur Pflicht werden. Somit sind bereits frühzeitig Daten zur Gefährdungsabschätzung zugänglich, wodurch ein Beitrag zum nachhaltigen und vorsorgenden Umweltschutz geleistet wird.

*Tabelle 5.27:  $E_r C_{50}$ -Werte tertiärer Gemische der Tenside bezogen auf 50 Gew. %-Lösung in Wasser,  $\text{NaHCO}_3$  50 mg/l.*

Testsubstanz		berechnet nach dem Konzept der additiven Toxizität	96 well MTP (200 $\mu$ l)	HT-Algentest 96 well MTP (200 $\mu$ l)
5A/40B/5C	[mg/l]	68,2	< 25	< 25
5A/5B/40C	[mg/l]	10,5	4,5	6,3
40A/5B/5C	[mg/l]	55,0	< 25	< 25
10A/10B/30C	[mg/l]	13,8	< 5	< 5
30A/10B/10C	[mg/l]	34,9	< 10	< 10
10A/30B/10C	[mg/l]	37,5	< 10	13,4
12,5A/25B/12,5C	[mg/l]	154	65,0	< 50
16,6A/16,6B/16,6C	[mg/l]	23,6	< 10	< 10
22,5A/5B/22,5C	[mg/l]	17,7	< 5	< 5
22,5A/22,5B/5C	[mg/l]	60,9	< 25	37,1
5A/22,5B/22,5C	[mg/l]	18,2	< 5	< 5
5D/5B/40C	[mg/l]	10,5	< 5	< 5
40D/5B/5C	[mg/l]	44,9	< 25	< 25
5D/40B/5C	[mg/l]	65,9	$25 < x < 50$	$\approx 50$
16,6D/16,6B/16,6C	[mg/l]	22,6	< 10	$\approx 10$
22,5D/5B/22,5C	[mg/l]	17,0	> 25	> 25
22,5D/22,5B/5C	[mg/l]	53,4	< 25	< 25
5D/22,5B/22,5C	[mg/l]	18,1	12,6	$\approx 10$
12,5A/25C/12,5D	[mg/l]	15,7	5,0	$5 < x < 10$

## 5.6 Einsatzgebiete des HT-Algentests

Die klassische Anwendung des Algenzellvermehrungshemmtest liegt in folgenden Bereichen:

- Zur Beurteilung der Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe (EU-Richtlinie 92/69/EWG 1992) [55].
- Zur Bewertung von Umweltproben (Abwasser, Boden).

Dabei weist der HT-Algentest insbesondere dann Vorteile auf, wenn bei den Untersuchungen viele Proben auftreten. Dies lässt sich zum Beispiel in folgenden Fällen ausnutzen:

- Fall 1: Grundlagenforschung  
Untersuchung von Mischungstoxizitäten sowie der Abhängigkeit der Wirkung von molekularen Strukturen (QSAR) von Chemikalien.
- Fall 2: Entwicklung  
Frühzeitige Erfassung umweltgefährdender Faktoren neuer Substanzen bereits in der Entwicklungsphase. Dabei werden strukturell ähnliche Substanzen oder Zubereitungen, z. B. aus der kombinatorischen Chemie, parallel getestet und neben den technischen Eigenschaften als Auswahlkriterium herangezogen.
- Fall 3: Altlasten  
Bei Altlasten können zur Kartierung und zur Überwachung des Sanierungserfolgs Boden- und Grundwasserproben auf ihre Algentoxizität untersucht werden. Dabei treten je nach Größe der Altlast sehr viele Messstellen auf.
- Fall 4: Abwasser und Oberflächenwasser  
Viele Messstellen können ebenfalls bei der Überwachung von Flussläufen und deren Abwassereinleitungen notwendig sein.
- Fall 5: „Toxicity Identification and Evaluation“  
Interessant ist die Kopplung mit chemisch-analytischen bzw. chemisch-präparativen Methoden wie zum Beispiel GC und HPLC zur Erfassung der Algentoxizität einzelner Fraktionen von Gemischen. Dies dient zur Aufklärung der toxisch relevanten Inhaltstoffe von Umweltproben.

Die Daten aus diesen Untersuchungen von Chemikalien und Umweltproben können somit einen wesentlichen Beitrag zur Vervollständigung von Datenbanken hinsichtlich der Algentoxizität liefern. Des Weiteren können daraus zukünftig Grenzwerte abgeleitet werden und sie können die Grundlage zur Modellierung der Algentoxizität z. B. neu entwickelter Substanzen stellen.

Daneben lässt sich mit den miniaturisierten Testverfahren die statistische Sicherheit des Algenzellvermehrungshemmtest nach DIN 38412 L33 [29] und DIN 38412 L9 [30] durch die größere Anzahl an Parallelen und Konzentrationen wesentlich erhöhen. Üblicherweise werden nur 5 max. 6 Konzentrationen getestet, wobei drei Parallelen pro Konzentration eingesetzt werden. Die DIN 38412 L33 [29] setzt sogar nur zwei Parallelen ein. Zusätzlich lassen sich zur Erhöhung der Validität der Ergebnisse, im Gegensatz zum konventionellen Testverfahren im „Erlenmeyerkolben“, ohne größeren Aufwand an Material und Inkubationsraum auch Testansätze zur chemischen Analytik in die miniaturisierten Testverfahren integrieren. Dies ist notwendig, da nach der EU-Richtlinie

92/69/EWG [55] der Nachweis erbracht werden muss, dass die Konzentration der Prüfsubstanz über den gesamten Prüfzeitraum bei bis zu 80 % der Anfangskonzentration ist. Zudem gilt beim AQS-Merkblatt [51] für Abwasseruntersuchungen folgendes Gültigkeitskriterium: Kaliumdichromat soll in einer Konzentration von 0,5 mg/l mitgemessen werden, wobei 30 bis 80 % Hemmung erreicht werden sollte. Dies kann ebenfalls ohne weiteres integriert werden, wobei sogar der Ausbau auf mehrere Konzentrationen mit Bestimmung des EC-Werts möglich ist. Das miniaturisierte Testverfahren gewährleistet somit eine niedrigere Variabilität und höhere Zuverlässigkeit als die konventionellen Testverfahren im „Erlenmeyerkolben“.



# Kapitel 6

## Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die in diesem Kapitel beschriebenen biotechnologischen Applikationen gehören ebenfalls zu der Gruppe der Toxizitätstests. Neben den Grundlagen dieser Testverfahren sollen die Parallelen in der Versuchsdurchführung zum Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* und die damit verbundene Chance zum Einsatz unserer neu entwickelten Anlage aufgezeigt werden.

### 6.1 Genotoxizitätstests

Genotoxizitätsprüfungen sollen das Risiko vererbbarer Schäden belegen und Hinweise auf mögliche kanzerogene Eigenschaften der untersuchten Substanzen geben [61]. Neben dem Schutz des Menschen vor genotoxischen Substanzen sollte dabei auch die Bedeutung von Genotoxinen in den Ökosystemen nicht unberücksichtigt bleiben. So können diese zur Veränderung von Populationen (Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen) führen und kanzerogene Effekte bei landwirtschaftlichen Nutztieren, Wild und Fischen auslösen. Eine mögliche Rückwirkung auf den Menschen über die Nahrungskette ist dabei nicht ausgeschlossen [62].

Das genotoxische Potential von Umweltschadstoffen kann durch verschiedene biologische Testverfahren und mit unterschiedlichen genetischen Endpunkten überprüft werden. Bei der Entwicklung und Anwendung von Testsystemen zur Prüfung der Genotoxizität geht man von einer Korrelation zwischen primärer DNA-Schädigung und dem Auftreten von Tumoren aus.

Die biologische Bedeutung der DNA-Reparatur zur Aufrechterhaltung der Integrität der DNA zeigt sich in der großen Vielzahl von Mechanismen, über die selbst einfache Organismen verfügen. Molekularbiologische Untersuchungen haben belegt, dass die wichtigsten Reparatursysteme im Bakterium *Escherichia coli* den Mechanismen von Säugezellen ähneln [63]. DNA schädigende Einflüsse wie UV-Strahlung oder chemische Verbindungen induzieren bei *E. coli* komplexe zelluläre Veränderungen, die in ihrer Gesamtheit als SOS-Antwort bezeichnet werden. Die SOS-Antwort äußert sich in einem gesteigerten Vermögen

geschädigte DNA zu reparieren und in einer gehemmten Zellteilungsaktivität [64]. Als Auslöser der SOS-Antwort wird das Vorliegen einzelsträngiger DNA gesehen.

Die in den Genotoxizitätstests eingesetzten Bakterienstämme sind gentechnisch dahingehend verändert, dass sie eine Kopplung des künstlich eingeführten *lacZ*-Gens mit einem Gen des zelleigenen SOS-Reparatursystems aufweisen. Das SOS-Reparatursystem selbst besteht aus mindestens zwölf unterschiedlichen Genen [65] und wird durch Vorliegen einzelsträngiger DNA aktiviert. Die gentechnisch veränderten Bakterien werden im Test gegenüber einer möglichen genotoxisch wirksamen Probe exponiert. Genotoxine können zu DNA-Schäden führen und damit zur Aktivierung des SOS-Reparatursystems. Durch die Kopplung des *lacZ*-Gens mit einem Gen des SOS-Reparatursystems, kommt es bei einer Aktivierung des Reparatursystems indirekt auch zur Aktivierung des *lacZ*-Gens. Die Aktivierung des *lacZ*-Gens führt zur Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase in der Zelle. Eine Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Bildung ist über ihre Enzymaktivität möglich. Dies kann über die Spaltung von o-Nitrophenylgalactopyranosid in einen gelben Farbstoff photometrisch erfasst werden. Die Quantität der gebildeten  $\beta$ -Galaktosidase gilt als Testkriterium für den Nachweis einer genotoxischen Wirkung. Um die physiologischen Vorgänge in Säugetierorganismen zu simulieren, wird der Test sowohl mit als auch ohne S9-Mix durchgeführt. Der S9-Mix enthält ein mit Aroclor induziertes Rattenleberhomogenat und eine Mischung aus Enzymen und Kofaktoren, um eine säugetiertypische Metabolisierung von Substanzen hervorzurufen. Um einen möglichen toxischen Effekt bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wird das Wachstum der Bakterien durch die Bestimmung der optischen Dichte kontrolliert.

### 6.1.1 umu-Test

Im umu-Test wird *Salmonella typhimurium* pSK1002 als Testorganismus eingesetzt. Als gentechnische Veränderung trägt der Testorganismus das Multicopyplasmid pSK1002. Dieses Plasmid enthält neben der Information für eine Ampicillinresistenz ein Fusionsprodukt aus dem *lacZ*-Operon und dem *umuC*-Gen des SOS-Reparatursystems. Der Teststamm besitzt einen Zellwanddefekt (*rfa*-Mutation), der die Permeabilität für große Moleküle ins Zellinnere erhöht und gleichzeitig für die Apathogenität des Stammes verantwortlich ist. Zusätzlich ist die Funktion der Excisionsreparatur ausgeschaltet.

### 6.1.2 NM2009-Test

Eine Variante des umu-Tests ist der NM2009-Test mit *Salmonella typhimurium* NM2009. Dieser Testorganismus enthält neben dem Plasmid pSK1002 das Plasmid pNM12. Es ist verantwortlich für die Bildung des Enzyms O-Acetyl-

transferase. Durch die Einführung dieses Plasmids erhöht sich die Gesamtaktivität der O-Acetyltransferase in der Zelle gegenüber der Enzymaktivität im *umu*-Teststamm um mehr als das 400-fache [66]. Dies führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Testorganismus gegenüber aromatischen Aminen und Nitroaromaten [67].

### 6.1.3 SOS-Test

Als Teststamm wird im SOS-Test *Escherichia coli* PQ37, ein von Huisman und D'Ari [68] entwickelter *E. coli* K12 Abkömmling, eingesetzt [69]. Bei diesem Bakterium ist anders als bei den oben beschriebenen Testorganismen das *lacZ*-Gen der  $\beta$ -Galaktosidase mit dem *sfiAC*-Gen des SOS-Reparatursystems fusioniert. Dieses Fusionsprodukt ist nicht als Plasmid in die Zelle integriert, sondern auf dem Hauptgenom des Bakteriums lokalisiert.

### 6.1.4 Methodenoptimierung

Der *umu*-Test, der NM2009-Test und der SOS-Test wurden von Ehrlichmann et al. [70] so modifiziert, dass alle drei Tests nach einem einheitlichen Protokoll im Mikrotitrationsplattenmaßstab durchführbar sind.

- Die jeweilige Testkultur wird mit bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten (kryokonservierten) Bakterien angeimpft.
- In ca. 90 Minuten wächst sie bis zu einer Trübung von 340 bis 350 Formazin-Trübungs-Einheiten (FNU) heran.
- Anschließend wird sie in Mikrotitrationsplatte A- und A+ gegeben. A- enthält das Testgut in unterschiedlichen Verdünnungen und die Kontrollansätze. A+ enthält ebenfalls das Testgut in unterschiedlichen Verdünnungen und die Kontrollansätze sowie ein metabolisierendes Enzymgemisch (S9-Mix) zur Aktivierung von Promutagenen. Beide A-Platten werden verschlossen und für 1,5 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert.
- Aus beiden A-Platten werden  $30\text{ }\mu\text{l}$  Aliquots entnommen und in neue Mikrotitrationsplatten B- und B+ überführt. Die B-Platten enthalten pro Well  $270\text{ }\mu\text{l}$  vortemperiertes Nährmedium. Die B-Platten werden für 2,5 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert.
- Aus den B-Platten werden  $30\text{ }\mu\text{l}$  Aliquots entnommen und in neue Mikrotitrationsplatten C- und C+ überführt. Die C-Platten enthalten das Substrat o-Nitrophenylgalactopyranosid (ONPG). Direkt nach Zugabe der Bakterien wird die Enzymkinetik im Mikrotitrationsplatten-Photometer aufgenommen.
- Nachdem die Aliquots für die C-Platten entnommen wurden, wird die optische Dichte beider B-Platten bestimmt.

Als Testkriterium gilt bei allen Tests die Induktionsrate, die sich aus der Steigung der Enzymkinetik ( $\beta$ -Galaktosidase) im linearen Bereich ergibt. Das

Wachstum der Bakterien wird dabei in Form des Wachstumsfaktors berücksichtigt.

Entsprechend der DIN-Vorschrift 38415 T3 [71] gilt eine Probe als „genotoxisch“, wenn die Induktion  $I$  mindestens einer Verdünnungsstufe  $\geq 1,5$  ist und der Wachstumsfaktor  $W$  dieser Verdünnungsstufe mindestens 0,5 beträgt. Eine Probe wird als „nicht genotoxisch“ eingestuft, wenn sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung die erste Verdünnungsstufe mit einem Wachstumsfaktor  $\geq 0,5$  keine Induktion  $\geq 1,5$  aufweist und ebenfalls keine Induktion  $\geq 1,5$  bei Wachstumsfaktoren  $< 0,5$  auftreten. Werden Induktionswerte  $\geq 1,5$  in Verdünnungsstufen mit Wachstumsfaktoren  $< 0,5$  gefunden, wird die Probe als „toxisch“ bezeichnet.

Ehrlichmann et al. konnten anhand von 42 Referenzsubstanzen die Eignung der optimierten und auf Mikrotitrationsplattenmaßstab übertragenen Genotoxizitätstests aufzeigen [70].

## 6.2 Zellvermehrungshemmtests

Bei mikrobiellen Zellvermehrungshemmtests wird die Häufigkeit der Zellteilung gemessen. Das Bakterienwachstum wird dabei über die optische Dichte der Zellsuspension verfolgt. Diese wird als Extinktion bei 450 nm ( $OD_{450}$ ) mit Photometern gemessen.

Die genaue chemische Zusammensetzung der einzelnen Testmedien soll hier nicht aufgeführt werden. Diese sind den jeweiligen DIN-Vorschriften zu entnehmen.

### 6.2.1 *Pseudomonas putida*-Zellvermehrungshemmtest

Das Maß für die Toxizität eines Testgutes in diesem Testsystem ist die Hemmung der Zellvermehrung bei dem *Organismus Pseudomonas putida*. Der Test kann nach DIN 38412 L8 [72], Erweiterung für 96-Well-Mikrotitrationsplatten, durchgeführt werden. Die Platten werden dabei bei 21 °C inkubiert und vor jeder Messung soll die Platte für 60 Sekunden geschüttelt werden. Bis zum Erreichen des Auswertungsendpunktes (frühstationäre Phase) wird die optische Dichte in 20 Minuten-Intervallen gemessen. Da die Zunahme der Zellzahl in einem definierten Bereich mit einer Steigung der optischen Dichte korreliert, gilt diese als Maß für die Zellvermehrung der Bakterien.

Das Plattenlayout entspricht dabei nahezu dem des Algentests. Es werden bei jedem Test Wachstumskontrollen (Nährmedium, Verdünnungswasser, Inokulum), Testansätze (Testgut, Nährmedium, Verdünnungswasser, Inokulum) und Blindwerte (Nährmedium und Verdünnungswasser) mitgeführt.

In der Regel haben die Wachstumskontrollen nach 22 bis 25 Stunden ihre stationäre Phase erreicht und der Test kann beendet werden. Wenn der Auswer-

tungsendzeitpunkt nicht anders bestimmt wurde, kann die Datenaufnahme nach 30 h abgebrochen werden. Ein *Pseudomonas putida*-Zellvermehrungshemmtest ist nach DIN 38412 L8 [72] gültig, wenn sich die Ausgangstrübung im Kontrollansatz innerhalb der Testzeit um mindestens das 100fache erhöht hat. Das entspricht ungefähr sechs bis sieben Generationszyklen.

### 6.2.2 *Vibrio fischeri*-Zellvermehrungshemmtest

Das Testkriterium bei diesem Verfahren ist die Wachstumshemmung des marinen Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri*. Der Test wird analog dem *Pseudomonas putida*-Zellvermehrungshemmtest im Mikrotitrationsplattenmaßstab durchgeführt. Über einen Zeitraum von 30 Stunden wird die optische Dichte der Testansätze in den einzelnen Kavitäten in 20 Minuten-Abständen gemessen. Die Inkubationstemperatur beträgt hier 20 °C. Die optische Dichte ist auch in diesem Verfahren die Grundlage für die Detektion der Zellvermehrung des Testbakteriums. Der *Vibrio fischeri*-Zellvermehrungshemmtest wird gemäß DIN-Entwurf, Stand März 1995 durchgeführt.

Die benötigten Komponenten für die Testdurchführung sind ebenfalls Testgut, Nährmedium, Verdünnungswasser und Inokulum.

Ein *Vibrio fischeri*-Zellvermehrungshemmtest ist gültig, wenn sich die Ausgangstrübung im Kontrollansatz innerhalb der Testzeit um mindestens das 10fache erhöht. Dies entspricht drei bis vier Verdopplungsschritten.

## 6.3 Diskussion

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits die oben erwähnten Testverfahren erfolgreich in den 96-Well-Mikrotitrationsplattenmaßstab übertragen [70, 73]. Dies ist Voraussetzung für eine nachfolgende Automatisierung und eine mögliche Umsetzung der Testsysteme mit dem HT-Algentest-Automaten.

Vor allem die hier beschriebenen Zellvermehrungshemmtests weisen deutliche Parallelen zum *Desmodesmus subspicatus*-Wachstumshemmtest auf. Die Inkubation bei 20 °C bzw. 21 °C mit definierten Schüttelsequenzen ist ohne weiteres mit unserem neu entwickelten Inkubationssystem „PolyShake“ realisierbar. Ebenso kommen die häufigen Transporte der Mikrotitrationsplatten ins Photometer zur Messwerterfassung unserem Robotik-Plattform-Konzept entgegen. Die vor dem eigentlichen Test ablaufenden Pipettierschritte zur Probenaufbereitung entsprechen in Anzahl der vorzulegenden Substanzen und den erforderlichen Volumina nahezu dem Algentest.

Zur vollständigen Testumsetzung müsste eine Entwicklungsstudie für die im *Desmodesmus subspicatus*-Wachstumshemmtest eingesetzten Mikrotitrationsplatten gemacht werden, da bei den Validierungsphasen der Zellvermehrungshemmtests andere Platten (Material, Form) verwendet wurden. Um die er-

folgreich getesteten Mikrotitrationsplatten dieser Testverfahren verwenden zu können, müssten die Oberflächen der Schütteleinheiten modifiziert werden.

Bei den drei verschiedenen Genotoxizitätstests stellt die Inkubation (bei 37 °C) und die erforderliche Datenaufnahme mittels einen Mikrotitrationsplatten-Photometer auch kein größeres Problem dar. Es müssten aber ebenfalls weitere Untersuchungen bzgl. der verwendeten Platten angestellt werden bzw. auch hier wäre ein Umbau der Schüttler von Nöten. Hingegen optimiert werden sollte das Liquid-Handling, da im Vergleich zu den übrigen Testverfahren deutlich mehr Pipettierschritte erforderlich sind und damit im Vergleich zur Testdauer (ca. 4 h) keine effiziente Pipettierung möglich ist. Es müsste entweder eine weitere Pipettierstation (Mehrkanal-Pipette) in die Plattform integriert werden oder direkt ein eigenständiger Pipetierroboter an die Anlage gekoppelt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neu entwickelte Anlage zur Durchführung des *Desmodesmus subspicatus*-Wachstumshemmtest (HT-Algentest) Potential besitzt um die in diesem Kapitel vorgestellten Toxizitätstests durchzuführen. Allerdings müssen insbesondere bei den wissenschaftlich gefragten Genotoxizitätstests technische Erweiterungen an der Anlage gemacht werden. Bei den Zellvermehrungshemmtest ist die Test-Umgebung hingegen bereits nahezu vollständig vorhanden. Weitere Anstrengungen bzgl. einer Testumsetzung dieser Verfahren sind aber erstrebenswert, da momentan auch hier keine (voll-) automatisierte Form dieser Toxizitätstests vorhanden ist.

# Kapitel 7

## BioLane™ Supervisor

### 7.1 Software Design

„BioLane™ Supervisor“ stellt einen als Executable programmierten, frei konfigurierbaren Anwendungs-Client für Geräteansteuerungen dar. Freie Konfiguration bedeutet dabei, dass Anwendungen „weich“ in einer binären Datei abgelegt sind und zur Laufzeit konfigurierbar sind. Da mit einer fertigen Kompilation gearbeitet wird, ist für die Erstellung einer neuen Applikation keine einzige Zeile Quellcode-Programmierung notwendig. Dies ermöglicht eine einfachere und zuverlässigere Software-Entwicklung.

Das dazugehörige Server-Modul wird vom sogenannten Dispatcher repräsentiert. Dieser kann ebenfalls als eigenständiges Executable mit Telegramm Monitor (z. B. für Win95, 98) oder als NT-Service gestartet werden. Der Dispatcher fungiert als Kommunikationsschnittstelle zwischen der Supervisor-Software und der Hardware bzw. ermöglicht ein Schreiben und Lesen von Versuchsdaten in Datenbanken, Files o.ä.

Die Kommunikation zwischen Client (Supervisor) und Server (Dispatcher) findet über das Netzwerkprotokoll TCP / IP (Transmission Control Protocol / Internet Protocol) statt.

#### 7.1.1 Dispatcher Technologie

Der Dispatcher reicht Kommunikationstelegramme unabhängig von Art und Inhalt weiter. Die Dispatcher-Schnittstellen (Seriell, TCP/IP, UDP, DLL, SQL, ASCII) sind zudem auch in der Anwender-Software „BioLane™ Supervisor“ verankert. D. h. bei rein lokalen Anwendungen kommt man ohne das Dispatcher-Modul aus.

Der Dispatcher ist prinzipiell aus zwei Teilen aufgebaut, einem Dispatcher-Server- und einem Dispatcher-Client-Teil.

Der Server-Teil ist für die Kommunikation mit der jeweiligen Komponenten-Software über ein spezielles TCP/IP-Protokoll im XML-Format (siehe Anhang 4) verantwortlich. Dieses für Netzwerk-Kommunikation standardisierte Protokoll ermöglicht eine plattformunabhängige Benutzung des Dispatchers.

Der Client-Teil kommuniziert direkt mit der jeweiligen Hardware bzw. erlaubt ein Schreiben der Versuchsdaten in Datenbanken, Files o.ä. Beispielsweise ist der Dispatcher im Falle einer seriellen Geräte-Anbindung ein Server-Relais zwischen der Netzwerkverbindung und den seriellen Com-Ports.

In Abbildung 7.1 ist schematisch die Funktionsweise des Dispatcher-Moduls dargestellt.

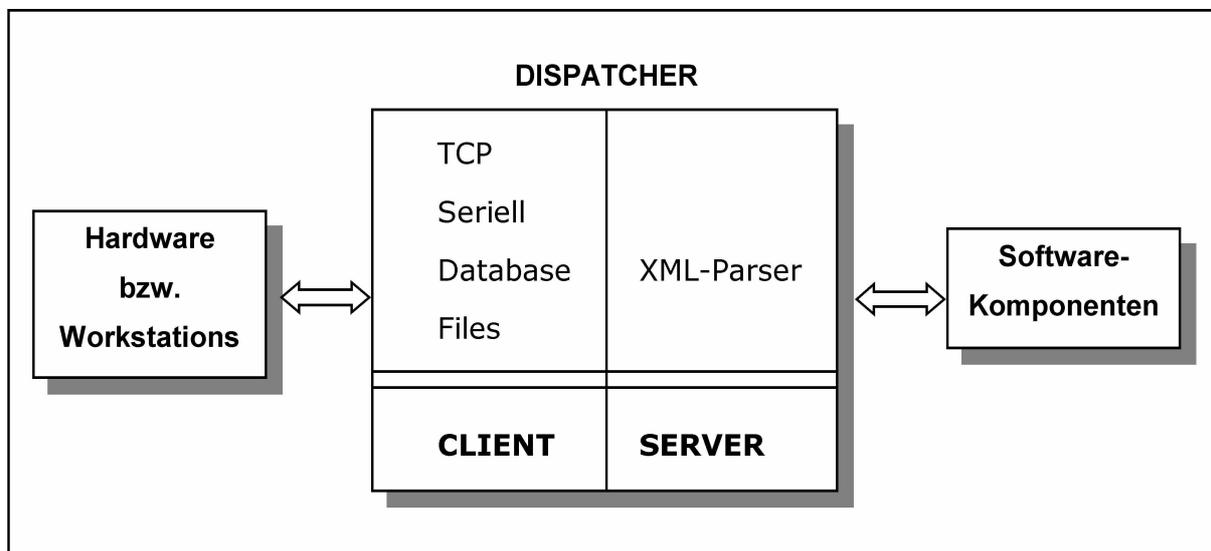


Abbildung 7.1: Funktionalität des Dispatchers. Die Software-Komponenten der übergeordneten Client-Software („BioLane™ Supervisor“) kommunizieren mit der Server-Seite des Dispatchers über TCP/IP im XML-Format. Ein im Dispatcher integrierter XML-Parser transferiert die ankommenden Botschaften zu der entsprechenden Hardware im jeweiligen Schnittstellen-Protokoll.

Für jede Kommunikations-Ebene zwischen Software-Komponente und Dispatcher-Server wird ein eigener Thread auf dem Dispatcher erzeugt und eine eindeutige Prozess-ID vergeben. Dadurch kann der Dispatcher theoretisch beliebig viele Clients bedienen (Dynamische Multi-Thread-Anwendung). Das gesamte Wissen über die Anzahl, Art, Inhalt der Kommunikation liegt auf der Client-Seite, so dass der Dispatcher absolut Projekt- und Systemunabhängig ist. Der Dispatcher-Socket identifiziert sich durch seine IP-Adresse und seinen Port. Deswegen können nicht nur innerhalb eines Dispatchers Geräte parallel bedient werden, sondern auch als Multitask-Anwendung mehrere Dispatcher gleichzei-

tig auf einem PC (unterschiedliche Port-Adressen). Dies erlaubt unbegrenzte Variationen für verteilte Anwendungen (siehe auch Abschnitt 7.1.3).

Dieses Konzept erlaubt eine enorme Sicherheit für verteilte Anwendungen, weil die Sichtbarkeit der Komponenten nach außen nur über den Dispatcher-Socket gegeben ist. Beispielsweise kann so in Files geschrieben werden, obwohl die Verzeichnisse dieses Rechners nicht freigegeben sind, da die textbasierten XML-Telegramme firewallgängig sind.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Merkmale der Dispatcher-Technologie nochmals zusammenfassend genannt werden:

- TCP/IP-Netzwerk-Server
- Standardisiertes XML-Protokoll zwischen Client und Server
- Plattformunabhängig, Firewallgängig
- Objektorientierter Kommunikationsinhalt
- Projektunabhängig
- Variable Peripherien: Seriell (RS232), TCP/IP, UDP, Datenbanken (Oracle, Interbase, MSSQL), Files, DLLs
- Dynamische Multi-Thread-Anwendung
- Unabhängige Multitask-Anwendung

## 7.1.2 Supervisor Technologie

### 7.1.2.1 Komponenten-Konfiguration

Die elementare Konfiguration aller in einer Anwendung vorkommender Komponenten (Geräte, Daten-Objekte) bestimmt die gesamte Applikations-Struktur. Neben den Schnittstellen-Eigenschaften (Beispiel Serielle Kommunikation: Baud-Rate, Anzahl der Stop-Bits, Parität, usw.) kann eine Komponenten-Hierarchie festgelegt werden, die nach dem Master-Slave-Prinzip funktioniert. Diese Hierarchie ermöglicht die Kommunikation zwischen einzelnen Komponenten, was eine komplexe Interaktion dieser Objekte im eigentlichen Programmablauf zulässt. Die Anzahl der Komponenten (physisch oder virtuell) ist dabei unbegrenzt.

### 7.1.2.2 Skriptsprache

Jede fertiggestellte Anwendung beruht auf Skripten, die schrittweise abgearbeitet werden. Dabei können innerhalb eines Skripts vielschichtige Verzweigungen zu anderen Komponenten auftreten. Der einfachste Fall eines Skripts besteht aus einem einzelnen Befehl.

Die Einfachheit der Supervisor-Programmierung beruht in der Erstellung von Befehl-Strings (mit Parameter In- und Output) auf unterster Kommunikationsebene, was ein direktes Ansprechen des jeweiligen Geräts ermöglicht. Mehrere dieser Kommando-Strings gekoppelt ergeben dann einen gekapselten Programmbefehl. Mehrere dieser Programmbefehle (von der gleichen oder von ver-

schiedenen Komponenten) ergeben dann das gewünschte Applikations-Skript. Diese Skripte können dann wiederum zu noch leistungsfähigeren Skripten verknüpft werden (siehe Abbildung 7.2). Diese exklusive Besonderheit macht „Bio-Lane™ Supervisor“ zu einer effizienten High-Level-Skript-Sprache.

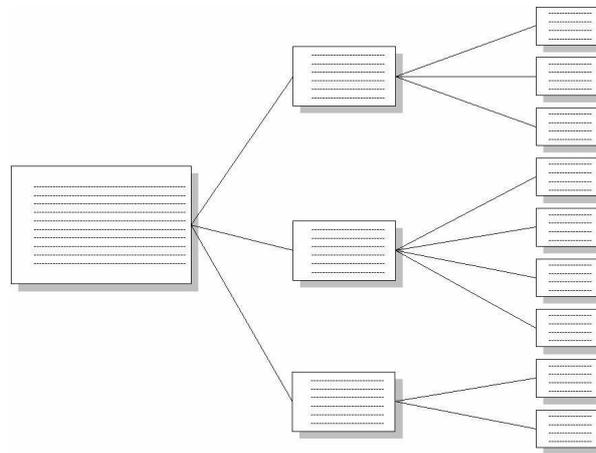


Abbildung 7.2: Ein leistungsfähiges Skript (links) setzt sich aus vielen untergeordneten Skripten zusammen.

Um den Informationsfluss innerhalb eines Skripts zu gewährleisten, können beliebig viele Konstanten und Variablen n-dimensionaler-Art definiert werden. Die Anzahl der Konstanten und Variablen kann dabei aufgrund des oben erwähnten Master-Slave-Prinzips minimal gehalten werden.

### 7.1.2.3 Multithreading

Es können mehrere Skripts gleichzeitig gestartet werden, was die Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten noch weiter erhöht. So können parallel zur Hauptanwendung z. B. Überwachungsprogramme für bestimmte Funktionen laufen (vgl. Kapitel 4.2.1).

Das gleiche Prinzip des Multithreading wird beim integrierten Online-Monitoring-Modul angewandt. Hier können als MDI-Anwendung beliebig viele Komponenten-Eigenschaften auf verschiedene Weise visualisiert werden. Als Darstellungstypen stehen dem Benutzer hier Textfelder (z. B. für Status-Abfragen), mehrdimensionale Diagramme (z. B. zur graphischen Darstellung der Messwerterfassung) oder Images (z. B. für Web-Kameras) zur Verfügung.

### 7.1.2.4 Binäres Applikations-File

Die gesamte Applikations-Umgebung wird in einem binären File (\*.cpl) abgespeichert. Hierin liegen dann alle Informationen über die oben beschriebenen Konfigurationen, Skripte und Monitoring-Einstellungen. Außerdem finden sich

dort alle Angaben für die benötigte Kommunikation zum Dispatcher-Modul wieder.

Durch bloßes Einladen eines entsprechenden binären Files erhält man somit eine komplett neue Applikation.

Das Grundprinzip der Supervisor-Technologie ist in Abbildung 7.3 schematisch dargestellt. Das Konfigurations-File (\*.cpl) bildet die Grundlage für jede Applikation. Der Dispatcher führt alle darin verankerten Befehle aus und ordnet sie den jeweiligen Komponenten zu. Die komplette Funktionalität des Dispatchers wird nur über die darin zugrunde liegenden Informationen aktiviert. Angesprochen wird das Server-Modul über XML.

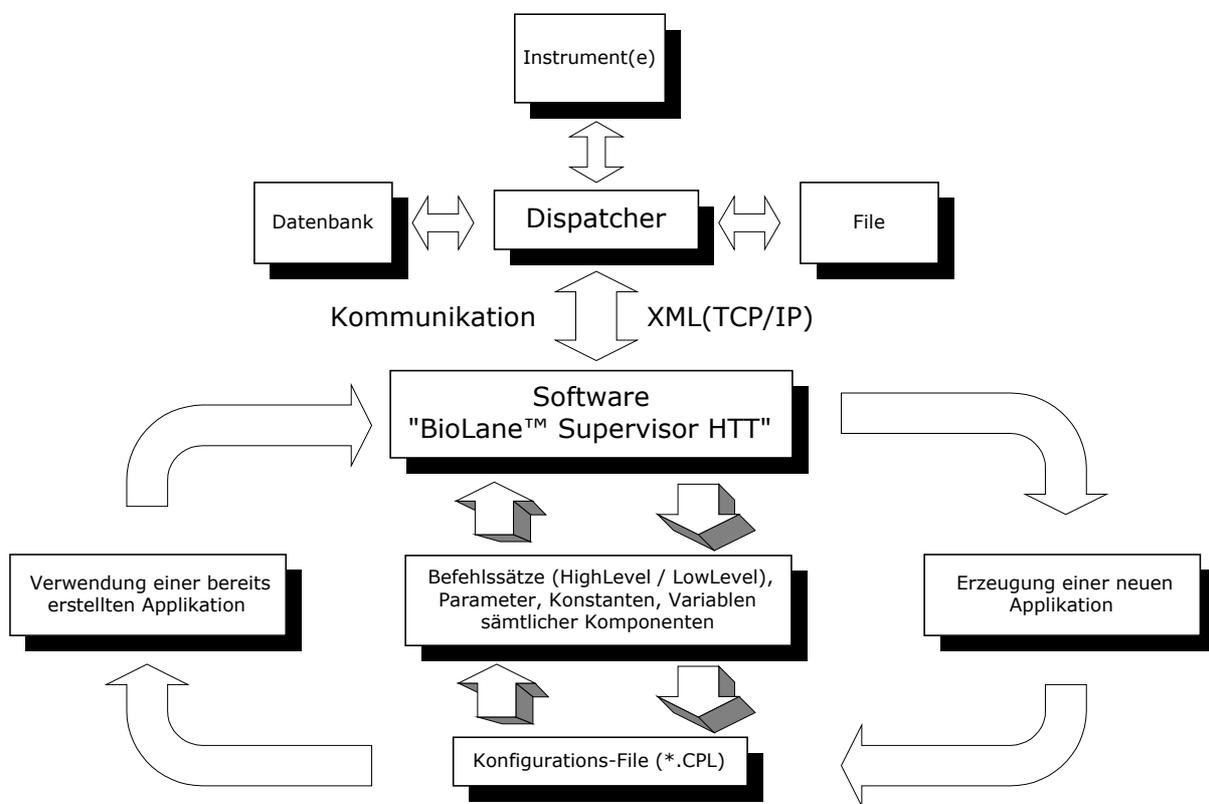


Abbildung 7.3: Prinzip der „BioLane™ Supervisor“-Technologie. Im binären Konfigurations-File (\*.cpl) ist die gesamte Information über eine Applikation gespeichert. Das Dispatcher-Modul ist dabei für die direkte Kommunikation mit der Peripherie verantwortlich.

Die Intelligenz jeder Anwendung ist somit streng dem zentralen Client-Modul „BioLane™ Supervisor“ zugeordnet.

### 7.1.3 Netzwerkfähigkeit

Das revolutionäre Kommunikations-Prinzip zwischen *Dispatcher* und „BioLane™ Supervisor“ ermöglicht eine Fernsteuerung via Internet. Da der Dispatcher für den Client einen eigenen, unabhängigen Thread aufbaut, können beliebig viele Clients bedient werden. Ebenso ist jeder Supervisor-Client in der Lage beliebig viele Dispatcher anzusprechen. Es entsteht somit eine M:N-Verknüpfung bzgl. der Client-Server-Struktur. Damit ergeben sich für später erstellte Anwendungen (fast) ungeahnte Möglichkeiten in Bezug auf die Ortsunabhängigkeit.

Dazu können folgende Beispiele genannt werden:

- Fall 1: 1 Rechner mit Supervisor und Dispatcher. Da die Hardware-Komponenten am Dispatcher-Rechner angeschlossen sind, bedeutet dies, dass der Anwender seine Applikation direkt vor Ort startet. Dies ist die einfachste aller Möglichkeiten. Hier wird kein externes Dispatcher-Modul benötigt, sondern es werden die lokal im Supervisor verankerten Dispatcher-Funktionalitäten verwendet.
- Fall 2: 1 Supervisor-Rechner und 1 Dispatcher-Rechner. Über TCP/IP wird hiermit eine „weltweite“ und ortsunabhängige Ansteuerung der Applikation ermöglicht.
- Fall 3: 1 Supervisor-Rechner und mehrere Dispatcher-Rechner. Bei diesem Fall kann der Anwender unabhängig vom Ort der verschiedenen anzusteuern Komponenten seine Applikation ausführen.
- Fall 4: Mehrere Supervisor-Rechner und 1 Dispatcher-Rechner. Verschiedene User können hier die gleiche Hardware ansteuern.
- Fall 5: Mehrere Supervisor-Rechner und mehrere Dispatcher-Rechner. Dies ist der Maximal-Fall und eröffnet alle denkbaren Kommunikations-Möglichkeiten, die einem durch das TCP/IP-Protokoll gegeben werden.

Die verschiedenen Kommunikationsmöglichkeiten sind in den Abbildungen 7.4, 7.5 und 7.6 schematisch dargestellt.

## 7.2 Applikationen

Da die Software „BioLane™ Supervisor“ absolut unabhängig von der Art und der Anzahl der verwendeten Geräte ist, konnten mit ihrer Hilfe technische Applikationen völlig unterschiedlicher Art realisiert werden. Einige davon sollen hier vorgestellt werden.

Es konnte so unter anderem bei einer aktuell laufenden Doktorarbeit der technischen Physik der Universität Kaiserslautern mit Anwendung in der klinischen Diagnostik und bei einer Diplomarbeit im Fachbereich Medizintechnik mitgewirkt werden. Darüber hinaus kam die Software beim sogenannten BSE-Test und bei der In-Situ-Hybridisierung zum Einsatz.

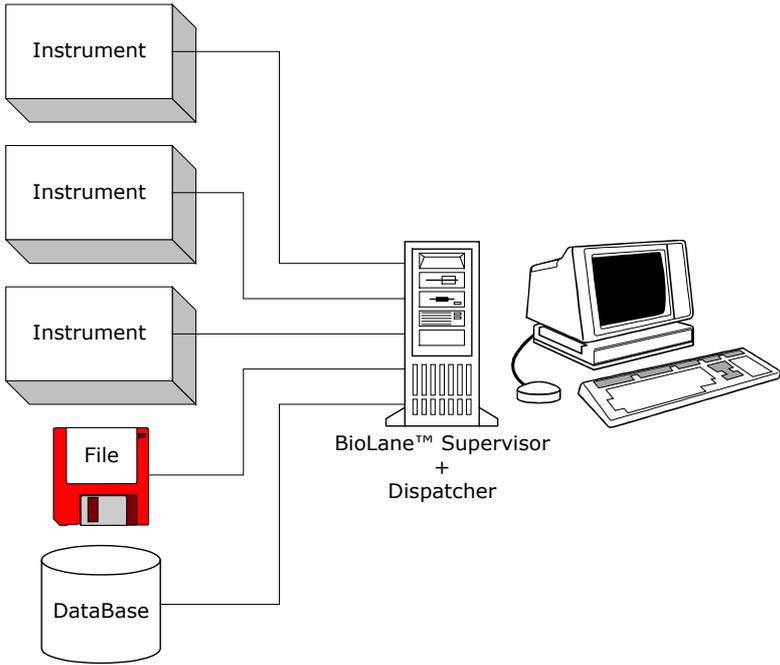


Abbildung 7.4: Kommunikationsprinzip zwischen „BioLane™ Supervisor“ und Dispatcher (Fall 1).

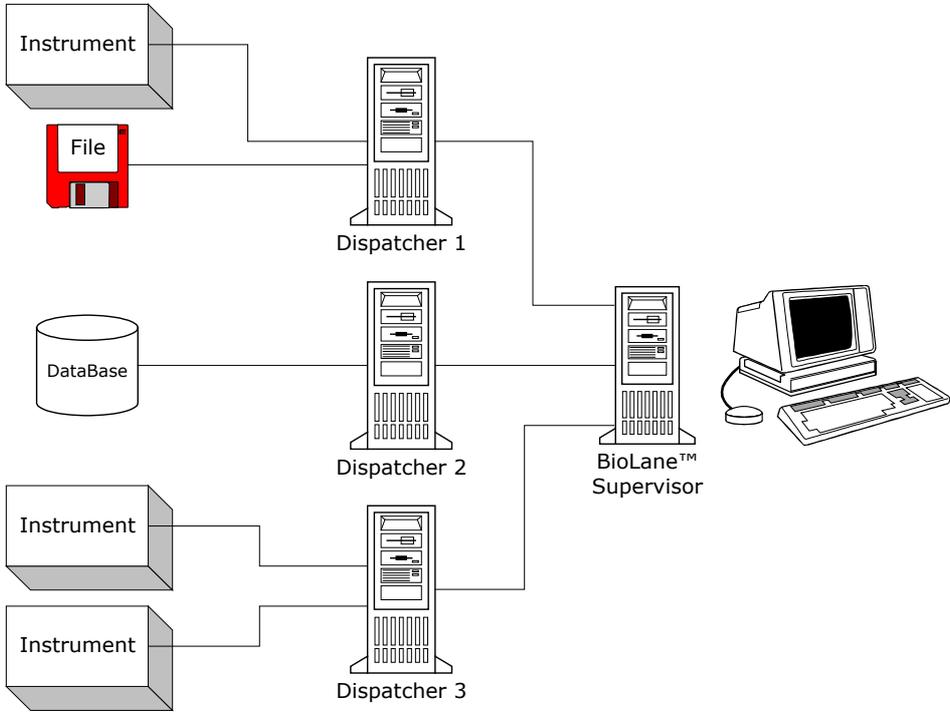


Abbildung 7.5: Kommunikationsprinzip zwischen „BioLane™ Supervisor“ und Dispatcher (Fall 3).

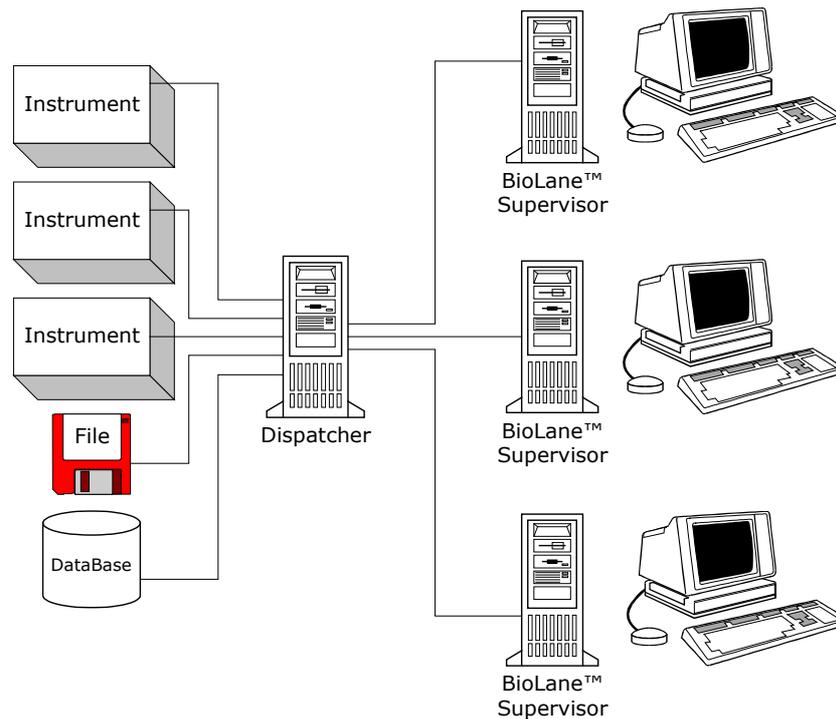


Abbildung 7.6: Kommunikationsprinzip zwischen „BioLane™ Supervisor“ und Dispatcher (Fall 4).

## 7.2.1 Blot-Prozessor BioLane™ HTI

Der Blot-Prozessor BioLane™ HTI der Hölle & Hüttner AG (Tübingen, Deutschland) ermöglicht erstmals die vollautomatische Inkubation von Blot-Membranen bei Western-, Southern oder Northern-Blot und die automatische Färbung von Gelen. Der BioLane™ HTI eignet sich zudem für die In-Situ-Hybridisierung und zum Einsatz in der Bio-Chip-Technologie [74].

Der BioLane™ HTI eliminiert manuelle Fehler und zeichnet sich durch exakte Reproduzierbarkeit, hohe Sensitivität, präzise Dosierung und genaue Temperierbarkeit der einzelnen Prozessschritte aus.

### 7.2.1.1 Technische Beschreibung

Das Herzstück des BioLane™ HTI sind zwei temperierbare Schütteleinheiten (4 °C – 70 °C), in dessen Schalen die gebräuchlichsten Membrantypen (verschiedene Größen) zum Einsatz kommen können. Durch die Verwendung von zwei Schütteleinheiten, können parallel zwei völlig unterschiedliche Prozesse ablaufen. Der Flüssigkeitstransport (pumpen und absaugen) erfolgt durch konventionelle Peristaltik- und Luftpumpen. Das integrierte Antikörper-Reservoir ist ebenfalls temperierbar ( $\geq 4$  °C). Über die Geräteschnittstelle (TCP/IP) sind schließlich je nach Anwendung beliebig viele Prozessschritte programmierbar.

In Abbildung 7.7 ist eine Fotografie des BioLane™ HTI zu sehen. Die wichtigsten Bauelemente sind: Hauptschalter (1); Peristaltik-Pumpen (2); Reagenzien-Flaschen (3); Ventil-Schlitten (4); Peltier-gekühltes Antikörper-Reservoir (5); Deckelablage (6); Schlauchzuführungen (7); Wasserwaage (8); Schalendeckel (9); Schütteleinheit (10); Kühlgebläse (11); Bedien-Panel (12); justierbare Füße (13).

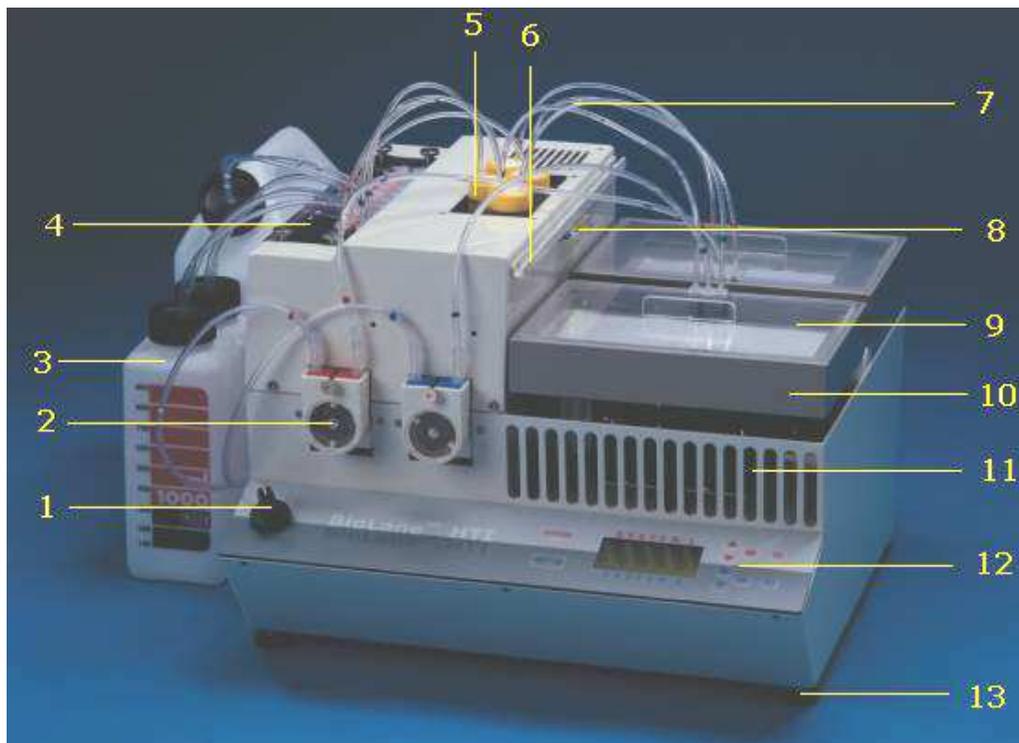


Abbildung 7.7: Fotografie des Blot-Prozessors BioLane™ HTI. Gekennzeichnet sind die wichtigsten Bestandteile. Erläuterungen dazu sind dem Text zu entnehmen.

### 7.2.1.2 Western Blotting

Das Western Blotting ist ein manuelles Verfahren, welches auf einer Membran immobilisierte Proteine durch spezifische Antikörper erkennt bzw. nachweist. Das Verfahren besteht aus einer Reihe einzelner Arbeitsschritte, wobei zwischen jedem Arbeitsschritt mehrere Waschschritte durchgeführt werden. Beim Blockieren werden unspezifische Bindungsstellen der Membran mit Proteinen gesättigt (z. B. Trockenmilchpulver). Das nachzuweisende Protein wird durch einen monoklonalen 1. Antikörper detektiert, der spezifisch an das Protein bindet. Ein 2. Antikörper bindet spezifisch an den 1. Antikörper. Der 2. Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches für die spätere Visualisierung benötigt wird. Durch Zugabe einer Chemikalie wird eine Chemilumineszenz-Reaktion

ausgelöst. Das emittierte Licht wird detektiert, z. B. durch Belichtung eines Röntgenfilms. Das Prinzip des Western-Blottings ist in Abbildung 7.8 noch einmal schematisch dargestellt.

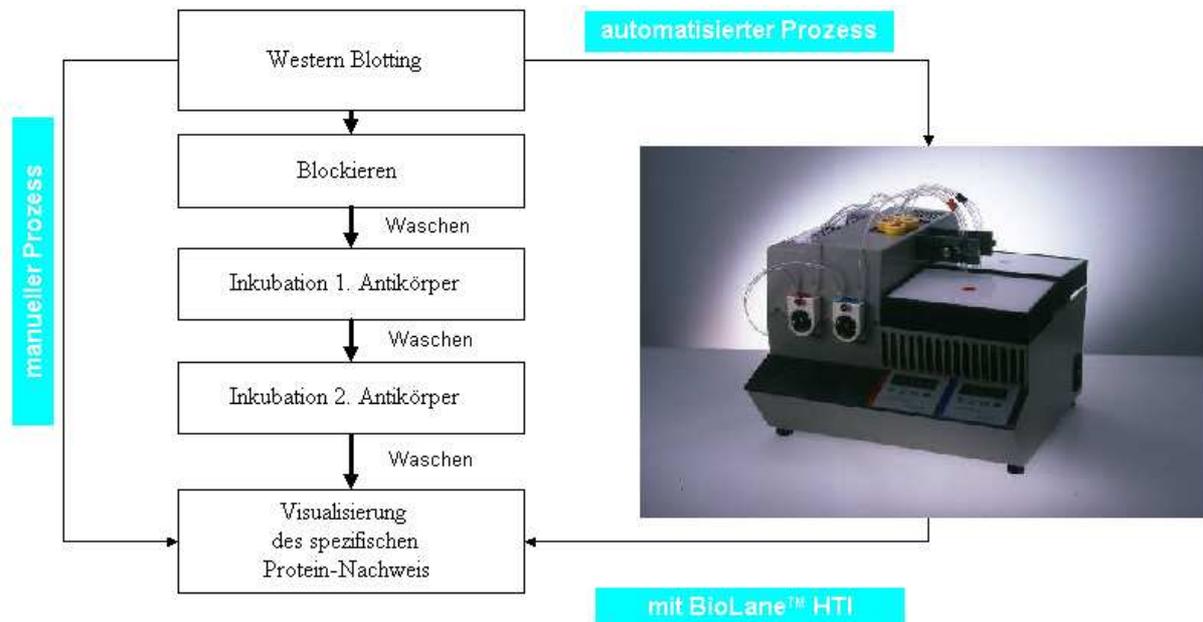


Abbildung 7.8: Prozessschritte beim Western-Blotting. Der BioLane™ HTI automatisiert diese Schritte.

### Beispiel: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Test

Als exemplarisches Beispiel des Western-Blotting soll hier der Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Test erläutert werden (siehe auch Abbildung 7.9).

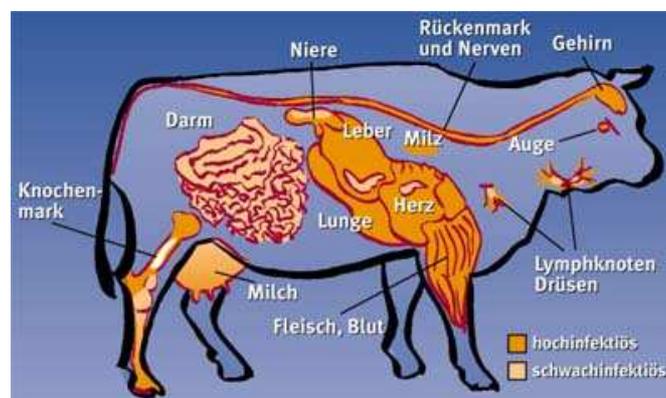


Abbildung 7.9: Die Rinderseuche BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) wird in Zusammenhang mit der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen gebracht. Es handelt sich dabei bei beiden Krankheitsformen um eine schleichende Auflösung des zentralen Nervensystems.

Als Ursache für die Zerstörung der Nervenzellen bei der Rinderseuche BSE gilt die Anreicherung eines Eiweißmoleküls (Prionprotein) in den Zellen. Der spezifische Nachweis dieses Proteins soll hier anhand der Vorgehensweise der Prionics AG (Zürich, Schweiz) erklärt werden [75].

Aus frisch geschlachtetem Rind (< 24h) werden aus speziellen Hirn-Regionen definierte Proben entnommen. Die Proben werden entweder sofort bearbeitet oder bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Aus dem Hirn-Gewebe werden 0,1-1,3 g für den BSE-Test entnommen. Die Gewebeproben werden in einer speziellen Homogenisierungsflüssigkeit mit Hilfe eines Homogenisators verflüssigt. Die Probe wird mit einer Endo-Protease (Proteinase K) in Fragmente verdaut. Das krankheitsspezifische, protease-resistente Prion Protein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) wird dabei nicht vollständig zerstört (Abbildung 7.10).

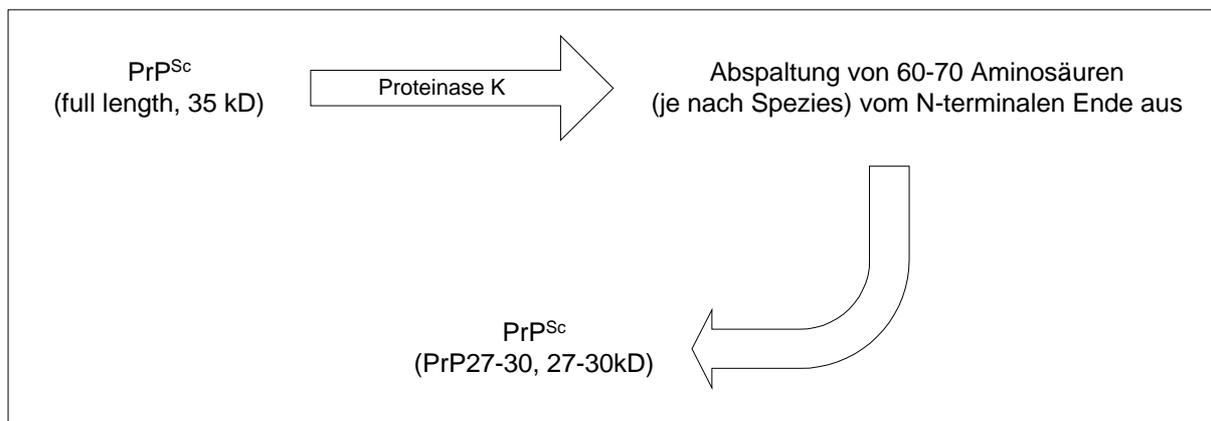


Abbildung 7.10: Prinzip des Protease-Verdauvorgangs.

Die Mischung Probe und Protease wird zur Inaktivierung der Protease mit Pefablock behandelt. Pefablock ist ein Inhibitor für Proteinase K. Zur Denaturierung des Prionproteins wird die Probe 5 min auf  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Denaturierung bewirkt eine Streckung des Proteins. Auf einem Polyacrylamid-Gel werden die Proben durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt. Die kleinen Proteine wandern hierbei schneller durch das Gel als große Proteine (Wanderungsrichtung ist von oben nach unten). Nach einer gewissen Zeit wandern die kleinsten Fragmente des abgebauten normalen Prionproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) unten aus dem Gel hinaus, während das resistente  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Fragment sich in der unteren Hälfte des Gels, und die unverdauten  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  Moleküle noch in der oberen Hälfte des Gels befinden. Das Prinzip dieser Gel-Elektrophorese ist in Abbildung 7.11 bildlich dargestellt.

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden durch den sogenannten Tankblot auf eine PVDF-Membran im elektrischen Feld übertragen. Die Proteine bleiben dabei an der Membran haften (Abbildung 7.12).

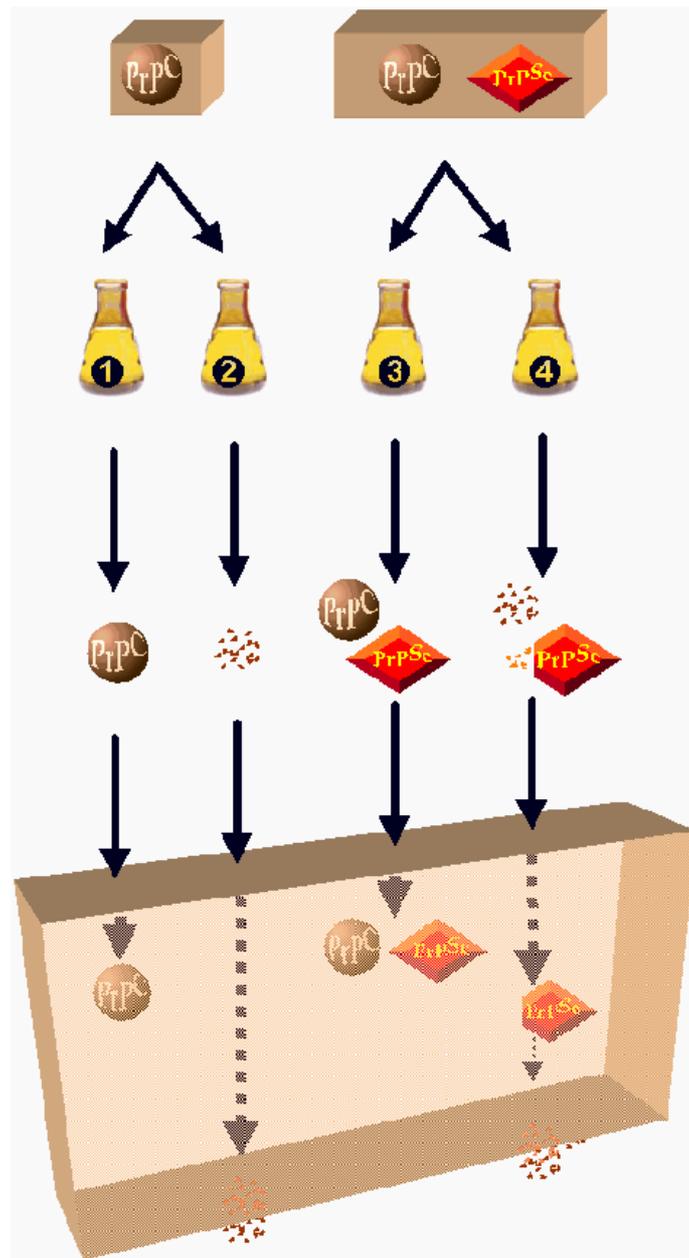


Abbildung 7.11: Prinzip der Gel-Elektrophorese beim BSE-Test. Die Proben 2 und 4 sind dabei Protease behandelt, die Proben 1 und 3 sind unbehandelt.

Im Anschluss an diese Vorarbeiten kann der eigentliche Western-Blot mit dem BioLane™ HTI vorgenommen werden. Dieser zeitintensive Prozess ist bei nicht-automatischer Durchführung sehr fehleranfällig. In diesem speziellen Fall des Protein-Nachweises wird das protease-resistente PrP durch einen Antikörper detektiert, der spezifisch an das PrP bindet.

Das visualisierte Endergebnis ist in Abbildung 7.13 zu sehen. Die Proben 1 und 3 waren dabei wieder unbehandelt.

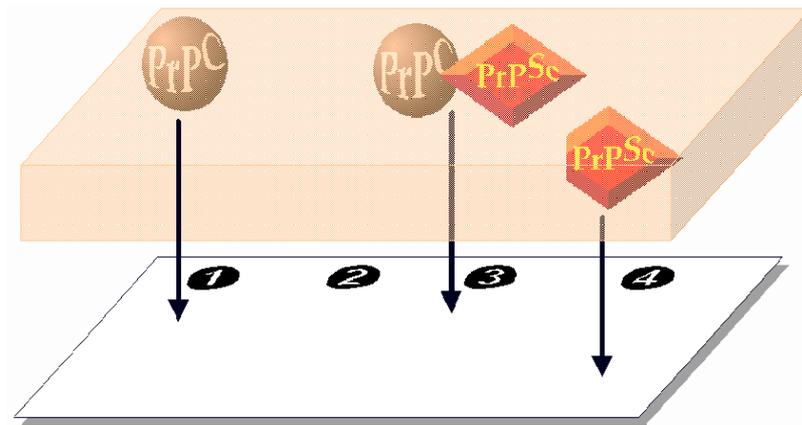


Abbildung 7.12: Beim Tankblot werden die aufgetrennten Proteine auf eine spezielle Membran übertragen.

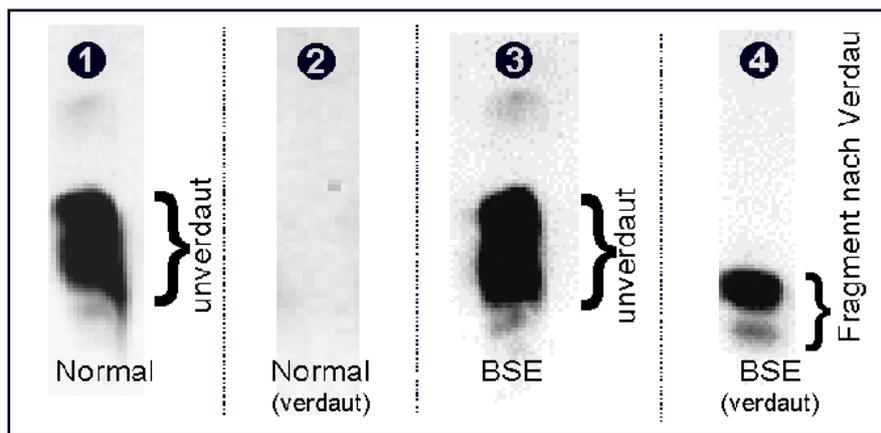


Abbildung 7.13: Visualisiertes Ergebnis des BSE-Tests. Die Proben 1 und 3 waren unbehandelt, die Proben 2 und 4 wurden mit Proteinase K versetzt. Die Fragmente des mit Protease behandelten krankheitsspezifischen Proteins PrP<sup>Sc</sup> sind eindeutig zu erkennen (4).

Man erkennt dabei eindeutig die Fragmente des mit Protease behandelten krankheitsspezifischen Proteins (4). Beim „gesunden“ Prionprotein ist dagegen wie zu erwarten nichts zu erkennen (2). Die unverdauten Überreste des PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> (1, 3) sind nicht voneinander zu unterscheiden.

Der BSE-Schnelltest mit dem BioLane™ HTI wurde von der Prionics AG erfolgreich validiert und wird dort aktuell bei Untersuchungen der Rinderseuche BSE eingesetzt.

### 7.2.1.3 In-Situ-Hybridisierung

Die sogenannte In-Situ-Hybridisierung (Whole-mount in situ hybridization) ist eine Technik um das Entwicklungsschema von Genen in Embryos zu ermitteln. Die Methode ermöglicht den spezifischen Nachweis von RNA im Embryo während verschiedener Evolutionsstadien. Eine Vielfalt an Model-Organismen wie *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Mus musculus* (Maus), *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel) wurden zu diesem Zweck untersucht.

Um diese Anwendung teilweise zu automatisieren wurde der Bio-Lane™ HTI an die Technik der In-Situ-Hybridisierung und des immunologischen Nachweises für Embryonen verschiedener Organismen angepasst.

Um mehrere Exemplare gleichzeitig untersuchen zu können, wurden spezielle Mikrotitrationsplatten mit einem feinmaschigen Netz am Boden der Platten verwendet. Während des Prozesses werden diese in die Standard-Schalen des Gerätes eingesetzt. Die Schalen dienen somit als Behälter für die Platten sowie für die verschiedenen benötigten Lösungen. Die Schalendeckel schützen dabei die Embryonen während des Experiments vor externer Kontamination. Die Verdunstungsverluste werden zudem minimiert.

Es können Mikrotitrationsplatten von 6 bis zu 96 Wells zum Einsatz kommen. Abhängig von der Größe der Organismen kann die Maschengröße der Netze dabei von 53  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  variieren. In Abbildung 7.14 sind derlei speziell angefertigte Mikrotitrationsplatten zu sehen.

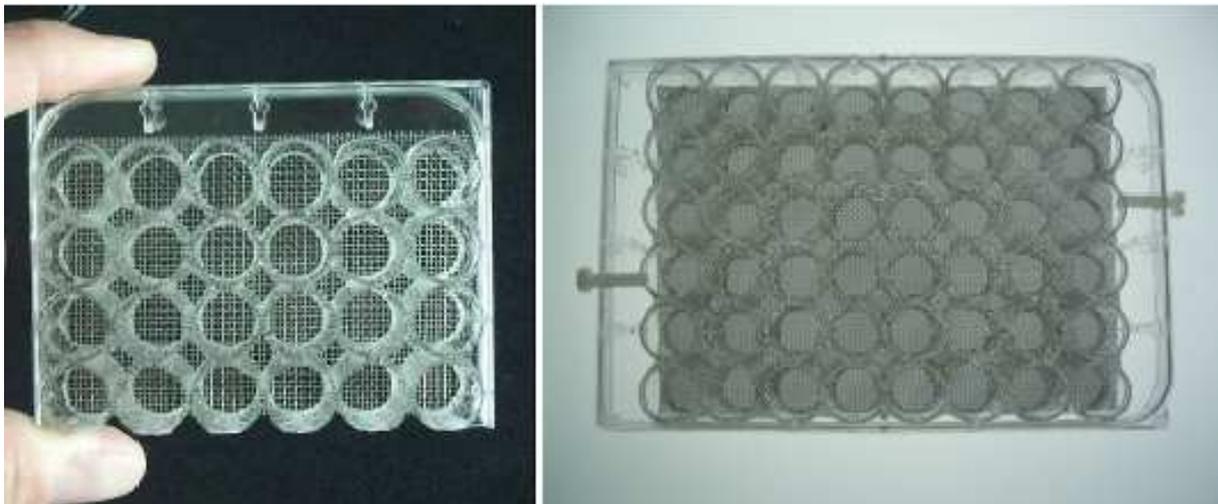


Abbildung 7.14: 24-Well-Mikrotitrationsplatte (links) und 48-Well-Mikrotitrationsplatte (rechts). Der Boden besteht hier aus einem Drahtnetz mit einer Maschengröße von 250  $\mu\text{m}$ .

Alle Prozessschritte werden in diesen Mikrotitrationsplatten durchgeführt.

Das Netz am Boden der Platten ermöglicht den Flüssigkeitstransport in die einzelnen Wells. Die Maschengröße wird dabei so gewählt, dass die Embryonen in den Wells nicht durch das Netz entweichen können.

Die Testdurchführung mit dem BioLane™ HTI gestaltet sich schließlich wie folgt:

- Mehrere Waschschrte wechseln sich mit einer Spülung der Probe mit Pufferlösung ab (Rehydratisierung der Embryonen)
- Zugabe von Proteinase K. Die Inkubation dauert je nach Probe zwischen 5 min und 1 h bei Temperaturen zwischen 20 °C und 37 °C
- Zugabe der RNA Sonden und anschließende Hybridisierung bei 65 °C
- Stringentes Waschen
- Zugabe der Blockierungslösung (Sättigung unspezifischer Bindungsstellen)
- Durchführung der Inkubation der Antikörper bei 4 °C
- Mehrere Waschschrte sind notwendig um ungebundene Antikörper zu entfernen
- Visualisierung: Immunologischer Nachweis (Färbung) der Targetregionen

Im Folgenden werden einige Ergebnisse von erfolgreichen Untersuchungen mit der Whole-Mount-In-Situ-Hybridisierung vorgestellt.

*Xenopus laevis* Embryonen im Gastrula-Stadium (10-12 Stunden alte Embryonen) wurden auf das Brachyury-Gen und das Chordin-Gen untersucht (Abbildung 7.15). *Danio rerio* Embryonen (Abbildung 7.16) wurden mit einer Sonde gegen flk1 gefärbt. Die Embryonen des Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*) wurden mit einer endo 16 a endoderm/gut spezifischen RNA Sonde untersucht (Abbildung 7.17). HoxC5 and Fgf8 Sonden wurden für Maus-Embryonen (*Mus musculus*) verwendet (Abbildung 7.18 und 7.19).

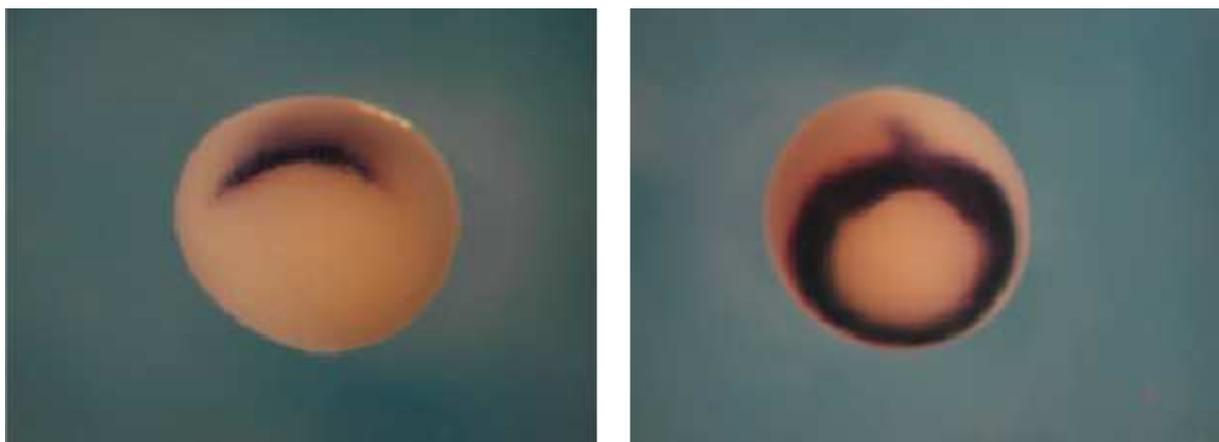


Abbildung 7.15: Färbung des Chordin-Gens (links) und des Brachyury-Gens (rechts) bei *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch) Embryonen im Gastrula-Stadium [76].



Abbildung 7.16: *Danio rerio* (Zebrafisch) Embryonen, gefärbt mit einer Sonde gegen *flkl* [77].



Abbildung 7.17: *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel) im Stadium nach 24 h (links) und 36 h (Mitte und rechts), gefärbt mit einer *endo 16 a* endoderm/gut spezifischen RNA Sonde [78].

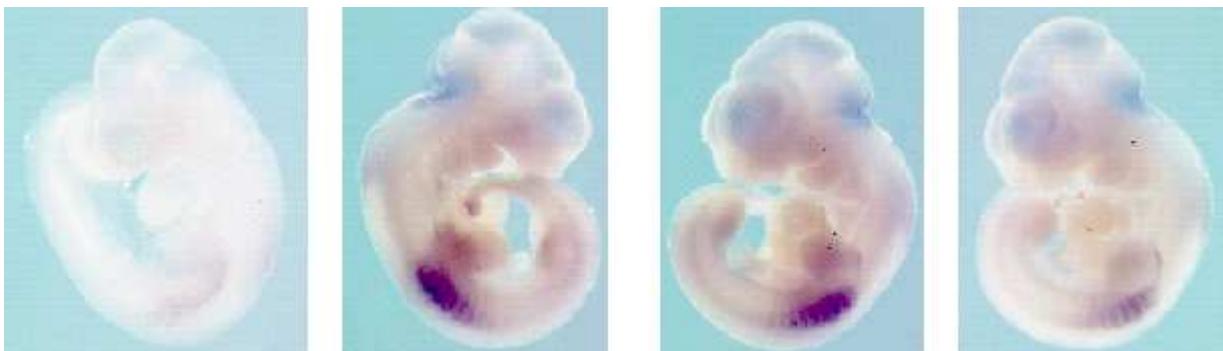


Abbildung 7.18: *Mus musculus* (Maus) Embryonen, gefärbt mit einer Sonde gegen *HoxC5* [79].



Abbildung 7.19: *Mus musculus* (Maus) Embryonen, gefärbt mit einer Sonde gegen Fgf8 [79].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der BioLane™ HTI erfolgreich für die In-Situ-Hybridisierung einsetzen lässt. Er garantiert einen sorgsamen Umgang mit den hochsensiblen Embryonen.

#### 7.2.1.4 Vernetzung

Die Stärke von „BioLane™ Supervisor“ bei der Ansteuerung des vorgestellten Blot-Prozessors liegt in der einfachen Möglichkeit der Vernetzung von mehreren Geräten. In Abbildung 7.20 ist schematisch eine Straße mit fünf BioLane™ HTIs dargestellt, wobei alle Geräte von einem zentralen Rechner mit installierter „BioLane™ Supervisor“ Software gesteuert werden.

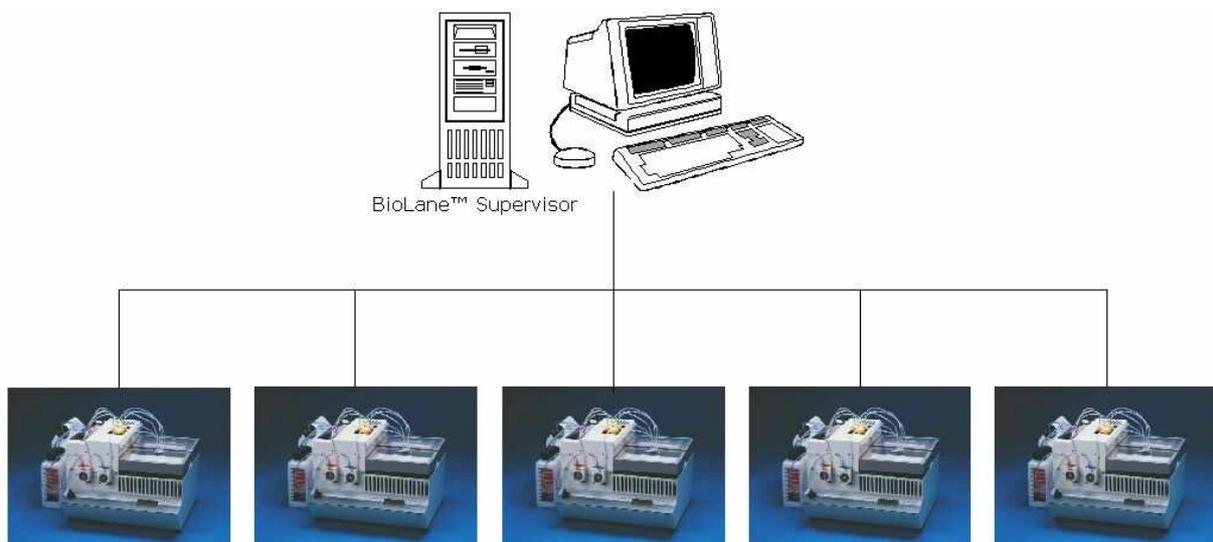


Abbildung 7.20: Vernetzung von Blot-Prozessoren mittels „BioLane™ Supervisor“.

In Abbildung 7.21 ist das dazugehörige Online-Monitoring dieses Systems zu sehen. Dabei wird von jedem Blot-Prozessor die Temperatur-Kurve der beiden Schalen und des Antikörper-Reservoirs angezeigt.

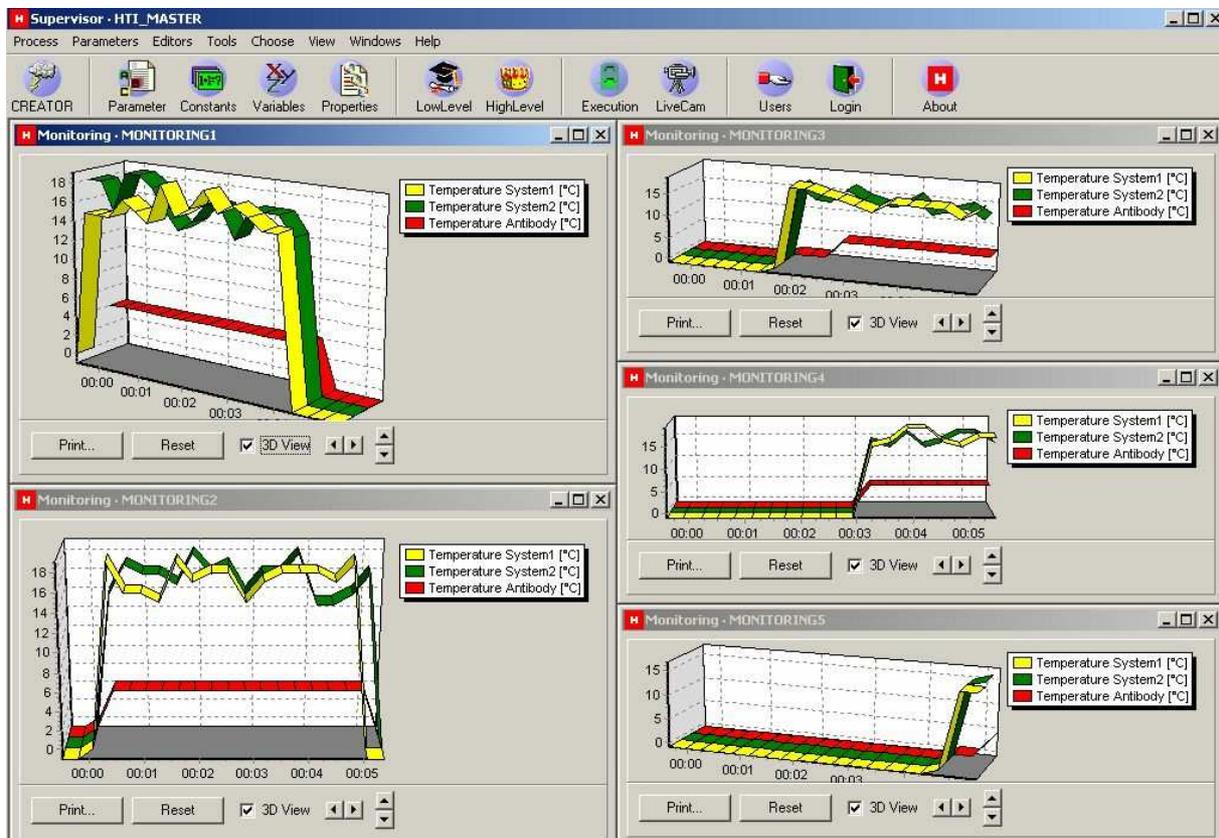


Abbildung 7.21: Online-Monitoring bei einem System mit fünf Blot-Prozessoren. Protokolliert wird jeweils die Schalentemperatur und die Temperatur des Antikörper-Reservoirs.

## 7.2.2 Minimal invasive Chirurgie

Instrumente für die minimal invasive Chirurgie werden bei ihrem Einsatz in der Medizin in ihrem Inneren derart verschmutzt, dass sie mit den gängigen Reinigungsmethoden nicht zuverlässig gesäubert werden können. Deshalb ist eine zusätzliche Untersuchung notwendig, die darüber eine Aussage machen kann, ob das medizinische Instrument gründlich gereinigt wurde oder nicht.

Eine neu entwickelte Methode [80] besteht darin, dass mit radioaktiv verseuchtem Blut das Instrument künstlich verunreinigt wird. Nach dem Waschvorgang liefert ein Geiger-Müller-Zählrohr Information darüber, wo innerhalb des Instruments noch verschmutzte Stellen vorhanden sind. Diese Untersuchung

gibt zusätzlich instrument-spezifisch Auskunft über konstruktionsbedingte Schwächen des Reinigungsprozesses.

### 7.2.2.1 Methodenbeschreibung

Um das empfindliche medizinische Instrument zu verunreinigen, kommt eine spezielle Simulationsbox zum Einsatz, in welcher der reale chirurgische Eingriff nachgeahmt wird (Abbildung 7.22). Durch eine Pumpe wird ein Überdruck erzeugt, welcher zusammen mit den Kapillarkräften im Inneren des Instrument für ein vollständiges Ausfüllen der Hohlräume verantwortlich ist.



*Abbildung 7.22: Simulationsbox (Mitte) zum Nachahmen des realen chirurgischen Eingriffs.*

Verwendet wird mit Technetium 99m markiertes Blut. Dieses wird für mindestens 60 min während der sogenannten Trockenperiode im Instrument belassen. Anschließend folgt der herkömmliche Reinigungsprozess. Dabei wird davor und danach mit einer Gamma-Kamera festgestellt, an welchen Stellen das Instrument kontaminiert ist (Abbildung 7.23).

### 7.2.2.2 Mobiles System

Um ein mobiles System für den Einsatz im Klinikalltag zu bekommen, wurde ein Prototyp entwickelt, der im Wesentlichen aus einer motorgesteuerten Linearachse und einem darauf befestigten Geiger-Müller-Zählrohr (Xenon-Detektor) besteht.



Abbildung 7.23: Messungen der Gamma-Kamera vor (links) und nach (rechts) dem Reinigungsprozess.

Die Oberfläche des kommerziell erhältlichen Detektors „Contamat FHT 11 M“ wurde derart mit einer Bleischicht überzogen, dass nur ein kleiner Spalt zur Erfassung der Radioaktivität (Alpha-, Beta-, Gamma-Strahlung) zurückbleibt. Somit konnte das räumliche Auflösungsvermögen erhöht werden.

Dieser Detektor wird dann auf der Linearachse unter dem kontaminierten Instrument hinwegbewegt, so dass man gleichzeitig Aussagen über die Position und die gemessene Strahlung machen kann.

Das Gesamtsystem ist in Abbildung 7.24 zu sehen.



Abbildung 7.24: Mobiles System (Prototyp) zur Überprüfung der Gründlichkeit bei der Reinigung von Instrumenten der minimal invasiven Chirurgie. Medizinisches Werkzeug (1), Xenon-Detektor (2), motorgesteuerte Linearachse (3).

Diese beiden Hauptbestandteile des Systems werden schließlich jeweils über die serielle Schnittstelle mit „BioLane™ Supervisor“ angesteuert. Daneben müssen alle anfallenden Daten von der Software gesammelt und verarbeitet werden (u. a. Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung). Als Endergebnis erhält man eine einfache grafische Darstellung über den „Verlauf“ der Verunreinigung innerhalb des Instruments (Abbildung 7.25).

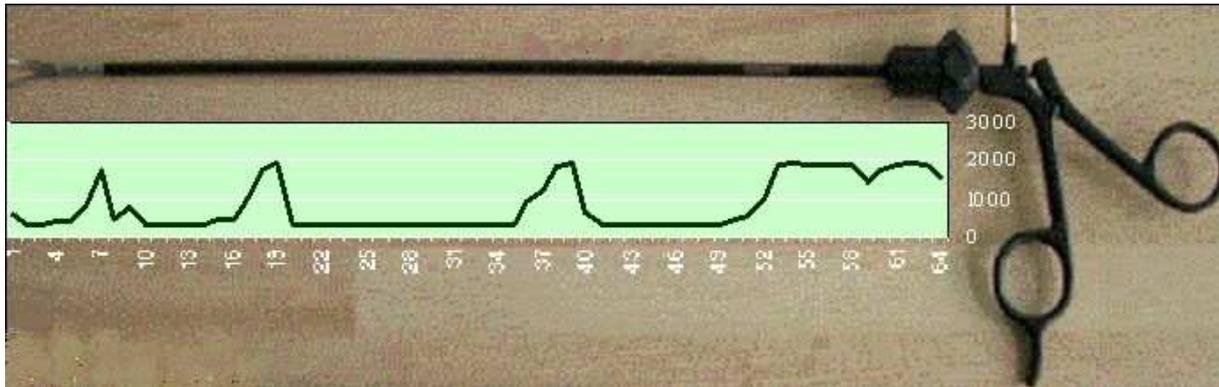


Abbildung 7.25: Aus den erhalten Messwerten des Detektors [Bq] und der Position der Linearachse kann mittels „BioLane™ Supervisor“ eine einfache Grafik erstellt werden, die Aussagen über den Grad der Kontamination im Inneren des Instruments zulässt.

Je nach Anzahl und Höhe der Peaks kann dann ein Instrument als rein oder nicht rein eingestuft werden.

### 7.2.3 Schwingquarz-Blutgruppen-Bestimmung

Die Blutanalyse, insbesondere die Blutgruppenbestimmung sowie Blutantikörperbestimmung ist ein wichtiger Vorgang in der klinischen Diagnostik. Ziel eines automatisierten Verfahrens zur Blutgruppenbestimmung ist daher eine sichere, schnelle und kostengünstige Methode. Diese Vorgaben lassen sich mit einem entsprechend modifizierten, regenerierbaren Biosensor realisieren [81]: Schwingquarze (QCM, quartz crystal microbalance) sind als massensensitive Sensoren überall dort verwendbar, wo die Detektion des Analyten mit einer Massenänderung auf der Oberfläche des Quarzes verbunden ist.

#### 7.2.3.1 Messverfahren

Schwingquarze lassen sich aufgrund ihres piezo-elektrischen Effekts (siehe Abbildung 7.25) durch Anlegen einer Wechselspannung zum Schwingen anregen, indem man auf den Quarz Elektroden (z. B. aus Gold) aufdampft und einen elektrischen Schwingkreis bildet.

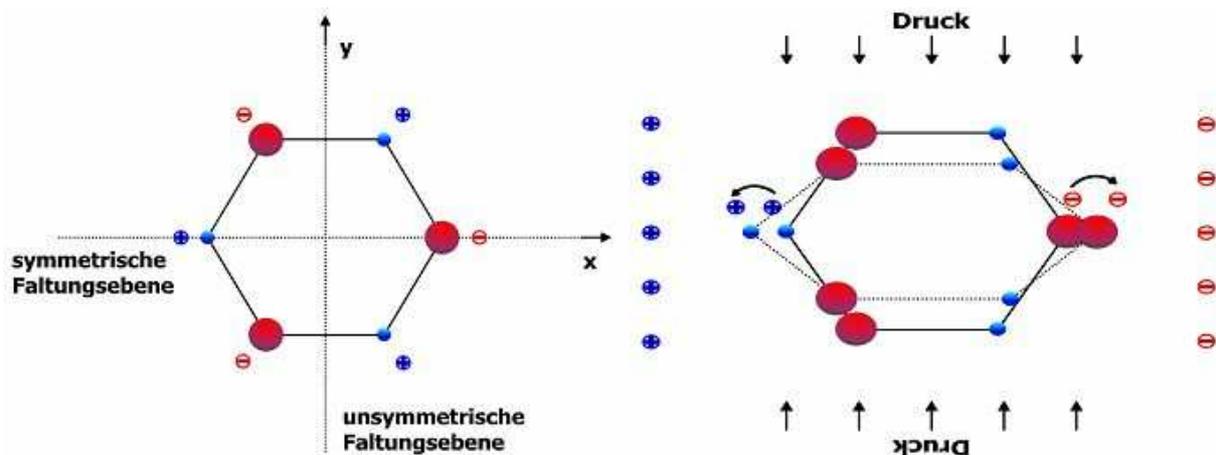


Abbildung 7.26: Piezoelektrizität: Symmetrieänderung durch mechanische Spannung verursacht ein elektrisches Feld. Umgekehrt ruft das Anlegen eines elektrischen Feldes eine Dehnung der Kristalls hervor.

Die Grundfrequenz hängt von der Dicke der Quarzscheibe ab und fällt bei auf den Elektroden absorbierten Massen aufgrund der Trägheit ab.

Der Ansatzpunkt des hier beschriebenen Verfahrens stützt sich auf einen modifizierten Schwingquarz, auf dessen Oberfläche ein Blutgruppenantikörper immobilisiert ist. Gekoppelt ist dieser Schwingquarz mit einer FIA (Fließ-Injektions-Anlage), so dass Messungen in einem kontinuierlichen Puffer- und Analytfluss möglich sind.

Die auf den Erythrozyten vorhandenen Epitope können mit entsprechenden Antikörpern spezifisch reagieren. Wird ein Quarz mit Anti-A belegt, können damit Erythrozyten, die das Antigen A exprimieren, eingefangen werden. Der Quarz mit aufgedampfter Goldelektrode wird durch einen Schwingkreis zum Schwingen angeregt, wobei die aktuelle Schwingungsfrequenz gemessen wird. Die verwendeten Quarze schwingen dabei im 10 MHz-Bereich.

Eine Blutgruppenbestimmung im AB0-System sowie Ermittlung des Rhesus-Faktors sind problemlos sowohl im Vollblut als auch in Erythrozytensuspensionen möglich. Eine Enzymbehandlung des Blutes (z. B. mit Bromelin) muss nicht vorgenommen werden, ist aber bei Bedarf möglich.

### 7.2.3.2 Beschichtungstechnik

Entscheidend für den Detektionserfolg ist die Beschichtung der Quarze. Vollständige, dichte Belegung der Oberfläche, regenerierbar, stabil und beständig und dabei kostengünstig und einfach herzustellen sind die Eigenschaften einer „optimalen“ Beschichtung.

Die besten Ergebnisse bezüglich obiger Punkte konnten mit einer Protein A-Beschichtung erhalten werden. Nach Belegung wird der Quarz mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend gibt man die entsprechende Antikörperlö-

sung auf den Quarz. Nach Spülen mit destilliertem Wasser ist der Quarz für die Messung bereit. Der Beschichtungsvorgang kann extern oder auch intern, d. h. in eingebautem Zustand erfolgen.

Mit dieser Methode belegte Quarze sind tagelang verwendbar, im Analytfluss stabil, und sowohl mit IgG- als auch mit IgM-Antikörpern belegungsfähig. Die Regenerierung erfolgt mit verdünnter NaOH-Lösung, wobei die Antikörper vom Protein A abgelöst werden und der Quarz neu mit Antikörpern belegt werden kann. Nach ca. 7 Regenerationen muss der Quarz komplett gereinigt werden und steht nach einer erneuten Protein A-Belegung für weitere Messungen zur Verfügung.

In Abbildung 7.27 ist schematisch ein mit Protein A beschichteter Schwingquarz dargestellt.

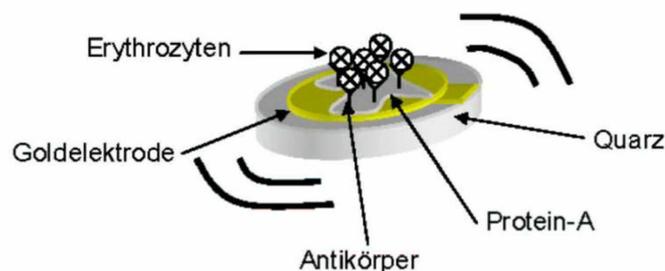


Abbildung 7.27: Ein mit Protein A beschichteter Schwingquarz. Aufgrund der Antikörperbelegung können dann durch Antikörper-Antigen-Bindung die entsprechenden Erythrozyten eingefangen werden.

### 7.2.3.3 Technischer Aufbau

Im Prototyp der computergesteuerten Fließ-Injektions-Anlage kommen fertig bedampfte Quarze (Massenware) in zwei separaten Messzellen zum Einsatz.

In Abbildung 7.28 und 7.28 ist die Messapparatur bzw. das Steuerungsprinzip schematisch dargestellt [81].

Die entscheidenden Bestandteile des Systems sind 2 Pumpen die mit einem 2- bzw. 8-Wege-Ventil für den Fluss durch die Messzellen verantwortlich sind. Der eigentliche Messaufbau besteht außer den beiden Messzellen aus einem peltiergekühlten Thermostat mit entsprechender Temperaturüberwachung sowie einer CCD-Kamera zur optischen Kontrolle. Der Messaufbau kann über ein eigens dafür entwickeltes Steuergerät angesprochen werden.

„BioLane™ Supervisor“ steuert über eine angepasste DLL-Schnittstelle dieses Steuergerät (Sub25) sowie den zur Messwerterfassung benötigten Frequenzzähler (GPIB-Schnittstelle). Alle übrigen Geräte werden seriell über die RS232-Schnittstelle angesteuert.

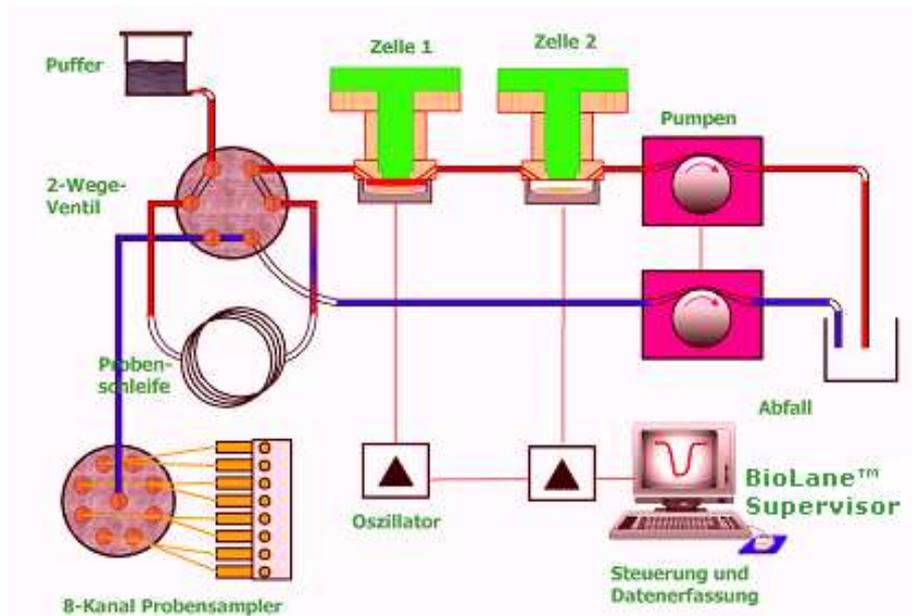


Abbildung 7.28: Aufbau der Fließ-Injektions-Anlage (FIA) mit zwei separaten Messzellen.

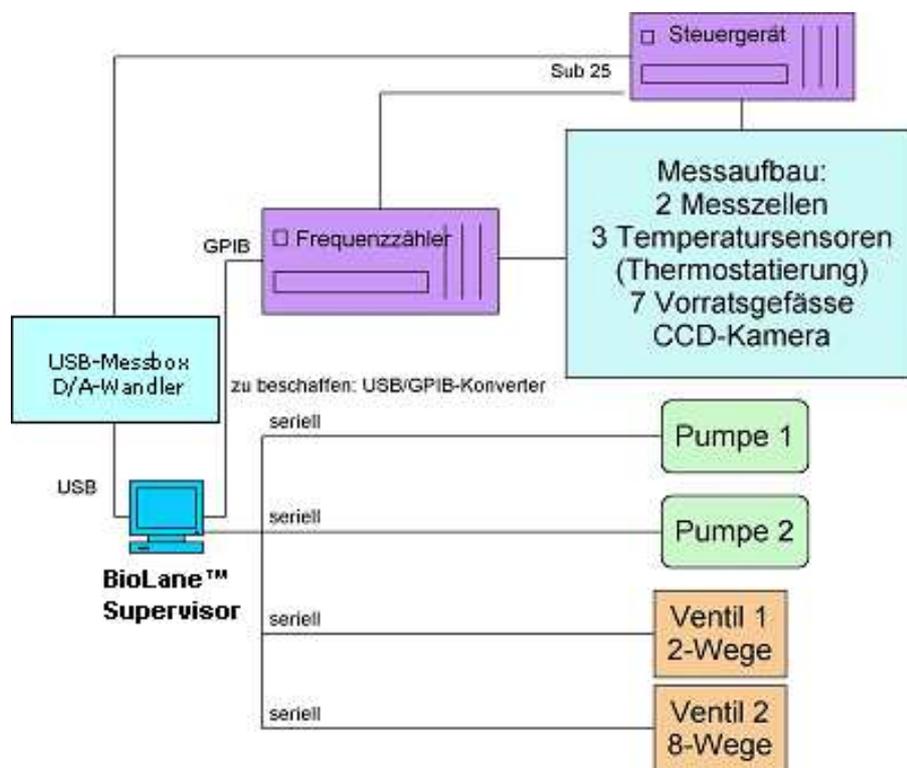


Abbildung 7.29: Steuerungskonzept des Prototypen. Als zentrale Steuerungseinheit fungiert „BioLane™ Supervisor“.

Ein typisches Messergebnis ist in Abbildung 7.30 zu sehen [81]. Der Schwingquarz ist dabei mit Antikörper gegen die Blutgruppe A belegt. Während Blutgruppe 0 nur ein kleines Signal liefert, fällt die Frequenz bei Blutgruppe A um mehr als 5 kHz ab. Es wurde hier eine Erythrozytenlösung mit 1 Million Zellen pro Liter verwendet.

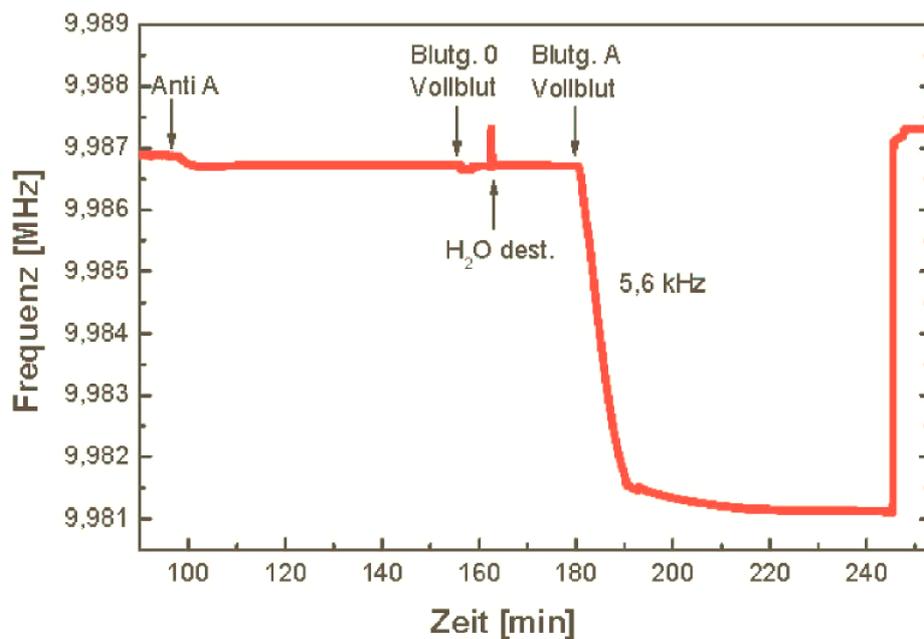


Abbildung 7.30: Messergebnis beim Nachweis der Blutgruppe A. Der gemessene Frequenzabfall beträgt 5,6 kHz.

Der große Vorteil der Quarzmethode liegt in der Verfolgung kinetischer Parameter, da der Bindungsvorgang online verfolgt werden kann. Es können so nicht nur ja/nein-Ergebnisse erhalten werden, sondern zusätzlich interessante Informationen über die Stärke der Bindung und die Bindungskinetik.

Durch das rein elektronische Transduktions- und Signalverarbeitungsprinzip kann ein Mehrkanalsystem problemlos auf Handgerätgröße miniaturisiert werden. Ein mobiler Einsatz z. B. für Notärzte bietet sich an, da vor allem durch die Vielseitigkeit des Gerätes akut relevante Parameter schnell bestimmt werden können.



# Kapitel 8

## Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer computergesteuerten Robotikplattform für Anwendungen im Bereich des Life Science Sektors. Primär sollte der Wachstumshemmtest mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* miniaturisiert und automatisiert werden. Der Aufbau sollte möglichst vielseitig einsetzbar und modifizierbar ausgelegt werden.

Zu diesem Zweck wurden in Zusammenarbeit mit der RWTH Aachen zunächst Voruntersuchungen zur Machbarkeit der Miniaturisierung des Testsystems gemacht. Dabei wurden Vergleichsstudien der verschiedenen Ansatzgrößen (Erlenmeyerkolbenmaßstab, Mikrotitrationsplattenmaßstab) angestellt, wobei parallel mehrere Randbedingungen (Messwerterfassung, Inkubations- und Auswertungsparameter, Verdunstung) optimiert werden mussten.

Bei der technischen Realisierung stand mit Hilfe der Polygen GmbH (Langen, Deutschland) die Entwicklung eines temperierbaren Mikrotitrationsplattenschüttlers im Vordergrund. Das neuartige Konzept einer peltiergekühlten Inkubationseinheit wurde dabei erfolgreich in den Testablauf integriert. Das Design und die Zusammenstellung der übrigen Komponenten (Roboter, Fluoreszenzmessgerät, Dosiersystem, Peripherielemente) erfolgte stets im Hinblick auf eine Wiederverwertbarkeit des Systems in anderen Forschungsgebieten. Zum experimentellen Aufbau gehört auch die Software-Umgebung, die für die Interaktion der Geräte, die Weitergabe der Messdaten und die statistische Auswertung verantwortlich ist. Hierzu wurde eine eigene High-Level-Programmiersprache („BioLane™ Supervisor“) geschaffen, die auf einfache Weise das Schreiben komplexer Applikationsskripte ermöglicht.

Der Validationsphase des „HT-Algentest“-Automaten anhand der Referenztoxene Kaliumdichromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) und 3,5-Dichlorphenol ( $C_6H_4Cl_2O$ ) folgten eingehende Untersuchungen mit anorganischen Salzen, diversen organischen Verbindungen, ausgewählten Umweltproben (Boden- und Abwasserproben) sowie von der Henkel KGaA (Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellten Tensiden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit dem Prototyp übereinstimmende Ergebnisse im Vergleich mit dem konventionellen Testsystem über einen weiten Toxizitätsbereich erhalten wurden. Sämtliche Umweltproben konnten zudem erfolgreich bewertet werden. In der vorhandenen automatisierten Testumgebung konnte außerdem die statistische Absicherung der Messergebnisse deutlich verbessert werden. Darüber hinaus scheint für die Zukunft die Kopplung an Syntheseautomaten der kombinatorischen Chemie für den vorsorgenden Umweltschutz sinnvoll.

Mit Genotoxizitätstests und bakteriellen Zellvermehrungshemmtests stehen für zukünftige Einsatzmöglichkeiten der Anlage weitere potentielle Testverfahren zur Verfügung. Hierzu müssten aber weitere Untersuchungen veranlasst werden sowie leichte Modifikationen am experimentellen Aufbau durchgeführt werden.

Die Programmiersprache „BioLane™ Supervisor“ wurde schließlich in die Produktpalette der Hölle & Hüttner AG (Tübingen, Deutschland) aufgenommen. Mit ihrer Hilfe konnte erfolgreich an mehreren Forschungsprojekten mitgewirkt werden. Die Bandbreite für technische Anwendungen (Anlagensteuerung) ist hierbei fast grenzenlos.

# Anhang 1

## Schnittstellen

### A 1.1 Allgemeines

Bei allen vorgestellten Übertragungsprotokollen handelt es sich um die genormte RS232-C-Schnittstelle. In den Abbildungen A1.1 und A1.2 sind die Nummerierungen der Pins bei einem 9-poligen bzw. bei einem 25-poligen SUB-D Stecker abgebildet. Diese Konvention soll bei den im Folgenden behandelten Geräten beibehalten werden.

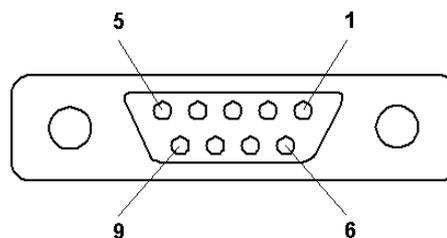


Abbildung A1.1: Pin-Belegung eines 9-poligen SUB-D Stecker.

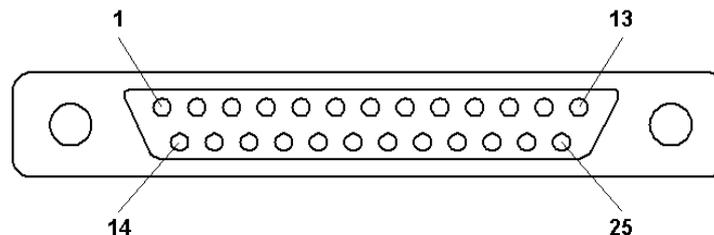


Abbildung A1.2: Pin-Belegung eines 25-poligen SUB-D Stecker.

Die Signalpegel sind bei allen Geräten wie aus Tabelle A1.1 ersichtlich definiert.

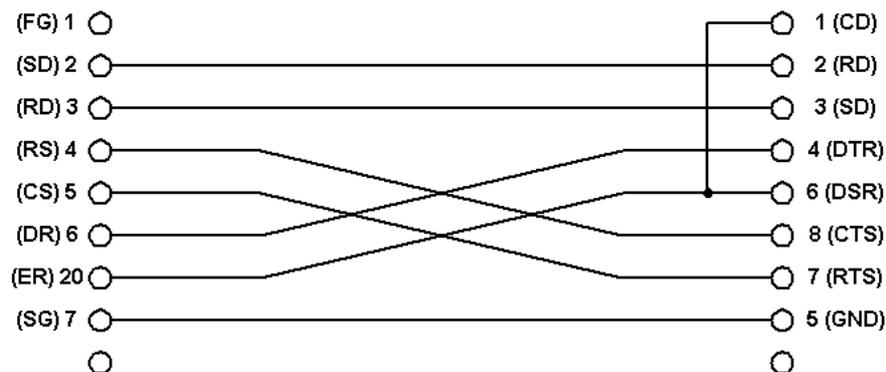
*Tabelle A1.1: Signalpegel und ihre Definition.*

Spannung [V]	Datensignal	Kontrollsignal
+3 bis +12	SPACE (logische 0)	EIN
-3 bis -12	MARK (logische 1)	AUS
+3 bis -3	undefiniert	undefiniert

## A 1.2 Mitsubishi Movemaster RV-2AJ

### *Pin-Belegung*

Die Pin-Belegung des Roboters Mitsubishi Movemaster RV-2AJ ist in Abbildung A1.3 dargestellt.



*Abbildung A1.3: Pin-Belegung beim Mitsubishi Movemaster RV-2AJ. Links ist die Controller-Seite (Signal, Pin-Nummer) dargestellt, rechts die Computer-Seite (Pin-Nummer, Signal).*

### *Zeichenformat*

Die zu übertragenden Zeichen bestehen aus Text- und Übertragungssteuerzeichen. Das Zeichenformat enthält die folgenden Elemente:

- Start-Bits: 1 Bit
- Daten-Bits: 8 Bits
- Paritätsüberwachung: Gerade Parität
- Stop-Bits: 2 Bits

Die Übertragungsgeschwindigkeit erfolgt mit einer Baudrate von 9600 bps.

### Übermittlungsprotokoll

Das allgemeine Übermittlungsprotokoll setzt sich zusammen aus einem Pre-String „1;1;“ und dem eigentlichen Kommando-String. Abgeschlossen werden alle Telegramme mit CR (ASCII Code 13) (Abbildung A1.4).



Abbildung A1.4: Allgemeines Übermittlungsprotokoll des Mitsubishi Move-master RV-2AJ.

## A 1.3 PolyShake

### Pin-Belegung

Die Pin-Belegung des temperierbaren Mikrotitrationsplattenschüttler PolyShake ist in Abbildung A1.5 dargestellt.

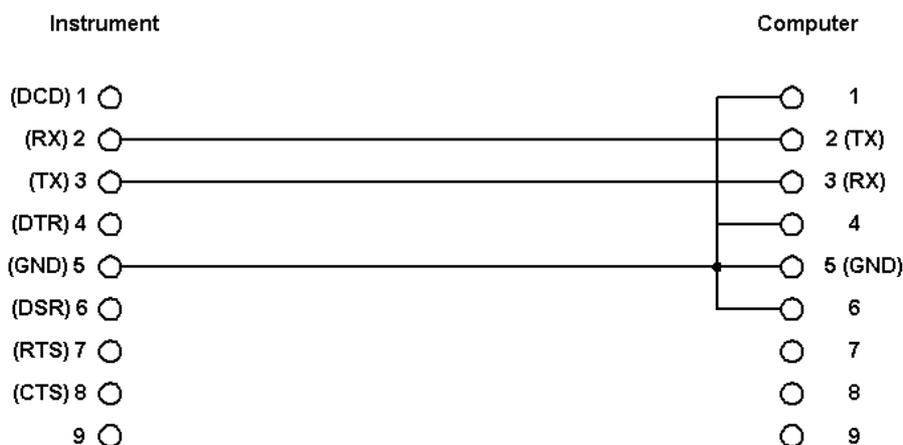


Abbildung A1.5: Pin-Belegung beim Mikrotitrationsplattenschüttler PolyShake.

### Zeichenformat

Das Zeichenformat enthält die folgenden Elemente:

- Start-Bits: 1 Bit
- Daten-Bits: 8 Bits
- Paritätsüberwachung: Keine Parität

- Stop-Bits: 2 Bits

Die Übertragungsgeschwindigkeit erfolgt mit einer Baudrate von 9600 bps.

### *Übermittlungsprotokoll*

Das Übermittlungstelegramm besteht aus einem Kommando-String. Abgeschlossen werden alle Telegramme mit CR (ASCII Code 13) (Abbildung A1.6).



Abbildung A1.6: Allgemeines Übermittlungsprotokoll des Mikrotitrationsplattenschüttler PolyShake.

## A 1.4 Tecan SpectraFluor

### *Pin-Belegung*

Die Pin-Belegung des Fluoreszenzmessgerätes SpectraFluor ist in Abbildung A1.7 dargestellt.

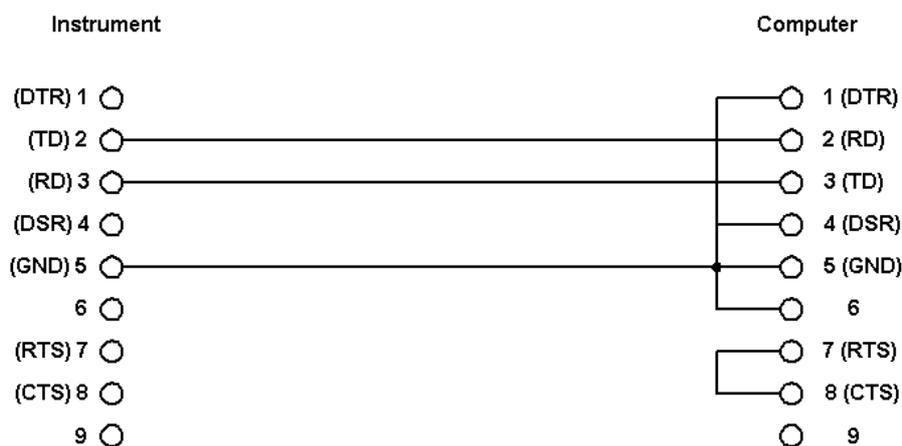


Abbildung A 1.7: Pin-Belegung beim Fluoreszenzmessgerät SpectraFluor.

### *Zeichenformat*

Das Zeichenformat enthält die folgenden Elemente:

- Start-Bits: 1 Bit

- Daten-Bits: 8 Bits
- Paritätsüberwachung: Keine Parität
- Stop-Bits: 1 Bit

Die Übertragungsgeschwindigkeit erfolgt mit einer Baudrate von 9600 bps.

### **Übermittlungsprotokoll**

Alle Übermittlungstelegramme beginnen mit STX (ASCII Code 02). Daran folgt unmittelbar der eigentliche Kommando-String. Abgeschlossen werden alle Telegramme mit ETX (ASCII Code 03), einer Checksummenberechnung (CS) zur Fehlersicherung und CR (ASCII Code 13) (Abbildung A1.8). Die Checksumme wird dabei byteweise zwischen STX (inklusive) und ETX (inklusive) mittels EXOR berechnet und als einzelnes Byte ausgegeben.



Abbildung A1.8: Allgemeines Übermittlungsprotokoll des Fluoreszenzmessgerätes SpectrFluor.

## **A 1.5 Eppendorf EDOS 5222**

### **Pin-Belegung**

Die Pin-Belegung des elektronischen Pipette EDOS 5222 ist in Abbildung A1.9 dargestellt.

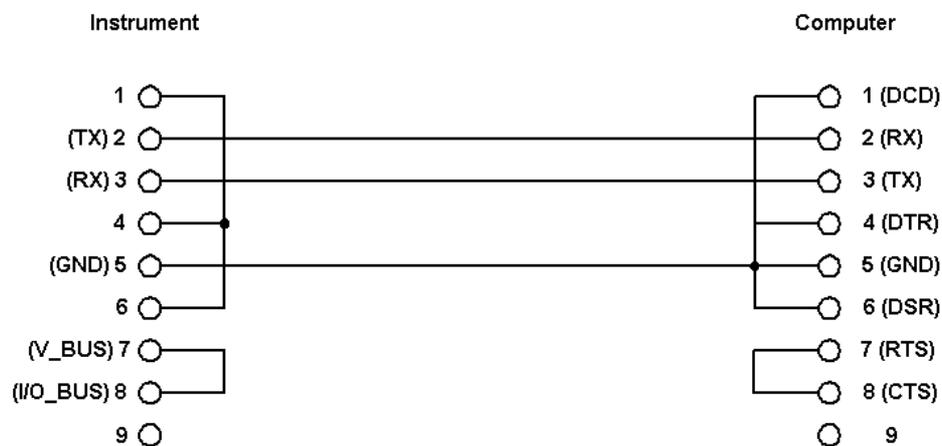


Abbildung A1.9: Pin-Belegung bei der elektronischen Pipette EDOS 5222.

### **Zeichenformat**

Das Zeichenformat enthält die folgenden Elemente:

- Start-Bits: 1 Bit
- Daten-Bits: 8 Bits
- Paritätsüberwachung: Gerade Parität
- Stop-Bits: 1 Bit

Die Übertragungsgeschwindigkeit erfolgt mit einer Baudrate von 9600 bps.

### **Übermittlungsprotokoll**

Das Übermittlungsprotokoll entspricht weitgehend dem Datenprotokoll nach ISO 1745 (fast select) (DIN 66019) für codegebundene Datenübermittlung. Die Fehlerüberwachung erfolgt durch paritätsgesicherte Übertragung der einzelnen 8-Bit Zeichen nach DIN 66003. Die Paritätsüberwachung erfolgt gemäß DIN 66219 (gerade Parität).

Das Telegramm einer Sendeaufforderung besteht aus EOT (ASCII Code 04), der Typadresse (spezifische Geräteklasse), der Geräteadresse und dem Kommando-String. Abgeschlossen wird das Telegramm mit ENQ (ASCII Code 05).

Die Antwort des Gerätes setzt sich aus STX (ASCII Code 02), dem Antwort-String, ETX (ASCII Code 03) und BBC (Block Check Count) zusammen. Bei der Fehlersicherung mittels BBC werden dabei alle Zeichen zwischen STX (exklusive) und EXT (inklusive) byteweise mit EXOR verknüpft und als Byte ausgegeben.

Das Telegramm zur Sendeaufforderung und das zugehörige Antwort-Telegramm ist in Abbildung A1.10 dargestellt.

#### **Sendeaufforderung:**

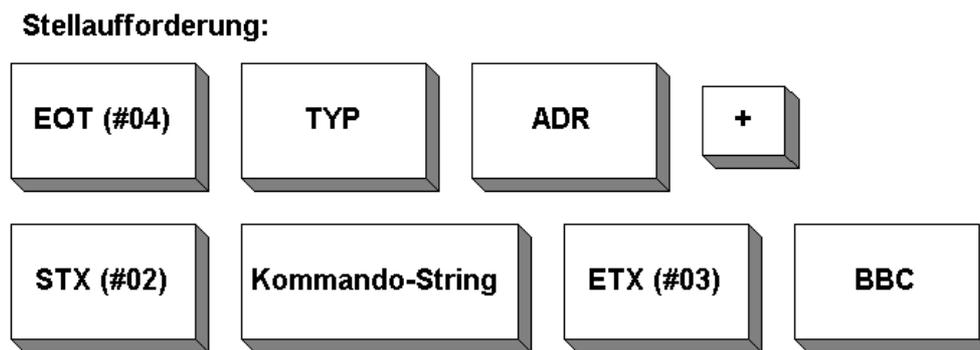


#### **Antwort-Telegramm:**



*Abbildung A1.10: Allgemeines Übermittlungsprotokoll der elektronischen Pipette EDOS 5222 bei einer Sendeaufforderung des Leitrechners mit dazugehörigem Antwort-Telegramm.*

Gemäß ISO 1745 fordert der Leitrechner eine Slave-Station auf Daten zu empfangen. Für das Gerät bedeutet dies, dass ein neuer Sollwert oder ein Stellbefehl übertragen wird. Nach der erfolgreichen Beendigung des Telegramms, d. h. nach Übernahme des neuen Sollwerts oder Durchführung des Stellbefehls antwortet das Gerät mit ACK (ASCII Code 06) bzw. bei Auftritt eines Fehlers mit NAK (ASCII Code 15). Das Telegramm zur Stellaufforderung ist in Abbildung A.1.11 dargestellt. Bei der Fehlersicherung mittels BBC werden dabei wieder alle Zeichen zwischen STX (exklusive) und ETX (inklusive) byteweise mit EXOR verknüpft und als Byte ausgegeben.



*Abbildung A.1.11: Allgemeines Übermittlungsprotokoll der elektronischen Pipette EDOS 5222 bei einer Stellaufforderung.*

## A 1.6 Spezifikationen

Eine detaillierte Auflistung aller Kommando-Strings und den dazugehörigen Antwortmöglichkeiten sind den Spezifikation [82, 83, 84, 85] zu entnehmen.



## Anhang 2

# Konstruktionszeichnungen

Im Folgenden werden in loser Reihenfolge Konstruktionszeichnungen präsentiert, die für die Anlage in Kapitel 4 angefertigt wurden. Einige Konstruktionen wurden in Absprache von den verschiedenen Werkstätten selbstständig gefertigt. Der Autor muss daher dem Leser einige Konstruktionszeichnungen schuldig bleiben.

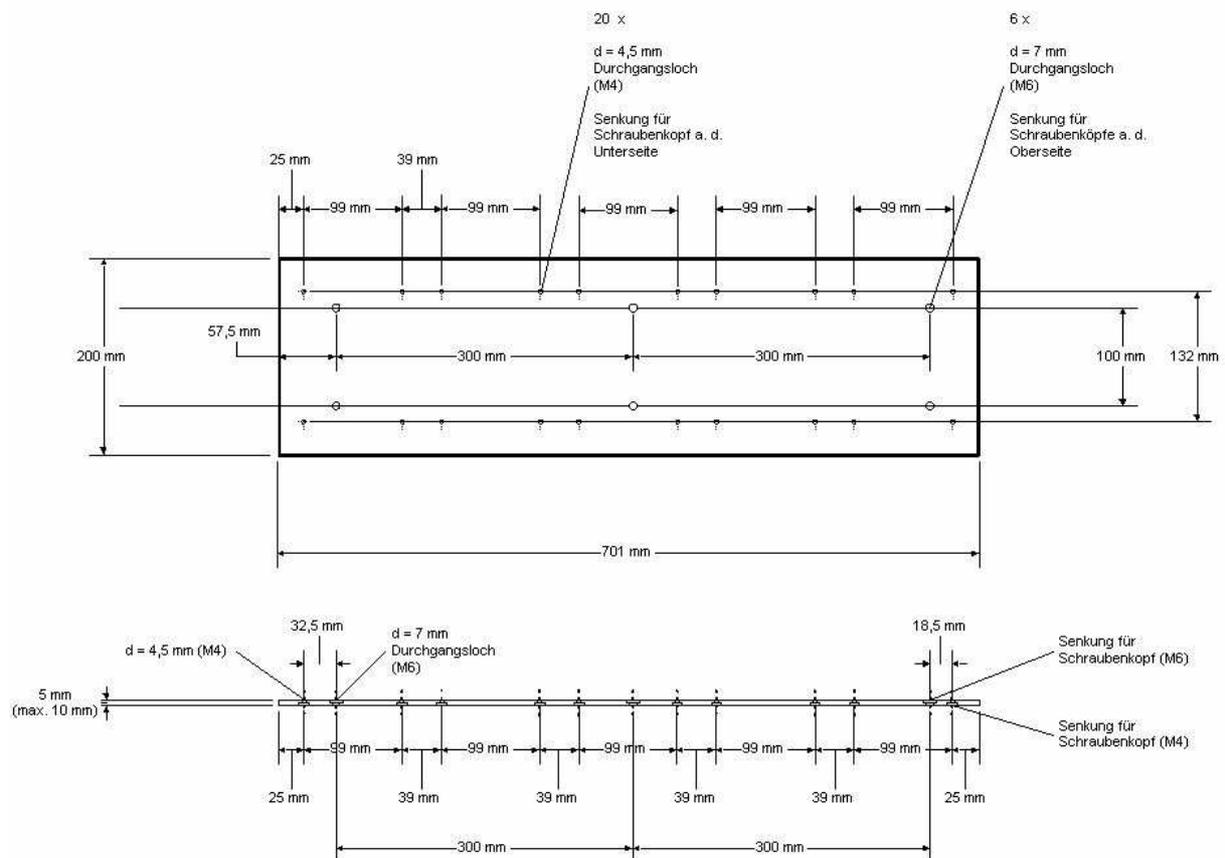


Abbildung A2.1: Adapterplatte für die Inkubationseinheit (5 Mikrotitrationsplattenschüttler): Draufsicht (oben), Seitenansicht (unten).

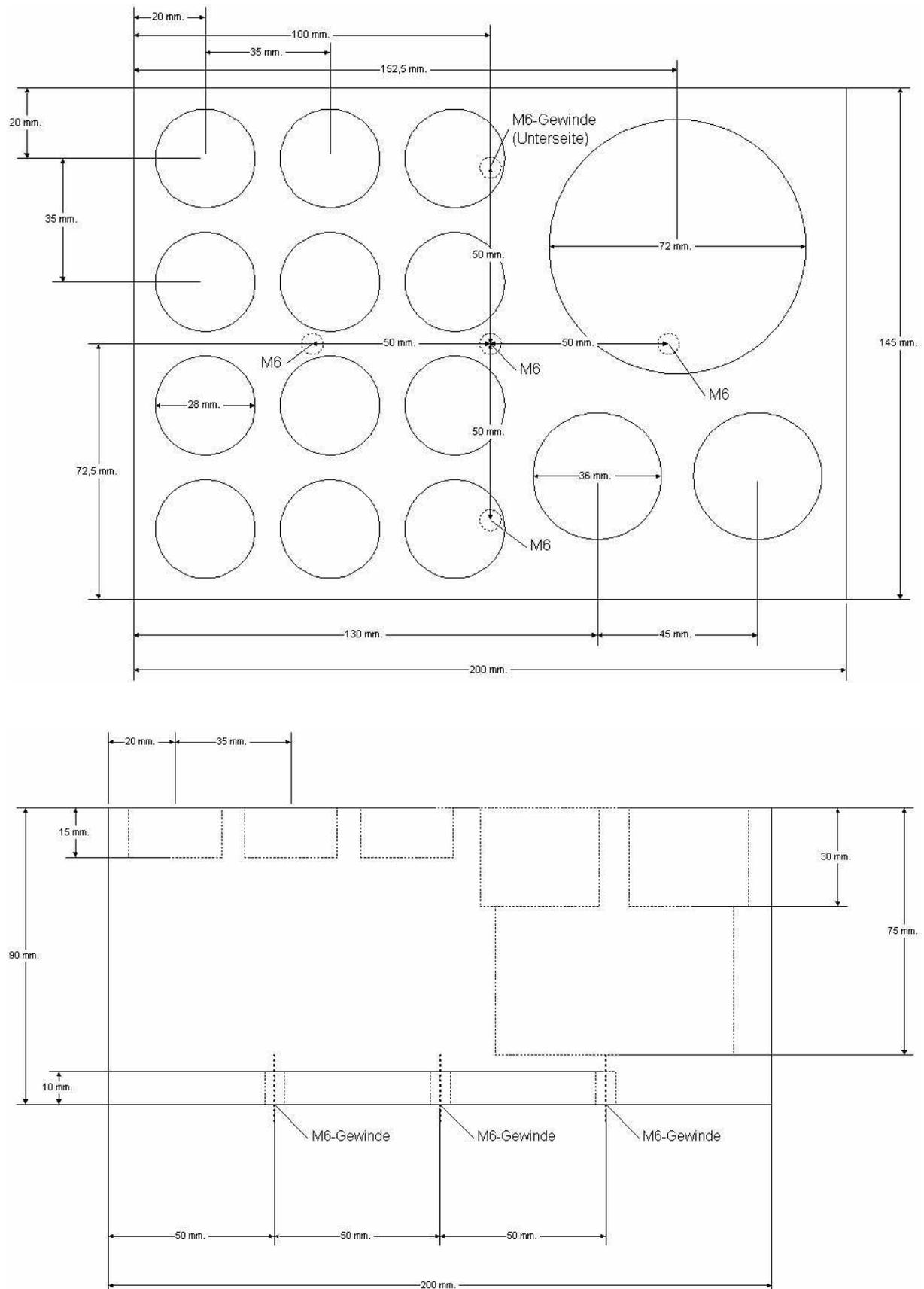


Abbildung A2.2: Gefäßhalterung (1) für das Liquid Handling: Draufsicht (oben), Seitenansicht (unten).

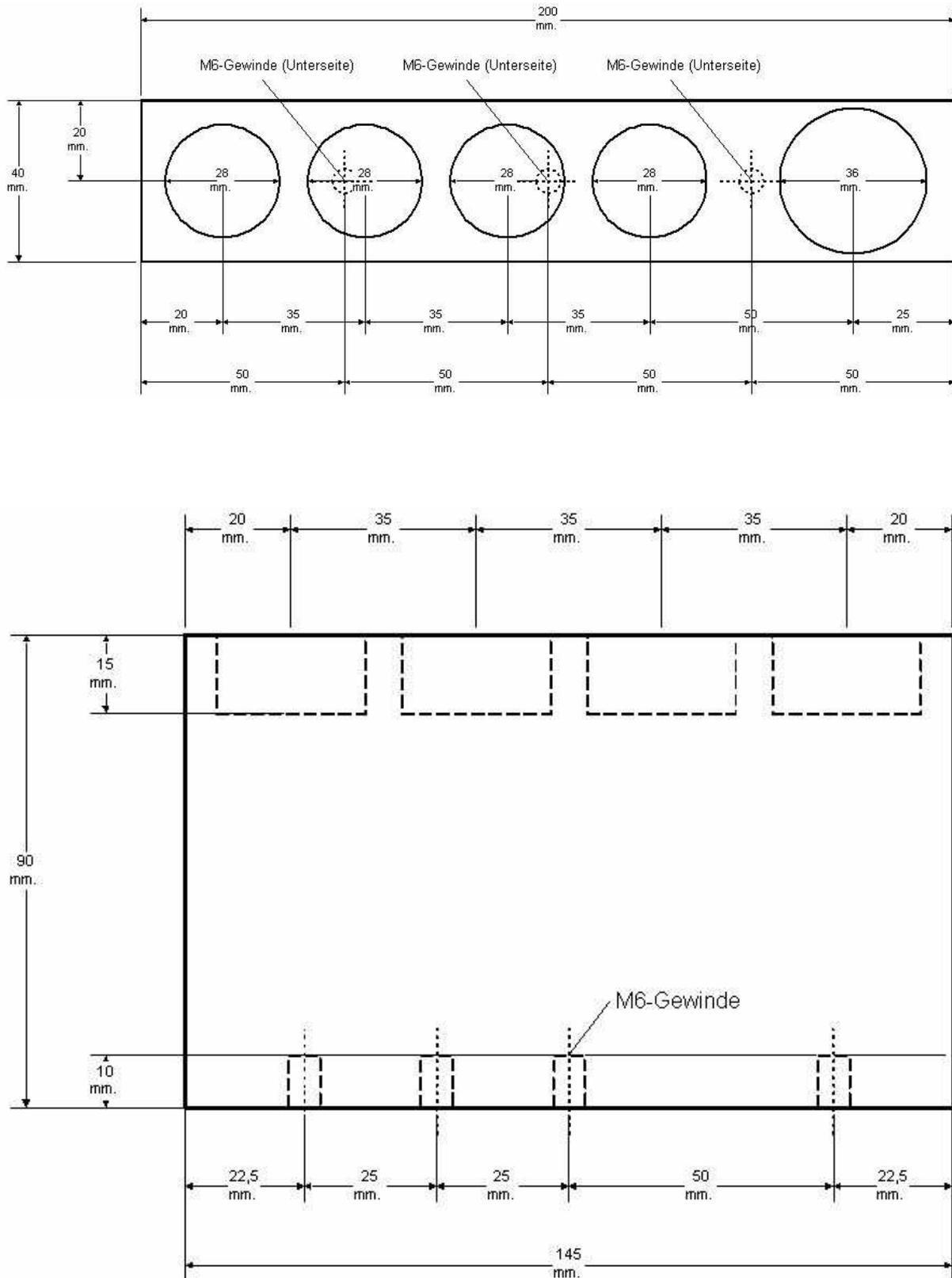


Abbildung A2.3: Gefäßhalterung (2) für das Liquid Handling: Draufsicht (oben), Seitenansicht (unten).

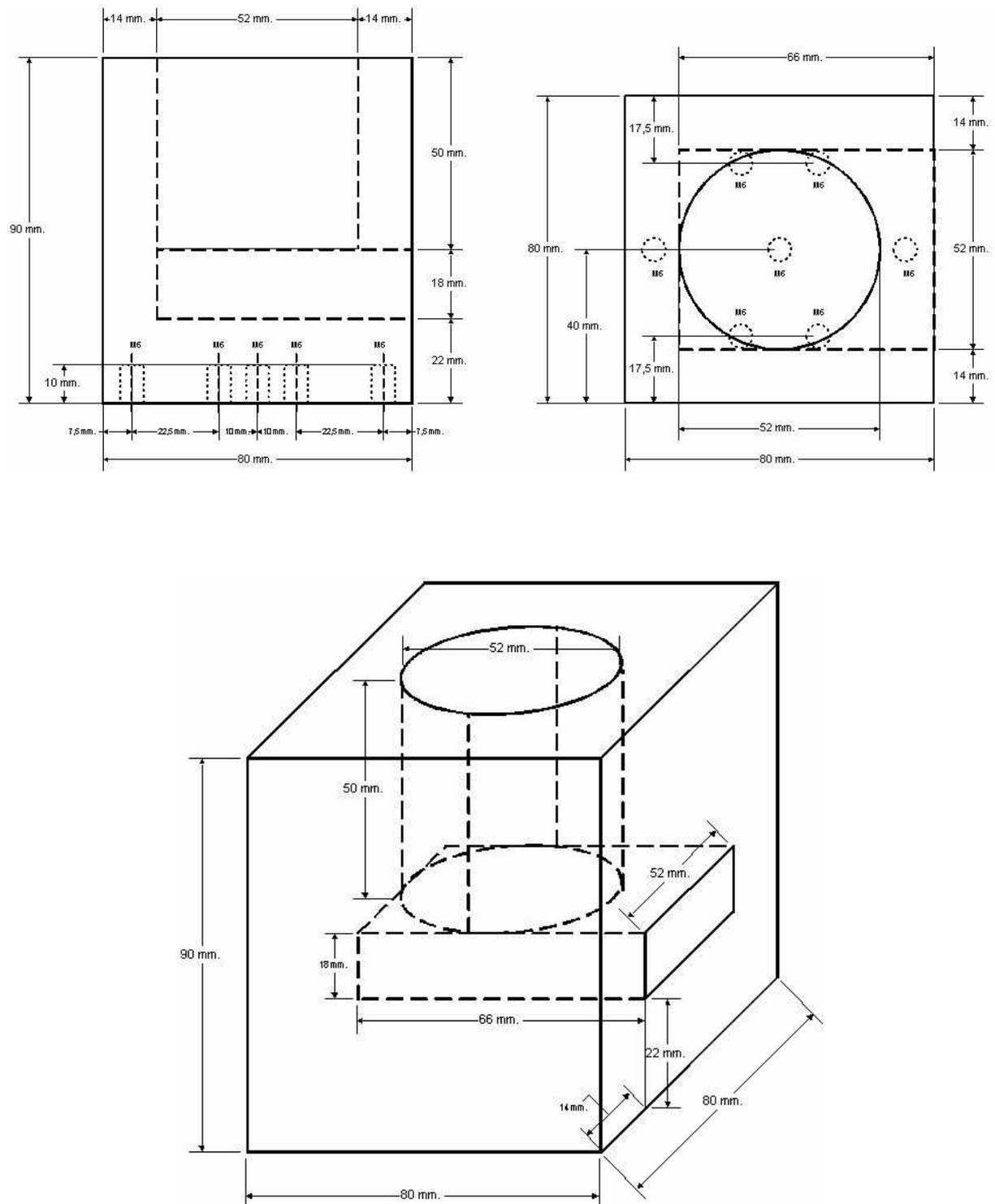


Abbildung A2.4: Gefäßhalterung (3) für das Liquid Handling: Seitenansicht und Draufsicht (oben), 3D-Darstellung (unten).

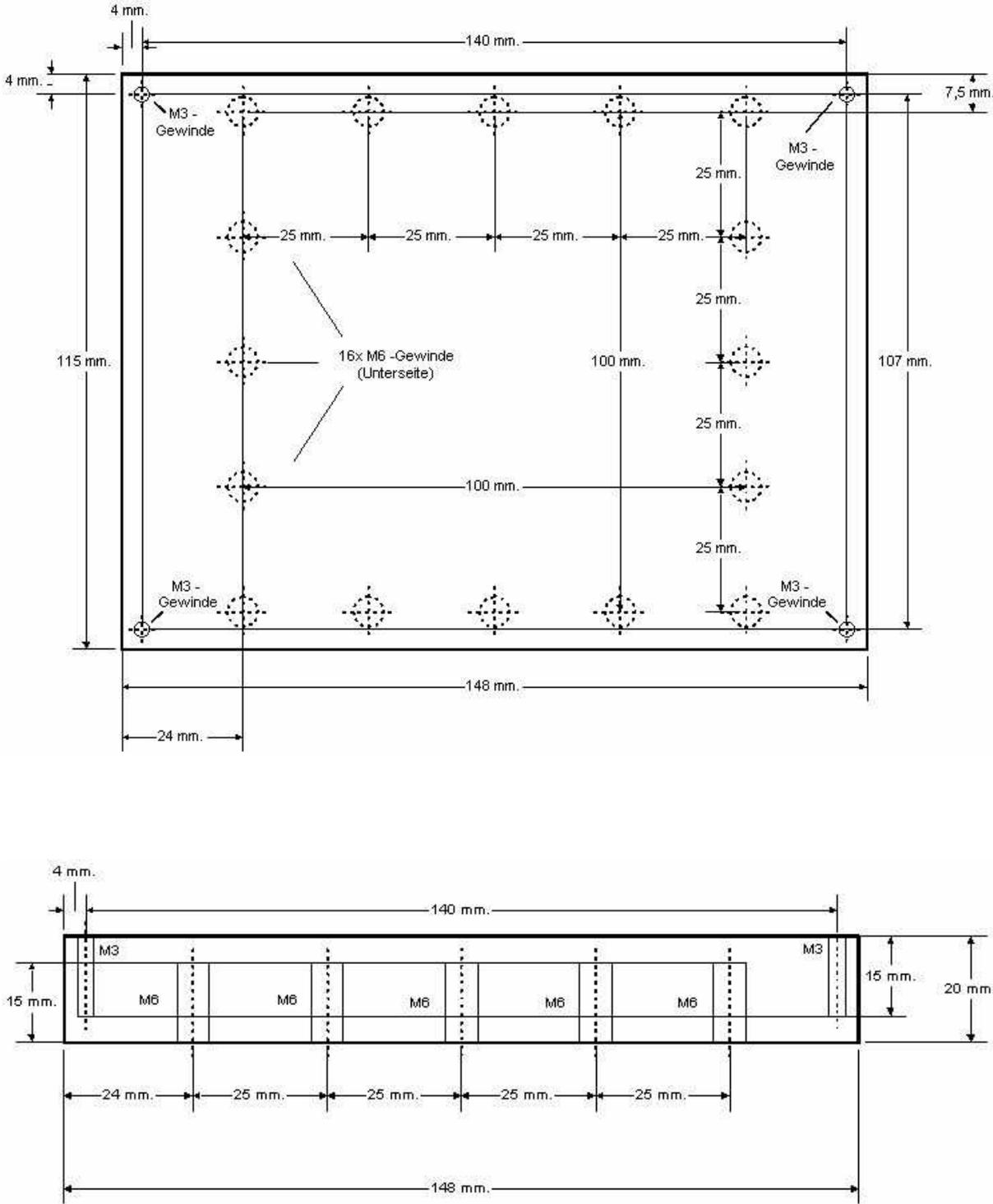


Abbildung A2.5: Positioniereinheit für Mikrotitrationsplatten: Draufsicht (oben), Seitenansicht (unten).



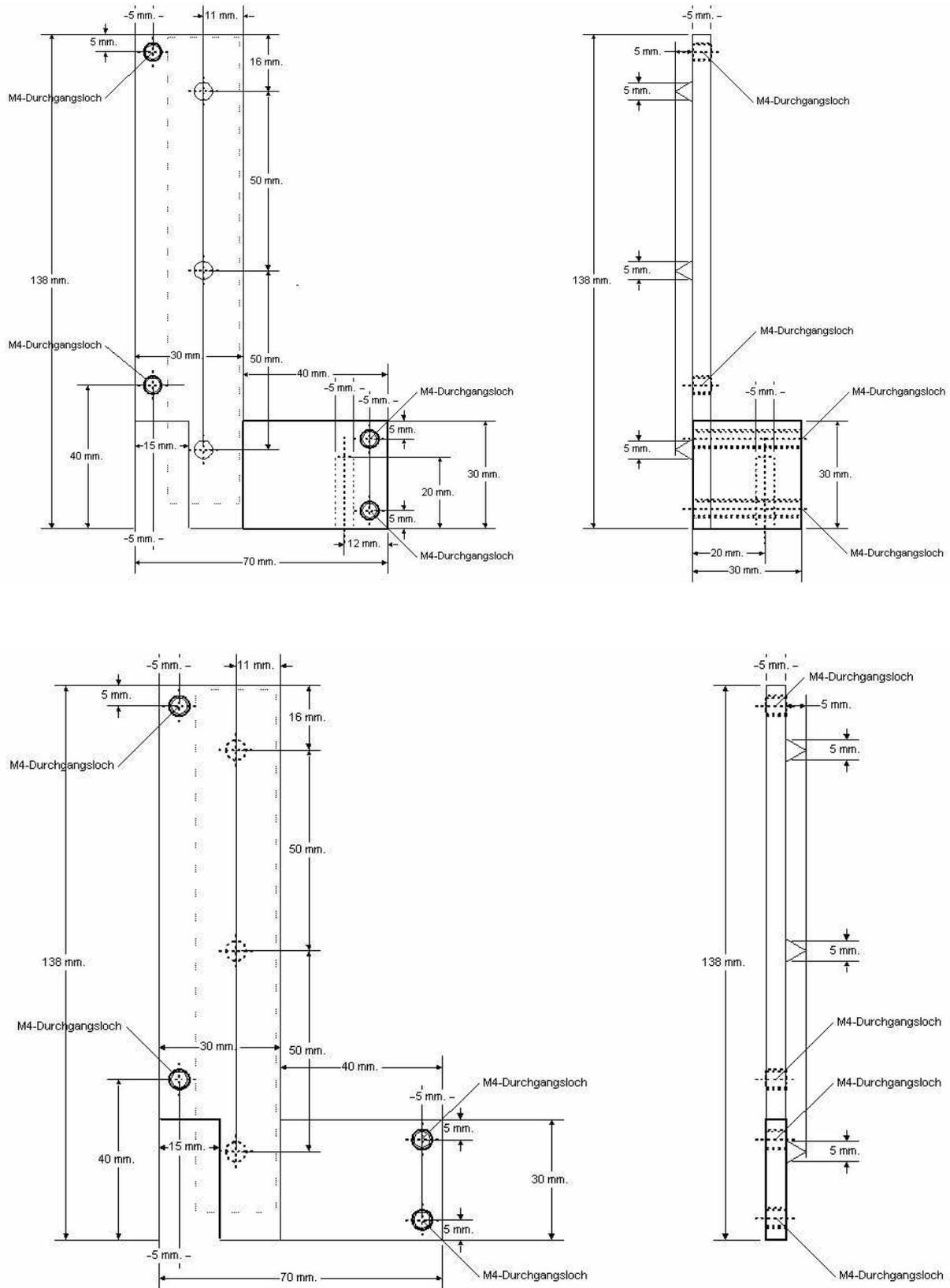


Abbildung A2.7: Adapter für das Dosiersystem EDOS 5222: Bauteil 1 (oben), Bauteil 2 (unten). Dargestellt ist jeweils die Seitenansicht (links) und die Vorderansicht (rechts).

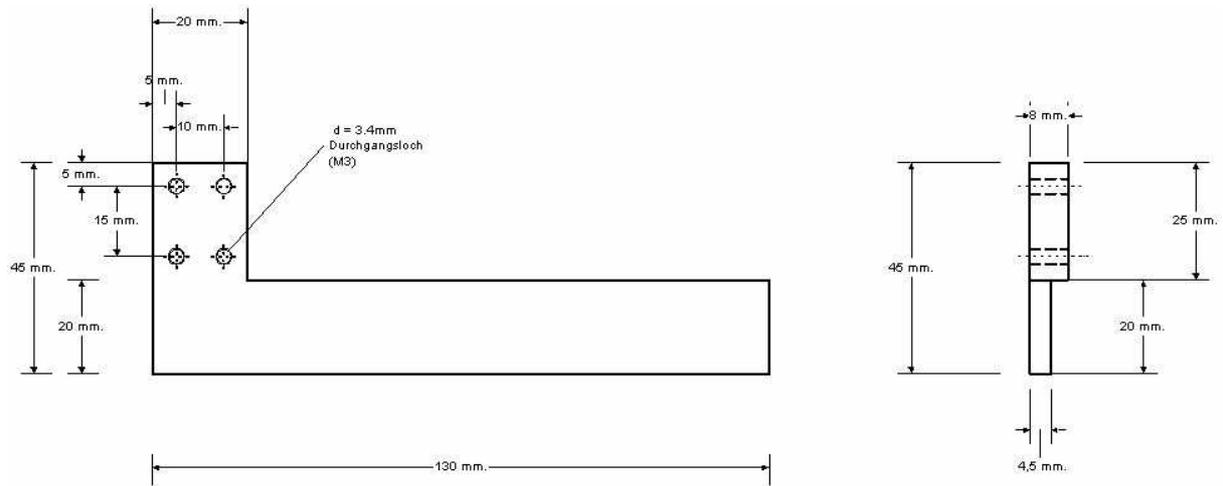


Abbildung A2.8: Greiferbacken für den Mitsubishi Movemaster RV-2AJ: Seitenansicht (links), Vorderansicht (rechts).

## Anhang 3

# Peltier-Kühlung

### A 3.1 Thermoelektrische Kühlung

Die thermoelektrische Kühlung nutzt den Peltier-Effekt aus. Der Peltier-Effekt ist die Umkehrung des Seebeck-Effekts, der in Thermoelementen zur Temperaturmessung ausgenutzt wird.

Die thermoelektrische Kühlung ist bei relativ geringem Kälteleistungsbedarf allen anderen Kälteerzeugungsverfahren überlegen [86]. Ihre besondere Bedeutung liegt auf dem Gebiet der Kleinkältegeräte. Das kleine Volumen und das geringe Gewicht von einzelnen Peltier-Elementen ermöglichen günstige Konstruktionen für die Kühlung verschiedenster Objekte.

Die Peltier-Elemente selbst benötigen keine Kältemittel, wie sie bei Absorber- oder Kompressor-Kühlaggregaten erforderlich sind. Es entfallen also die lästigen Dichtungsprobleme, wodurch die Konstruktion der Kühleinrichtung wesentlich vereinfacht wird. Des Weiteren ist praktisch keine Wartung erforderlich, da Peltier-Elemente keine beweglichen Teile besitzen. Ein wesentlicher Vorteil der Peltier-Kühlung gegenüber anderen Kühlverfahren ist die stufenlose Regelbarkeit der Kälteleistung bzw. der Temperaturabsenkung durch Änderung des Betriebsstroms.

### A 3.2 Peltier-Effekt

Die Besetzung bestimmter Energieniveaus der Ladungsträger in einem elektrisch leitenden Material ist die Ursache, dass mit einem Transport der elektrischen Ladung auch ein Wärmestrom verbunden ist. Dieser Wärmestrom unterscheidet sich in der Regel zwischen den verschiedenen Leitermaterialien und führt bei einem Übergang von Leiter A zu Leiter B zu einer Differenz in den Wärmeströmen [87, 88]. Je nach Vorzeichen des Nettowärmestroms kühlt sich die Kontaktstelle ab oder wird erwärmt.

Dieses Auftreten von Energieüberschuss und Energiemangel an der Grenzfläche zweier verschiedener Leiter ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

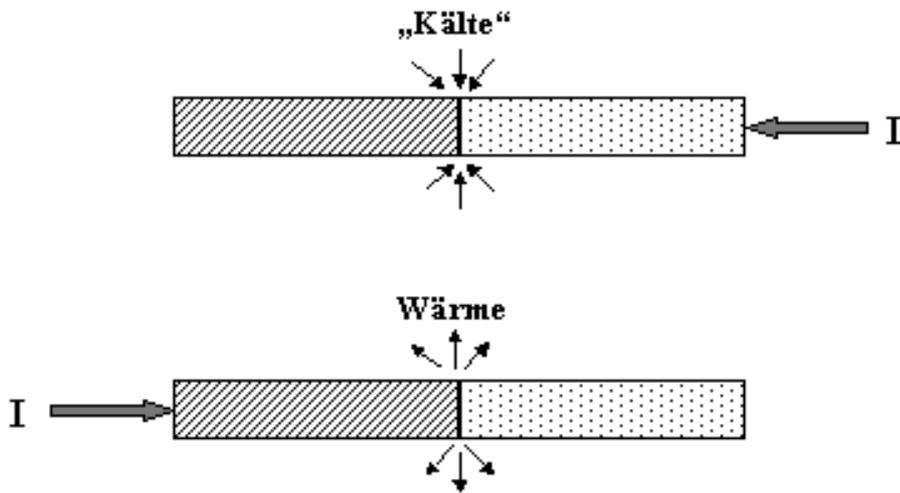


Abbildung A3.1: Der Peltier-Effekt: Fließt durch die Kontaktstelle zweier verschiedener Materialien ein Strom  $I$ , so entsteht an der Kontaktstelle je nach der Stromrichtung Wärme oder „Kälte“.

Der Peltier-Effekt sagt allgemein aus, dass mit einem elektrischen Strom stets ein Wärmetransport verbunden ist. Fließt in einem Material der elektrische Strom  $I$ , so auch gleichzeitig ein ihm proportionaler Wärmestrom

$$\dot{Q} = \Pi \cdot I. \quad (\text{A3.1})$$

Die Proportionalitätskonstante  $\Pi$  heißt Peltierkoeffizient. Die Einheit von  $\Pi$  ist Volt. Der Peltierkoeffizient kann gemäß der Thomson-Relation  $\Pi = S \cdot T$  umgeschrieben werden; dabei ist  $S$  der Seebeckkoeffizient und  $T$  die Temperatur des Materials. Der Seebeckkoeffizient ist ebenso wie der Peltierkoeffizient eine Materialgröße und wird üblicherweise in  $\mu\text{V}/\text{K}$  angegeben. Die Ladungsträgerart im gegebenen Material bestimmt das Vorzeichen des Seebeckkoeffizienten und damit des Peltierkoeffizienten. Der Seebeckkoeffizient  $S$  ist eine negative Größe, wenn der elektrische Strom durch Elektronen getragen wird; bei Löcherleitung ist  $S$  positiv.

Der Wärmestrom ist abhängig von der mittleren Energie  $\bar{\epsilon}$  der Elektronen, einer Art Transportenergie und der Lage des Fermi-Niveaus  $\zeta$ . Es lässt sich somit für den Peltierkoeffizienten ein allgemeingültiger Ausdruck angeben [89]:

$$\Pi = \frac{\bar{\varepsilon}}{e}. \quad (\text{A3.2})$$

$e$  ist die Elementarladung. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist das Fermi-Niveau nach  $\xi = \bar{\varepsilon} - T \cdot s$  mit der Entropie  $s$  verbunden. Mit Hilfe der Thomson-Relation wird deutlich, dass der Transport von Wärme durch Ladungsträger einem Entropiestrom pro Ladung gleichkommt.

Vor allem bei nichtentarteten Halbleitern macht sich ein besonders starker Peltier-Effekt bemerkbar. Das liegt daran, dass unter einer Ladungsträgerkonzentration von etwa  $10^{19} \text{ cm}^{-3}$  die Fermi-Dirac-Statistik mit der Boltzmann-Verteilungsfunktion approximiert werden kann. Der Seebeckkoeffizient lässt sich damit wie folgt formulieren [90]:

$$S = \pm \frac{k_B}{e} \left( \frac{\eta}{k_B T} + \left( r + \frac{5}{2} \right) \right). \quad (\text{A3.3})$$

$\eta$  ist dabei der Betrag der Differenz der Leitungsbandkantenenergie  $E_L$  bei einem n-Halbleiter bzw. Valenzbandkantenenergie  $E_V$  bei einem p-Halbleiter von dem Fermi-Niveau  $\xi$ . Dieser Ausdruck lässt sich aus einem parabolischen Ein-Band-Modell ableiten, bei dem die Spin-Bahn-Aufspaltung deutlich größer ist als  $k_B T$  [91]. Handelt es sich um eine Bandstruktur mit mehreren äquivalenten Leitungs- oder Valenzbändern, so gilt Gleichung (A.3.3) für jedes einzelne Band. Der erste Term in der Klammer stellt den Beitrag der potentiellen Energie der Ladungsträger dar. Der zweite Term repräsentiert die durchschnittlich transportierte Energie der Ladungsträger bezüglich der Bandkante in der Größenordnung von  $k_B T$ . Es wurde hierbei die Näherung berücksichtigt, dass die Relaxationszeit  $\tau$  der Ladungsträger nach

$$\tau \propto |\varepsilon - E_{V,L}|^r \quad (\text{A3.4})$$

berechnet werden kann. Isotropie der Streuung muss dabei vorausgesetzt werden. Der Streumechanismus stellt eine Art „Energiefilter“ dar und ist besonders effektiv für die thermoelektrische Anwendung, wenn „kalte“ Ladungsträger stark gestreut (herausgefiltert) werden und „warme“ Ladungsträger sich praktisch ungestört durch den Kristall bewegen können [92]. Eine Zusammenstellung über die verschiedenen Streumechanismen ist z.B. in [93] zu finden. Bei den diskutierten thermoelektrischen Halbleitern sind Streuungen der Ladungsträger an akustischen Phononen ( $r = -3/2$ ) und ionisierten Störstellen ( $r = 3/2$ ) die wichtigsten Streumechanismen.

Geeignete thermoelektrische Materialien zeichnen sich also dadurch aus, dass sie als Folge des elektrischen Stromflusses Wärme innerhalb des Materials von einem Ort zum anderen transportieren können. Um die Umwandlung von elektrischer Energie in thermische Energie zu veranschaulichen, betrachten wir jeweils einen n-dotierten Halbleiter und einen p-dotierten Halbleiter zwischen zwei Metallkontakten. Ohne Stromfluss befinden sich die Fermi-Niveaus der Kontakte und des Halbleiters auf gleichem Niveau. In Abbildung A3.2 ist dieser Fall dargestellt.

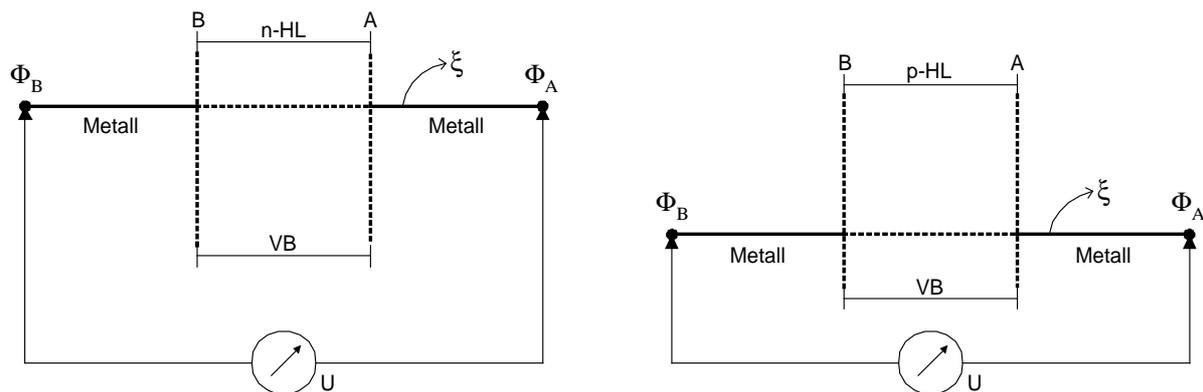


Abbildung A3.2: n-Halbleiter und p-Halbleiter zwischen zwei Metallkontakten. Das Fermi-Niveau  $\xi$  der einzelnen Schaltungen ist angeglichen. VB entspricht dem Valenzband, n-HL beziehungsweise p-HL stellen die Leitungsbander der Halbleiter dar.

Das Erwärmen der rechten Kontaktstelle Halbleiter/Metall A und/oder das Abkühlen der linken Stelle B führt dazu, dass die Ladungsträger bei A nun eine höhere durchschnittliche Energie besitzen als dieselben bei B. Es resultiert ein Ladungstransport von A nach B, bis sich der stationäre Zustand eingestellt hat [94]. Durch diesen Diffusionsstrom entsteht ein Konzentrationsunterschied der Ladungsträger. Das dadurch aufgebaute Gegenfeld wirkt der Diffusion entgegen. Im stationären Zustand sind die beiden Größen einander entgegen gerichtet und kompensieren sich. Es entsteht jedoch eine konstante elektrische Spannung, da sich an der Kontaktstelle B mehr Ladungsträger befinden als bei A. Die abgegriffene Spannung beträgt  $U = \Phi_B - \Phi_A$ . Es wird also eine Spannung erzeugt, indem durch thermische Einwirkung ein Konzentrationsgradient hervorgerufen wird. Dies wird als Seebeck-Effekt bezeichnet. Unter Stromfluss käme der Effekt zum Erliegen, da die Temperaturunterschiede rasch ausgeglichen würden. Durch ständiges Erwärmen von A und/oder Kühlen von B lässt sich der Strom jedoch aufrechterhalten. Das Resultat ist die Erzeugung von elektrischer Energie durch Umwandlung von thermischer Energie.

Der Peltier-Effekt stellt die Umkehrung dar. Das Durchfließen eines elektrischen Stromes durch einen Halbleiter erzeugt eine warme und eine kalte Kontaktstelle. Es wird elektrische in thermische Energie umgewandelt. In Abbildung A3.3 wird gezeigt, wie das Anlegen eines konstanten elektrischen Feldes zu einem „Verbiegen“ der Bänder führt. Im n-Halbleiter sorgen Elektronen (von rechts nach links), im p-Halbleiter Löcher (von links nach rechts) für den Ladungstransport. Dadurch, dass nur solche Ladungsträger zum Stromfluss beitragen können, die eine ausreichend hohe Energie besitzen, um die Energiebarriere  $\Delta E_n$  beziehungsweise  $\Delta E_p$  zu überwinden, kommt es zu einem Transport von thermischer Energie, welche zuvor dem Gitter entzogen wurde [95].

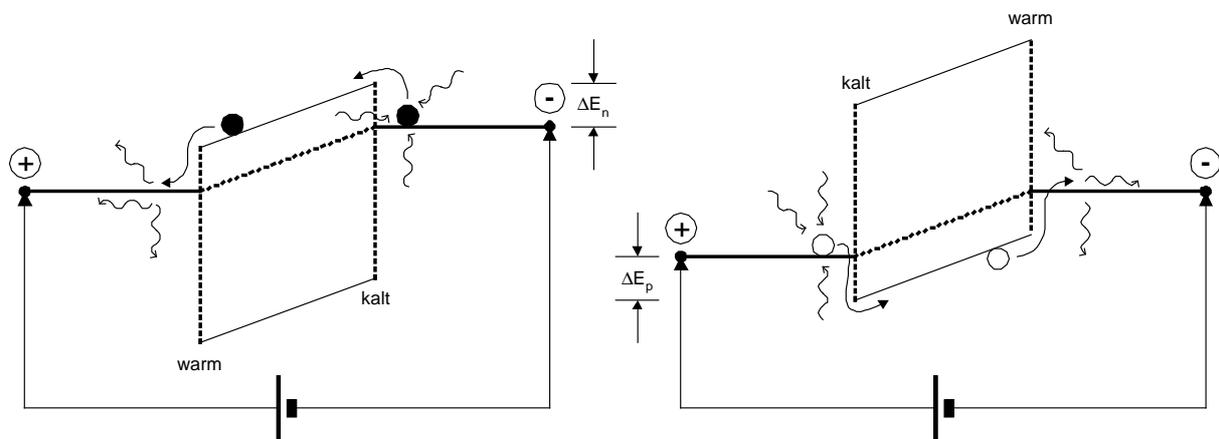


Abbildung A3.3: Durch Einwirkung eines elektrischen Feldes sind die Bänder „verbogen“. Gezeigt ist, wie Elektronen (linkes Bild), bzw. Löcher (rechtes Bild) Energie aus dem Gitter aufnehmen, dann die Energiebarriere  $\Delta E_n$  bzw.  $\Delta E_p$  überwinden und somit zum Stromfluss beitragen.

Die Ladungsträger transportieren ihre Energie zur anderen Kontaktstelle. Dort besetzen sie energetisch günstigere Zustände und geben ihre überschüssige Energie an das Gitter ab. Diese Kontaktstelle wird erwärmt, während sich die Kontaktstelle, von der die Ladungsträger stammen, abkühlt. Dieser Pumpmechanismus wird als Peltier-Effekt bezeichnet.

Eine Anordnung, die mittels des Peltier-Effekts einen kontinuierlichen Wärmestrom erzeugt wird Peltier-Element genannt. Ein Peltier-Element arbeitet also im Prinzip wie eine Wärmepumpe. Wird es von einem elektrischen Strom durchflossen, so nimmt es auf der einen Seite Wärme auf, die es auf der anderen Seite wieder abgibt. Die eine Seite wird kalt, die andere warm. In Abbildung A3.4 ist die Wirkungsweise eines Peltier-Elements dargestellt. Die zugeführte elektrische Leistung ist eingezeichnet, sowie die an Kalt- und Warmseite auftretenden Wärmemengen.

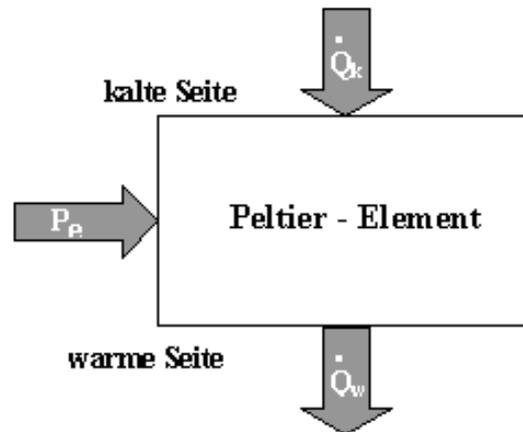


Abbildung A3.4: Wirkungsweise eines Peltier-Elements. Dabei bezeichnet  $P_e$  die dem Peltier-Element zugeführte elektrische Leistung,  $\dot{Q}_k$  die der kalten Seite pro Sekunde entzogene Wärmemenge, also die Kälteleistung, und  $\dot{Q}_w$  die auf der warmen Seite pro Sekunde abgegebene Wärmemenge.

Die Temperatur der kalten Seite soll im Folgenden mit  $T_k$  bezeichnet werden. Der warmen Seite ordnen wir die Temperatur  $T_w$  zu.

An der Warmseite des Peltier-Elements entsteht so nach Gleichung (A3.1) und unter Verwendung der Thomson-Relation pro Sekunde die Wärmemenge

$$\dot{Q}_w = S \cdot I \cdot T_w . \quad (\text{A3.5})$$

Entsprechend lautet die an der Kaltseite des Peltier-Elements pro Sekunde aufgenommene Wärmemenge (Kälteleistung)

$$\dot{Q}_k = S \cdot I \cdot T_k . \quad (\text{A3.6})$$

Die benötigte elektrische Leistung lautet nach  $P_e = \dot{Q}_w - \dot{Q}_k$

$$P_e = S \cdot I \cdot (T_w - T_k) . \quad (\text{A3.7})$$

Die Bruttokälteleistung (A3.6) wird durch zwei unvermeidbare Effekte vermindert: Zum einen um den durch Wärmeleitung von der warmen zur kalten Seite fließenden Wärmestrom, zum anderen durch die als Joulesche Wärme bezeichnete Stromwärme. Die Nettokälteleistung an der Kaltseite des Peltier-Elements formuliert sich daher wie folgt:

$$\dot{Q}_{kalt} = SIT_k - \frac{1}{2} I^2 R - K\Delta T . \quad (\text{A3.8})$$

$K$  ist hier der Wärmeleitwert.

Analog erhält man für die auf der Warmseite des Peltier-Elements abgegebene Wärmemenge:

$$\dot{Q}_{warm} = SIT_w + \frac{1}{2}I^2R - K \cdot \Delta T. \quad (\text{A3.9})$$

Die dem Peltier-Element zugeführte elektrische Leistung schreibt sich jetzt

$$P_{elektrisch} = SI\Delta T + I^2R. \quad (\text{A3.10})$$

Für das Maximum der Temperaturdifferenz gilt:

$$\Delta T_{\max} = \frac{1}{2} \frac{S^2}{KR} T_k^2. \quad (\text{A3.11})$$

Die letzte Gleichung zeigt, dass die erreichbare Temperaturdifferenz um so größer ist, je größer der Seebeckkoeffizient  $S$  und je kleiner der Widerstand  $R$  und der Wärmeleitwert  $K$  des Peltier-Elements sind.

Diese Materialeinflüsse kommen im sogenannten Gütefaktor  $Z$  zum Ausdruck:

$$Z = \frac{S^2}{\kappa\rho}, \quad (\text{A3.12})$$

wobei  $\kappa$  hier die Wärmeleitfähigkeit und  $\rho$  den spezifischen Widerstand bezeichnet. Damit wird die maximale Temperaturdifferenz zu

$$\Delta T_{\max} = \frac{1}{2} Z T_k^2; \quad (\text{A3.13})$$

sie hängt also direkt vom geometrieunabhängigen Gütefaktor  $Z$  (Einheit  $1/K$ ) ab.

Bei kleiner Temperaturdifferenz ist die verfügbare Kälteleistung groß, bei großer Temperaturdifferenz ist sie nur klein. Die größte Kälteleistung  $\dot{Q}_{kalt,max}$  erreicht man bei  $\Delta T = 0$ , die größte Temperaturdifferenz  $\Delta T_{max}$  stellt sich bei  $\dot{Q}_{kalt}$  ein.

In Abbildung A3.5 ist diese Abhängigkeit der Temperaturdifferenz von der verfügbaren Kälteleistung für  $T_w = \textit{konstant}$  dargestellt. Die ausgezogene Kurve gilt für den Strom  $I_{opt}$ . Bei Abweichungen von diesem Wert werden die Maximalwerte nicht mehr erreicht, wie die gestrichelte Kurve zeigt.

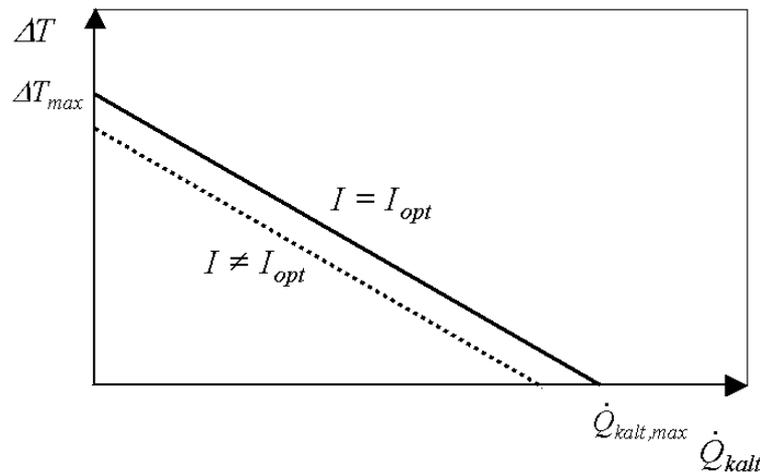


Abbildung A3.5: Abhängigkeit der Temperaturdifferenz von der Kälteleistung bei  $T_w = \text{konstant}$ .

Wir haben nun eine weitere wichtige Eigenschaft eines Peltier-Elements kennen gelernt, nämlich seine Charakteristik. Die Charakteristik eines Peltier-Elements ist wie folgt definiert:

$$\Delta T = \Delta T_{\max} - m \cdot \dot{Q}_{\text{kalt}} . \quad (\text{A3.14})$$

Die Größe  $1/m$  kann auch als Belastbarkeit bezeichnet werden. Die Charakteristik beschreibt also die Abkühlung bei der festen Stromereinstellung  $I_{\text{opt}}$  in Abhängigkeit von der Belastung der kalten Seite. D. h. wir können anhand der Charakteristik aussagen, um wie viel die Temperaturdifferenz zurückgeht, wenn das Peltier-Element eine gewisse Kühlleistung aufbringen muss. (Charakteristiken sind bei kommerziellen Peltier-Elementen stets bekannt.)

## A 3.3 Materialien für die Peltier-Kühlung

Besondere Beachtung muss man beim Bau eines Peltier-Elements der Materialauswahl schenken. Wie wir im vorherigen Abschnitt gesehen haben, ist der Gütefaktor  $Z$  ausschlaggebend für die maximal erreichbare Temperaturdifferenz eines Peltier-Elements (Gleichung (A3.13)). Der Gütefaktor stellt also eine Art Qualitätskriterium dar, wie gut ein Material für die Peltier-Kühlung geeignet ist.

Aus der Definition des Gütefaktors (Gleichung (A3.12)) ist ersichtlich, dass in Frage kommende Materialien sich durch hohe Seebeckkoeffizienten, niedrige Wärmeleitfähigkeiten und niedrige spezifische Widerstände auszeichnen.

Metalle haben zwar einen niedrigen spezifischen Widerstand, aber einen zu kleinen Seebeckkoeffizienten. Bei Isolatoren liegen gerade die umgekehrten Verhältnisse vor. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Wärmeleitfähigkeit erkennt man, dass das Optimum für thermoelektrische Materialien im Halbleitergebiet liegt [96].

Als beste Werkstoffe für die Peltier-Kühlung sind heute Halbleiter-Mischkristalle auf der Basis Wismut-Tellurid ( $\text{Bi}_2\text{Te}_3$ ) anzusehen. Für den p-Halbleiter mischt man Antimon bei und erhält dadurch  $\text{Bi}_{2-x}\text{Sb}_x\text{Te}_3$ ; für den n-Halbleiter nimmt man Selen und bekommt  $\text{Bi}_2\text{Te}_{3-x}\text{Se}_x$ . Die Gütefaktoren, die man damit in kommerziellen Peltier-Elementen erreicht, liegen zwischen  $2 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$  und  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ . Der Unterschied ist auf unterschiedliche Fertigungstechniken in der Produktion zurückzuführen. Damit sind von Zimmertemperatur ( $\sim 300 \text{ K}$ ) aus startend Abkühlungen zwischen 60 und 70 K möglich.

Die einfachste Konstruktion eines Peltier-Elements besteht aus einem Halbleiter (p- oder n-dotiert) durch den man einen elektrischen Gleichstrom leitet. In Abbildung A3.6 ist dies zusammen mit den auftretenden Wärmeströmen dargestellt. Man beachte, dass beim n-dotierten Halbleiter (Seebeckkoeffizient ist negativ!) die Wärmeströme antiparallel zum elektrischen Strom sind. Die Wärmeströme in den metallischen Zuleitungen sind aufgrund des niedrigen Seebeckkoeffizients vernachlässigbar.

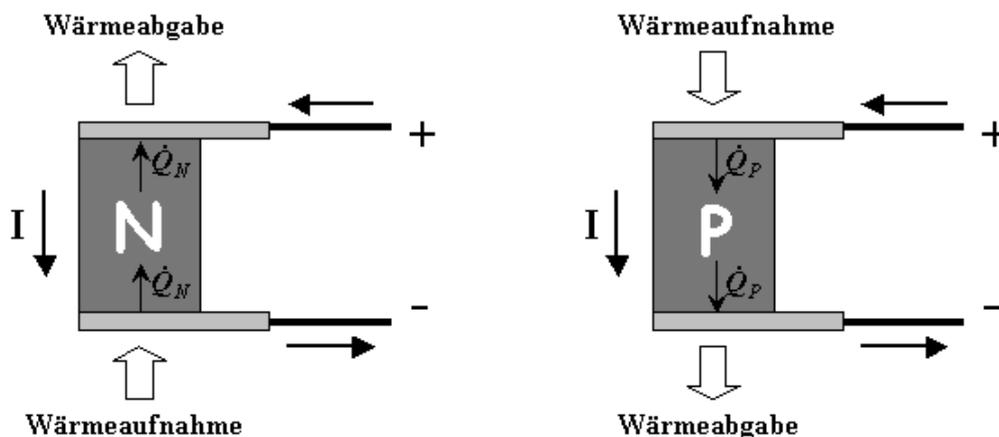


Abbildung A3.6: Schematische Darstellung des Peltier-Effekts in einem n-dotierten (links) und p-dotierten (rechts) Halbleiter. Eingezeichnet sind die technische elektrische Stromrichtung und die damit verbundenen Wärmeströme.

## A 3.4 Peltier-Module

Kommerzielle Peltier-Elemente bestehen aus einer Reihenschaltung von Halbleiter-Peltier-Elementen aus n- und p-dotierten  $\text{Bi}_2\text{Te}_3$ , den sogenannten Peltier-Schenkeln. Diese Schenkel sind nicht direkt, sondern über elektrisch und thermisch gut leitende Kontaktbrücken aus Kupfer miteinander verbunden. Durch eine mäanderförmige Anordnung von n- und p-leitenden Schenkeln liegen die kalten und die warmen Kontaktstellen jeweils auf entgegengesetzten Seiten (Abbildung A3.7). Der entscheidende Vorteil dieser Anordnung ist, dass die kalten Kontaktstellen von Zuleitungen frei bleiben, die ihnen sonst ständig schädliche Wärme zuführen würden.

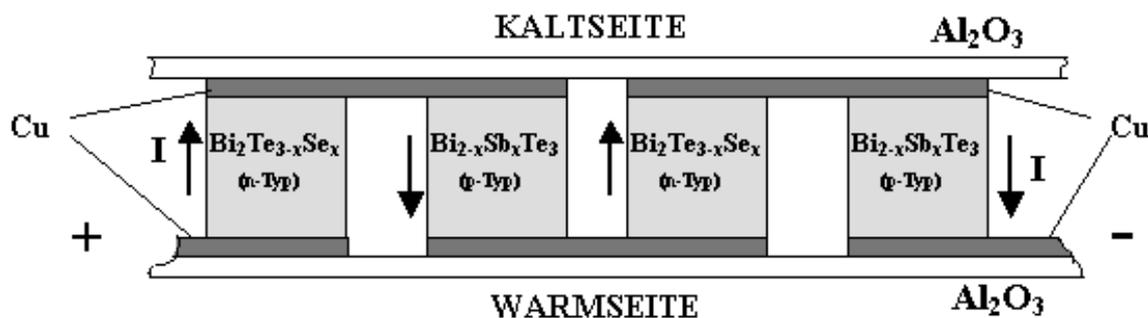


Abbildung A3.7: Anordnung der einzelnen Peltier-Schenkel in einem kommerziellen Peltier-Element. Durch die mäanderförmige Hintereinanderschaltung der p- und n-leitenden Schenkel erreicht man eine räumliche Trennung von Kalt- und Warmseite.

Die oben und unten aufgebrauchten Keramikplatten ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) dienen als elektrisch isolierende und mechanische Träger der Mäanderstruktur aus Peltier-Schenkeln und Kupferbrücken. Aluminiumoxid wird dabei wegen seiner guten Wärmeleitfähigkeit und seiner einfachen Herstellung verwendet. Die elektrische Reihenschaltung der Halbleiter-Elemente und die spezielle Anordnung führt dazu, dass alle relevanten Wärmeströme gleichgerichtet sind. Durch diese thermische Parallelschaltung ist die räumliche Trennung von Kalt- und Warmseite gewährleistet.

In kommerziellen Peltier-Elementen verwendet man sehr viele dieser Peltier-Schenkel. Man spricht dann auch von Peltier-Modulen. Je nachdem welche Kühlleistung das Peltier-Modul aufbringen soll, bestückt man es mit bis zu 400 einzelner Schenkel. Die typische Bauweise eines Peltier-Moduls ist schließlich in Abbildung A3.8 dargestellt.

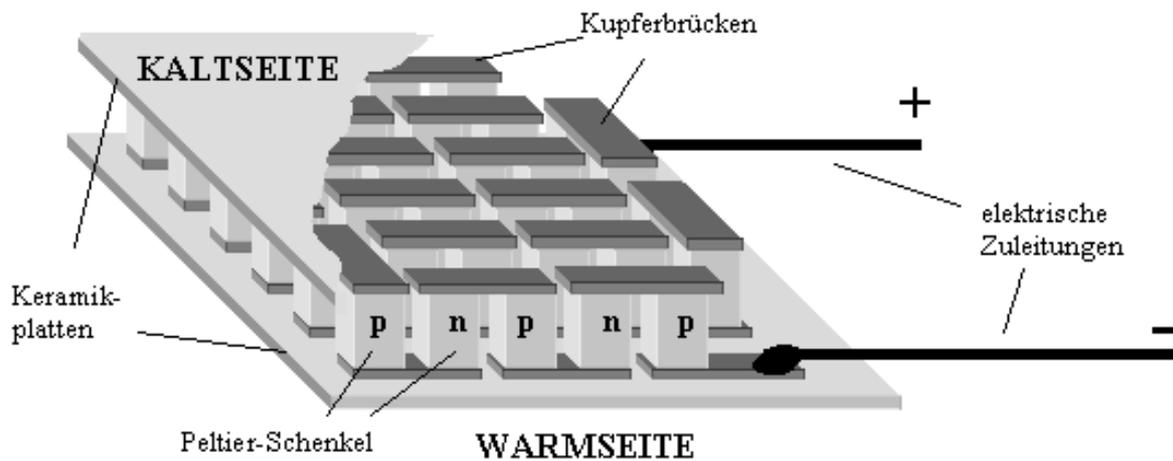


Abbildung A3.8: Typische Bauweise eines Peltier-Moduls. Durch die obere Keramikplatte (Kaltseite) ist ein Schnitt gemacht worden, um den besonderen Verlauf der Kupferbrücken erkennen zu können.



## Anhang 4

# Extensible Markup Language (XML)

## A 4.1 Einführung

Die Extensible Markup Language, abgekürzt XML, beschreibt eine Klasse von Datenobjekten, genannt XML-Dokumente, und beschreibt teilweise das Verhalten von Computer-Programmen, die solche Dokumente verarbeiten. XML ist ein Anwendungsprofil (application profile) oder eine eingeschränkte Form von SGML, der Standard Generalized Markup Language (ISO 8879) [97]. Durch ihre Konstruktion sind XML-Dokumente konforme SGML-Dokumente.

XML-Dokumente sind aus Speicherungseinheiten aufgebaut, genannt Entities, die entweder analysierte (parsed) oder nicht analysierte (unparsed) Daten enthalten. Analysierte Daten bestehen aus Zeichen, von denen einige Zeichendaten und andere Markup darstellen. Markup ist eine Beschreibung der Aufteilung auf Speicherungseinheiten und der logischen Struktur des Dokuments. XML bietet einen Mechanismus an, um Beschränkungen der Aufteilung und logischen Struktur zu formulieren.

Ein Software-Modul, genannt XML-Prozessor, dient dazu, XML-Dokumente zu lesen und den Zugriff auf ihren Inhalt und ihre Struktur zu erlauben. Es wird angenommen, dass ein XML-Prozessor seine Arbeit als Teil eines anderen Moduls, genannt Anwendung, erledigt. Dieses Kapitel beschreibt das notwendige Verhalten eines XML-Prozessors soweit es die Frage betrifft, wie er XML-Daten einlesen muss und welche Informationen er an die Anwendung weiterreichen muss.

XML-Applikationen eignen sich als Plattform- und Software-unabhängiges Austausch-Format für Daten zwischen verschiedenen Programmen und Rechnern - ähnlich wie RTF für Texte, CVS für Tabellen, EDI für kommerzielle Anwendungen - aber in einem einheitlichen, allgemein verwendbaren, Hersteller-unabhängigen Format

## A 4.1.1 Herkunft und Ziele

XML wurde von einer XML-Arbeitsgruppe (ursprünglich bekannt als das SGML Editorial Review Board) entwickelt, die 1996 unter der Schirmherrschaft des World Wide Web Consortium (W3C) gegründet wurde.

Die Entwurfsziele für XML sind:

1. XML soll sich im Internet auf einfache Weise nutzen lassen.
2. XML soll ein breites Spektrum von Anwendungen unterstützen.
3. XML soll zu SGML kompatibel sein.
4. Es soll einfach sein, Programme zu schreiben, die XML-Dokumente verarbeiten.
5. Die Zahl optionaler Merkmale in XML soll minimal sein, idealerweise Null.
6. XML-Dokumente sollten für Menschen lesbar und angemessen verständlich sein.
7. Der XML-Entwurf sollte zügig abgefasst sein.
8. Der Entwurf von XML soll formal und präzise sein.
9. XML-Dokumente sollen leicht zu erstellen sein.
10. Knappheit von XML-Markup ist von minimaler Bedeutung.

## A 4.1.2 Terminologie

Die Terminologie, die zur Beschreibung von XML-Dokumenten verwendet wird, ist innerhalb dieses Abschnitts definiert. Die in der folgenden Liste definierten Begriffe werden benutzt, um jene Definitionen zu formulieren und die Aktionen eines XML-Prozessors zu beschreiben.

*darf (may)*

Definition: Konforme Dokumente und XML-Prozessoren dürfen sich so verhalten, wie beschrieben, müssen es aber nicht.

*müssen/nicht dürfen (must)*

Definition: Konforme Dokumente und XML-Prozessoren müssen sich/dürfen sich nicht so verhalten, wie beschrieben, andernfalls sind sie fehlerhaft.

*Fehler (error)*

Definition: Eine Verletzung der Regeln der Spezifikation; die Konsequenzen sind nicht definiert. Konforme Software darf Fehler erkennen und anzeigen und anschließend weiterarbeiten.

*Kritischer Fehler (fatal error)*

Definition: Ein Fehler, den ein konformer XML-Prozessor erkennen und an das Anwendungsprogramm melden muss. Nach der Erkennung eines kritischen Feh-

lers darf der Prozessor die Verarbeitung fortsetzen, um nach weiteren Fehlern zu suchen und diese dem Anwendungsprogramm zu melden. Um die Fehlerkorrektur zu unterstützen, darf der Prozessor nichtverarbeitete Daten des Dokuments (mit vermischtem Text und Markup) dem Anwendungsprogramm zur Verfügung stellen. Wenn ein kritischer Fehler aufgetreten ist, darf ein Prozessor die normale Verarbeitung nicht fortsetzen. Dies heißt insbesondere, dass er keine weiteren Daten oder Informationen über die logische Struktur des Dokuments an das Anwendungsprogramm weiterleiten darf, wie es normalerweise geschieht.

*benutzeroptional (at user option)*

Definition: Konforme Software darf oder muss (in Abhängigkeit von dem Modalverb im Satz) sich so verhalten wie beschrieben. Sie muss dem Benutzer eine Möglichkeit einräumen, das beschriebene Verhalten ein- oder auszuschalten.

*Gültigkeitsbeschränkung (validity constraint)*

Definition: Eine Regel, die für alle gültigen XML-Dokumente gilt. Verletzungen von Gültigkeitsbeschränkungen sind Fehler. Sie müssen benutzeroptional von validierenden XML-Prozessoren gemeldet werden.

*Wohlgeformtheitsbeschränkung (well-formedness constraint)*

Definition: Eine Regel, die für alle wohlgeformten XML-Dokumente gilt. Verletzungen von Wohlgeformtheitsbeschränkungen sind kritische Fehler.

*passen (match)*

Definition: (Strings oder Namen:) Zwei Zeichenketten oder Namen, die verglichen werden, müssen identisch sein. Zeichen mit mehreren möglichen Repräsentationen in ISO/IEC 10646 [98] (zum Beispiel Zeichen in einer geschlossenen Form und einer Form, die aus einem Grundzeichen und einem diakritischen Zeichen zusammengesetzt wird) passen nur, wenn sie die gleiche Repräsentation in beiden Zeichenketten haben. (Strings und Regeln in der Grammatik:) Ein String passt zu einer grammatikalischen Produktion, wenn er zur Sprache gehört, die durch die Produktion erzeugt wird. (Inhalt und Inhaltsmodelle:) Ein Element passt zu seiner Deklaration, wenn es in der Weise konform ist, die in der Gültigkeitsbeschränkung beschrieben ist.

*zwecks Kompatibilität (for compatibility)*

Definition: Bezeichnet einen Satz, der eine Eigenschaft von XML beschreibt, die einzig zu dem Zweck eingeführt wurde, dass XML mit SGML kompatibel bleibt.

*zwecks Zusammenarbeit (for interoperability)*

Definition: Bezeichnet einen Satz, der eine unverbindliche Empfehlung beschreibt, die dazu dient, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass XML-

Dokumente von existierenden SGML-Prozessoren verarbeitet werden können, die älter sind als der WebSGML Adaptations Annex der ISO 8879 [97].

## A 4.2 XML-Dokumente

Jedes XML-Dokument hat sowohl eine logische als auch eine physische Struktur. Physisch besteht das Dokument aus einer Reihe von Einheiten, genannt Entities. Ein Entity kann auf andere Entities verweisen, um sie in das Dokument einzubinden. Jedes Dokument beginnt in einer Dokument-Entity. Aus logischer Sicht besteht das Dokument aus Deklarationen, Elementen, Kommentaren, Zeichenreferenzen und Verarbeitungsanweisungen, die innerhalb des Dokuments durch explizites Markup ausgezeichnet sind. Logische und physikalische Strukturen müssen dabei korrekt verschachtelt sein.

Die Funktion des Markups in einem XML-Dokument ist es, die Aufteilung auf Speicherungseinheiten und die logische Struktur zu beschreiben sowie Attribut-Wert-Paare mit der logischen Struktur zu verbinden. XML stellt einen Mechanismus zur Verfügung, die Dokumenttyp-Deklaration, um Beschränkungen der logischen Struktur zu definieren und die Verwendung von vordefinierten Speichereinheiten zu unterstützen. Ein XML-Dokument ist gültig, wenn es eine dazugehörige Dokumenttyp-Deklaration besitzt und wenn sich das Dokument an die darin formulierten Beschränkungen hält.

Die XML-Dokumenttyp-Deklaration enthält oder verweist auf Markup-Deklarationen, die eine Grammatik für eine Klasse von Dokumenten bilden. Diese Grammatik ist bekannt als Dokumenttyp-Definition, kurz DTD. Die Dokumenttyp-Deklaration kann entweder auf eine externe Teilmenge (eine besondere Art eines externen Entity) verweisen, die Markup-Deklarationen enthält, oder sie kann Markup-Deklarationen direkt in einer internen Teilmenge enthalten oder beides. Die DTD für ein Dokument besteht aus beiden Teilmengen zusammen.

### A 4.2.1 Logische Strukturen

Jedes XML-Dokument enthält ein oder mehrere Elemente, die entweder durch Start- und End-Tags oder, im Falle eines leeren Elements, durch ein Leeres-Element-Tag begrenzt sind. Jedes Element hat einen Typ, der durch einen Namen, auch „generic identifier“ (GI) genannt, identifiziert wird, und es kann auch eine Menge von Attributspezifikationen haben. Jede Attributspezifikation hat einen Namen und einen Wert.

### A 4.2.2 Physische Strukturen

Ein XML-Dokument kann aus einer oder mehreren Speicherungseinheiten bestehen. Diese werden Entities genannt. Sie haben alle Inhalt und sind alle (abge-

sehen vom Dokument-Entity und der externen Teilmenge der DTD) durch einen Entity-Namen identifiziert.] Jedes XML-Dokument besitzt ein Entity namens Dokument-Entity, welches als Ausgangspunkt für den XML-Prozessor dient und das gesamte Dokument enthalten darf.

Entities dürfen entweder analysiert (parsed) oder nicht-analysiert (unparsed) sein. Der Inhalt eines analysierten Entity wird als sein Ersetzungstext bezeichnet. Dieser Text gilt als integraler Bestandteil des Dokuments.

## A 4.2.3 XML-Syntax

### *Start- und End-Tags*

Die meisten Befehle (Tags) in SGML- und XML-Anwendungen - wie auch in HTML - treten paarweise als Start- und End-Tags auf und geben an, welche Bedeutung der dazwischen liegende (eventuell durch weitere Tags unterteilte) Text hat:

```
<xxx> ... Text ... </xxx>
```

oder

```
<xxx yyy="zzz" ... > ... Text ... </xxx>
```

In HTML ist der End-Tag in vielen Fällen optional, d. h. er darf weggelassen werden. Der Web-Browser kann dann aufgrund der in der HTML-Norm festgelegten Bedeutung der HTML-Tags "erraten", an welcher Stelle er sich den nicht angegebenen End-Tag "dazudenken" muss.

Bei XML-Anwendungen müssen (im Gegensatz zu HTML) die End-Tags immer angegeben werden und dürfen niemals weggelassen werden:

Richtig ist

```
<p> ... Text ... </p><p> ... Text ... </p>
```

Nicht richtig wäre

```
<p> ... falsch ... <p> ... falsch ...
```

Diese "strengere" Regel hat unter anderem die folgenden Gründe: Im Gegensatz zur festgelegten HTML-Norm soll der Anwender bei XML-Applikationen die Möglichkeit haben, nachträglich zusätzliche Tags in der DTD oder im Schema zu definieren, und daher können die Verarbeitungsprogramme nicht so wie der HTML-Browser immer nach denselben Regeln die fehlenden End-Tags selbst korrigieren. Außerdem sind die verarbeitenden Programme viel einfacher zu schreiben und können viel effizienter ablaufen, wenn sie sich dar-

auf verlassen können, dass das XML-File syntaktisch richtig ist, und keine automatische Fehlerkorrektur programmiert werden muss.

### ***Einzelne Elemente ohne End-Tag***

In HTML gibt es Tags, zu denen es keinen End-Tag gibt, weil sie nicht die Eigenschaften eines Textbereiches definieren sondern einzelne, selbständige Elemente darstellen. Beispiele sind `<br>` für einen Zeilenwechsel, `<hr>` für eine Trennlinie oder `<img>` für ein Bild.

Im XML müssen alle Tags der Form `<xxx>` immer einen End-Tag der Form `</xxx>` haben. Die XML-Tags, zu denen es keinen End-Tag gibt, müssen zur Unterscheidung davon in der Form

```
<xxx />
```

oder

```
<xxx yyy="zzz" ... />
```

geschrieben werden.

Nicht erlaubt ist also

```
<p> ... <br> ... falsch ... <br> ... falsch ... </p>
```

sondern man muss stattdessen richtig

```
<p> ... <br /> ... <br /> ... </p>
```

schreiben oder eventuell auch

```
<p> ... <br></br> ... <br></br> ... </p>
```

Der Grund für diese "strengere" Regel liegt ebenfalls in einer Vereinfachung der Programmierung: Das Verarbeitungsprogramm muss nicht darauf "warten", welche End-Tags eventuell noch kommen werden, sondern weiß immer sofort, ob es sich um ein fertiges Einzel-Element oder um den Start-Tag eines längeren Elementes handelt.

### ***Groß- und Kleinschreibung***

Im Gegensatz zu HTML ist bei XML die Groß- und Kleinschreibung *nicht* egal: `<xxx>` und `<Xxx>` und `<XXX>` sind voneinander verschiedene Befehle. Wenn ein Befehl als `<xxx>` definiert ist, dann darf man nicht stattdessen `<XXX>` schreiben, und auch eine Kombination wie

<XXX> ... falsch ... </xxx>

wäre nicht erlaubt.

### ***Parameter (Attribute)***

Auch die Regeln dafür, wann die Werte von "Attributen" (also Parametern innerhalb von Befehlen) zwischen Quotes-Zeichen eingeschlossen werden müssen, sind bei XML strenger als das, was manche Web-Browser in HTML zulassen. Alle Attribut-Werte sollen immer in Quotes-Zeichen eingeschlossen werden. Dabei dürfen entweder das ASCII-Zeichen Double-Quotes " oder das ASCII-Zeichen Apostroph ' verwendet werden (natürlich nur paarweise, nicht vermischt), aber nicht die ähnlich aussehenden typographischen Anführungszeichen oder Akzentzeichen.

Richtig sind also nur die folgenden beiden Varianten:

<xxx yyy="zzz" ... >

<xxx yyy='zzz' ... >

### ***Entities***

Wie in SGML (und daher auch in HTML) kann man auch in XML Entities definieren, bei denen einem Namen ein bestimmter Text zugeordnet wird. Diese Entities kann man dann überall im Text und auch in Parametern von Befehlen in der Form

&name;

verwenden.

Typische Beispiele sind:

&lt; für das Kleiner-Zeichen <

&gt; für das Größer-Zeichen >

&amp; für das Und-Zeichen &

Entities können aber nicht nur einzelne Zeichen sondern auch längere Textteile enthalten, wie die "Abkürzungen" in der Textverarbeitung.

### ***Schachtelung von Tags***

In XML müssen Start- und End-Tags immer richtig geschachtelt werden.

Richtig sind

<person> <vorname> ... </vorname> ... </person>

<vorname> ... </vorname> <zuname> ... </zuname>

Nicht erlaubt wären

`<person> ... <vorname> ... </person> ... falsch ... </vorname>`

`<vorname> ... <zuname> ... falsch ... </vorname> ... </zuname>`

Bei XML darf die Software *nicht* versuchen, solche Fehler durch Rateversuche zu korrigieren, sondern *muss* die Verarbeitung von fehlerhaften XML-Dokumenten immer mit einer Fehlermeldung abbrechen.

Ein Grund für diese "strengere" Regel ist, dass die XML-Befehle nicht nur das Layout des Textes (wie in HTML), sondern die Bedeutung der Textteile definieren, und falsche Interpretationen der Befehle daher nicht bloß zu unschönen, sondern zu logisch und inhaltlich falschen Ergebnissen führen würden.

Die XML-Tags dienen nicht nur für die Interpretation der sichtbar angezeigten Texte durch einen kritisch denkenden Menschen, sondern auch für die Weiterverarbeitung der Informationen durch automatisch laufende Computer-Programme. Deshalb müssen die Syntax-Regeln von XML strenger eingehalten werden als die von HTML.

# Literaturverzeichnis

- [1] F. Korte: *Lehrbuch der ökologischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. neubearbeitete Auflage (1992).
- [2] J.-G. Kohl, A. Niklisch: *Ökophysiologie der Algen – Wachstum und Ressourcennutzung*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1988).
- [3] M. A. Lewis: *Are Laboratory-Derived Toxicity Data for Freshwater Algae worth the effort?*, *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 9, 1279-1284 (1990).
- [4] N. Nyholm, T. Källqvist: *Methods for Growth Inhibition Toxicity Tests with Freshwater Algae*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 689-703 (1989).
- [5] M. Xyländer, W. Braune: *Influence of Nickel on the Green Alga Haematococcus lacustris*, *Journal of Plant Physiology* Vol.144, 86-93 (1994).
- [6] M. A. Lewis: *Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing: A Review*, *Environmental Pollution* 87, 319-336 (1995).
- [7] F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler: *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*, Springer Verlag, Berlin (1993).
- [8] C. M. Radetski, J.-F. Ferada, C. Blaise: *A semistatic microplate-based phytotoxicity test*, *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 14, 299-302 (1995).
- [9] P. G. Wells, K. Lee, C. Blaise: *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice*, CRC Press, Boca Raton (1997).
- [10] W. Dott, A. Eisenträger, W. G. Hanstein, P. H. Roos: *Entwicklung und Anwendung miniaturisierter automatisierter Testverfahren zur humantoxikologischen und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben*, S. Heiden (Hrsg.): *Innovative Techniken der Bodensanierung*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1999).
- [11] S. Heiden, W. Dott: *Initiativen zum Umweltschutz 7: „Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human- und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben*, Zeller Verlag, Osnabrück (1997).
- [12] R. P. H. Schmitz, H. Ehrlichmann, A. Eisenträger, W. Dott: *Agonistic and antagonistic toxic effects observed with miniaturized growth and luminescence inhibition assays*, *Chemosphere* 38, 1, 79-95 (1998).
- [13] R. P. H. Schmitz, C. Kretkowski, A. Eisenträger, W. Dott: *Ecotoxicological testing with new kinetic growth and luminescence inhibition assays in microtitration scale*, *Chemosphere* 38, 1, 67-78 (1998).

- [14] R. P. H. Schmitz, A. Eisenträger, W. Dott: *Miniaturized kinetic growth inhibition assays with Vibrio fischeri and Pseudomonas putida (application, validation and comparison)*, Journal of Microbiological Methods, 31, 1, 159-166 (1998).
- [15] R. P. H. Schmitz, H. Ehrlichmann, A. Eisenträger, W. Dott: *Ökotoxikologische Bewertung von Einzelstoffen und Umweltproben mit miniaturisierten aquatischen Biotestsystemen*, J. Oehlmann, B. Markert (Hrsg.): *Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden*, Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, 115-124 (1999).
- [16] J. Lukavsky: *The Evaluation of Algal Growth Potential (AGP) and Toxicity of Water by Miniaturized Growth Bioassay*, Water Research Vol. 26, No. 10, 1409-1413 (1992).
- [17] M. Reinke, G. Kalnowski, W. Dott: *Evaluation of an Automated, Miniaturized Pseudomonas putida Growth Inhibition Assay*, Vom Wasser 85, 199-213 (1995).
- [18] M. P. Anderson, C. N. Bensch, J. F. Stritzke: *A rapid microtitre plate assay*, Weed Science, 42, 517-522 (1994).
- [19] C. Blaise: *Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects*, Environmental Toxicology and Water Quality, 6, 145-155 (1991).
- [20] K. Fent: *Ökotoxikologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1998).
- [21] F. Stöcker, G. Dietrich: *Fachlexikon ABC Biologie*, Verlag Harri Deutsch, Leipzig (1986).
- [22] W. Dekant, S. Vamvakas: *Toxikologie für Chemiker und Biologen*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1995).
- [23] H. R. Christen: *Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie*, Verlag Sauerländer AG, Aarau (1985).
- [24] OECD (Organisation for economic cooperation and development): *Alga growth inhibition test*, OECD-Guideline No.201 (1984).
- [25] BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit): *Biozidgesetz*, URL: [http://www.bmu.de/download/dateien/biozid\\_entwurf\\_begruendung.pdf](http://www.bmu.de/download/dateien/biozid_entwurf_begruendung.pdf) (Stand:17.12.2001).
- [26] N. Nyholm, P. Settergren, O. Kusk: *Statistical treatment of data from microbial toxicity tests*, Environmental Toxicology and Chemistry Vol.11, 157-167 (1992).
- [27] G. Gunkel: *Bioindikatoren in aquatischen Ökosystemen*, Gustav Fischer Verlag, Jena (1994).
- [28] W. Heldt: *Pflanzenbiochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1999).
- [29] DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: *Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (S.-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L33)*, DIN 38412 Teil 33, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammunter-

- suchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Beuth Verlag GmbH, Berlin (1991).
- [30] DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: *Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Grünalgen (Wachstumshemmtest mit den Süßwasseralgen Scenedesmus subspicatus und Selenastrum carpicornutum) (L9)*, DIN 38412 Teil 9, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Beuth Verlag GmbH, Berlin (1993).
- [31] S. Koojman: *The analysis of aquatic toxicity data*, VU university press, Amsterdam (1996).
- [32] D. Connell: *Bioaccumulation of chemicals by aquatic organisms*, Ecotoxicology, S. 572-583, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1998).
- [33] H. Blanck, G. Wallin, S. Wängberg: *Species dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds*, Ecotoxicology and Environmental Safety 8, 339-351 (1984).
- [34] P. Arensberg, V. H. Hemmingsen, N. Nyholm: *A miniscale algal toxicity test*, Chemosphere 28, 2103-2115 (1995).
- [35] H. Neumann-Hensel, K. Heuer, R. Lehmann, W. Ahlf: *Miniaturisierung von standardisierten Biotestverfahren für Reihenuntersuchungen von Sediment- und Bodeneluat*, Posterpräsentationen auf der Gründungstagung des deutschsprachigen Zweiges der SETAC Europe, 24.02.-25.02.97, RWTH Aachen (1997).
- [36] R. Rojickova, D. Dvorakova, B. Marsalek: *The Use of Miniaturized Algal Bioassays in Comparison to the Standard Flask Assay*, Institut of Botany, Czech Academy of Sciences, Czech Republic (1997).
- [37] A. Eisenträger, U. Hempel, R. P. H. Schmitz, W. Dott: *Presentation of a new miniaturized algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus in microtitration scale*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry: Interfaces in environmental chemistry and toxicology: from the global to the molecular level, Proceedings of the 8<sup>th</sup> annual meeting of SETAC-Europe, 14-18 April, Bordeaux, France, 291-292 (1998).
- [38] W. Dott, A. Eisenträger, U. Hempel: *Miniaturisierter und automatisierter Algen-Fluoreszenz- und Wachstumstest*, Patentanmeldung vom 29.01.1999, AZ 199 03 519.9, Deutschland (1999).
- [39] D. J. Finney: *Probit Analysis*, Cambridge University press, Cambridge (1964).
- [40] W. D. Ashton: *The Logit Transformation*, 1-88 (1972).
- [41] D. R. Waud: *On Biological Assays involving Quantal responses*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 183, 577-607 (1972).
- [42] E. R. Christensen: *Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model*, Water Research, 18, 213-221 (1984).
- [43] L. Sachs: *Angewandte Statistik*, Springer Verlag, Heidelberg (1992).

- [44] E. Weber: *Grundriss der biologischen Statistik*, Gustav Fischer Verlag, Jena (1986).
- [45] P. J. McKerrow: *Introduction to Robotics*, Addison-Wesley (1991).
- [46] Mitsubishi Electric Corporation: *Mitsubishi Industrial Robot, RV-1A/RV-2AJ, CR1-571 Controller, Standard Specifications Manual*, Tokio (2000).
- [47] Tecan AG: *TECAN SPECTRAFluorPlus<sup>®</sup>*, Technisches Datenblatt, Herbiikon (2001).
- [48] H. L. Cube: *Lehrbuch der Kältetechnik*, Fachverband Deutscher Kältefachleute (VDKF), Karlsruhe, 2. Auflage (1975).
- [49] E. U. Schlünder: *VDI-Wärmeatlas*, VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (GVC), Düsseldorf, 3. Auflage (1977).
- [50] E. Schmidt, W. Beckmann: *Das Temperatur- und Geschwindigkeitsfeld vor einer wärmeabgebenden Platte bei natürlicher Konvektion*, Techn. Mech. Themo. Dyn. 1, 10, 341-349 (1930).
- [51] AQS-Merkblatt zur DIN 38412 L33: *AQS-Merkblatt zu den Rahmenempfehlungen der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen. Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (S.-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-L33)*, AQS 7./8.Lieferung, Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin (1998).
- [52] ISO/DIS 8692: International Standard. *Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae* (2002).
- [53] DIN EN 28692: Europäische Norm. *Ringversuch: Wachstumshemmtest mit den Süßwasseralgen Scenedesmus subspicatus und Selenastrum carpicornutum (ISO 8692 : 1989)*, 29. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1993).
- [54] P. Schopfer, A. Brennicke: *Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin, 5. Auflage (1999).
- [55] ISO 14442: International Standard. *Water quality – Guidelines for algal growth inhibition test with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water* (1999).
- [56] EU-Richtlinie 92/69/EWG: *RICHTLINIE 92/69/EWG DER KOMMISSION vom 31. Juli 1992 zur siebzehnten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt* (1992).
- [57] *Zwischenbericht der Henkel KGaA zum Projekt „Umweltschonendes, automatisches High-Throughput-testing mit Algen“*, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, AZ 17281 (2001).
- [58] J. Staudinger, P. V. Roberts: *A critical compilation of Henry's law constant temperature dependence relations for organic compounds in dilute aqueous solutions*, Chemosphere 44, 561-576 (2001).

- [59] DECHEMA: *Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial*, 7. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie - Boden", DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. Frankfurt am Main, Deutschland, ISBN 3-89746-026-2, (2001).
- [60] J.-P. Rila, K. Hund-Rinke, F. Pfeifer, W. Dott, A. Eisenträger: *Validation of Microplate Bioassays for the Assessment of Contaminated and Remediated Sites*, Journal of Soils & Sediments, <http://dx.doi.org/10.1065/jss2003.02.068> (2003).
- [61] L. D. Kier: *Comments and perspective on the EPA workshop on „The relationship between short-term test information and carcinogenicity“*, Environmental and molecular mutagenesis, 11, 147-157 (1988).
- [62] R. Fahrig: *Genotoxizität*, Lehrbuch der Toxikologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1997).
- [63] D. Voet, J. G. Voet: *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992).
- [64] B. Lewin: *Gene - Lehrbuch der Molekularen Genetik*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1988).
- [65] J. W. Little, D. W. Mount: *The SOS regulatory system in E. coli*, Cell, 29, 11-22 (1982).
- [66] Y. Oda, H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi, T. Shimada: *Development of high sensitive umu testsystem: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by Salmonella typhimurium NM2009 possessing high O-acetyltransferase activity*, Mutation research, 334, 145-156 (1995).
- [67] Y. Oda, H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi, T. Shimada: *Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in Salmonella typhimurium NM3009 having high O-acetyltransferase and nitroreductase activities*, Environmental and molecular mutagenesis, 21, 357-364 (1993).
- [68] O. Huisman: *An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in E. coli*, Nature, 290, 797-799 (1981).
- [69] P. Quillardet, M. Hofnung: *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures*, Mutation research, 147, 65-78 (1985).
- [70] H. Ehrlichmann, W. Dott: *Entwicklung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden mit optimierten und miniaturisierten prokaryontischen Testverfahren*, Shaker Verlag, Aachen (1999).
- [71] DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: *Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T3)*, DIN 38412 Teil 3, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), 37. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1996).

- [72] DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: *Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest*, DIN 38412 Teil 8, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Bakterien (Gruppe T), 37. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1991).
- [73] R. P. Schmitz, W. Dott: *Vergleichende Untersuchung zur Miniaturisierung von Lumineszenz- und Zellvermehrungshemmtests mit Prokaryonten*, Shaker Verlag, Aachen (1999).
- [74] Hölle & Hüttner AG: *Der Blot-Prozessor BioLane<sup>TM</sup> HTI*, Technische Beschreibung, Tübingen (2002).
- [75] Prionics AG: *Prionics<sup>®</sup> Check: Nachweis des Prionoproteins (BSE-Schnelltest)*, SOP, Zürich (2002).
- [76] H. Steinbeisser: *Bericht über aktuelle Forschungsergebnisse am MPI*, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen (2003).
- [77] EXELIXIS Deutschland GmbH: *Aktuelle Forschungsergebnisse*, bereitgestellt von Dr. Torsten Trowe, Tübingen (2003).
- [78] Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Evolution and Development Group: *Aktuelle Forschungsergebnisse*, bereitgestellt von Dr. Albert J. Poustka, Berlin (2003).
- [79] The National Institute for Medical Research: *Aktuelle Forschungsergebnisse*, bereitgestellt von Dr. Malcolm Logan, London (2003).
- [80] R. Kiss: *Development of a mobile measurement system for detecting contamination in surgical instruments*, Thesis, BME (2003).
- [81] F. Gehring: *Entwicklung eines Blutanalysegerätes (vorläufiger Titel)*, Dissertation, Technische Physik, Universität Kaiserslautern (2004).
- [82] Mitsubishi Electric Corporation: *Mitsubishi Industrial Robot, CRI Controller, Instruction Manual – Explanations of Movemaster Commands*, Tokio (2000).
- [83] Polygen GmbH: *Schnittstellenbeschreibung*, bereitgestellt von R. Friedberger, Langen (2001).
- [84] Tecan AG: *SpectraFluor, Computer Interface, Revision 2.5, Firmware Version 3.21*, bereitgestellt von J. Dallinger, Herbikon (2001).
- [85] Eppendorf AG: *EDOS 5222 Programmierpaket*, Hamburg (2001).
- [86] Valvo: *Peltier-Batterien*, Informationsmaterial (1999).
- [87] H. Jungnickel, R. Agsten, W. E. Kraus, *Grundlagen der Kältetechnik*, Verlag Technik GmbH, 3. Auflage (1990).
- [88] D. H. Fraser, *The Physics of Semiconductor Devices*, Oxford Physics Series, 4. Auflage (1986).
- [89] A. F. Ioffe, *Halbleiter Thermoelemente*, Springer Verlag, Berlin (1957).
- [90] W. Shockley, *Electrons and Holes in Semiconductors*, Van Nostrand, New York (1950).
- [91] C. Herring, *Phys. Rev.* 96, 5, 1163 (1950).
- [92] Y. I. Ravich, *CRC Handbook of Thermoelectricity*, ed. by D.M. Rowe, CRC Press Inc., 67 (1995).

- 
- [93] Bonc-Bruevic, Kalasnikov, *Halbleiterphysik*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften (1982).
  - [94] G. Busch, H. Schade, *Vorlesungen über Festkörperphysik*, Birkhäuser (1973).
  - [95] J. J. Brophy, *Semiconductor Devices*, Verlag Harri Deutsch, Leipzig, 2. Auflage (1992).
  - [96] P. H. Egli, *Thermoelectricity*, Proceedings of the conference on Thermoelectricity (1958).
  - [97] ISO (International Organization for Standardization). *ISO 8879:1986(E). Information processing -- Text and Office Systems -- Standard Generalized Markup Language (SGML)*, First edition (1986).
  - [98] ISO (International Organization for Standardization). *ISO/IEC 10646-1993 (E). Information technology -- Universal Multiple-Octet Coded Character Set (UCS) - Part 1: Architecture and Basic Multilingual Plane* (1993).



# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die auf irgendeine Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. H. Ruder sei sehr dafür gedankt, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit anzufertigen. Meinem Bruder Steffen Hüttner gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme in das „Team“ der Hölle & Hüttner AG während der Projektlaufzeit. Besonders hervorzuheben ist hierbei mein „inoffizieller“ Betreuer Stefan Plappert, da ohne ihn die hervorragende Umsetzung der Software nicht vorstellbar gewesen wäre. Adolf Eisenträger danke ich für die ausgezeichnete Betreuung aller Arbeiten in Aachen betreffend und die sehr gute Projektkoordination.

Schließlich möchte ich mich bei allen beteiligten Mitarbeitern der Technischen Hochschule in Aachen, der Henkel KGaA in Düsseldorf und der Polygen GmbH in Langen sowie bei all meinen Kollegen hier in Tübingen für die tolle und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Zu viele Personen hätten es verdient in diesem Zusammenhang genannt zu werden. Daher spreche ich hiermit an alle ein „Herzliches Dankeschön!“ aus.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Martin Hüttner  
Geburtsdatum: 22. August 1975  
Geburtsort: Tübingen  
Familienstand: ledig

## Werdegang

1981 – 1985      Grundschule Hügelstraße Tübingen  
1985 – 1994      Kepler-Gymnasium Tübingen  
Juni 1994        Allgemeine Hochschulreife  
1994 – 2000      Studium der Physik  
                      an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
1999 – 2000      Diplomarbeit am Lehrstuhl für Experimentalphysik II (Festkörperphysik) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. R. P. Hübener mit dem Thema „Peltier-Kühlung für supraleitende Elektronik und Betriebsmittel“  
März 2000        Diplom in Physik  
2000 – heute      Promotion am Institut für Theoretische Astrophysik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. Ruder: „Entwicklung einer computergesteuerten Robotikplattform für Life Science Applikationen am Beispiel des miniaturisierten Chlorophyll-Fluoreszenztests mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus*“

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:  
M. Baumann, H. Clement, H. D. Ebert, O. Eibl, A. Fäßler, K. H. Gaukler, F. Gönnerwein, W. D. Hartmann, R. P. Hübener, H. Kaul, D. Kern, P. Kramer, E. Lindner, F. Loose, O. Lutz, H. Müther, E. Plies, N. Schopohl, A. Schwenk, F. F. Seelig, G. Staudt, J. Strähle, G. J. Wagner, M. Wolff.