

Biofilme als mögliche Indikatoren für Umweltbelastungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Chem. Andrea Kubik
geboren am 05.03.1980 in Nordhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. J.W. Einax
2. PD Dr. S. Eick
3. Prof. Dr. G. Schüürmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 28. November 2007

Abkürzungsverzeichnis

ANN	Künstliche Neuronale Netze
Aer	Aeromonas hydrophila
Aneg	andere gram-negative Bakterien
Apos	andere gram-positive Bakterien
Baz	Bazillen
BF	Biofilm
CA	Clusteranalyse
cfu	koloniebildende Einheiten
CI	Clusterimaging
Clos	Clostridien
CV	Kreuzvalidierung
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Entero	Enterobakterien
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FA	Faktorenanalyse
GRNN	durch Regression generalisierte Neuronale Netze
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
MDS	multidimensionale Skalierung
MLP	mehrschichtiges Perceptron
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
PCB	polychlorierte Biphenyle
PLS	Partial-Least-Squares-Regression
PP	Polypropylen
PRESS	Prediction Error Sum of Squares
RBF	Radial-Basis-Funktion Netz
REM	Rasterelektronenmikroskop
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction

Schpi	Schimmelpilze
Spropi	Sprosspilze
SV	Support Vektoren
SVM	Support Vektor Maschinen
TIC	anorganischer Kohlenstoff
V	Volumen
VC	Vapnik-Chervonenkis
W	Wasser

Probenabkürzungen:

BnS	Matrix der Biofilme von natürlichen Substraten
G	Matrix aller Biofilmproben
S	Saale
S	Matrix der Saaleproben
ST	Matrix der Saale- und Teichproben
STL	Matrix der Saale-, Teich- und Leutraproben
T	Teich
T	Matrix der Teichproben
L	Leutra

Verzeichnis der Formelzeichen

A	Matrix der Regressionsparameter
A_i	Aktivierungszustand
b	Zahl der verwendeten Diskriminanzfunktionen
C	Festlegung der Zugehörigkeit eines SV
c	Minkowski-Konstante
d	Distanz
d_{VC}	Vapnik-Chervonenkis Dimension
E	Residuenmatrix
E	gemessenes Potential
E_0	Standardpotential
f	Freiheitsgrad
F	Matrix der Faktorwerte
F	Faraday-Konstante
F	Prüfwert für F-Test
f_{act}	Aktivierungsfunktion
G	Varianz-Covarianz-Matrix innerhalb der Klassen
g	Zahl der Klassen
H	Varianz-Covarianz-Matrix zwischen den Klassen
h_j^2	Kommunalitäten
K	Zahl der Objekte
L	Ladungsmatrix
L_D	Lagrange-Funktion
m	Zahl an Kalibrierstandards
N	Probenzahl
n_w	Zahl der Wiederholbestimmungen
Net	Propagierungsfunktion
O	Ausgabe der Neuronen
p	Grad der polynomialen Kernfunktion
P	Matrix der Ladung für X
Q	Matrix der Ladungen für Y

Q	Datenverdichtungskoeffizient
Q_{xx}	Summe der Abweichungsquadrate
R	allgemeine Gaskonstante
R_d	Zahl der Dimensionen
R	Korrelationsmatrix
r_i	Radius des Streukreises
r_v	Korrelationskoeffizient der Validierung
s	Standardabweichung
s_d	relative Ergebnisunsicherheit
$s_{x,0}$	Verfahrensstandardabweichung
$s_{x,y}$	Reststandardabweichung der Meßwerte der Kalibrierung
T	Temperatur
T	Matrix der latenten Variablen für X
\$	Prüfwert für Student's <i>t</i> -Test
u	Unähnlichkeit
U	Matrix der latenten Variablen für Y
V	Matrix der Eigenvektoren
W	Gewichte
WFR	Wiederfindungsrate
X	Datenmatrix
x	generierter Datenvektor
\bar{x}	Mittelwert
x_{BG}	Gehalt an der Bestimmungsgrenze
x_{EG}	Gehalt an der Erfassungsgrenze
x_{NG}	Gehalt an der Nachweisgrenze
Y	Matrix unabhängiger Variablen
z	Ladungszahl
Z	autoskalierte Datenmatrix

α	kritische Irrtumswahrscheinlichkeit
α_i	Aktivitätskoeffizient
$e_{\infty/N}$	Fehler für unendlich viele/N Proben
δ	Disparität
θ	Schwellenwert
κ	Lagrange-Multiplikatoren
Λ_{wilk}	Likelihood-Quotenkriterium nach Wilks
λ	Eigenwert
μ	wahrer Wert

Inhaltsverzeichnis

Seitenzahl

Abkürzungsverzeichnis *Formelzeichen*

1	Problemstellung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Biofilm	4
2.1.1	Geschichtliches	5
2.1.2	Vorkommen	6
2.1.3	Vorteile für das Leben im Biofilm	9
2.1.4	Bildung von Biofilmen	10
2.1.5	Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen	13
2.2	Beziehungen zwischen Metallen und Mikroorganismen	17
2.2.1	Biologische Funktionen anorganischer Elemente	18
2.2.2	Die Toxizität anorganischer Elemente	19
2.3	Akkumulation von Metallionen in Biofilmen	20
2.3.1	Mechanismen der Biosorption	21
2.3.2	Einflussfaktoren auf die Biosorption	22
2.3.3	Biosorption an Zelloberflächen im Biofilm	23
2.3.4	Biosorption durch die EPS	26
3	Chemometrische Methoden	28
3.1	Multidimensionale Skalierung	29
3.2	Clusteranalyse und Clusterimaging	34
3.3	Faktorenanalyse	36
3.4	Lineare Diskriminanzanalyse	37
3.5	Partial-Least-Squares-Regression	39
3.6	Künstliche Neuronale Netze	40
3.7	Support-Vektor-Maschinen	43

4	Experimentelles	47
4.1	Probennahme	47
4.1.1	Systematische Züchtung von Biofilmen	47
4.1.2	Biofilme von natürlichen Substraten	51
4.2	Probenvorbereitung	53
4.3	Analytische Messung chemischer Parameter	55
4.3.1	Elementanalytik	55
4.3.2	Anionen- und DOC-Bestimmung in den Wasserproben	58
4.4	Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze	60
4.5	Qualitätssicherung	61
4.5.1	Referenzmaterialien	62
4.5.2	Vergleich zweier Aufschlussverfahren	64
4.6	Mikrobiologische Bestimmung	66
5	Untersuchungsergebnisse der systematisch gezüchteten Biofilme ..	69
5.1	Homogenitätsuntersuchungen	69
5.2	Einfluss der Aufwuchsdauer	70
5.3	Ermittlung und Interpretation von Anreicherungs-faktoren	71
6	Multivariate Datenauswertung	75
6.1	Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Saale-Teich	75
6.1.1	Dimensionsreduzierung mittels Multidimensionaler Skalierung für die Variablen der mikrobiologischen Bestimmung	76
6.1.2	Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes	77
6.1.3	Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse	80
6.1.4	Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen	81
6.1.5	Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netze	82

6.2	Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Saale-Teich-Leutra	86
6.2.1	Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes	86
6.2.2	Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse	88
6.2.3	Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen	89
6.2.4	Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen	91
6.3	Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Biofilme natürlicher Substrate	95
6.3.1	Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes	96
6.3.2	Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse	97
6.3.3	Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen	98
6.3.4	Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen	100
6.4	Chemometrische Auswertung und Interpretation der Gesamtmatrix . .	102
6.4.1	Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes	102
6.4.2	Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse	104
6.4.3	Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen	107
6.4.4	Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen	108
6.5	Überblick	109
7	Zusammenfassung	111

Literaturverzeichnis

Anhang

Danksagung

Selbstständigkeitserklärung

Lebenslauf

1 Problemstellung

Für Belastungsuntersuchungen in Fließgewässern werden bisher zum einen Wasser- und zum anderen Sedimentproben analysiert. Erstere haben den Nachteil, dass sie nur eine Momentaufnahme des Zustandes eines Gewässers darstellen. Daher führen nur gelegentlich durchgeführte Wasseruntersuchungen zu keiner eindeutigen Aussage der Wasserqualität, denn Schadstoffkonzentrationen im Wasser können durch kurzfristige Einleitungen und Wasserstandsänderungen in kürzester Zeit stark variieren [1].

Für die Bewertung einer langfristigen Belastungsentwicklung werden Untersuchungen an Sedimenten durchgeführt, die jedoch durch einen recht hohen Arbeitsaufwand charakterisiert sind. Des Weiteren finden in Flussabschnitten mit hoher Strömungsgeschwindigkeit Verfrachtungen statt, so dass diese Stellen teilweise nur schwer untersucht werden können.

Aus diesen Gründen wird nach einem weiteren Untersuchungsobjekt im aquatischen System gesucht, das die Fähigkeit besitzt, die Elementkonzentrationen im Wasser widerzuspiegeln. Die anorganische Zusammensetzung eines Biofilms variiert in Abhängigkeit vom Substrat und der wässrigen Phase, in der er gebildet wird. Durch seine Struktur kann der Biofilm (bzw. seine extrazellulären Substanzen) Stoffe "einfangen" und über einen langen Zeitraum speichern [2]. Des weiteren ist bekannt, dass Biofilme die Eigenschaft besitzen, Schadstoffe abzubauen [3]. Ausgehend von diesem Wissen soll überprüft werden, ob Biofilme für ein umweltanalytisches Monitoring geeignet sind.

Die nahezu ubiquitär vorkommenden Biofilme sind für viele Gebiete der Wissenschaft von Interesse. In der Mikrobiologie sind vor allem die veränderten Eigenschaften der Mikrokonsortien bezüglich dem planktonischen Bakterium Untersuchungsgegenstand. Die Ausbildung von Resistenzen der Bakterien in Biofilmen, beispielsweise gegen Antibiotika, ist ein wichtiger Untersuchungsgegenstand in der Medizin. Zum Schutz von technischen Systemen ist es wichtig, Verfahren zu entwickeln, die das Besiedeln von Mikroorganismen auf Oberflächen verhindern, um somit eine Biokorrosion zu vermeiden. Im

Bereich der Umweltchemie finden Untersuchungen statt, die als Bioindikatoren für belastete Gewässer Biofilme diskutieren [4]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Themenbereich systematische Untersuchungen durchgeführt.

Von Natur aus kommen Schwermetalle und ihre Verbindungen in der Biosphäre nur in Spuren vor und sind somit im biologischen Kreislauf nur in äußerst geringen Konzentrationen anzutreffen. Einige von ihnen (z. B. Cu, Zn, Fe) sind in geringen Konzentrationen für Lebewesen essenziell, jedoch in hohen Konzentrationen toxisch, andere (z. B. Pb, Cd, Hg) sind bereits im Spurenbereich toxisch [5].

Ein Problem unserer Zeit stellt immer noch der anthropogene Eintrag von Schwermetallen in die Umwelt dar. Da diese im Gegensatz zu vielen organischen Schadstoffen nicht in natürlichen Prozessen abgebaut werden können, reichern sie sich in der Umwelt an. Sie können auf Grund ihrer erhöhten Konzentrationen schädlich auf Organismen wirken [6].

Im wässrigen Milieu liegen die Metalle größtenteils nicht als freie Ionen vor, sondern sie bilden mit den im Wasser vorhandenen Anionen Komplexe. Typische im natürlichen bzw. im industriellen Wässern vorkommende Liganden stellen beispielsweise Chlorid-, Hydroxid-, Sulfat- und Phosphationen aber auch organische Liganden dar [7]. Die vorliegende Elementspezies hat einen erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und somit die Toxizität der Schwermetalle.

Eine hohe Stichprobenzahl und ein breites Analytenspektrum führt bei Arbeiten im Bereich der Umweltanalytik oft zu sehr großen Datenmatrizen. Da die Variablen häufig miteinander wechselwirken, ist eine Auswertung allein mit univariat-statistischen Methoden nicht vollständig. Es wurden somit zahlreiche multivariat-statistische Methoden der Chemometrik angewendet. Mit der Clusteranalyse, dem Clusterimaging und der linearen Diskriminanzanalyse sollen Ähnlichkeiten zwischen den Proben aufgeklärt und statistisch bestätigt werden. Des Weiteren wird mit der Faktorenanalyse ein Verfahren zur Dimensionsreduzierung der Variablen angewendet. Mit Partial-Least-Squares-Regression, Support-Vektor-Maschinen und Künstlichen Neuronalen Netzen sollen Modelle berechnet

werden, mit denen aus analysierten Parametern weitere Variablen vorhergesagt werden können.

Im Rahmen der Arbeit soll auf die folgenden Fragen eine Antwort gefunden werden:

- Wie züchtet man die Biofilme?
- Wie kann man die Elementgehalte der Biofilme analysieren?
- Wie lange sollte die Aufwuchszeit für gezüchtete Biofilme betragen?
- Sind die Gehalte von parallel gezüchteten Biofilmen überhaupt vergleichbar?
- Haben die Jahreszeit und somit das Wetter Einfluss auf das Akkumulationsverhalten des Biofilms?
- Können verallgemeinerbare Anreicherungsfaktoren für jedes Element berechnet werden?
- Ist es möglich, Biofilme anhand ihres Herkunftsgewässers zu unterscheiden?
- Welche Elemente haben den größten Einfluss hinsichtlich der Differenzierung verschiedener Biofilmproben?
- Können aus den Elementgehalten im Biofilm Rückschlüsse auf die Belastungen des Wassers gezogen werden?

Um diese Fragen zu beantworten, sind zunächst in zwei Oberflächengewässern Biofilmproben systematisch gezüchtet worden, wobei sich die Art der Gewässer unterschied. Zum einen erfolgten die Untersuchungen in einem Fließgewässer (Saale) und zum anderen in einem stehenden Gewässer (Gartenteich). Im Anschluss erfolgte die Probennahme von Biofilmen, die auf natürlichen Substraten aufgewachsen sind.

Für die statistische Auswertung sind die Proben in verschiedene Matrizen zerlegt worden, um ein breites Spektrum an Informationen zu erhalten. Die Ergebnisse der chemometrischen Datenanalyse werden hinsichtlich der verschiedenen Fragestellungen diskutiert.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Biofilm

Biofilme stellen die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen dar, in der sie auf der Erde nahezu ubiquitär vorkommen [8]. Sie bilden sich in der Natur, auf zahlreichen medizinischen Substraten und in technischen Systemen [9]. Ein Biofilm ist ein sehr komplexes biologisches System. Daher findet man zahlreiche Definitionen in der Literatur, wobei im Folgenden auf drei näher eingegangen wird.

Nach FLEMMING et al. [10] kann man Biofilme wie folgt definieren: “Der Begriff Biofilm ist eine etwas unscharfe Bezeichnung für mikrobielle Aggregate wie “Schleime”, “Aufwuchs”, Flocken und größere Ansammlungen von Biomasse in Form von Schlämmen. Ihnen allen ist gemeinsam, dass die Mikroorganismen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind, die sie zusammenhält und gegebenenfalls an Oberflächen bindet. Die EPS spielen eine zentrale Rolle für die Besonderheiten dieser Form des mikrobiellen Lebens.”

Eine ergänzende Beschreibung hinsichtlich der Biofilmdefinition ist im Abwasserlexikon enthalten [11]: “Biofilme entstehen, wenn Mikroorganismen sich an Grenzflächen zwischen Gas- und Flüssigphasen, Flüssig- und Festphasen oder an Flüssig-/Flüssigphasen ansiedeln. Es bildet sich auf der Grenzfläche eine dünne, meist geschlossene Schleimschicht (Film), in die Mikroorganismen eingebettet sind. Diese Schicht bezeichnet man als Biofilm.”

Eine weitreichende und sehr genaue Definition liefert TIEFENBRUNNER et al. [12]:

- Ein Biofilm besteht aus Bakterienzellen, die miteinander verbunden sind, aber insgesamt an einem Substratum (Oberfläche, Grenzschicht) anheften und vollständig oder teilweise in eine von Organismen produzierte, polymere, organische Masse (EPS) eingebettet sind.

- Ein Biofilm ist eine Oberflächenstruktur, die weder räumlich noch über die Zeitachse gesehen gleichmäßig ausgebildet ist.
- Ein Biofilm kann neben den Mikroorganismen abiotische oder anorganische Bestandteile in größeren Mengen enthalten, die ebenfalls durch die von Bakterien gebildeten Schleime (EPS) im Gesamtverband zusammengehalten werden.
- Ein Biofilm kann einzelligen kleinen Tieren (Amöben, Ciliaten, Flagellaten) Nahrungsgrundlage und Schutz bieten, wobei auch bei optimalen Bedingungen immer Zysten (Dauerformen) dieser Organismen vorhanden sind.

2.1.1 Geschichtliches

Das Wachstum auf biotischen oder abiotischen Oberflächen, also die sessile Lebensweise, stellt die älteste bislang bekannte Daseinsweise von Leben auf der Erde dar [13].

Die Erde entstand vor etwa 4,5 bis 4,2 Milliarden Jahren. Kurze Zeit später konnten sich die ersten Komponenten der Biosphäre entwickeln [14]. In 3,5 Milliarden Jahre alten Sedimentgesteinen hat man von Mikroorganismen durch Mineralisierungsprozesse gebildete Stromatolithe gefunden. Diese "Archean stromatolite" stammen aus Südafrika und Westaustralien [10, 15]. Vor ca. 2,9 Milliarden Jahren haben sich photosynthetisch arbeitende Cyanobakterien gebildet. Sie entwickelten sich als mikrobieller Bewuchs von Oberflächen, den sogenannten "microbial mats". Ihre Aktivität wird für die Entwicklung von Sauerstoff in der zunächst anaeroben Erdatmosphäre verantwortlich gemacht [16, 17].

Alle wesentlichen geologischen Stoffkreisläufe finden bzw. fanden unter Beteiligung von Biofilmen statt. Auch am Aufbau der Erdkruste waren sie maßgeblich beteiligt. Biofilme heften sich an zerfallendes organisches Material und sind in der Lage, es teilweise abzubauen. Durch diese Fähigkeit sind die Lagerstätten von Mineralen, Erzen, Kohle, Erdgas und Erdöl entstanden. Die fossilen Brennstoffe sind, somit ganz oder teilweise auf mikrobielle Tätigkeiten zurückzuführen [18].

Biofilme sind maßgeblich an der Verwitterung von Gesteinen beteiligt. Bei der Fixierung von atmosphärischem Kohlendioxid sind die mikrobiologischen Matten bis heute von Bedeutung [13, 14].

Erst in den frühen siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts erkannte man die ubiquitäre Besiedlung von Oberflächen durch Mikroorganismen und intensivierte die Untersuchungen an Biofilmen [19]. Bis zur heutigen Zeit ist diese Lebensform von Mikroben sehr interessant, da immer neue Aspekte und Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt werden.

2.1.2 Vorkommen

Biofilme entstehen durch Anlagerung von Mikroorganismen an Grenzflächen jeglicher Art. Tab. 2.1 enthält eine Aufstellung von Grenzflächen und möglichen Biofilmvorkommen in Anlehnung an [10].

Tab. 2.1: Übersicht über das Vorkommen von Biofilmen

Grenzfläche	Biofilmvorkommen (Beispiele)
Fest / Flüssig	- in Gewässersedimenten - in Rohrleitungen - auf Zähnen
Fest / Gasförmig (z.T mit Flüssigkeitskontakt)	- in Böden - in Flechten - Bakterienkolonien auf Agarplatten
Flüssig / Gasförmig	- Schwimmschichten (Neuston) an Gewässeroberflächen
Flüssig / Flüssig	- Kohlenwasserstoff abbauende Biofilme an Öl-Wasser-Grenzflächen

Zur Ausbildung eines Biofilms sind eine Grenzfläche, Mikroben, hinreichende Feuchtigkeit und Nährstoffe notwendig [13]. Auf Grund dieser sehr geringen Anforderungen herrscht eine weite Spannweite der Existenzbedingungen. Auch extreme, nahezu existenzfeindliche Lebensräume können besiedelt werden [3]. In Tab. 2.2 sind die Spannweiten für die Existenz von mikrobiellem Leben angegeben.

Tab. 2.2: Spannweite von Biofilmvorkommen (Auswahl) [6,7]

Einflussfaktor	Spannweite
Temperatur	von -12°C (kalte, salzhaltige Lösungen) bis 110°C (heiße Schwefelquellen im Meer)
pH-Wert	von 0 (Thiobacillus ferrooxidans) bis >13 (Natronbakterien)
Redoxpotential	von -450 mV (methanogene Bakterien) bis 850 mV (Eisenbakterien)
Salzgehalt	von 0 (dest. Wasser) bis gesättigte Salzlösung (halophile Bakterien in Salzseen)
Substrate	Metall, Beton, Kunststoffe, Glas, Mineralgesteine, Öle, tierische und pflanzliche Gewebe
Strahlenbelastung	Biofilme auf Quarzhüllen von UV-Lampen Biofilme auf radioaktivem Material

Biofilme sind in der heutigen Umwelt als ubiquitär anzusehen. Es existiert praktisch keine Oberfläche, die nicht von Mikroorganismen besiedelt ist bzw. unter geeigneten Bedingungen besiedelt werden kann. Des Weiteren sind keine Werkstoffe bekannt, denen es möglich ist, dauerhaft der mikrobiologischen Korrosion zu widerstehen [13].

Die Konzentration von Nährstoffen in aquatischen Ökosystemen beträgt oft nur wenige Mikrogramm pro Liter. Im Gegensatz zum suspendierten Zustand gilt in dieser oligotrophen Umgebung das Leben im Biofilm für die Mikroben als Überlebensstrategie, denn sie können mit Hilfe der EPS Nährstoffe anreichern und nutzen [21, 22].

Am Selbstreinigungsprozess von Böden, Sedimenten und Gewässern in der Natur sind Biofilme entscheidend beteiligt. Sie bilden Mikrokonsortien aus, welche zu konzentrierten Abbauleistungen fähig sind. Einen Überblick über ihre Struktur und Funktion sowie ihre Anwendung zur Reinigung von schwermetallbelasteten Böden (Bioleaching) sind in [23, 24] enthalten. Gerade schwer abbaubare Substanzen können durch Mischkolonien in Biofilmen umgesetzt werden [18]. Diese Fähigkeit findet beispielsweise in der Abwasserreinigung in Batch-Biofilm-Reaktoren ihre Anwendung [25]. Weitere Informationen über die Verwendung der Biofilme bei der Abwasserreinigung werden in RODGERS et al. und CHEN et al. beschrieben [26, 27].

Biofilme wurden und werden in der Industrie vielseitig kommerziell angewendet [28 - 31]. Das Produkt der Biofilme, die EPS, wird heute in großem Umfang biotechnologisch gewonnen und eingesetzt. Sie werden als Zusatzstoffe in Nahrungsmitteln, als Biotenside und neuerdings auch als Klebstoffe verwendet [8].

Biofilme sind aber bei weitem nicht immer nützlich, sie können sogar sehr störend sein. Unerwünscht sind sie beispielsweise in Anlagen zur Wasseraufbereitung, an Schiffsrümpfen und in Rohrleitungen. Sie können dort Biofouling hervorrufen, das unter anderem zur Verblockung von Membranen, erhöhten Reibungswiderständen und Druckverlusten führen kann [18]. Wenn die Auswirkungen von Biofilmen in einem System eine gewisse Toleranzschwelle überschritten haben und sich negativ auf die Systemleistung auswirken, so dass Gegenmaßnahmen ergriffen werden müssen, bezeichnet man das als Biofouling [32]. Eine Steigerungsform ist die Biodeterioration, d.h. ein Angreifen der Biofilme auf ihr Substrat. Die Folge kann eine mikrobiell induzierte Korrosion von Metalloberflächen, die sogenannte Biokorrosion sein [18]. Davon können Metalle, mineralische Werkstoffe sowie Beschichtungen betroffen werden [33].

In Trinkwassersystemen treten Biofilme ubiquitär auf, entweder als dünne, fleckenförmige "Besiedlung" oder als flächendeckender, mehrlagiger "Bewuchs". Die Ansiedlung und Vermehrung von hygienisch relevanten Keimen, eine erhöhte Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln, die Bildung von Geruchsstoffen und Biokorrosion sind Beispiele für Probleme, die durch Biofilme in Trinkwassersystemen auftreten können [34].

In Form der Besiedlung des Darmes, der Schleimhäute, der Zähne und der Haut sind funktionierende Biofilme entscheidend für die Gesundheit. Geraten diese Biofilme aus dem Gleichgewicht, können sie zu Krankheiten (z. B. Parodontitis) führen [10]. Sehr gefürchtet sind Biofilme, die sich auf Implantaten bilden, da sie die Ursache für lebensbedrohliche Infektionskrankheiten sein können [35]. Koagulase-negative Staphylokokken gehören zu den häufigsten Erregern von Infektionen an implantierten Fremdkörpern, wie beispielsweise Venenkathetern, Herzklappen, Gelenken und Herzschrittmachern [36].

2.1.3 Vorteile für das Leben im Biofilm

Mikroorganismen in Biofilmen besitzen offenbar einen entscheidenden Vorteil gegenüber ihrer Existenz als Einzelindividuum im suspendierten Zustand. In der EPS können Nährstoffe angereichert werden. Des Weiteren liefert sie einen Schutz gegenüber Austrocknung, hydraulischen Belastungen, pH-Schwankungen, toxischen Metallionen, osmotischem Stress, Antibiotika und Bioziden. Die Mikroorganismen bilden in der EPS stabile synergistische Gemeinschaften (Mikrokonsortien) aus, die in der Lage sind, komplexe Substrate abzubauen [8, 28].

Die räumliche Nähe und relative Konstanz der Nachbarschaft bestimmter Bakterien führt dazu, dass diese Mischkulturen in komplexer Weise miteinander kooperieren und interagieren. Ein Beispiel für die Interaktion von Bakterien in Biofilmen ist das Wachstum von Bakterien mit hohen Nährstoffansprüchen, in für sie unwirtschaftlicher, da nährstoffarmer Umgebung. Es konnte gezeigt werden, dass sich spezielle Mikroorganismen (z. B. Stämme von *Escherichia coli*) in Biofilmen von Umweltbakterien vermehren können, obwohl sie im freien Wasser nicht wachsen konnten [37].

Im Biofilm steht ein Pool an genetischen Informationen bereit, der den Mikroorganismen die Möglichkeit des Gentransfers bietet [28, 38, 39]. Auch freie DNA kann über längere Zeit hinweg (im Biofilm) erhalten bleiben und wieder aufgenommen werden. Die Matrix fungiert somit als "Recyclingshof" für genetische Informationen aus lysierten Zellen. Auch die extrazellulären Enzyme werden von der Matrix zurückgehalten. Sie bleiben somit in relativer Nähe zu den Zellclustern und sind wichtig für den Abbau von partikulärem Material oder Feststoffen. Ein gewisser Nachteil für Mikroorganismen im Biofilm kann die relativ schlechte Nahrungszufuhr in einigen Bereichen des Biofilms sein. Durch die Poren und Kanäle in der Matrix wird der Stofftransport prinzipiell auch bis in die Tiefen ermöglicht [29].

2.1.4 Bildung von Biofilmen

Die Ausbildung eines Biofilms benötigt drei Komponenten. Zum einen das Medium, beispielsweise Wasser, welches durch seine chemischen und physikalischen Parameter, wie Temperatur, pH-Wert, Stoffgehalte und Viskosität charakterisiert ist. Das Substrat, z. B. die Gesteine in einem Fließgewässer, bildet die zweite Komponente. Es ist durch Eigenschaften wie Oberflächenspannung, Rauigkeit und Porosität gekennzeichnet. Die dritte Komponente stellen die Mikroorganismen dar. Sie beeinflussen die Biofilmbildung, beispielsweise durch Art und Anzahl, ihren Ernährungszustand und die Ladung der Zelloberfläche. Diese drei Faktoren beeinflussen sich gegenseitig, so dass ein komplexes Geflecht aus Wechselwirkungen entsteht [13]. Daher existiert kein einheitlich gültiger Adhäsionsmechanismus für alle Mikroben auf allen Substraten. Es ist dennoch möglich, die Bildung von Biofilmen in drei allgemeine Stadien einzuteilen. Bei diesen Phasen handelt es sich um die Induktions-, die Wachstums- und die Plateauphase [40]. Sie sind in Abb. 2.1 in einer sigmoiden Kurve dargestellt [41].

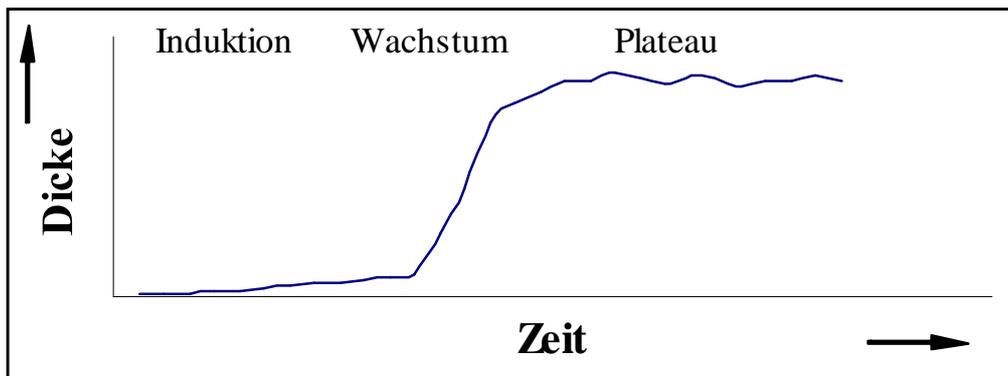


Abb. 2.1: Phasen der Biofilmbildung (nach Characklis)

Induktionsphase

Der erste Schritt (Phase 1) bei der Ausbildung eines Biofilms ist die Adsorption von Makromolekülen (z. B. Proteine, Polysaccharide) und hydrophoben Molekülen der wässrigen Phase an das Substrat (Abb. 2.2). Die Ausbildung dieses "conditioning films" erfolgt innerhalb von Sekunden und ermöglicht die Besiedlung durch Mikroorganismen [10, 42].

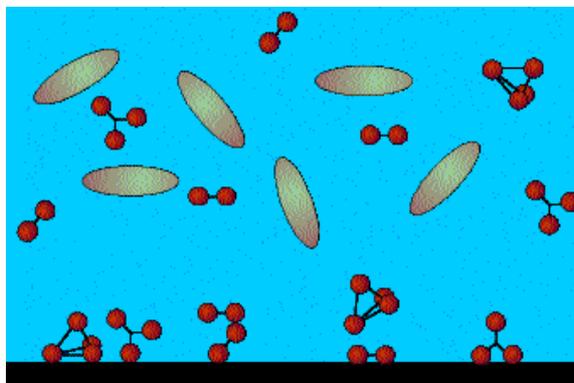


Abb. 2.2: Phase 1 der Biofilmbildung [43]

Innerhalb kürzester Zeit erfolgt nun die zweite Phase, die Primäradhäsion (Abb. 2.3) der Mikroorganismen. Diese läuft wahrscheinlich in zwei Schritten ab. Vermutlich zur Nahrungsaufnahme erfolgt zunächst eine reversible Anheftung, ehe nach einiger Zeit die irreversible Anheftung folgt [22].

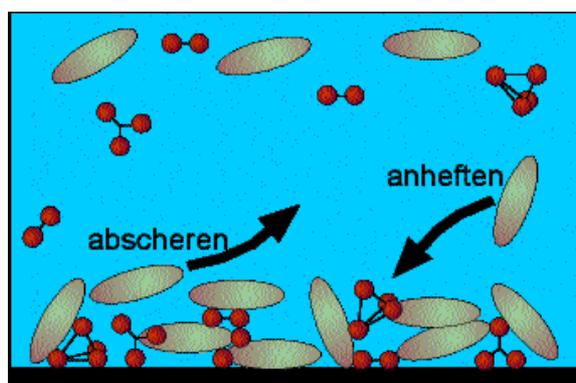


Abb. 2.3: Phase 2 der Biofilmbildung [43]

Die Mikroorganismen fangen in Phase 3 an, extrazelluläre polymere Substanzen zu produzieren (Abb. 2.4). Dadurch werden die Grundlagen zur Ausbildung von Mikrokolonien geschaffen. Der frühe Beginn der Bildung von EPS dient wahrscheinlich dazu, die Bakterien fest im Zellverband der Mikrokolonien zu fixieren sowie zur Aufrechterhaltung der Biofilme im Verlauf ihrer Alterung [10]. Die Bildung von EPS ist eine generelle Fähigkeit von Mikroorganismen und wurde vor allem in natürlicher Umgebung für Prokaryoten (Bakterien) sowie für Eukaryoten (Algen, Pilze) nachgewiesen [8].

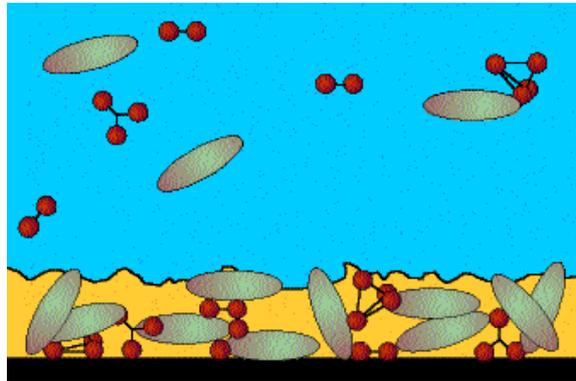


Abb. 2.4: Phase 3 der Biofilmbildung [43]

Der zeitliche Rahmen der Induktionsphase variiert sehr stark. Er kann zwischen Stunden (extrem belastete Systeme) und Monaten bis hin zu Jahren (extrem oligotrophe Systeme) betragen. Die Art und Rauigkeit des Substrates, die Anwesenheit von konditionierenden Makromolekülen und die Scherkraft des Mediums bestimmen den Verlauf der Induktionsphase [13].

Wachstumsphase

Im Anschluss an die Induktionsphase beginnen sich die Mikroorganismen zu vermehren. Dabei wird die Akkumulation des Biofilms im wesentlichen durch zwei Faktoren beeinflusst. Zum einen durch das Wachstum der Primärbesiedler und zum anderen durch die Adsorption der neu hinzukommenden Mikroorganismen. Diese treffen nun auf eine durch den bereits vorhandenen Aufwuchs bestimmte Grenzfläche. Die gebildete EPS verstärkt die Affinität der Partikel, sich aus der flüssigen Phase anzulagern. Dadurch kann es zu einer erhöhten Immobilisierung von leblosen Komponenten kommen [13]. Durch dieses verbesserte Nährstoffangebot können sich nun auch Lebewesen anlagern und vermehren, die unter den ursprünglichen Bedingungen nicht dazu fähig gewesen wären. Somit kommt es während dieser Phase zur Ausbildung der Mikrokonsortien [37]. Das Wachstum des Biofilms ist das Charakteristikum für diese Phase, daher ist der limitierende Faktor die Nährstoffversorgung. Diese wird wesentlich durch Transportprozesse in der Schleimschicht beeinflusst [44].

Plateauphase

Die erreichbare Dicke von Biofilmen ist begrenzt, denn es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Neubildung und Ablösen von Biofilmteilen ein [10]. Der Gleichgewichtszustand stellt die Plateauphase dar und ist in aquatischen Systemen meist nach einigen Wochen erreicht. Dieser Zustand wird im wesentlichen durch die Scherkraft des Mediums und durch das Wachstum der Mikroben (abhängig von der Nährstoffzufuhr im Medium) bestimmt. Bei Medien mit hoher Scherkraft kommt es teilweise sogar zum Ablösen ganzer Biofilmfetzen (sloughing off). Das führt zu dünnen aber dafür dichten und relativ glatten Biofilmen. Dicke, eher raue Biofilme bilden sich in Medien mit hohem Nährstoffangebot und geringen Scherkräften [13, 45].

2.1.5 Struktur, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen

Die Basisstruktureinheit von Biofilmen sind die Mikrokonsortien. Hierbei handelt es sich um einzelne durch die Matrix umschlossene Gemeinschaften von Bakterien einer oder mehrerer Spezies [46]. Daraus resultiert notwendigerweise eine große Zahl von Schwesterzellen in der EPS [47].

Die EPS stellt die Schlüsselmoleküle für Struktur, Funktion und Organisationsform von Biofilmen dar. Sie bestimmt die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Biofilmen, wie beispielsweise ihre mechanische Festigkeit und ihre dreidimensionale Struktur. Des Weiteren konditioniert sie die Mikroumgebung der Biofilmbewohner [8].

Bis zu Beginn der neunziger Jahre basierte die Vorstellung über den Aufbau eines Biofilms darauf, dass die Bakterien in eine flächige, kompakte Matrix aus EPS eingebettet sind. Dieses Modell konnte jedoch eine Vielzahl von experimentellen Beobachtungen nicht erklären. Durch die Anwendung der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie, als eine zerstörungsfreie Messmethode, sind genaue Informationen über die Struktur natürlicher Biofilmproben gewonnen worden. Abb. 2.5 repräsentiert schematisch die typische Struktur eines Biofilms. Man erkennt, dass die Mikroorganismen in Matrix eingebettet sind, diese jedoch relativ inhomogen verteilt ist, z. B. als "Höhlen", "Tunnel" oder "Tür-

me” [48]. Die Mikroorganismen sind in Mikrokolonien organisiert, zwischen denen sich ein offenes Kanalsystem befindet. In den Kanälen kann man einen konvektiven Fluss beobachten [49].

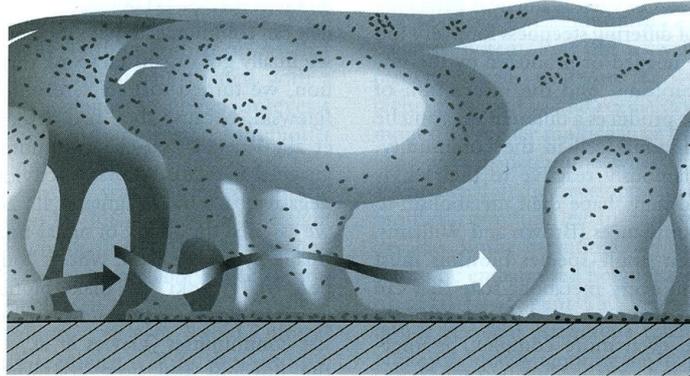


Abb. 2.5: Struktur eines Biofilms nach J. W. Costerton [48]

Die Komponenten in einem Biofilm können wie folgt unterteilt werden [13, 50]:

- Wasser
- EPS
- Mikroorganismen
- sorbierte, gelöste Substanzen
- eingelagerte organische und anorganische Partikel

Im nassen Biofilm beträgt der Anteil des Wassers zwischen 85 und 95%. Es stellt somit den Hauptbestandteil dar. Die Bindung von Wasser ist eine sehr wichtige physikalisch-chemische Eigenschaft von Biofilmen. Das Wasser kann chemisch (Komplexe), physikalisch-chemisch (Wasserstoffbrückenbindung, dipolare Wechselwirkung), physikalisch (eingeschlossen ins Netzwerk) und biochemisch (eingeschlossen in Lipidmembranen) gebunden sein. Die Bindungsart bestimmt die strukturellen und dynamischen Eigenschaften des gebundenen Wassers [51].

Die EPS ist bezogen auf die Trockenmasse mit 85-95% der Hauptbestandteil [50]. Die EPS besteht aus einer Reihe von Biomolekülen, darunter hauptsächlich Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine, Lipide, Phospholipide, Glycolipide und Nucleinsäuren. Entfernt man durch Trocknung den Hauptbestandteil der EPS, das Wasser, entstehen filamentöse

beziehungsweise flächige Strukturen als Trocknungsartefakte.

Der Zusammenhalt der EPS beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen, Dispersionswechselwirkungen (z. B. van-der-Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen) und elektrostatischen Wechselwirkungen. Diese Bindungen sind nicht gerichtet, man muss sie sich als ein Netzwerk vorstellen, das von fluktuierenden Haftpunkten zusammengehalten wird. Wenn durch zunehmenden Druck der Bruchpunkt des Gels überschritten wird, gleiten die Bindungspartner übereinander und finden neue Bindungsstellen. Der Biofilm verhält sich viskoelastisch. Durch die Anwendung eines Filmrheometers kann die mechanische Stabilität von Biofilmen bestimmt werden [52]. Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass Calciumionen die Stabilität von Biofilmen stark beeinflussen. Die doppelt geladenen Calciumionen können die Polymerstränge elektrostatisch verbrücken [53].

Die Anzahl der Zellen im Biofilm ist deutlich höher als im suspendiertem Zustand. Die Konzentration von Mikroorganismen in Biofilmen kann bis zu 10^{12} Zellen/mL betragen [22]. Bakterien, Algen (nur bei Lichtzutritt), Pilze, Viren, Bakteriophagen, Protozoen, Ciliaten, Rädertierchen und Nematoden können in der Mikrobiozönose enthalten sein [13, 18]. Von allen im Biofilm enthaltenen Organismen stellen die Bakterien die dominante Spezies dar [54].

Die Biofilmorganismen weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber Bioziden, Antibiotika und Desinfektionsmitteln auf. Diese Schutzwirkung basiert auf verschiedene Mechanismen [8]:

- Diffuser Stofftransport verzögert das Eindringen von Bioziden in tiefere Bereiche.
- Das Biozid kann mit EPS-Bestandteilen reagieren und es entstehen somit Zonen ohne Biozidbelastung.
- Im Biofilm können spezifische Phänotypen auftreten, die spezielle Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress aufweisen.
- Zellen in tieferen Bereichen gehen in einen Ruhezustand über, indem sie weniger empfindlich gegen Antibiotika sind.

In der Literatur findet man Informationen über Schwermetallresistenzen von Mikroorganismen [55 - 59] und über die Wirkung von Antibiotika auf Biofilmbakterien [36, 60].

Die wichtigsten Eigenschaften von Biofilmen sind [10, 13, 18, 61]:

- räumliche Inhomogenität (vertikal, horizontal)
- Nähe zum Substrat (Aufwuchsfläche)
- hohe Zelldichte (ermöglicht Gentransfer)
- lange Kontaktzeiten der Zellen zueinander
- räumlich fixierte Mikrokonsortien verschiedener Spezies
- zeitliche Dynamik
- durch Mikrokonsortien bessere mikrobielle Umsetzung von chemischen Verbindungen (höhere Nitrifikationsaktivität, Abbau von PCB's)
- metabolische Aktivität hauptsächlich durch Transportprozesse limitiert (im Unterschied zu planktonischen Zellen)
- Unterscheidung zu planktonischen Populationen in Zellgröße, Spezieszusammensetzung, Substrataufnahme, Atmung, Produktbildung
- Nährstoffen werden in der Gel-Matrix angereichert
- anpassungsfähig und regenerationsfähig
- durch Wasserbindungsvermögen der EPS: Schutz vor Austrocknen
- Oberflächeneigenschaften
 - meistens rauer als die Unterlage
 - weiche, viskoelastische Oberfläche, die kinetische Energie absorbiert
 - "Klebrigkeit" durch EPS-Matrix
 - Maskierung der Oberflächeneigenschaften der Unterlage
 - Erzeugung hydrophiler Oberflächen

2.2 Beziehungen zwischen Metallen und Mikroorganismen

Metallionen nehmen im Bereich der zahlreichen gelösten Substanzen in aquatischen Systemen eine einzigartige Stellung ein. Sie haben die Eigenschaft, innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereiches von einer essentiellen, wachstumsfördernden Funktion in eine toxische zu wechseln. Die Mikroorganismen sind daher gezwungen, eine strenge Kontrolle über die Menge an Metallionen auszuüben, mit denen sie in Umgebungen stark schwankender Konzentrationen an gelösten Metallionen in Kontakt kommen [62].

Die Interaktionen von Mikroorganismen mit Metallen sind sehr vielseitig. Die Frage, welche Elemente für einen bestimmten Organismus lebensnotwendig (essentiell), förderlich oder andererseits abträglich und sogar toxisch sind, wird mit ständig wechselnden Schwerpunkten diskutiert [63]. In Abb. 2.6 ist das Dosis-Wirkungs-Diagramm für essentielle und in Abb. 2.7 für nichtessentielle Elemente dargestellt. (Die Diagramme gelten für alle Arten von Organismen.). Man kann erkennen, dass nur die Dosis entscheidet, ob ein Element eine toxisch wirkt oder nicht.

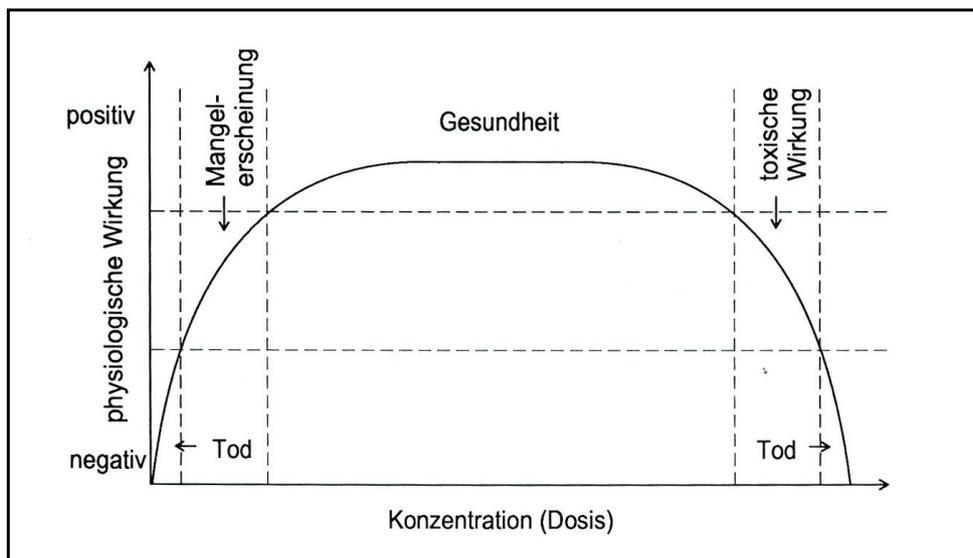


Abb. 2.6: Dosis-Wirkungs-Diagramm für essentielle Elemente [63]

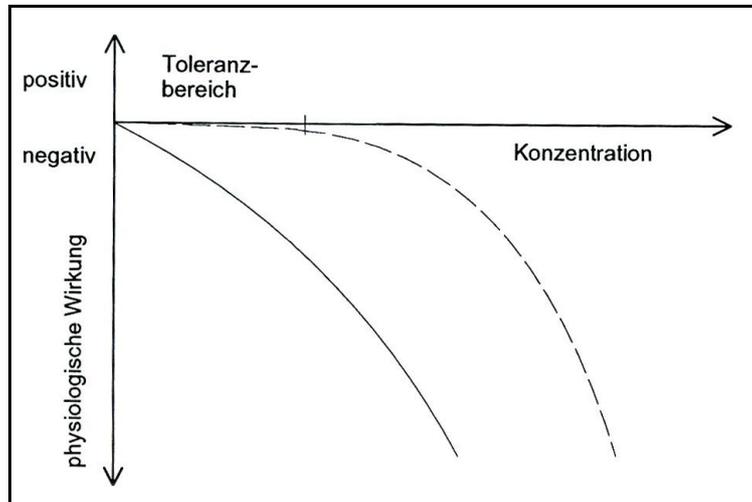


Abb. 2.7: Dosis-Wirkungs-Diagramm für nichtessentielle Elemente [63]

Der Transport und die Akkumulation von sowohl essentiellen als auch nichtessentiellen Metallionen durch Bakterien kann durch eine Reihe von verschiedenen Mechanismen geschehen. Mögliche Mechanismen (exemplarische Auswahl) sind [64]:

- passive Immobilisierung
- Akkumulation durch aktive Bakterienarten bzw. Transportsysteme
- Transport durch Membranrezeptoren
- chemische und physikalische Bindung von Metallen an Zelloberflächen

Im Kapitel 2.3 wird näher auf das Akkumulationsverhalten von Mikroorganismen eingegangen.

2.2.1 Biologische Funktionen anorganischer Elemente

Mikroorganismen benötigen für ihre strukturellen Arrangements und einige metabolische Aktivitäten, Metallionen. Durch die evolutionäre Entwicklung ist es oft so, dass häufig vorkommende Elemente in den Mikroorganismen Funktionen ausüben, während seltene Schwermetallionen eher toxisch wirken [65].

Organismen haben komplexe Systeme entwickelt für Aufnahme, Anreicherung, Transport und Speicherung von anorganischen Elementen. Das ist nur damit zu erklären, dass sie eine offenbar notwendige auf andere Art nicht zu gewährleistende Funktion haben. Es gibt

eine Vielzahl von Funktionen, für die sich gerade die Ionen der anorganischen Elemente eignen [63].

Tab. 2.3: Metallionen und ihre Funktion in Organismen

Elemente	Funktion
Ca, Mg, Zn	Aufbau fester Strukturen durch Biomineralisation
Ca, K, Na	Ladungsträger für Informationsübertragung
Mg, Zn	Auf- und Abbau organischer Verbindungen
Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V, W	Transport von Elektronen
Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V	Aktivierung kleiner, hochsymmetrischer Moleküle
Co, Cu, Fe, Ni	Erzeugung von Radikalen

Wie man aus Tab. 2.3 erkennen kann, sind einige Elemente für verschiedene Funktionen einsetzbar. Durch den Liganden und die Oxidationsstufe des Metalls wird die Funktion des jeweiligen Enzyms bestimmt. Eine exemplarische Aufstellung über Metalloenzyme und ihre Reaktion im Organismus enthält Tab. 2.4.

Tab. 2.4: Metalloenzyme (Auswahl) [66]

Metall	Enzym	Reaktion
Co	Ethanolamindeaminase	Ethanolamin \rightarrow Acetaldehyd + Ammoniak
Cu	Rustcyanin	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + 1\text{e}^-$
	Cytochrom c oxidase	$4 \text{ cytochrom c}(\text{Fe}^{2+}) + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cytochrom c}(\text{Fe}^{3+}) + 2\text{H}_2\text{O}$
Fe	Peroxidase	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{ O}_2$
	Rubredoxin	Elektronentransfer
Mo	Nitrogenase	$\text{N}_2 + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_3$
	Superoxiddismutase	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
V	Nitrogenase	$\text{N}_2 + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_3$

2.2.2 Die Toxizität anorganischer Elemente

Schwermetalle beeinflussen die Morphologie, die biochemische Aktivität und das Wachstum von Mikroorganismen. Die Toxizität von Schwermetallen wird durch zahlreiche physikalisch-chemische Einflussfaktoren bestimmt, wobei die Wirkungen der einzelnen Faktoren spezifisch ist [67]:

- pH-Wert
 - physiologischer Zustand und biochemische Aktivität der Mikroben
 - chemische Speziation des Metalls
- Potential
 - negatives Potential: Sulfidbildung
 - Oxidationsstufe des Metalls
- Anionen (Bindungsform des Metalls)
- Kationen (Konkurrenz um Bindungsstellen)
- organische Materie (mögliche Komplexbildung in der Lösung)
- Temperatur (physiologischer Zustand der Mikroben)

Auch zur Entfernung unerwünschter anorganischer Stoffe haben Organismen verschiedenartige, meist energieaufwändige Entgiftungsstrategien entwickelt [63, 68]:

- enzymatische Umwandlung von toxischen zu weniger toxischen Stufen (Hg²⁺ zu Hg⁰)
- enzymatische Umwandlung zu flüchtigen Verbindungen (SeO₃²⁻ zu Me₂Se)
- spezielle Membranen verhindern den Durchtritt in besonders gefährdete Bereiche (Zellinneres, Zellkern)
- Membranen binden die Schadstoffe auf der Oberfläche
- Ionenpumpen entfernen unerwünschte Stoffe aus gefährdeten Zellräumen (AsO₄³⁻)
- Ionenpumpen bieten ein Gegenion an (Cd²⁺ + S²⁻ → CdS)
- Fixierung toxischer Ionen (Metallothionein-Proteine)

2.3 Akkumulation von Metallionen in Biofilmen

Die Akkumulation von Metallen (Biosorption) kann sowohl von lebenden Organismen als auch von nichtlebender Biomasse, wie beispielsweise gelöste organische Materie im Wasser und organische Fraktionen im Sediment, erfolgen. Die metallbindenden Eigenschaften der entsprechenden Substrate spielen eine große Rolle für den Fluss der Metallionen in die Zelle [69]. Die Initialbindung bei der Akkumulation von Metallen durch Mikroorganismen ist die Biosorption an den Zelloberflächen. Ihr kann ein Transport durch

die Zellmembran und dort z. B. der Einbau der Metalle in Enzymen folgen [70].

Die EPS enthält geladene Gruppen in Aminosäuren und Zuckersäuren sowie unpolare Bereiche in Proteinen, Polysacchariden und Biotensiden. Sie stellt somit neben den Zellwänden, den Membranen und dem Cytoplasma einen Sorptionsort für Ionen, unpolare Substanzen und Partikel dar [8]. Algen, Bakterien, Pilze und die EPS können im Biofilm als Sorptionsstelle fungieren.

2.3.1 Mechanismen der Biosorption

Der Mechanismus der Biosorption ist sehr schwer zu fassen, da man nicht mit klar definierten chemischen Substanzen arbeitet. Dennoch kann man die Bindungsmechanismen in aktive oder passive einteilen. Bei der aktiven Bindung wird als Reaktion auf gelöste Substanzen durch Absonderung von bindenden, chelatisierenden oder fällenden Zellprodukten eine chemische Bindung ausgebildet. Diese Mechanismen werden oft zur Detoxifikation angewendet. Des weiteren erlauben aktive Transportsysteme die Aufnahme von Metallionen ins Cytoplasma. Methylierung, Demethylierung, Oxidation und Reduktion sind ebenfalls aktive Prozesse, durch die sorbierte Substanzen verändert werden. Alle diese Bindungsmechanismen tragen zur Gesamtsorptionskapazität des Biofilms bei. Die Metallbindung durch Zelloberflächen wird als passive Bindung betrachtet. Sie entsteht direkt (nicht erst durch Bildung auf Grund der gelösten Stoffe) durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Metallkationen und den anionischen Zelloberflächen. Diese Bindung kann sowohl von lebenden als auch von toten Zellen durchgeführt werden. Man benötigt lediglich die intakte Oberfläche [50].

Die Metallbindungsmechanismen der Bakterien sind: Ionenaustausch, Adsorption, Fällung, Komplexierung und Koordination [69, 71]. Die treibende Kraft beim Ionenaustausch ist die Anziehungskraft des Substrates gegenüber dem zu akkumulierenden Metallion. Die Unterscheidung zwischen Adsorption und Fällung liegt in der treibenden Kraft für die Reaktion. Bei ersterer liegt diese in der Affinität der Bindungspartner (Metallkomplex), während bei der Fällung die begrenzte Löslichkeit den Ausschlag gibt [69]. Hydroxide,

Sulfide, Carbonate, Sulfate, Oxidhydrate und Phosphate stellen die wichtigsten Fällungsprodukte dar. Die Komplexierung und Koordination erfolgt an Bindungsstellen der Zellwände und mittels EPS.

2.3.2 Einflussfaktoren auf die Biosorption

Die Bildung von Biofilmen kann wie oben gezeigt auch unter extremen Bedingungen geschehen. Die äußeren Bedingungen wirken entscheidend auf die Akkumulation von Metallen durch die Biofilme ein. Einige wichtige Einflussfaktoren stellen Metallkonzentration, Temperatur, pH-Wert, andere Kationen und vorhandene Anionen dar [69].

Biosorption findet bei nahezu jeder Konzentration statt. Die vorhandene Metallkonzentration beeinflusst die Einstellung des chemischen Gleichgewichtes und gibt somit an, welche Speziation des Metalls vorliegt.

Bei niedrigen Temperaturen wird die reine physikalische Sorption (exotherm) begünstigt. Die Biosorption kann aber auch als chemische Sorption auf dem Wege der Komplexbildung geschehen. Dieser Vorgang kann sowohl endotherm als auch exotherm verlaufen.

Der pH-Wert beeinflusst die Akkumulation von Metallen auf drei Wegen:

- Speziation der Metallionen in der Lösung ist pH-abhängig
- Zerstörung der Struktur des Sorbenten durch extreme pH-Werte
- Bindungsstellen des Substrates sind pH-abhängig
 - Bei niedrigen pH-Werten sind die Bindungspositionen des Biosorbens durch die Protonen besetzt. Es kann somit keine Akkumulation von Metallionen stattfinden.

Metallionen, die als negativ geladene Komplexe vorkommen oder die eine starke Tendenz zur Ausbildung von kovalenten Bindungen besitzen (z. B. Ag, Hg), zeigen eine geringere pH-Abhängigkeit beziehungsweise sind sogar pH-unabhängig.

Die Existenz von mehr als einem Metall beeinflusst und verringert die Akkumulation jedes Einzelnen. Durch die jeweiligen Affinitäten der Bindungspartner zueinander stellt sich ein Gleichgewicht der akkumulierten Metalle ein. Metalle mit einer geringen Bindungsstärke werden durch Metalle, die eine stärkere Bindung mit der entsprechenden Bindungsstelle eingehen können, verdrängt.

Die Bildung von Komplexen mit den Metallen in der Lösung stellt den größten Einfluss der Anionen auf die Biosorption dar. Durch diese Komplexbildung verändert sich die Affinität des Metalls zur Bindungsstelle. Sie kann sich erhöhen aber auch verringern. Sehr starke Komplexbildner, wie EDTA, verringern die Akkumulation von Metallen. Der Einfluss der meisten Anionen (Sulfat-, Phosphat-, Chlorid- und Carbonationen), ist als eher gering einzustufen.

2.3.3 Biosorption an Zelloberflächen im Biofilm

Im Biofilm leben eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, die durch ihre charakteristischen Oberflächen gekennzeichnet sind. Algen, Bakterien und Pilze sind entscheidend für die Akkumulation von Metallen an Zelloberflächen.

Algen

Bei der Biosorption an Algen spielen sowohl Bindungen durch elektrostatische Anziehungskräfte als auch durch Komplexbildung eine Rolle. Sie findet hauptsächlich an der Zellwand statt. Eine typische Algenzellwand ist in Abb. 2.8 dargestellt. Sie besteht aus einem faserigen Skelett und einer amorphen, einlagernden Matrix. Das Skelett besteht in den meisten Fällen aus Cellulose, die Matrix hingegen aus Polysacchariden (oft sulfoniert). Die genaue Zusammensetzung hängt von der Algenart ab.

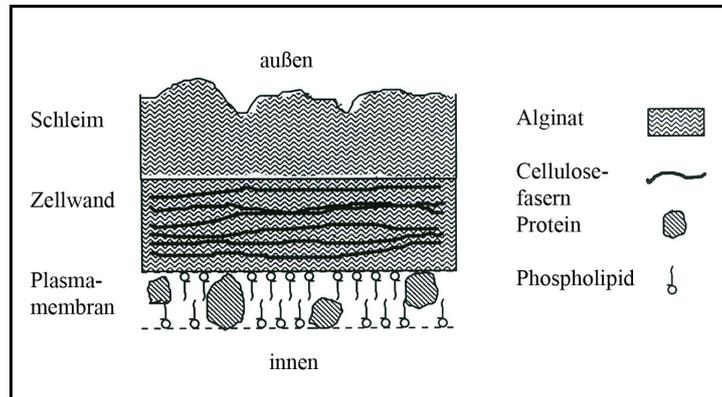


Abb. 2.8: Zellwand einer Braunalge [69]

Die Hauptbindungsgruppen für die Metalle stellen die Carboxylgruppen der Uronsäuren und die Sulfonatgruppen dar. Die ebenfalls in Polysacchariden vorhandenen Hydroxylgruppen spielen erst ab einem pH-Wert von größer zehn eine Rolle [69].

Bakterien

Die Fällung stellt eine weit verbreitete Metallbindung durch Bakterien dar. Komplexierung durch N- und O-Liganden an der Zellwand und elektrostatische Anziehung zwischen geladenen Gruppen in der Zellwand können Bakterien ebenfalls zur Akkumulation von Metallen verwenden. Gram-positive Bakterien besitzen durch ihre dickere Peptidoglykanschicht eine höhere Metallbindungskapazität als gram-negative [69].

Gram-positive Bakterien besitzen eine 20-30 nm dicke Peptidoglykanschicht (Trockenmasse: 30 - 50 %) [54]. In diese sind Teichon- und Teichuronsäuren eingelagert. Die gesamte Zellwand hat eine Dicke von 50-150 nm. Peptidoglykan ist ein lineares Polymer aus alternierenden Glucosamin- und Mureinsäuren mit Peptidseitenketten [65]. Diese Seitenketten enthalten eine Carboxylgruppe an der terminalen Aminosäure und weitere verschiedene funktionelle Gruppen an den mittleren Aminosäuren. Teichonsäuren enthalten Phosphodiester und Teichuronsäuren Carboxylgruppen. Beide Gruppen sind für die negative Ladung der Biomasse verantwortlich und sind zum Ionenaustausch befähigt [69]. Abb. 2.9 zeigt den typischen Aufbau einer Zellwand eines gram-positiven Bakteriums.

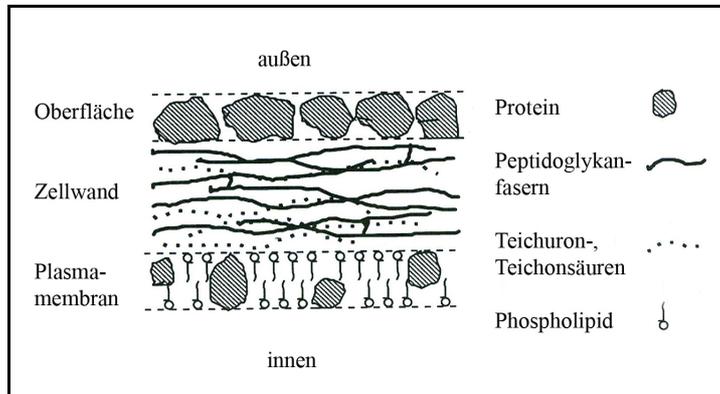


Abb. 2.9: Zellwand eines gram-positiven Bakteriums aus [69]

Die Peptidoglykanschicht (2-10% des Trockengewichtes) in gram-negativen Bakterien beträgt nur etwa drei Moleküle und enthält keine Teichon- und Teichuronsäuren. Die Gesamtzellwandbreite beträgt 30-80 nm [54, 72]. Das Charakteristikum dieser Bakterien ist eine äußere Membran, die Lipopolysaccharide und Phospholipide enthält. Deren Phosphonatgruppen erzeugen eine negative Oberflächenladung, welche zur Kationenbindung dient. Die schematische Darstellung der Zellwand eines gram-negativen Bakteriums enthält Abb. 2.10. Weiterführende Informationen über die Bindung von Metallen durch Bakterien erhält man in MC LEAN et al. und GADD [73, 74].

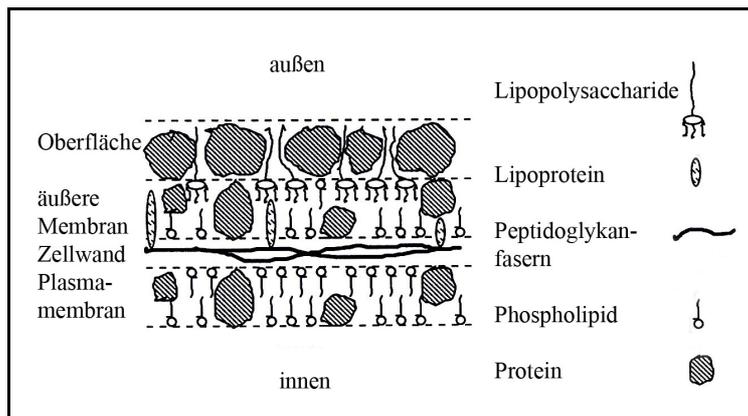


Abb. 2.10: Zellwand eines gram-negativen Bakteriums aus [69]

Pilze

Genau wie bei den Algen und Bakterien stellt die Zellwand auch bei den Pilzen die Hauptakkumulationsquelle für Metalle dar. Die Zellwand von Pilzen besteht bis zu 90% aus Polysacchariden (zum Teil phosphoryliert). Die innere Faserschicht besteht gewöhnli-

cherweise aus Chitin, kann aber auch durch Cellulose bzw. β -Glucan ersetzt sein. Die äußere, eher amorphe Schicht ist meistens durch α -Glucan aufgebaut. Abb. 2.11 zeigt das Schema einer Pilzzellwand [72].

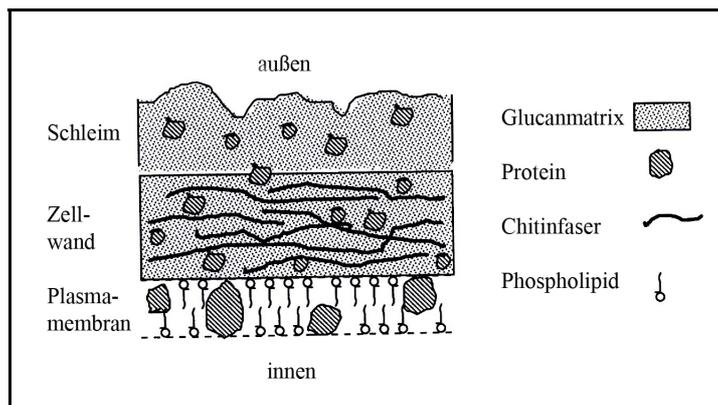


Abb. 2.11: Zellwand eines Pilzes [69]

Die Phosphat- und Carboxylatgruppen sind für die negative Ladung der Zellwand von Pilzen verantwortlich, während die Aminogruppen des Chitins eine positive Ladung erzeugen. In Pilzen können somit Komplexe mit N- oder O-Donoren gebildet werden [69]. Weitere Informationen zur Metallakkumulation durch Pilze, sind in VOLESKY und VON HULLEBUSCH et al. nachzulesen [75, 76].

2.3.4 Biosorption durch die EPS

Die EPS kann zum einen chelatisierend auf Metallionen wirken oder auch metallbindend. Sie kann Metallionen somit passiv immobilisieren sowie lösliche Metallionen und unlösliche Metallverbindungen adsorbieren [50].

Die Dichte der geladenen funktionellen Gruppen ist in der EPS sehr hoch. Sie besitzt damit eine sehr hohe Bindungskapazität für Metallionen. Die "vollständige Konzentration" an elektrostatischen Bindungsplätzen in der EPS kann das 20 bis 30fache der Bakterienoberflächen betragen. Die Bindungsstärke des EPS-Metallkomplexes ist stark von der Ionengröße und -ladung sowie von physikalisch-chemischen Parametern abhängig [77].

Die effektivsten “Bindungsgruppen” in der EPS stellen die Carboxylreste dar. Es reagieren hierbei die freien Elektronenpaare der Carboxylgruppe mit dem ladungskompensierenden Metallion. Im sauren oder neutralen Medium sind schwache Elektronendonoren in Form des Sauerstoffatoms der Etherbindung und der Hydroxylreste der Zuckereinheiten vorhanden [78]. Die generelle Metall-Molekül-Interaktion stellt hierbei stets eine Säure-Base-Reaktion dar [79].

Die Bindung von Anionen durch die EPS ist ebenfalls möglich. Zum einen können multivalente gebundene Kationen und zum anderen die positiven Aminogruppen der Zucker etc. Anionen binden [50]. Auch organische Verbindungen werden durch die EPS im Biofilm akkumuliert. Es existieren eine Vielzahl von verschiedenen Mechanismen. Vertiefte Informationen über die Akkumulation organischer Substanzen sind in MARTIENSSEN und FLEMMING et al. aufgezeigt [3, 50].

3 Chemometrische Methoden

Um die anthropogenen und geogenen Einflüsse auf Umweltproben zu beurteilen, ist es notwendig, eine möglichst hohe Stichprobenzahl und ein breites Spektrum an Analyten zu charakterisieren. Die möglichst hohe Zahl an Analyten im Bereich der Umweltanalytik, ergibt sich auch dadurch, dass zu Beginn der Untersuchungen noch nicht bekannt ist, welche Variablen den größten Einfluss bezüglich der Problemstellung haben. Die Anwendung chemometrischer Auswertemethoden bedingt eine möglichst hohe Zahl an Stichproben, um statistisch abgesicherte Ergebnisse zu erhalten. Daher führen Arbeiten im Bereich der Umweltanalytik meist zu sehr großen Datenmatrizen. Mit univariat-statistischen Methoden werden Beziehungen zwischen Variablen nicht beachtet. Eine alleinige Auswertung nur mit diesen Methoden, liefert nur unvollständige Ergebnisse. Daher existieren zahlreiche multivariat-statistische Methoden, mit denen Zusammenhänge zwischen Variablen aufgeklärt, Dimensionserniedrigungen durchgeführt sowie Vorhersagemodelle berechnet werden können. Eine Variante der Einteilung für multivariat-statistischen Methoden, ist dem Organigramm in Abb. 3.1 zu entnehmen.

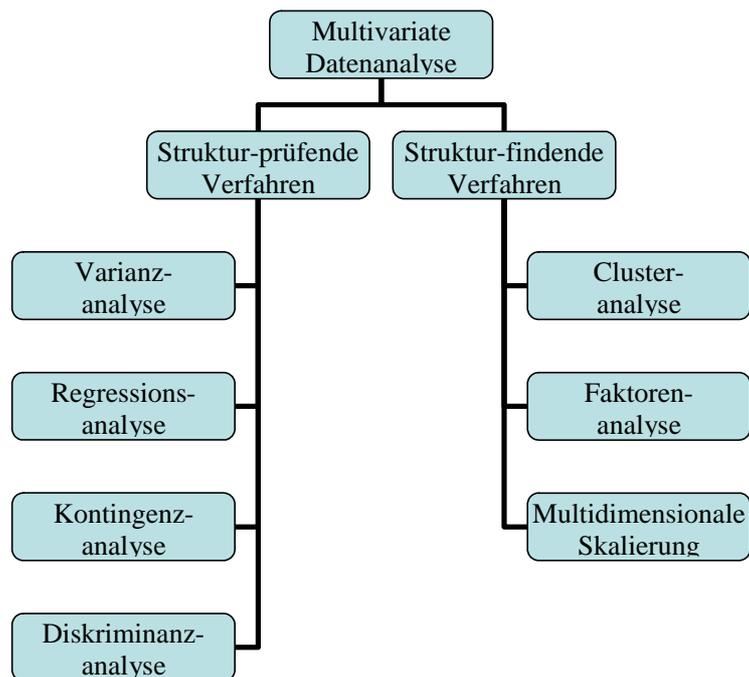


Abb. 3.1: Einteilung der multivariat-statistischen Methoden nach BACKHAUS et al.[82]

Eine Vielzahl chemometrischer Methoden sind in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommen. Die multidimensionale Skalierung wird zur Visualisierung eines kategorialen Datensatzes verwendet. Clusteranalyse und Clusterimaging ordnen die Variablen und Objekte des Datensatzes nach ihren Ähnlichkeiten und stellen das Ergebnis visuell dar. Die so erhaltene Gruppierung kann mittels der Diskriminanzanalyse verifiziert werden. Support-Vektor-Maschinen und Künstliche Neuronale Netze werden ebenfalls zur Klassifizierung der Datensätze verwendet. Durch die Faktorenanalyse wird eine Datenreduktion sowie eine bessere kausale Interpretierbarkeit der Ergebnisse erreicht. Die “Soft-Modeling” Methoden Partial-Least-Squares-Regression und Künstliche Neuronale Netze erlauben die Modellierung und Vorhersage einer oder mehrere Zielvariablen durch eine oder mehrere unabhängige Variablen.

3.1 Multidimensionale Skalierung

Die multidimensionale Skalierung (MDS) versucht die Komplexität von Objekten, die durch mehrere Merkmale beschrieben werden, bei minimalem Informationsverlust so zu vereinfachen, dass sie grafisch, das heißt zwei- oder höchstens dreidimensional, dargestellt werden können. Die geometrische Position der Objekte lässt Klassen erkennen, die zudem anhand der Achsen des Darstellungsraumes inhaltlich interpretierbar werden können [80].

Für kategoriale Datensätze stellt die MDS die Alternativmethode zur Faktorenanalyse dar [81]. Ihre Schritte sind in Tab. 3.1 zusammengefasst und werden nachfolgend nach BACKHAUS et al. [82] erläutert.

Tab. 3.1: Schritte der durchgeführten MDS

Schritt	Prozess
1	Messung von Ähnlichkeiten
2	Wahl des Distanzmodells
3	Ermittlung der Konfiguration
4	Zahl und Interpretation der Dimensionen

Messung von Ähnlichkeiten

Die Ausgangsdaten für eine MDS stellen die Ähnlichkeiten der Objekte zueinander dar. Die Ähnlichkeitsurteile beziehen sich dabei stets auf Objektpaare und nicht auf einzelne Objekte.

Die drei wichtigsten Methoden zur Erhebung von Ähnlichkeitsurteilen sind:

- Methode der Rangreihung
 - Die Objektpaare werden nach der empfundenen Ähnlichkeit geordnet.
- Ankerpunktmethode
 - Es dient jedes Objekt genau einmal als Vergleichsobjekt.
- Ratingverfahren
 - Die Objektpaare werden einzeln auf einer Ähnlichkeitsskala eingestuft.

Wahl des Distanzmodells

Da die Objekte in einem Wahrnehmungsraum abgebildet werden sollen, müssen die Ähnlichkeiten in Form von Distanzen dargestellt werden. Hierfür werden in der Literatur verschiedene Distanzmaße beschrieben [83, 84]. Auf die drei am häufigsten verwendeten Distanzmaße soll im folgenden näher eingegangen werden.

EUKLIDISCHE Metrik

Hierbei wird die Distanz zweier Punkte nach ihrer kürzesten Entfernung (“Luftweg”) beschrieben. Die Berechnung erfolgt gemäß der Formel 3.1:

$$d_{kl} = \left[\sum_{r=1}^R (x_{kr} - x_{lr})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

mit: d_{kl} Distanz der Punkte k, l
 x_{kr}, x_{lr} Koordinaten der Punkte k, l auf der r -ten Dimension ($r = 1, 2, \dots, R$)

CITY-BLOCK-Metrik

Dabei wird die Distanz zweier Punkte als Summe der absoluten Abstände zwischen den Punkten ermittelt. Formel 3.2 stellt die Berechnungsgrundlage dar:

$$d_{kl} = \sum_{r=1}^R |x_{kr} - x_{lr}| \quad (3.2)$$

MINKOWSKI-Metrik

Dieses Distanzmaß stellt die Verallgemeinerung der beiden obigen Formeln dar. Die Distanz zweier Punkte wird als Differenz der Koordinatenwerte über alle Dimensionen berechnet. Diese Differenzen werden mit einem Faktor c potenziert, abschließend wird die Gesamtsumme mit dem Faktor $1/c$ potenziert (Formel 3.3). Für $c = 1$ ergibt sich die CITY-BLOCK-Metrik und für $c = 2$ die EUKLIDISCHE Metrik.

$$d_{kl} = \left[\sum_{r=1}^R (x_{kr} - x_{lr})^c \right]^{\frac{1}{c}} \quad (3.3)$$

mit: $c \geq 1$ MINKOWSKI-Konstante

Ermittlung der Konfiguration

Bei der MDS soll aus den vorgegebenen Ähnlichkeiten bzw. Unähnlichkeiten u_{kl} (für Objekte k und l) in einem Raum mit möglichst geringer Dimension R eine Konfiguration ermittelt werden, deren Distanzen d_{kl} die Monotoniebedingung (Gleichung 3.4) möglichst gut erfüllen. Die Rangfolge der Distanzen zwischen den Objekten soll die Rangfolge der vorgegebenen Unähnlichkeiten so gut wie möglich repräsentieren.

$$\text{wenn } u_{kl} > u_{ij} \text{ dann } d_{kl} > d_{ij} \quad (3.4)$$

Man startet mit einer Ausgangskonfiguration und versucht diese iterativ zu verbessern (Kruskalsche Lösungsalgorithmus). Um die Güte der Konfiguration zu veranschaulichen, konstruiert man ein SHEPARD-Diagramm. Hierbei trägt man die Unähnlichkeiten auf der Abszisse und die Distanzen auf der Ordinate auf. Wenn die Monotoniebedingung erfüllt ist, entsteht durch Verbinden der Punkte eine monoton steigende Kurve.

Die Disparitäten δ werden als dritte Größe eingeführt. Hierbei handelt es sich um schwach monotone Transformationen der Unähnlichkeiten. Rechnerisch werden die Disparitäten durch Mittelwertbildung der nichtmonotonen Distanzen ermittelt. Unter Nutzung der

Disparitäten wird nun eine verbesserte Konfiguration (veränderte Koordinatenwerte) nach dem Algorithmus von Kruskal berechnet. Die jeweilige Konfiguration wird so lange verbessert, bis eine vorgegebene Zahl von Iterationen überschritten wird oder bis ein minimaler *STRESS* (Gütemaß) erreicht ist.

Der *STRESS* wird als Zielkriterium für die Optimierung verwendet. Er stellt ein Maß für die Güte der Kalibration dar und misst, wie gut eine Konfiguration die Monotoniebedingung erfüllt. Je größer der *STRESS*, desto schlechter ist die Konfiguration. Die Gleichungen 3.5 und 3.6 stellen die Berechnungsgrundlage für die gebräuchlichsten *STRESS*-Werte dar:

$$STRESS1 = \sqrt{\frac{\sum_k \sum_l (d_{kl} - \bar{d}_{kl})^2}{\sum_k \sum_l d_{kl}^2}} \quad (3.5)$$

$$STRESS2 = \sqrt{\frac{\sum_k \sum_l (d_{kl} - \bar{d}_{kl})^2}{\sum_k \sum_l (d_{kl} - \bar{d}_{kl})}} \quad (3.6)$$

mit: d_{kl} / \bar{d}_{kl} Distanz / Disparität zwischen Objekt k und l

Der Kruskalsche Lösungsalgorithmus basiert auf dem Prinzip des steilsten Anstieges. Die Gleichung 3.7 gibt an, wie sich ein neuer Koordinatenwert berechnen lässt [85]. Es wird ein Vektor zur Verschiebung des Objektes k erzeugt, dessen Richtung von den Koordinaten aller Objekte und den Disparitäten bezüglich k abhängig ist. Die Länge des Vektors kann durch die Schrittweite ι variiert werden. Je kleiner der *STRESS* wird, desto kleiner muss ι gewählt werden.

$$x_{kr}^+ = x_{kr} + \frac{\iota}{K-1} \sum_{l=1}^K \left(1 - \frac{d_{kl}}{\bar{d}_{kl}}\right) \cdot (x_{lr} - x_{kr}) \quad (r=1, \dots, R) \quad (3.7)$$

Erhält man einen *STRESS* von Null, existieren weitere Lösungen, die auch die Monotoniebedingung erfüllen. Bei derartigen Fällen gibt es keine eindeutige Lösung. Gibt es eine

stressminimale Lösung mit Werten größer Null, hat Kruskal Erfahrungswerte als Anhaltspunkte für die Interpretation vorgeschlagen (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Anhaltspunkte zur *STRESS*-Bewertung

Anpassungsgüte	<i>STRESS1</i>	<i>STRESS2</i>
gering	0,200	0,400
ausreichend	0,100	0,200
gut	0,050	0,100
ausgezeichnet	0,025	0,050
perfekt	0,000	0,000

Zahl und Interpretation der Dimensionen

Die Zahl der Dimensionen bestimmt den Wahrnehmungsraum und sollte der “wahren” Dimensionalität entsprechen. Da diese jedoch meistens unbekannt ist, ergibt sich ein Problem der MDS. Dieses wird in der Praxis gemildert, da man sich in der Regel auf zwei oder drei Dimensionen beschränkt. Die Beschränkung ergibt sich durch die grafische Darstellbarkeit und somit Interpretierbarkeit der Ergebnisse.

Die Zahl der Dimensionen kann nach folgenden Kriterien gewählt werden:

- Interpretierbarkeit der Konfiguration
- *STRESS*
 - bei nur sehr geringen Änderungen des *STRESS* → niedrigere Dimension
- Datenverdichtungskoeffizient Q
 - für stabile Lösungen sollte $Q \geq 2$ betragen

$$Q = \frac{K(K-1)/2}{K \cdot R_d} \quad (3.8)$$

mit: K Zahl der Objekte
 R_d Zahl der Dimensionen

Aus der Bedingung $Q \geq 2$ und Gleichung 3.8 ergibt sich, dass mindestens neun Objekte für eine Darstellung im zweidimensionalen Raum vorhanden sein müssen. Dieser Fakt begrenzt die Anwendbarkeit der MDS.

3.2 Clusteranalyse und Clusterimaging

Bei der Clusteranalyse findet ein Ordnen der gegebenen Objekte anhand aller vorgegebenen Variablen nach ihren Ähnlichkeiten statt. Dabei werden die Objekte so geclustert, dass Objekte eines Clusters ähnliche und Objekte verschiedener Cluster möglichst unähnliche Variablenwerte aufweisen [86]. Für die chemometrische Bewertung von umweltanalytischen Daten sind in der Literatur hauptsächlich Verfahren der hierarchischen, agglomerativen Clusteranalyse beschrieben [87, 88]. Daher werden auch nur diese im Folgenden näher erläutert.

Das Clusterimaging ergänzt die hierarchische, agglomerative Clusteranalyse. Sie gliedert sich in folgende Schritte [89]:

- Auswahl des Distanzmaßes und des Fusionierungsalgorithmus
- Clusteranalyse der Objekte
- Clusteranalyse der Variablen
- Sortieren der Datenmatrix X nach berechneten Ordnungen
- Visualisierung der sortierten Datenmatrix

Die Ausgangsdatenmatrix X besteht aus p Merkmalen und n Objekten. Vor der eigentlichen Anwendung der Clusteranalyse müssen die Originaldaten zunächst autoskaliert werden (Gleichung 3.9). Das ist erforderlich, um die Dimension der Variablen anzugleichen. Als Ergebnis liegt nun eine Datenmatrix Z vor, mit dem Mittelwert Null und der Standardabweichung Eins für jede Variable [90, 91a].

$$z_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)}{s_j} \quad i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, p \quad (3.9)$$

Das Verfahren der Clusteranalyse beginnt mit der Wahl des Distanzmaßes. Hierbei finden in Analogie zur MDS die EUKLIDISCHE, die CITY-BLOCK oder die MINKOWSKI-Metrik Anwendung. Ein weiteres häufig angewendetes Distanzmaß ist die QUADRIERTE EUKLIDISCHE Distanz. Bei ihr werden Objekte, die weiter auseinander liegen, stärker gewichtet als bei der EUKLIDISCHEN Distanz.

Auf die berechnete Distanzmatrix wird ein Fusionierungsalgorithmus angewendet. In der Literatur sowie in Statistikprogrammen existieren verschiedene Algorithmen [82, 89]. In dieser Arbeit wurde der Fusionierungsalgorithmus nach WARD gewählt (Gleichung 3.10). Er erzeugt in den meisten Fällen einfache interpretierbare Strukturen [92]. Durch ihn werden die Cluster so zusammengefasst, dass die Summe der Varianzen (Abstandsquadrate) innerhalb eines Clusters nach der Fusion möglichst wenig zunimmt. Die Homogenität des Clusters bleibt somit lange erhalten [93]. Das Ergebnis ist die Anordnung der Objekte oder der Merkmale nach ihren Ähnlichkeiten.

$$d(R, P + Q) = \frac{n_r + n_p}{N} \cdot d(R, P) + \frac{n_r + n_q}{N} \cdot d(R, Q) - \frac{n_r}{N} \cdot d(P, Q) \quad (3.10)$$

mit $d(R, P+Q)$ Distanz zwischen R und der neuen Gruppe $P + Q$
 $d(R,P)/(R,Q)/(P,Q)$ Distanz zwischen R und P / R und Q / P und Q
 n / N Zahl der Objekte / Gesamtobjektzahl

Das Clusterimaging ergänzt die Ergebnisse der Clusteranalyse [94]. Mit ihm ist es möglich, gleichzeitig die Anordnung der Objekte und Merkmale visuell darzustellen [95]. Hierzu verwendet man die Vorgaben der Clusteranalyse und ordnet die Datenmatrix Z neu an. Durch die Zuordnung von Farben für verschiedene Datenbereiche erfolgt die Visualisierung der sortierten Matrix. Die so erhaltenen Farbkarten können nun für die simultane Interpretation der Merkmals- und Objektordnung verwendet werden [95].

3.3 Faktorenanalyse

Die Faktorenanalyse ist ein Verfahren zur Dimensionserniedrigung. Man versucht die Merkmale, durch eine kleine Zahl von gemeinsamen Faktoren auszudrücken. Diesen Faktoren soll man Eigenschaften zuordnen können, die nicht direkt messbar sind [96a].

Analog zur Clusteranalyse werden autoskalierte Werte für die Berechnungen verwendet. Man unterscheidet bei der Faktorenanalyse zwischen gemeinsamen und merkmalseigenen Faktoren. Ein gemeinsamer Faktor liegt vor, wenn mindestens zwei seiner Ladungen von Null verschieden sind. Erfüllt nur eine Ladung dieses Kriterium, handelt es sich um einen merkmalseigenen Faktor. Daher ergeben sich zwei Matrizen, wobei die eine \mathbf{L} alle Ladungen der gemeinsamen Faktoren enthält (Anzahl d) und die zweite die Ladungen der merkmalseigenen Faktoren \mathbf{K} . Im Falle von orthogonalen Faktoren ergibt sich:

$$\mathbf{R}' = \mathbf{L}\mathbf{L}^T + \mathbf{K}\mathbf{K}^T \quad (3.11)$$

Die quadrierten Elemente der Matrix \mathbf{K} sind die merkmalseigenen Varianzen. Sie entsprechen der standardisierten Varianz, die sich nicht mit den gemeinsamen Faktoren erklären lässt. Ausgehend von der Ladungsmatrix \mathbf{L} , ergibt sich für orthogonale Faktoren eine reduzierte Korrelationsmatrix \mathbf{R} .

$$\mathbf{R} = \mathbf{L}\mathbf{L}^T = \mathbf{R}' - \mathbf{K}\mathbf{K}^T = \begin{pmatrix} h_1^2 & r_{12} & \mathbf{L} & r_{1p} \\ r_{12} & h_2^2 & & r_{2p} \\ \mathbf{M} & & & \\ r_{1p} & & & h_p^2 \end{pmatrix} \quad (3.12)$$

Die Größen h_j^2 stellen die Kommunalitäten dar. Sie geben an, welcher Anteil des j -ten standardisierten Merkmals durch gemeinsame Faktoren erklärt wird. Sie sind empirisch bekannt oder werden aus den multiplen Korrelationskoeffizienten geschätzt [96a].

Das erste Problem der Faktorenanalyse steht in der Schätzung der Ladungsmatrix \mathbf{L} . Hierzu existieren zahlreiche Verfahren, wobei im Folgenden nur kurz auf die Hauptfaktorenanalyse eingegangen wird. Zunächst schätzt man aus der Korrelationsmatrix die

Kommunalitäten der p Merkmale. Danach reproduziert man die reduzierte Korrelationsmatrix \mathbf{R} und löst von dieser das Eigenwertproblem:

$$\mathbf{R} \mathbf{V} = \mathbf{V} \mathbf{L} \quad (3.13)$$

Die Matrix der Eigenvektoren \mathbf{V} liefert die Ladungsmatrix \mathbf{L} . Für die Bewertung der Objekte ist das Berechnen einer Faktorwertmatrix \mathbf{F} notwendig:

$$\mathbf{F} = \mathbf{X} \mathbf{L} \quad (3.14)$$

Man muss beachten, dass bei der Faktorenanalyse im engeren Sinn keine eindeutige Faktorwertmatrix angegeben werden kann, da nur die reduzierte Korrelationsmatrix verwendet wird [96a].

Um eine bessere Interpretierbarkeit der Faktoren zu erhalten, wendet man eine Faktorrotation an. Bei dem verwendeten Varimaxkriterium wird die Varianz der Ladungen innerhalb eines gemeinsamen Faktors variiert. Es sollen dabei gemeinsame Faktoren erhalten werden, die durch möglichst wenige Merkmale beschrieben werden. Es kommt zur Erhöhung großer Eigenwerte und Ladungen und zur Erniedrigung kleiner [96a]. Die Zahl der signifikanten Faktoren wird mittels dem Kaiser-Kriterium bestimmt, nachdem alle Faktoren mit einem Eigenwert von größer Eins zu verwenden sind [97].

3.4 Lineare Diskriminanzanalyse

Das Ziel der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) ist die optimale, lineare Separation der gegebenen Gruppen. Diese Separation erfolgt vor allem im Hinblick auf eine spätere Klassifikation, kann aber auch davon losgelöst betrachtet werden. Man berechnet eine Ebene bzw. Hyperebene so, dass die Varianz zwischen den Klassen maximiert und innerhalb der Klassen minimiert wird [96b].

Die mathematische Grundlage der LDA ist das Lösen eines Eigenwertproblems. Ausgehend von einer Datenmatrix X mit n Objekten und p Merkmalen und g verschiedenen Gruppen ermittelt man die Gewichte der linearen Diskriminanzfunktion als Eigenvektoren:

$$\mathbf{G}^{-1}\mathbf{H}\mathbf{w} = \mathbf{1}\mathbf{w} \quad (3.15)$$

Die Matrix \mathbf{G} ergibt sich aus der Kovarianzmatrix \mathbf{C} der verschiedenen Klassen g nach:

$$\mathbf{G} = (n - g)\mathbf{C} = (n - g)\frac{1}{n - g}\sum_{j=1}^g (n_j - 1)\mathbf{C}_j \quad (3.16)$$

$$\mathbf{C}_i = \frac{1}{n_j - 1}\sum_{l \in g_j} (x_{li} - \bar{x}_{ji})(x_{lk} - \bar{x}_{jk}) \quad (3.17)$$

mit: n Gesamtzahl der Objekte
 n_j Zahl der Objekte in Gruppe j
 $l \in g_j$ Index l ist ein Element der j -ten Gruppe

Die Matrix \mathbf{H} beschreibt die Varianz der Gruppenmittelwerte um den Gesamtmittelwert.

$$\mathbf{H} = \sum_{j=1}^g n_j (\bar{x}_j - \bar{x})(\bar{x}_j - \bar{x})^T \quad (3.18)$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^g n_j \bar{x}_j \quad (3.19)$$

Der Eigenvektor \mathbf{w}_1 wird auf der Basis des größten Eigenwertes λ_1 gefunden. Er liefert die erste lineare Diskriminanzfunktion s_1 .

$$s_1 = w_{11}x_1 + \mathbf{L} + w_{1p}x_p \quad (3.20)$$

Mit den Residualwerten der Matrix \mathbf{X} berechnet man den zweitgrößten Eigenwert. Mittels des zweiten Eigenvektors erhält man die zweite Diskriminanzfunktion. Dieses Verfahren setzt man so lange fort, bis alle Diskriminanzfunktionen zur Lösung des Klassifizierungs-

problems gefunden wurden. Eine Visualisierung der Trennung der Objekte erreicht man durch Auftragen der Diskriminanzfunktionen gegeneinander [96b].

Unbekannte Objekte können klassifiziert werden, indem man die Merkmalswerte in die Diskriminanzfunktion einsetzt. Dadurch erfolgt eine Transformation der Koordinaten analog der Modellerstellung. Die Zuordnung des Objektes zu einer Klasse erfolgt nach dem kürzesten euklidischen Abstand des Objektes zum Klassenschwerpunkt [96b].

3.5 Partial-Least-Squares-Regression

Die Partial-Least-Squares-Regression (PLS) ist eine Methode der multivariaten Kalibration. Bei ihr haben sowohl die Y - als auch die X -Matrix aktiven Einfluss auf die Berechnungen. Beide Matrizen werden in zwei kleinere Matrizen zerlegt und zwar so, dass die Kovarianz zwischen den beiden Matrizen der latenten Variablen maximiert wird [96c]:

$$X = TP^T + E_x \quad (3.21)$$

$$Y = UQ^T + E_y \quad (3.22)$$

wobei:
$$U = AT + E_u \quad (3.23)$$

mit:

X, Y	Matrix der unabhängigen/abhängigen Variablen
T, U	Matrizen der latenten Variablen
P, Q	Matrizen der Ladungen
E	Residuenmatrizen
A	Matrix der Regressionsparameter

Die Berechnung der latenten Variablen erfolgt nach einem iterativen Prozess. Dadurch ist ihre Anwendung nicht auf Datensätze mit mehr Variablen als Objekten begrenzt [96c].

Da es sich um eine multivariate Kalibrationsmethode handelt, muss man das berechnete Modell validieren. Man verwendet dazu Testdatensätze bzw. setzt die Kreuzvalidierung ein. Aus den vorhergesagten Konzentrationen lässt sich der *RMSEP* (Root Mean Square Error of Prediction) aus dem *PRESS* (Prediction Error Sum of Squares) berechnen.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad (3.24)$$

mit: y_i vorhergesagter Wert
 \bar{y} zertifizierter Wert

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (3.25)$$

mit: n_v Zahl der Vorhersagen

Dieses Gütemaß gibt die Zuverlässigkeit von Analysenergebnissen an, da allein durch Richtigkeit und Präzision ein niedriger *RMSEP* erreicht werden kann. Möchte man verschiedene Modelle miteinander vergleichen, ist es notwendig, den *RMSEP* zu normalisieren [91b].

$$RMSEP_{norm} = \frac{RMSEP}{s_c} \quad (3.26)$$

Die Anzahl der zu verwendenden latenten Variablen bestimmt man mittels *RMSEP* [98]. Man verwendet so viele latente Variablen, bis sich der *RMSEP* nicht mehr signifikant verbessert.

3.6 Künstliche Neuronale Netze

Man bezeichnet informationsverarbeitende Systeme, die aus einer großen Anzahl einfach aufgebauter Verarbeitungseinheiten, den so genannten Neuronen bestehen, als Künstliche Neuronale Netze (Artificial Neural Networks, ANN). Die Neuronen senden sich Signale über gerichtete Verbindungen zu. Bei den ANN handelt es sich um stark idealisierte Modelle biologischer Nervensysteme, die problembezogen konstruiert werden [99, 91c].

Entstehungsphasen

Bei ihrer Entstehung werden drei Phasen durchlaufen: die Trainingsphase, die Testphase und die Anwendungsphase [100]. In der Trainingsphase werden repräsentative Lerndaten verwendet, um ein Modell zu erzeugen. Am Ende dieser Phase sollten alle Daten vom

Modell richtig interpretiert werden, denn nur dann hat das Netz richtig gelernt. Mit bekannten Daten, die jedoch nicht zur Modellbildung genutzt worden sind, wird das ANN in der Testphase überprüft. Wenn diese Daten richtig interpretiert werden, kann man von der Richtigkeit des Modells ausgehen. Bei Falschinterpretationen müssen weitere Daten für die Lernphase bereitgestellt werden. Bei der Anwendungsphase verlässt man sich auf die Richtigkeit des ANN (regelmäßig überprüfen!). Neue Daten werden interpretiert.

Bestandteile eines ANN

Folgende Komponenten (Einheiten) charakterisieren ein ANN [91c, 101]:

- Neuronen (Zellen, Prozessoreinheiten) mit Bestandteilen
 - ein /mehrere Eingänge; ein Ausgang
 - Aktivierungszustand /Aktivierungsfunktion
 - Ausgabefunktion
- Gewichte
 - Geben die Stärke der gerichteten Verbindungen zwischen den Neuronen an.
- Propagierungsfunktion (*Net*)
 - Sie gibt an, wie sich der Signalinput eines Neurons berechnet.
- Lernregel
 - Ist ein Algorithmus, mit dem die Parameter des ANN in der Art verändert werden, dass für Netzeingaben adäquate Netzausgaben erzeugt werden.

Die Propagierungsfunktion *Net* berechnet sich aus den Ausgaben *O*, der anderen Neuronen und den Gewichten *W* meist durch:

$$Net_i(t) = \sum_{j=1}^k O_j W_{ji} \quad (3.27)$$

Der Aktivierungszustand eines Neurons *i* ergibt sich zu der Zeit *t* + 1 (Iterationsschritt) nach:

$$A_i(t + 1) = f_{act}(A_i(t), Net_i(t), (\mathbf{q}_i)) \quad (3.28)$$

mit: f_{act} Aktivierungsfunktion
 Net Propagierungsfunktion
 θ Schwellenwert

Durch die Ausgangsfunktion f_{out} wird die Ausgabe O des Neurons i berechnet (3.29). Häufig wählt man für die Ausgangsfunktion die Propagierungsfunktion. Dadurch können die Aktivierungs- und die Ausgabenfunktion zusammengefasst werden (3.30).

$$\begin{aligned} O_i(t) &= f_{out}(A_i(t)) \\ O_i(t) &= f_{act}(Net_i(t)) \end{aligned} \quad (3.29)/(3.30)$$

Netz-Arten

Man kann die ANN anhand ihrer Linearität unterteilen. Im Folgenden wird kurz auf die Mehrschichtigen Perceptron Netze (MLP) als lineare und zum anderen auf Radial-Basis-Function-Netze (RBF) als nichtlineare Methode eingegangen.

Bei den Mehrschichtigen Perceptrons (multilayer perceptrons) sind die Neuronen in mehreren Schichten angeordnet. Dadurch kann die Leistungsfähigkeit gegenüber einschichtigen Perceptronen erheblich gesteigert werden. Standardmäßig sind alle Neuronen einer Schicht über Gewichte mit allen Neuronen der folgenden Schicht verbunden. Eine Verbindung zu Neuronen der zurückliegenden Schicht ist ausgeschlossen. Die Neuronen in den verdeckten Schichten, die keine Verbindung nach außen besitzen, heißen verdeckte oder innere Neuronen. Die Bestimmung dieser Netze erfolgt mit der Backpropagation (Generalisierung der Delta-Regel) [101].

Bei der Backpropagation werden zwei Netzdurchläufe definiert. Zunächst erfolgt ein Vorwärtsthroughlauf von der Eingabeschicht zur Ausgabeschicht, während im Anschluss der Durchlauf in umgekehrte Richtung stattfindet. Eine Einheit der verdeckten Schicht überträgt während des Vorwärtsthroughlaufes eine Aktivierung an die Einheiten der Ausgabeschicht. Beim Rückwärtsthroughlauf empfängt die Einheit der verdeckten Schicht

Fehlersignale von den Einheiten der Ausgangserschicht. Das Ziel des Trainings besteht in einer kurzen und effektiven Bestimmung der Gewichte [102].

Bei den RBF-Netzen wird die Möglichkeit genutzt, nichtlineare Zusammenhänge durch eine Linearkombination von Basisfunktionen zu modellieren. Radiale Funktionen besitzen Funktionswerte, die von einem Zentralpunkt aus monoton ansteigen oder abfallen (z.B. Cauchy-Funktion, modifizierte Gaußfunktion). Analog zu den MLP sind die Neuronen in mehreren Schichten angeordnet, wobei die RBF-Netze gewöhnlich nur eine verdeckte Schicht besitzen. In der Trainingsphase werden die Gewichte und Funktionen so gewählt, dass die Abweichungen der berechneten Funktionen zu den Stützstellen (Neuronen der verdeckten Schicht) ein Minimum werden [91c, 101].

3.7 Support-Vektor-Maschinen

Die Support-Vektor-Maschinen (SVM) werden vor allem zur binären Klassifikation eingesetzt [103]. Es handelt es sich bei ihnen um flexible einsetzbare lineare und nicht-lineare Regressoren [104].

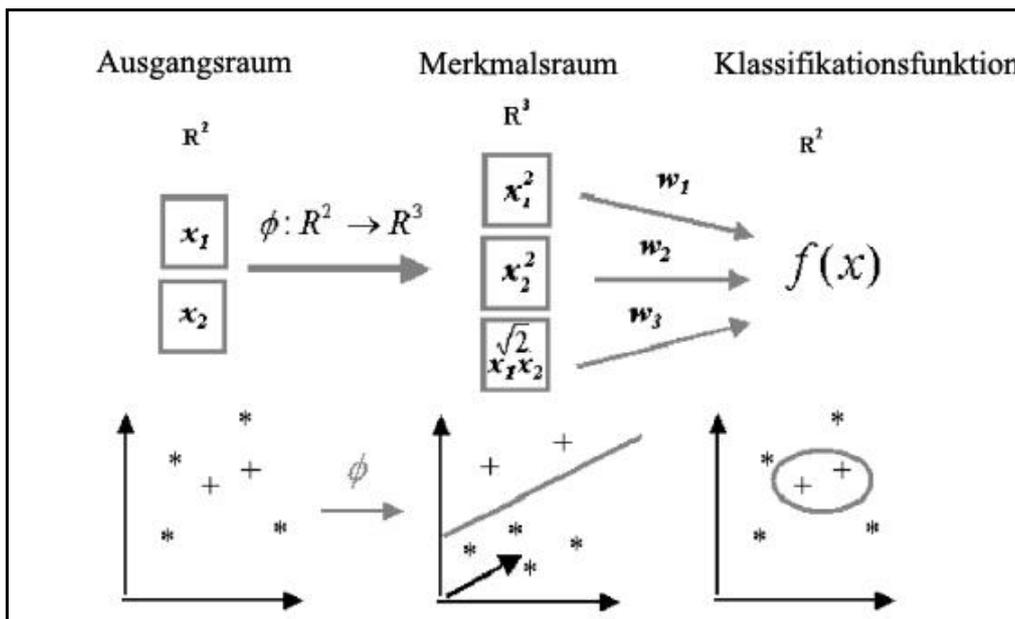


Abb. 3.2: Prinzip der SVM nach [105]

In Abb. 3.2 wird das Prinzip der SVM verdeutlicht. Man erkennt die Transformation des Ausgangsdatensatzes in den hier dreidimensionalen Merkmalsraum. Dort erfolgt die Konstruktion einer optimalen Hyperfläche (mit maximalem Trennungstreifen). Transformiert man nun zurück, erhält man die Hyperfläche im Ausgangsdatensatz.

Verwendet man Kernfunktionen, ist es möglich, die Hyperfläche ohne direkte Transformation in den Merkmalsraum zu berechnen [105]. Des Weiteren legt man eine Fehlergrenze ϵ fest. Ist ein Fehler kleiner als ϵ , dann wird er nicht als Fehler bewertet, während Eingangsdatenpunkte, die einen Fehler größer als ϵ produzieren, die Support-Vektoren (SV) darstellen. Sie werden als Parametervektoren für die nichtlineare Regression benutzt [104].

Mathematische Hintergründe der Support-Vektor-Maschinen

Alle in diesem Kapitel dargestellten mathematischen Grundlagen beziehen sich auf ZOMER et al. [105] und [106]. Für begrenzte Datensätze sind die SVM eine ideale Klassifizierungsmethode, denn durch die Einführung der Vapnik-Chervonenkis-Dimension (VC-Dimension, d_{vc}) reduzieren sie das sonst weit verbreitete Problem des "Overfitten".

Die VC-Dimension ist die Anzahl an Parametereinstellungen für eine Funktion, so dass alle möglichen Kombinationen von Klassen für diese Daten unterschieden werden können. Die praktische Anwendung der d_{vc} gestaltet sich als schwierig, da sie nur für wenige Funktionen (z. B.: lineare) bekannt ist. Sie lässt sich jedoch aus empirischen Messungen errechnen. Mit Hilfe der d_{vc} ergibt sich eine obere Schranke für die Genauigkeit:

$$\mathbf{e}_{\infty} \leq \mathbf{e}_N + \sqrt{\frac{d_{vc} \left(\log \left(\frac{2N}{d_{vc}} \right) + 1 \right) - \log \frac{h}{4}}{N}} \quad (3.31)$$

mit: $\mathbf{e}_{\infty/N}$ Fehler für unendlich-viele / N Proben
 d_{vc} Vapnik-Chervonenkis-Dimension
 N Probenzahl
 $(1-\eta)$ Wahrscheinlichkeit

Die SVM klassifizieren mittels Hyperebenen. Dadurch ergibt sich in Form eines Randes (Margin) eine Begrenzung von d_w . Das Optimierungsproblem stellt das Maximieren des Margins und somit der LAGRANGE-Funktion dar:

$$L_D = \sum_i k_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j} k_i k_j y_i y_j x_i' x_j \quad (3.32)$$

mit: x generierter Datenvektor
 y_i Werte (+1/-1) der Klasse
 κ LAGRANGE-Multiplikatoren

Nur für die SV besitzen die LAGRANGE-Multiplikatoren Werte verschieden von Null. Je höher κ , desto höher ist der Einfluss des SV auf die Grenze zwischen den Klassen.

Mit dem Parameter C legt man fest, welche Vektoren als SV verwendet werden. Somit beeinflusst man die Genauigkeit des Modells. Wählt man ein sehr großes C , so minimiert man den Trainingsfehler, berechnet jedoch ein Modell mit geringerer Verallgemeinerbarkeit:

$$0 \leq k_i \leq C \quad (3.33)$$

Die trennende Hyperebene lässt sich wie folgt beschreiben:

$$xw + b = 0 \quad (3.34)$$

wobei w und b gegeben sind durch:

$$w = \sum_i^{N_s} k_i y_i s \quad (3.35)$$

$$b = \frac{1}{y_i} - \sum_{j=1}^{N_s} k_j y_j x_j s_i \quad (3.36)$$

mit: N_s Anzahl der SV
 s generierter SV
 s_i SV mit $\kappa < C$

Die Klassifikation unbekannter Objekte erfolgt über:

$$y = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^{N_S} k_i y_i s_i x_i + b\right) \quad (3.37)$$

Der Einsatz von Kernfunktionen führt dazu, dass in einem höherdimensionalen Raum eine Hyperfläche mit kleinstmöglichem Klassifikationsfehler berechnet werden kann. Die Kernfunktion ist definiert als:

$$K(x_i, x_j) = \Phi(x_i) \Phi(x_j) \quad (3.38)$$

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Kernfunktionen. Die in der Praxis am häufigsten angewendeten sind:

$$\text{Gaussian: } K(x_i, x_j) = \exp\left(-\frac{\|x_i - x_j\|^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.39)$$

$$\text{Polynomial: } K(x_i, x_j) = (x_i x_j + q)^b \quad (3.40)$$

$$\text{Sigmoidal: } K(x_i, x_j) = \tanh(x(x_i x_j) + q) \quad (3.41)$$

Die Größen σ , ζ und θ stellen vom Anwender selbst zu wählenden Konstanten der jeweiligen Kernfunktionen dar.

Somit ergibt sich als Optimierungsproblem folgende LAGRANGE-Gleichung:

$$L_D = \sum_i k_i - \frac{1}{2} \sum k_i k_j y_i y_j K(x_i, x_j) \quad (3.42)$$

In Gleichung 3.42 ist das Skalarprodukt von $x \cdot x$ (Gleichung 3.32) durch die Kernfunktion ersetzt. Man erhält somit eine rechen-technisch behandelbare Funktion. Für praktische Anwendungen lässt sich keine analytische Lösung mehr finden, daher muss die Optimierung numerisch durchgeführt werden.

4 Experimentelles

4.1 Probennahme

Während des Zeitraumes Oktober 2003 bis November 2005 fanden systematische Untersuchungen an speziell gezüchteten Biofilmproben statt. Im Jahr 2006 wurden Biofilme, die auf natürlichen Substraten aufgewachsen sind, analysiert. Es erfolgte stets die Probenahme von Biofilm und zugehöriger Wasserprobe.

4.1.1 Systematische Züchtung von Biofilmen

Um die Anreicherung von Metallen in Biofilmen charakterisieren zu können, ist es notwendig, verschiedene Einflussfaktoren systematisch zu untersuchen. Die Art des Gewässers ist einer dieser Faktoren. Die Biofilme wurden in einem anthropogen belastetem Fließgewässer und in einem stehenden Gewässer gezüchtet. Als exemplarisches Beispiel für das Fließgewässer wurde die Saale, die hinsichtlich ihrer Belastungen hervorragend untersucht ist, gewählt [20]. Sie durchfließt mehrere geologische Zonen und verschiedene Belastungszonen. Die Züchtung der Biofilme erfolgte in Kunitz (Abb. 4.1). Diese Stelle spiegelt die charakteristischen Belastungen einer Großstadt wider, da sie sich kurz hinter (flussabwärts) Jena befindet.



Abb. 4.1: Lage der Probennahmestelle Kunitz ()

(Quelle: www.pitfax.de/luftbilder/kunitz.php; 03.01.07)

Die Saale hat an dieser Stelle eine Tiefe von etwa 1,5 m und fließt langsam. Daher ist das

Einbringen einer Apparatur zur Züchtung der Biofilme möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Probennahmestelle ist ihre Abgeschlossenheit. Dadurch sind die Untersuchungen nahezu ungestört durchführbar. Abb. 4.2 zeigt die Probennahmestelle in Kunitz.



Abb. 4.2: Probennahmestelle in Kunitz

Als exemplarisches Beispiel für ein stehendes Gewässer wurde ein Gartenteich im Stadtgebiet von Jena gewählt (Abb. 4.3). Dieser Teich wird jedes Jahr im Frühjahr gereinigt und mit Wasser aus dem Gemdenbach gefüllt. Es handelt sich somit um ein stehendes Gewässer mit natürlichem Wasserkörper. Seine Tiefe beträgt etwa 0,75 m. Der Teich ist der Lebensraum für mehrere Goldfische und verschiedene Pflanzen.

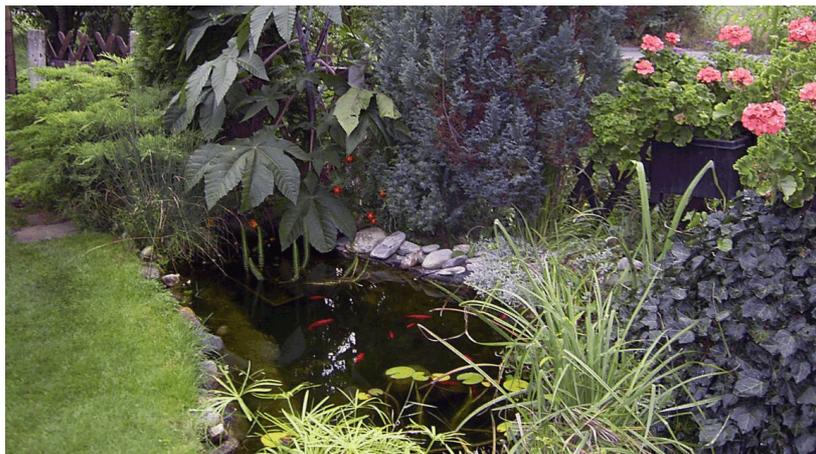


Abb. 4.3: Gartenteich

Für das Biofilmwachstum hat die Aufwuchsdauer einen entscheidenden Einfluss [18]. Daher wurde sie systematisch variiert. Dass auch die Jahreszeiten einen Einfluss auf die Bildung von Biofilmen haben, wurde von EITNER gezeigt [107]. Die Biofilme sind somit in allen vier Jahreszeiten gezüchtet worden. FRIESE et al. haben gezeigt, dass das Substrat

einen entscheidenden Einfluss auf die Elementgehalte des Biofilms besitzt [108]. Durch den Einsatz einer Probennahmebox, konnte diese Einflussgröße beseitigt werden. Es kam eine Box aus Polypropylen zum Einsatz, in der acht Polycarbonatplatten parallel angeordnet waren (Abb. 4.4). Diese Vorrichtung wurde so installiert, dass sich die Polycarbonatplatten senkrecht und etwa 0,20 m unter der Wasseroberfläche befanden. In der Saale erfolgte die Ausrichtung der Platten in Fließrichtung.



Abb. 4.4: Probennahmebox

Während der ersten Probennahmekampagne (2003) wurden wöchentlich Wasserproben entnommen. Durch die Analyse der Elementgehalte konnte gezeigt werden, dass keine wesentlichen Gehaltsänderungen stattfanden. Aus diesen Ergebnissen resultierte für die folgenden Chargen ein zweiwöchiger Beprobungsrhythmus.

Parallel zur Wasserprobennahme wurden Wassertemperatur, pH-Wert, Leitfähigkeit, Salzgehalt und Redoxpotenzial als Vor-Ort-Parameter bestimmt. Anwendung fanden hierbei die SenTix Redox-Messkette und das Taschen-pH-Meter pH 330i, jeweils von der Firma WTW. Die Funktionstüchtigkeit (Richtigkeit) der verwendeten Messgeräte wurde vor den Messungen jeweils mit den geeigneten Validierungslösungen geprüft.

Für den gesamten Probennahmezeitraum sind vom Institut für Geographie der FSU Jena die Wetterdaten (Sonnenscheindauer, Temperatur, Niederschlag) zur Verfügung gestellt worden.

Kennzeichnung der Biofilmproben

Tab. 4.1 enthält eine Übersicht über alle Biofilmproben mit ihren Aufwuchsdauern und den entsprechenden Jahreszeiten, wobei die Kennzeichnung der Proben nach folgendem Prinzip erfolgte:

Gewässer Charge - Serie

wobei:

Gewässer:	T	Teich
	S	Saale
Charge:	2003	1
	2004	2
	2005	3
Serie:	Durchnummerieren der gezüchteten Biofilme	

Tab. 4.1: Übersicht der gezüchteten Biofilmproben

Probe	Aufwuchsdauer in Wochen	Jahreszeit	Probe	Aufwuchsdauer in Wochen	Jahreszeit
S/T 1-1	3	Herbst	S 3-2	12	Sommer
S/T 1-2	5	Herbst	T 3-1	2	Frühling
S/T 1-3	7	Winter	T 3-2	4	Frühling
S/T 2-1	6	Frühling	T 3-3	6	Frühling
S 2-2	6	Frühling	T 3-4	8	Frühling
T 2-3	4	Frühling	T 3- I	6	Frühling
T 2-3	2	Frühling	T 3-5	2	Sommer
S 2-3	6	Sommer	T 3-6	4	Sommer
S/T 2-4	6	Sommer	T 3-7	6	Sommer
T 2-5	6	Sommer	T 3-8	8	Sommer
S 2-5	6	Herbst	T 3-9	2	Sommer
T 2-6	6	Herbst	T 3-10	4	Sommer
S 3-1	6	Frühling	T 3-11	6	Herbst
S 3-2	6	Sommer	T 3-12	8	Herbst

4.1.2 Biofilme von natürlichen Substraten

Beim zweiten Teil der charakterisierten Biofilmproben handelt es sich um solche, die auf natürlichen Substraten, wie beispielsweise Steinen im Flussbett, Holzbalken von Brücken oder Betonwänden in Hafenbecken aufgewachsen sind. Die Proben stammen aus den verschiedensten Regionen der Welt. Ihre Auswahl erfolgte anhand der Realisierbarkeit der Probennahme, das heißt in diesem Falle das Vorhandensein eines geeigneten Probennehmers.

Durch die Verwendung natürlicher Substrate können keinerlei Aussagen über die Aufwuchsdauer getroffen werden. Die charakterisierten Proben werden daher nach der Art ihres Ursprungsgewässers geordnet. Daraus resultiert die Einteilung in stehendes Gewässer, fließendes Gewässer und Meer.

Die Biofilmproben wurden direkt vor Ort mittels eines Kunststoffspatels in eine Polypropylenflasche überführt und die entsprechenden Wasserproben ebenfalls in PP-Flaschen abgefüllt. Dabei war es nicht möglich, die Bestimmung der Vor-Ort-Parameter zu realisieren. Das Tiefkühlen der Proben sofort nach der Probennahme konnte nicht gewährleistet werden (notwendig für mikrobiologische Untersuchung), daher wurden für diese Proben nur die chemischen Parameter bestimmt. Tab. 4.2 gibt einen Überblick über die Biofilmproben von natürlichen Substraten.

Tab. 4.2: Biofilmproben von natürlichen Substraten

Ort (Land)	Gewässer	Gewässertyp
Damp (D)	Ostsee	Meer
Mallorca (E)	Mittelmeer	Meer
Nin (C)	Mittelmeer	Meer
Punta Skala (C)	Mittelmeer	Meer
Steinbeck (D)	Ostsee	Meer
Travemünde I (D)	Ostsee	Meer
Travemünde II (D)	Ostsee	Meer
Autobahnkreuz:Erfurt (D)	Autobahnrückflussbecken	stehendes Gewässer
Autobahnkreuz: Rippachtal (D)	Autobahnrückflussbecken	stehendes Gewässer
Bossow (D)	Krakower See	stehendes Gewässer
Chemnitz (D)	Gartenteich	stehendes Gewässer
Metebach (D)	Feuerlöschteich	stehendes Gewässer
New Hampshire (USA)	White Oak Pond	stehendes Gewässer
Juquitiba (Bra)	São Lourenço	fließendes Gewässer
Falken (D)	Folgenbach	fließendes Gewässer
Oberpöllnitz (D)	Pöllnitzbach	fließendes Gewässer
Celle 1 (D)	Aller	fließendes Gewässer
Celle 2 (D)	Aller	fließendes Gewässer
Geithain (D)	Bach	fließendes Gewässer
New York (USA)	Hudson River	fließendes Gewässer
Lauscha (D)	Lauscha	fließendes Gewässer
Lauscha (D)	Obermühle	fließendes Gewässer
Lauscha (D)	Steinach	fließendes Gewässer
London (GB)	Themse	fließendes Gewässer
Wegscheid-Lenggrieß (D)	Quelle	fließendes Gewässer

4.2 Probenvorbereitung

Wasserproben

Für die Bestimmung der chemischen Parameter erfolgte zunächst die Konservierung mit drei Tropfen konzentrierter Salzsäure und das Abtrennen der Schwebstoffe über einen Filter (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die Proben wurden bis zur Analyse im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen sind zur Lagerung tiefgekühlt (-20 °C) worden.

Biofilmproben

Die mit Biofilm bewachsenen Polycarbonatplatten wurden im jeweiligem Wasser ins Labor transportiert. Aus Abb. 4.5 ist zu erkennen, dass sich die Biofilme aus Saale und Teich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

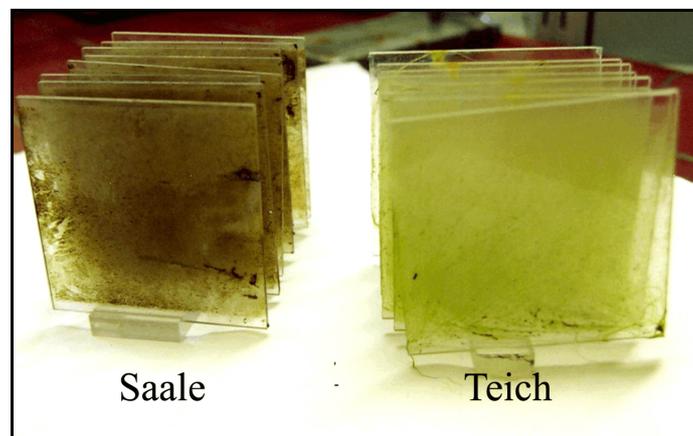


Abb.4.5: Biofilme gezüchtet auf Polycarbonatplatten

Im folgenden sind REM-Aufnahmen der gezüchteten Biofilme dargestellt. Sehr deutlich ist, die ungleichmäßige Verteilung des Biofilmbewuchses zu erkennen (Abb. 4.6). Es existieren Bereiche mit sehr starkem und Bereiche mit eher spärlichem Bewuchs. Durch die Probenvorbereitung (aufsteigende Alkoholreihe) wird dem Biofilm das gesamte Wasser entzogen. In den REM-Aufnahmen ist, die EPS somit nur noch als eine Art Netz zu erkennen (Abb. 4.7). Die REM-Untersuchungen wurden im Elektronenmikroskopischen Zentrum des Klinikums der FSU Jena durchgeführt.

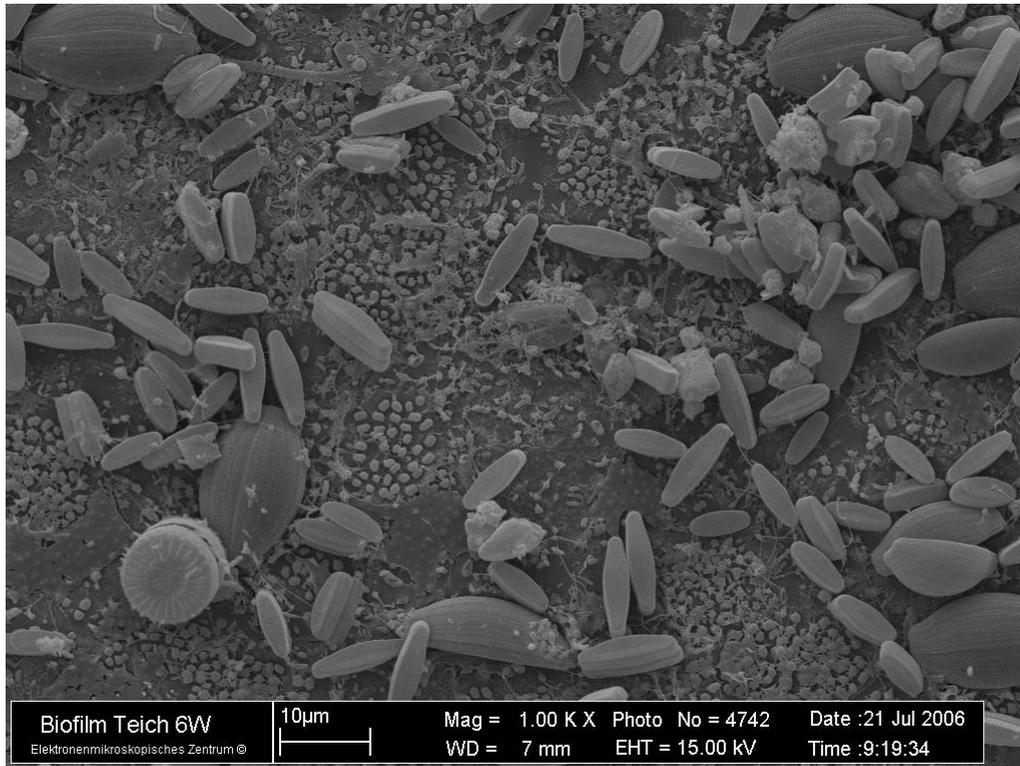


Abb. 4.6: REM-Aufnahme eines Biofilms aus dem Teich

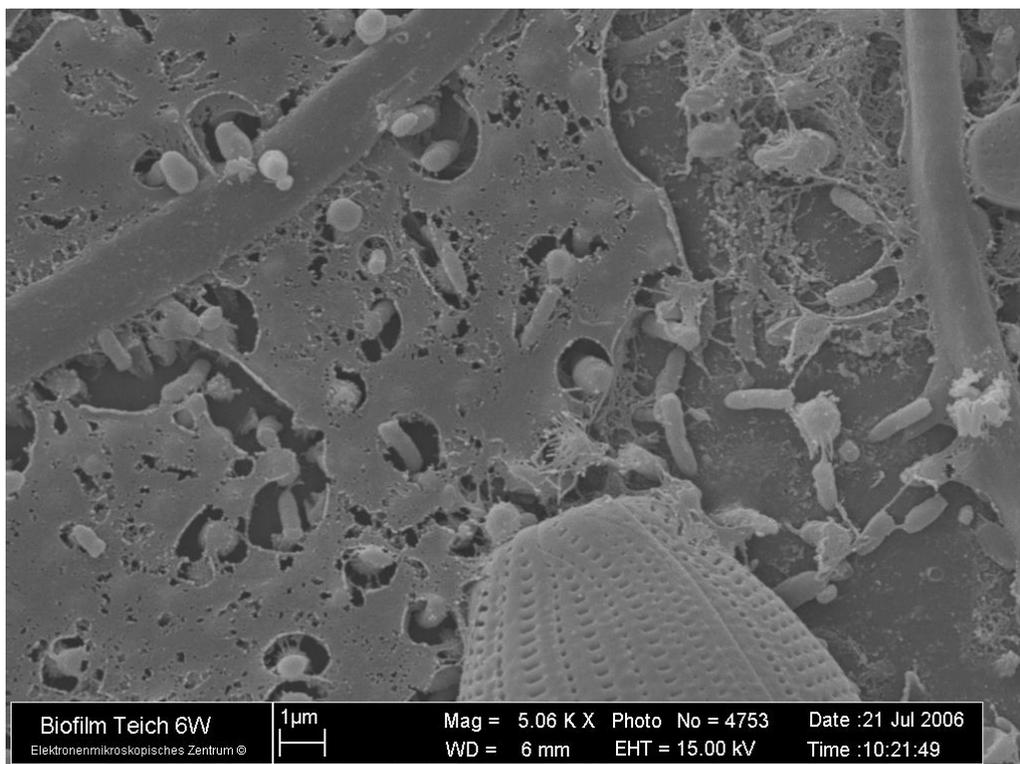


Abb. 4.7: REM-Aufnahme Biofilm: EPS-Netzwerk

Für die Bestimmung der chemischen Parameter wurden die auf Polycarbonatplatten gezüchteten Biofilme im Labor mit einem Teflonspatel abgekratzt und in eine Polypropylenflasche überführt. Die Biofilme sind im Trockenschrank bei 110°C bis zur Massekonstanz getrocknet worden (etwa eine Woche). Die getrockneten und gemörserten Proben wurden in fest verschlossenen Probengefäßen (Schutz vor Luftfeuchtigkeit) bei Raumtemperatur gelagert.

In den Biofilmproben sollten die Elementgehalte mittels optischer Emissionsspektrometrie bzw. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma bestimmt werden. Um diese Analysenmethoden nutzen zu können, war es erforderlich, die feste Ausgangsprobe in eine flüssige Messprobe zu überführen. Es wurde sich für einen Aufschluss mit Perchlorsäure entschieden. In 5 ml Teflongefäße sind 10 bis 50 mg Biofilmpulver eingewogen und 3 ml konzentrierter Perchlorsäure zugeben worden. Nachdem die Suspension 15 min bei Raumtemperatur stand, ist sie solange erhitzt worden (kein Sieden), bis sich eine klare, durchsichtige Lösung gebildet hat (etwa 2 bis 3 Stunden). Anschließend wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 5 ml aufgefüllt und im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Für die mikrobiologische Untersuchung wurden Suspensionen vom Biofilm mit sterilem Wasser (8 ml) hergestellt. Die Lagerung aller Biofilm-Wasser-Suspensionen erfolgte im Tiefkühlschrank bei -20 °C.

4.3 Analytische Messung chemischer Parameter

4.3.1 Elementanalytik

Elementaranalyse

Die von den Mikroorganismen produzierte EPS besteht im wesentlichen aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel. Da Mikroorganismen eine individuelle EPS erzeugen, sollten sich die Gehalte dieser Elemente für verschieden Arten von Biofilmen unterscheiden. Das wurde mittels Elementaranalyse der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel im Institut für Organische und Makro-

molekulare Chemie der FSU Jena untersucht.

Spektrometrie

Die Wasserproben sowie die Aufschlusslösungen wurden mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES; Maxim 112 der Firma Fisons Instruments) und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma als Ionisierungsquelle (ICP-MS; Elan 6000 der Firma Perkin Elmer) analysiert. Die Anwendung von Multielementmethoden war notwendig, da 17 Elemente bestimmt werden sollten: Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Se, Sr und Zn. Die Elementauswahl berücksichtigt essenzielle (z.B. Fe) sowie nichtessenzielle (z.B. Al) Elemente [63].

Für die Messungen am ICP-OES wurde an jedem Messtag die Wellenlängenkalibrierung mit einer Lösung, die je 10 µg/ml Zn [bei $\lambda = 213,857$ nm], Cu [bei $\lambda = 324,754$ nm] und K [bei $\lambda = 766,488$ nm] enthielt, überprüft. Vor jeder Messreihe wurde neu kalibriert. Alle Proben wurden 1:10 (V:V) verdünnt und durch Doppelbestimmung charakterisiert. In Tab. 4.3 sind die mittels ICP-OES analysierten Elemente und ihre Analysenlinien angegeben. Kursiv geschriebene Elemente sind nur in den Biofilmproben analysiert worden.

Tab. 4.3: Messwellenlängen (ICP-OES)

Element	Wellenlänge in nm	Element	Wellenlänge in nm
<i>Al</i>	308,216	Mg	279,552
Ca	396,849	<i>Mn</i>	257,611
<i>Fe</i>	259,939	Na	589,001
K	766,488	Sr	407,771

In der Massenspektrometrie stehen mehreren Isotopen zur Verfügung. Das geeignetste ist durch Vorversuche und durch Analysen von zertifiziertem Referenzmaterial ermittelt worden. Die Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z), die Häufigkeiten der Isotope sowie mögliche Interferenzen können Tab. 4.4 entnommen werden. Auf Grund der relativ geringen Auflösung, die man mit Quadrupolgeräten erreicht, muss besonders auf spektrale Interferenzen geachtet werden.

Tab. 4.4: Ausgewählte Messisotope mit ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis, den Häufigkeiten der Isotope in Prozent und möglichen Interferenzen (kursiv: nur in den Wasserproben bestimmt)

Element	m/z	H	Interferenzbeispiele	Element	m/z	H	Interferenzbeispiele
<i>Al</i>	27	100	<i>BeO, CO, CN</i>	Zn	68	19	VO, ClO ₂ , Ba ²⁺
P	31	100	SiH, NO, NOH	Se	82	9	Kr, Ar ₂ H, BrH
Cr	52	84	SO, ArO, ArC	Cd	112	24	Sn, ZrO, MoO
<i>Mn</i>	55	100	<i>HClO, ArN, ClO</i>		113	12	In, MoO
<i>Fe</i>	57	2	<i>CaO, ArO</i>		114	29	Sn, MoO
Co	59	100	CaO	Pb	206	24	Hg, WO
Ni	60	26	CaO		207	22	
Cu	63	69	TiO, PO ₂		208	52	
	65	31	TiO, PO ₂ , Ba ²⁺				

Für Messungen am ICP-MS sind an jedem Messtag die folgenden Parameter optimiert worden: Linsenspannung, Oxidrate (< 3%), Anteil an doppelt geladenen Ionen (< 2%), Zerstäubergasfluss (0,85 - 0,90 L/min). Durch die Optimierung sollte eine möglichst hohe Empfindlichkeit (hohe Intensitäten, möglichst geringe spektrale Interferenzen) für die Messungen am Gerät erreicht werden.

Analysiert wurden die Wasserproben unverdünnt und die Biofilmproben 1:100 (V:V) verdünnt. Die gemessenen Intensitäten sind für alle Proben durch eine Dreifachmessung belegt worden. Ein externer Standard wurde alle acht Proben gemessen, um gerätebedingte Schwankungen mittels Driftkorrektur auszugleichen. Da in Vorversuchen ein Matrixeffekt in den Wasserproben nachgewiesen werden konnte, erfolgte eine matrixangepasste Kalibration.

4.3.2 Anionen- und DOC-Bestimmung in den Wasserproben

Sulfat

Die Bestimmung des Sulfates erfolgte mit Bariumchloranilat. Bei dieser Methode wird die Probe in 50%iger Ethanollösung (pH-Wert: 4) mit festem Bariumchloranilat versetzt. Dabei bildet sich das unlösliche Bariumsulfat, während gleichzeitig die äquivalente Menge des farbigen Chloranilations (Absorptionsmaxima: 320-350 nm, 530.550 nm) freigesetzt wird. Dieses kann mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden [109 a].

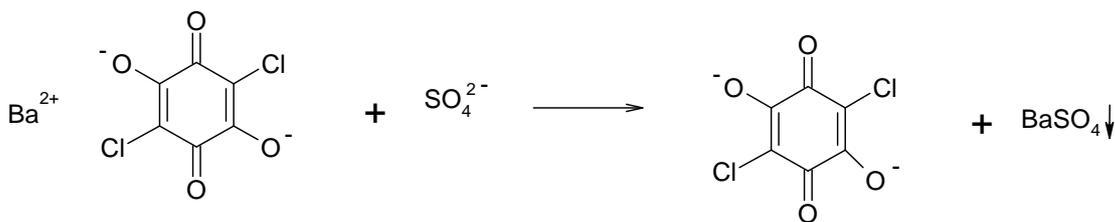
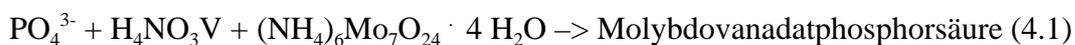


Abb. 4.8: Reaktionsschema der photometrischen Sulfatbestimmung

Phosphat

Mit Molybdat und Vanadat erfolgte die Bestimmung des Ortho-Phosphates in den Wasserproben. Hierzu wird eine Reagenzlösung aus gleichen Teilen Ammoniumheptamolybdat- und Ammoniumvanadatlösung hergestellt. Sie wird der Wasserprobe zugesetzt und es bildet sich ein orangegelber, wasserlöslicher Komplex der Molybdovanadatphosphorsäure. Es wird bei 410 nm mittels UV-VIS-Spektroskopie analysiert [109 b].



Nitrit

Die Bildung eines Azofarbstoffes ist das Prinzip für die photometrische Bestimmung von Nitrit. Die Probe wird mit einer Reagenzlösung die Sulfanilamid und N-(1-Naphtyl)-ethylendiamen-dihydrochlorid enthält versetzt. Es folgt die Diazotierung des Sulfanilamids durch das Nitrit. Das entstandene Diazoniumsalz koppelt mit dem N-(1-Naphtyl)-

ethylendiamen-dihydrochlorid zum roten Azofarbstoff (Abb. 4.9). Das Reaktionsgemisch wird nach 20-30 min bei 540 nm gegen Wasser photometriert [109 c, DIN 38 405 Teil 10].

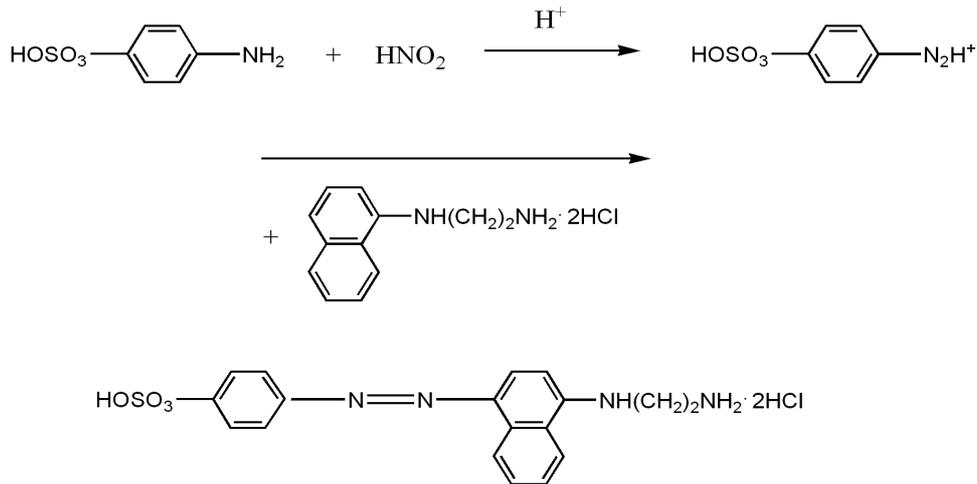


Abb. 4.9: Reaktionsschema der photometrischen Nitritbestimmung

DOC

Der gelöste organisch gebundene Kohlenstoff (DOC) stellt einen häufig verwendeten Summenparameter dar. Er wurde in den Wasserproben der Saale und des Teiches analysiert. Die Bestimmung des DOC erfolgte mit dem „liqui TOC“ der Firma elementar. Im Vorfeld der DOC-Analyse wird der anorganisch gebundene Kohlenstoff mittels 1,75 M Phosphorsäure ausgetrieben. Im Anschluss wird ein Aliquot der angesäuerten Probe unter Zugabe einer 1,5 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -Lösung im UV-Reaktor unter Freisetzung von CO_2 oxidiert. Das freigesetzte CO_2 wird mit einem nichtdispersiven IR-Detektor quantitativ bestimmt.

Nitrat

In den Wasserproben wurde Nitrat mittels ionenselektiver Flüssigmembranelektrode der Firma Mettler Toledo analysiert. Das Prinzip der Messung beruht auf Änderungen des Membranpotentials. Aktivitätsunterschiede eines bestimmten Ions an beiden Seiten der Membran führen zu einer elektrischen Potentialdifferenz über die Membran [111]. Das gemessene Potential E ist eine Funktion der Konzentration (Aktivität) entsprechend der Nernstgleichung (4.2).

$$E = E_0 \pm \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln a_i \quad (4.2)$$

4.4 Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze

Das untere Ende des Arbeitsbereiches ist für ein Messverfahren durch die dazugehörige Bestimmungsgrenze festgelegt. Diese kann in Vorversuchen nach der Kalibrier- und der Leerwertmethode bestimmt werden. Das Verfahren zur Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze ist in der DIN 32 645 vorgeschrieben [112]. Die Nachweisgrenze ergibt sich nach der Kalibriergeradenmethode aus Gleichung (4.3):

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t(P; f) \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (4.3)$$

Im Anhang A1 sind die ermittelten Nachweisgrenzen für die Wasser- sowie die Biofilmprouben angegeben.

Die Erfassungsgrenze berechnet sich nach:

$$x_{EG} = x_{NG} \cdot 2 \quad (4.4)$$

Für die Berechnung der Bestimmungsgrenze gilt folgende Iterationsvorschrift:

$$x_{BG} = k \cdot \frac{s_{yx}}{b} \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (4.5)$$

Eine gute Näherung für die Bestimmungsgrenze erhält man, wenn man den Wurzelausdruck aus Gleichung 4.5 durch $k \cdot x_{NG}$ ersetzt. Für die durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Berechnung der Bestimmungsgrenze nach:

$$x_{BG} = 3 \cdot x_{NG} \quad (4.6)$$

Durch die Wahl $k = 3$, beträgt die relative Fehlerunsicherheit 33,3% bezüglich der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Eine Extrapolation auf Konzentrationen außerhalb des Kalibrationsbereichs ist nicht erlaubt. Man wählt für die Dokumentation der Analysenergebnisse die Angabe “< Bestimmungsgrenze”. Für eine weitere statistische Bewertung der Ergebnisse ist eine “<<- Kennzeichnung nicht möglich, da für statistische Prozeduren genaue Zahlenwerte eingesetzt werden müssen. Daher wird in dieser Arbeit der folgende Ansatz gewählt:

a) wenn $x \leq x_{NG}$ dann $x = \frac{x_{NG}}{2} = \frac{x_{EG}}{4}$

Da sich für Werte kleiner der Nachweisgrenze aus ihrer Wahrscheinlichkeitsverteilung die halbe Nachweisgrenze bzw. ein Viertel der Erfassungsgrenze als wahrscheinlichster Wert ergibt [113].

b) Werte größer der Nachweisgrenze → analysierten Gehalt angeben

Für alle analysierten Gehalte über der Nachweisgrenze werden die ermittelten Werte angegeben [113]. Diese Angabe wird trotz der großen Standardabweichung als genauer angesehen, als wenn alle Gehalte beispielsweise durch die halbe Bestimmungsgrenze ersetzt werden. Bei dieser Vorgehensweise werden Informationen verschenkt.

4.5 Qualitätssicherung

Da bei jedem Analysenverfahren zufällige und systematische Fehler auftreten können, ist es notwendig, die Richtigkeit des angewendeten Verfahrens zu prüfen. Systematische Fehler beeinflussen die Richtigkeit des Ergebnisses, während zufällige Fehler einen Einfluss auf die Präzision der Messung haben [114]. Die Richtigkeit der Analysenmethode ist unter anderem anhand von zertifiziertem Referenzmaterial kontrolliert worden.

4.5.1 Referenzmaterialien

Die Richtigkeit des Messwertes ist mit dem t-Test nach STUDENT überprüft worden. Bei dieser Methode wird die Anzahl der durchgeführten Parallelbestimmungen n berücksichtigt. Der Prüfwert für den Vergleich von gemessenem Wert und zertifiziertem Wert μ berechnet sich nach [115]:

$$\mathcal{S} = \frac{|\bar{x} - m|}{s} \sqrt{n} \quad (4.7)$$

und wird mit dem Tabellenwert $t(f, \alpha)$ verglichen. Der zertifizierte Wert und der gemessene unterscheiden sich signifikant, wenn der Prüfwert größer als der tabellierte Wert ist.

Für die Wasserproben fand das Flusswasser SLRS-3 Anwendung [116]. In Anlehnung an die Analysen der Proben, sind die Gehalte durch eine Dreifachmessung charakterisiert worden. Mit einer statistischen Sicherheit von 95% ergibt sich ein Tabellenwert $t(f=2, \alpha=0,05)$ von 4,3. Eine Gegenüberstellung der zertifizierten und gemessenen Werte sowie der berechneten Prüfwerte, ist in Tab. 4.5 zu sehen.

Tab. 4.5: Analysenergebnisse für das Flusswassers SLRS-3

	μ in			x in			s in	s_{rel} in	Prüf-	Signif.
	$\mu\text{g/L}$			$\mu\text{g/L}$			$\mu\text{g/L}$	%	wert	Unterschied
Al	31	±	3	30,9	±	2,9	1,2	3,8	0,1	nein
Cd	0,013	±	0,002	0,013	±	0,001	0,0002	1,8	1,9	nein
Co	0,027	±	0,003	0,04	±	0,012	0,005	11,6	5,4	ja
Cu	1,35	±	0,07	1,3	±	0,104	0,04	3,2	1,9	nein
Cr	0,3	±	0,04	0,29	±	0,15	0,05	20,6	0,4	nein
Fe	100	±	2	99,4	±	14	5,6	5,6	0,2	nein
Mn	3,9	±	0,3	3,6	±	0,3	0,06	3,5	3,5	nein
Ni	0,83	±	0,08	0,83	±	0,1	0,05	5,4	0,04	nein
Zn	1,04	±	0,09	0,94	±	0,6	0,2	24	0,8	nein

Nahezu alle Elemente sind richtig bestimmt worden, nur Cobalt weist einen signifikanten Unterschied auf. Er ist auf eine Konzentration nahe der Bestimmungsgrenze zurückzuführen. Die angewandten Analysemethoden liefern somit für die Metallgehaltsbestimmung in Gewässerproben die richtigen Ergebnisse.

Es existiert noch kein zertifizierter Biofilm und kein geeignetes, mit Perchlorsäure aufgeschlossenes Referenzmaterial. Es musste somit nach einer Alternative gesucht werden. Da ein Hauptbestandteil der Biofilme Algen sind, erfolgte die Richtigkeitsprüfung des Analyseverfahrens zur Gehaltsbestimmung von Metallen in Biofilmen mit (NIES No. 3; Chlorella Nr. 530) [117]. Es handelt sich hierbei um eine Alge, deren Elementgehalte nach einem Königswasseraufschluss zertifiziert worden sind. Die entsprechenden Analyseergebnisse sind in Tab. 4.6 aufgezeigt. Analog zu den Wasserproben fand eine Dreifachbestimmung statt und alle Prüfwerte werden wiederum mit 4,3 verglichen.

Tab. 4.6: Analyseergebnisse der Alge (NIES No. 3; Chlorella Nr. 530)

	μ in		x in		s in	s_{rel} in	Prüf-	Signif.
	$\mu\text{g/g}$		$\mu\text{g/g}$		$\mu\text{g/g}$	%	wert	Unterschied
Ca	4900	± 30	4217	± 683	14	0,3	11	ja
Co	0,87	± 0,05	0,85	± 0,02	0,2	18	0,2	nein
Cu	3,5	± 0,3	3,46	± 0,04	0,22	6	0,3	nein
Fe	1850	± 10	1820	± 30	72	4	0,7	nein
Mg	3300	± 200	2748	± 552	87	3	11	ja
Mn	69	± 5	61	± 8	7	11	2,1	nein
Sr	40	± 3	32	± 8	1	5	9,6	ja
Zn	20,5	± 0,3	19	± 1,2	2	10	1	nein

Die Elemente Cobalt, Kupfer, Eisen, Mangan und Zink wurden richtig bestimmt. Für die analysierten Erdalkalimetallen treten signifikante Unterschiede auf. In allen drei Fällen sind die gemessenen Gehalte zu gering. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Elemente nicht vollständig aus dem Silikatgerüst gelöst worden sind. Beim Aufschluss der Alge blieb ein weißer silikatischer Niederschlag zurück. Des weiteren muss beachtet

werden, dass die Gehalte für einen anderen Aufschluss zertifiziert worden sind. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung in den Referenzmaterialien werden akzeptiert.

4.5.2 Vergleich zweier Aufschlussverfahren

Eine weitere Methode zur Qualitätssicherung stellt der Vergleich von analysierten Elementgehalten einer Biofilmmischprobe nach zwei verschiedenen Aufschlussverfahren dar. Der erste Aufschluss erfolgte wie bereits erläutert mit Perchlorsäure. Mit Salpetersäure kam ein zweiter, mikrowellenunterstützter Aufschluss zum Einsatz. Die analysierten Elementgehalten wurden mittels t -Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Berechnung des Prüfwertes für den Vergleich zweier Mittelwerte erfolgt nach [118]:

$$\mathcal{S} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_D} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (4.8)$$

wobei:

$$s_D = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{f}} \quad (4.9)$$

Die Freiheitsgrade berechnen sich nach:

$$f = n_1 + n_2 - 2 \quad (4.10)$$

Die Voraussetzung für die Anwendung des t -Testes nach Student ist die Varianzhomogenität. Diese muss zunächst mit dem F -Test überprüft werden. Bei ihm wird aus den Standardabweichungen der beiden Messreihen ein Prüfwert berechnet und mit dem entsprechenden Quantil der F -Verteilung verglichen. Wenn der berechnete Prüfwert kleiner dem tabelliertem F -Wert ist, so kann die Nullhypothese der Varianzgleichheit als bestätigt betrachtet werden.

$$\mathcal{F} = \frac{s_1}{s_2} \quad \text{mit } s_1 \geq s_2 \quad (4.11)$$

Wird mit dem F -Test eine Varianzeninhomogenität nachgewiesen, so muss an Stelle des t -Testes der Welch-Test angewendet werden [115]. Der Prüfwert berechnet sich nach:

$$W = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \cdot \left(\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \right)^{-1} \quad (4.12)$$

wobei sich die Freiheitsgrade für den Tabellenwert $t(f, \alpha)$ ergeben aus:

$$f = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}} \quad (4.13)$$

Analog dem t -Test erfolgt der Vergleich des Prüfwertes mit dem Tabellenwert. Statistisch gleiche Mittelwerte erhält man, wenn der Prüfwert kleiner dem tabellierten Wert ist. Die Ergebnisse des Mittelwertvergleiches sind für exemplarische Elemente in Tab. 4.7 zusammengefasst. Für beide Aufschlüsse wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ergibt sich somit ein tabellierter F -Wert von 19 und ein t -Wert von 2,78.

Tab. 4.7: Vergleich zweier Aufschlüsse

	\bar{x}_1 in	\bar{x}_2 in	s_1 in	s_2 in	F	t	sign. Unterschied
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$			
Ca	131332	132753	7074	10199	2,1	0,2	nein
Co	13,2	13,1	0,7	0,4	0,3	0,2	nein
Cr	46,2	47,6	5,5	5,6	0,9	0,5	nein
Cu	42,9	44,0	1,1	1,3	1,2	1,9	nein
Fe	12099	10424	440	960	4,8	2,7	nein
Mg	5196	5148	122	148	1,5	0,4	nein

	\bar{x}_1 in	\bar{x}_2 in	s_1 in	s_2 in	f	f	sign. Unterschied
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$			
Mn	3353	3187	180	236	1,7	1,0	nein
Ni	33,6	32,0	3,5	3,9	1,2	0,9	nein
Sr	986	998	31	45	2,0	0,4	nein
Zn	407	404	22	32	2,2	0,2	nein

Nach beiden Analysenverfahren werden identische Elementgehalte bestimmt. Man kann somit von der Richtigkeit der gemessenen Werte ausgehen.

4.6 Mikrobiologische Bestimmung

Alle Untersuchungen fanden am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Institut für Medizinische Mikrobiologie statt.

Um die Artenvielfalt und Anzahl der Mikroben zu bestimmen, wurde die Biofilm-Wasser-Suspension auf Agarplatten aufgebracht. Die qualitative Bestimmung fand mittels selektiver Agarplatten, der Koloniemorphologie und biochemischer Merkmale statt, während die quantitative Untersuchung durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten erfolgte.

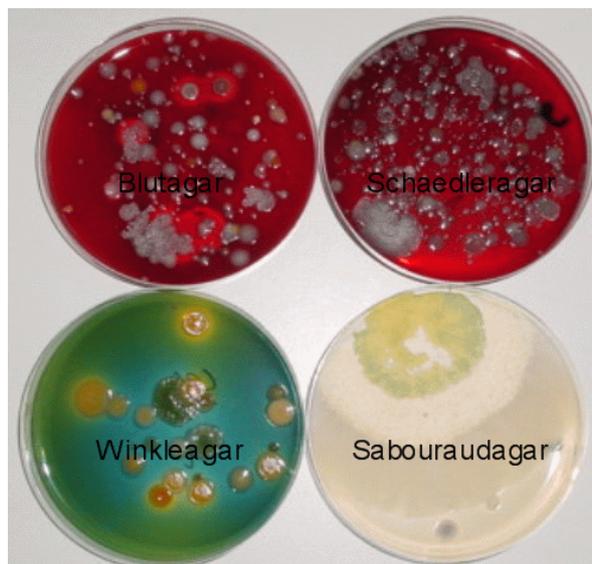


Abb. 4.10: Selektive Agarplatten mit Bakterienkolonien

Sabouraudagarplatten

Diese Platten sind selektiv für Pilzkulturen. Der verwendete Agar stammt von der Firma Oxoid. Für die Untersuchung wurden 0,1 ml der Probe auf der Platte ausgestrichen. Dann kamen die Platte zunächst 24 Stunden bei 37 °C und anschließend nochmals 48 Stunden bei 20 °C in den Brutschrank. Nach dieser Zeit erfolgte die Auszählung und die Identifizierung der Mikroben anhand der für Spross- und Schimmelpilzen typischen Kolonieförmungen.

Schaedleragarplatten

Diese Platten (enthalten 8 % Blut) stammen ebenfalls von der Firma Oxoid. Sie dienen der Kultur anaerober Bakterien. Für die Untersuchung wurden 0,1 ml der Probe auf die Agarplatte aufgestrichen. Nachdem 72 Stunden lang bei 37 °C bebrütet worden ist, konnte die Auswertung erfolgen.

Blutagarplatten

Aerobe Bakterien können mit Blutagarplatten der Firma Oxoid nachgewiesen werden. Die Platten bestehen aus Columbiaagar mit 8 % Schafsblut. Auf die Platten wurden 0,1 ml der Probelösungen aufgebracht. Vor der Auszählung und Identifizierung erfolgte die Bebrütung, zunächst 24 Stunden bei 37 °C und abschließend nochmals 48 Stunden bei 20 °C.

Winkleagarplatten

Diese Platten werden nach einer hauseigenen Rezeptur hergestellt. Sie enthalten Bromthymolblau und Lactose. Dadurch ist eine Selektivität gegenüber gramnegativen Keimen gegeben. Die Bestimmung erfolgte analog den Blutagarplatten.

Es erfolgte die Identifizierung und Auszählung folgender Mikroben (Mikrobengruppen):

- Pilze
 - Sprosspilze (aerob)
 - Schimmelpilze (aerob)

- Grampositive Keime
 - Clostridien (anaerob)
 - Bazillen (aerob)
 - Andere grampositive Keime (aerob)
- Gramnegative Keime
 - Aeromonas hydrophila (aerob)
 - Enterobakterien (aerob)
 - Andere negative Keime (aerob)

Qualitätssicherung für die Mikrobebestimmung

Aus jeder Charge der verwendeten Nährböden wurden Versuche mit relevanten Keimen durchgeführt, um die geforderten Eigenschaften der selektiven Nährböden zu überprüfen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wurde dadurch überprüft, dass für mehrere Proben verschiedene Verdünnungsstufen ausgewertet worden sind. Hierbei wurden jeweils vergleichbare Keimzahlen gefunden.

5 Untersuchungsergebnisse der systematisch gezüchteten Biofilme

5.1 Homogenitätsuntersuchungen

Die Probennahmebox ermöglicht die simultane Züchtung von acht Biofilmproben. Um möglichst sichere Analysenwerte zu erhalten, sollen die Mittelwerte dieser Proben verwendet werden. Es muss somit zunächst überprüft werden, ob die Gehalte der einzelnen Biofilmproben zu einem Mittelwert zusammengefasst werden dürfen. Ein multipler Test kann an dieser Stelle nicht angewendet werden, da jede der acht Biofilmproben nur einmal analysiert worden ist. Aus diesem Grund werden die acht Proben in zwei Gruppen eingeteilt. Die entsprechenden Mittelwerte werden mit dem t -Test (analog Kapitel 4.5.2) auf signifikante Unterschiede geprüft. Ist kein signifikanter Unterschied festzustellen, gehören die Daten der gleichen Grundgesamtheit an.

Die Einteilung der Messwerte erfolgt dreimal nach dem Zufallsprinzip. Ist für keine der gebildete Gruppen ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte nachzuweisen, sind die Proben als homogen anzusehen und die Mittelwertsberechnung ist erlaubt. Für diese Überprüfung sind die Daten der Biofilme der 1. Charge aus dem Teich und der Saale verwendet worden.

Vor dem t -Test wird mit dem F -Test auf Varianzenhomogenität geprüft. Wenn diese nicht gegeben ist, muss der Welch-Test angewendet werden. Ausgewählte Ergebnisse enthält Tab. 5. 1. Es ist deutlich zu erkennen, dass die berechneten Prüfwerte unter dem tabellierten Wert ($f = 6, \alpha = 0,05 \rightarrow t: 2,447$) liegen. Auch für alle weiteren Proben bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten. Aus den Ergebnissen ergibt sich somit, dass die acht simultan aufgewachsenen Biofilmproben homogen sind. Für die weitere Auswertung ist somit die Verwendung des Mittelwertes erlaubt.

Tab. 5.1 Exemplarische Ergebnisse der Homogenitätsprüfung

Probe	Element	s_1	s_2	s_3	signifikanter Unterschied
T1-1	Ca	2,07	0,49	0,81	nein
	Cd	0,82	2,15	0,95	nein
	Fe	1,39	1,37	0,12	nein
	Mn	0,02	0,02	0,01	nein
	Zn	0,58	1,49	1,21	nein
S1-2	Al	1,48	0,16	1,20	nein
	Co	0,52	2,15	0,25	nein
	K	1,87	0,07	0,27	nein
	Mg	1,97	0,07	2,23	nein
	P	0,04	1,78	0,98	nein
	Pb	0,65	1,09	0,59	nein

5.2 Einfluss der Aufwuchsdauer

Zu Beginn der Untersuchungen musste eine geeignete Aufwuchsdauer bestimmt werden. Zu diesem Zweck erfolgte im ersten Jahr der Probennahme die Variation der Aufwuchszeit. Es sind sowohl für den Teich als auch für die Saale drei Probennahmeserien durchgeführt worden, mit den Aufwuchsdauern 3, 7 und 5 Wochen. Betrachtet man die ermittelten Gehalte (Abb. 5.2 /5.3; Konzentrationen sind mittelwertnormiert), so erkennt man nicht den erwartete Verlauf analog der Aufwuchsdauer, auch der Verlauf der verschiedenen Elementgehalte variiert stark.

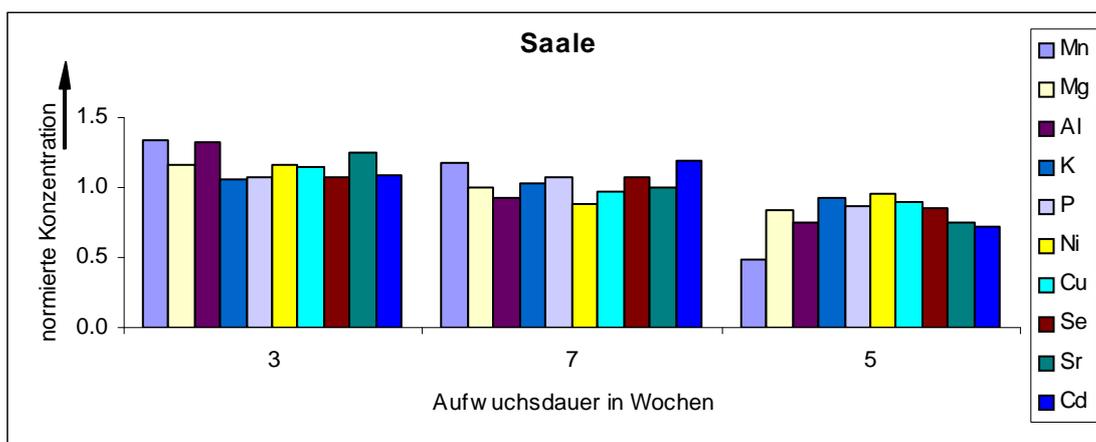


Abb. 5.2: Exemplarische Beispiele für die Elementgehalte in der Saale

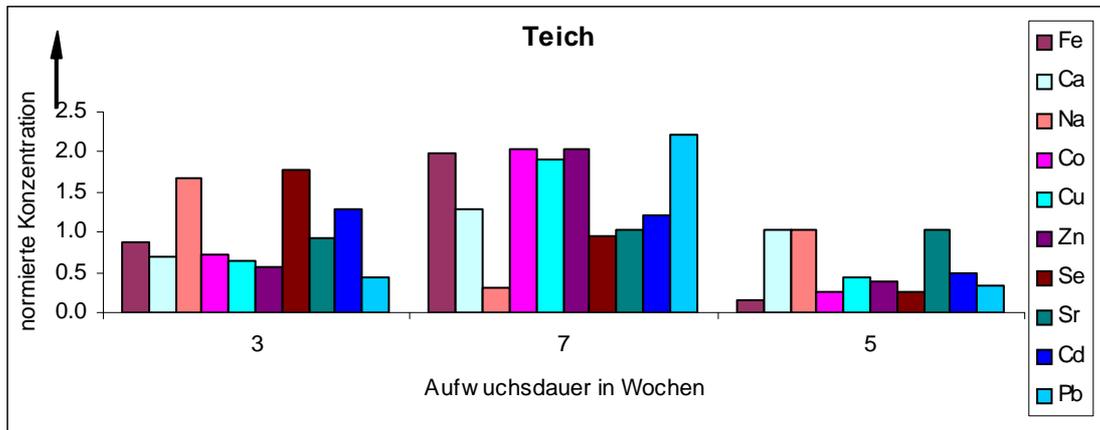


Abb. 5.3: Exemplarische Beispiele für Elementgehalte im Teich

Aus den erhaltenen Ergebnissen sind keine Rückschlüsse auf eine optimale Aufwuchsdauer zu ziehen. Die Proben dieser Charge sind im Herbst und Winter gezüchtet worden. Zwischen der ersten und dritten Charge liegt eine Differenz der mittleren Tagestemperatur von 8°C. Der Wintereinbruch und somit das Abkühlen der Gewässer auf unter 4°C haben enormen Einfluss auf die Biofilmbildung. Die jahreszeitliche Abhängigkeit bei der Biofilmbildung muss somit stets beachtet werden (siehe Kapitel 4.1.1).

Für die Untersuchungen der zweiten Charge wird eine Aufwuchsdauer von 6 Wochen festgelegt. Die Auswahl berücksichtigt, dass eine ausreichende Menge an Biofilm zu erwarten ist und man kann davon ausgehen, dass die Biofilmbildung die Plateau-Phase erreicht hat.

5.3 Ermittlung und Interpretation von Anreicherungsfaktoren

Für die Ermittlung von Anreicherungsfaktoren ist während der 3. Charge für die Biofilme im Teich eine Art "Standardaddition" durchgeführt worden. Zu Beginn einer Serie erfolgte das Einsetzen von acht Platten in den Teich. Nach jeweils 2 Wochen wurden zwei Platten entnommen, so dass am Ende jeder Serie die Gehalte nach 2, 4, 6 und 8 Wochen per Doppelbestimmung ermittelt werden konnten. Diese Prozedur ist dreimal (3 Folgen) wiederholt worden. Die Entnahme der Wasserproben erfolgte wöchentlich. Für die Berechnung der Anreicherungsfaktoren im Aufwuchszeitraum werden aus allen entnom-

menen Wasserproben, die Mittelwerte der Metallgehalte verwendet. Des weiteren erfolgt eine Umrechnung der Metallgehalte des Wassers in $\mu\text{g/g}$.

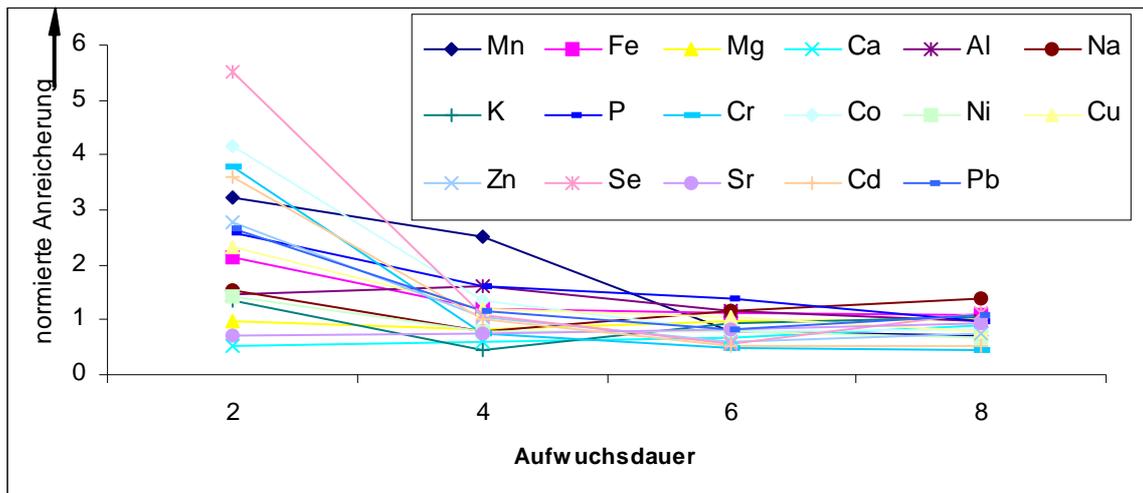


Abb. 5.4: Anreicherungs-faktoren der Teichproben

Abb. 5.4 zeigt den Verlauf der Anreicherungs-faktoren (mittelwertnormiert) für alle Elemente exemplarisch für die 3. Folge. Man erkennt, dass die deutlichste Änderung der Anreicherungs-faktoren zwischen zwei und vier Wochen stattfindet. Im weiteren Verlauf des Wachstums kommt es kaum noch zu Änderungen der Anreicherungs-faktoren. Man kann daher sagen, dass in diesem Ökosystem nach vier, spätestens sechs Wochen die Plateau-Phase erreicht wird.

Wählt man als x-Achse die verschiedenen Elemente, so erhält man einen Graphen, der den Vergleich der Elemente anhand ihrer Anreicherungs-faktoren ermöglicht (Abb. 5.5). Die Reihenfolge der Elemente ergibt sich nach der Größe des Anreicherungs-faktors. Durch die logarithmische Skalierung der y-Achse wird der direkte Vergleich ermöglicht. Betrachtet man die Anreicherungs-faktoren in Abhängigkeit vom Element, so zeigt sich, dass die Alkali- und Erdalkalimetalle am wenigsten angereichert werden. Bei den Schwermetallen wird Nickel am geringsten und Mangan am stärksten angereichert. Ein Grund für die unterschiedlich starke Akkumulation von Metallen könnten die verschiedenen Bindungs-mechanismen darstellen.

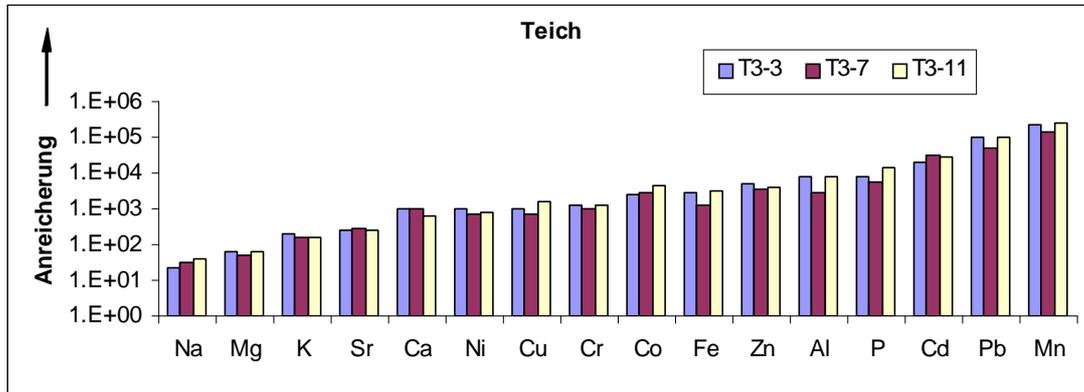


Abb. 5.5: Anreicherungs-faktoren für den Teich (1. Folge)

Um zu erkennen, ob die berechnete Reihenfolge der Elemente allgemein gültig oder gewässerspezifisch ist, werden die Anreicherungs-faktoren für die Saaleproben der 3. Charge berechnet und nach dem gleichem Prinzip grafisch dargestellt (Abb. 5.6).

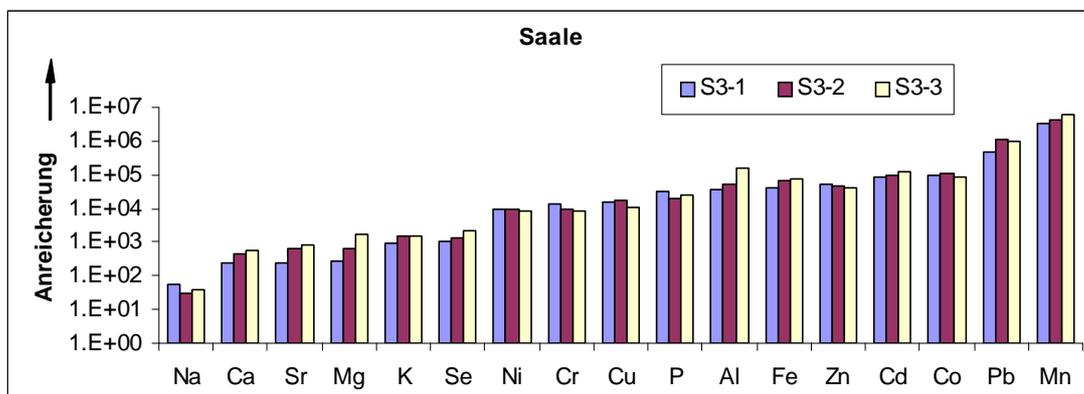


Abb. 5.6: Anreicherungs-faktoren für die Saale

Analog zu den Ergebnissen der Teichproben ist die Anreicherung der Alkali- und Erdalkalielelemente am geringsten. Nickel wird im Vergleich wieder weniger stark angereichert und Mangan am stärksten.

Da an zwei verschiedenen Gewässern eine nahezu gleiche Reihenfolge der Elemente nach ihren Anreicherungs-faktoren gefunden wurde, kann man davon ausgehen, dass diese für Biofilme in Gewässern allgemein gültig ist. Eine exakte Begründungen für die Anordnung der Elemente kann im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben werden. Die verschiedenen

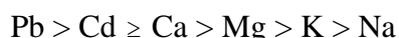
Bindungsvarianten der Metalle im Biofilm und die vorliegenden Elementspezies im Wasser stellen zwei von vielen möglichen Einflussfaktoren für die Anreicherung dar.

In der Literatur werden für die Akkumulation von Elementen durch Organismen häufig Transferfaktoren bestimmt. Transferfaktoren für den Übergang der Element aus dem Boden in die Pflanze sind unter anderem von SCHÖNBUCHNER berechnet worden. Er erhält folgende Abstufung der Elemente [125]:



Die Reihenfolge der Elemente stimmt nicht mit der für die Biofilmproben überein. Des weiteren liegen die Transferfaktoren im Bereich 0,001 bis etwa 3, d. h. sie sind sehr viel kleiner als die oben ermittelten. Daraus erkennt man, dass die Transferfaktoren nicht mit den Anreicherungsfaktoren verglichen werden können, denn beide Werte beschreiben unterschiedliche Prozesse. Bei den Transferfaktoren werden nur die Spezies berücksichtigt, die direkt durch die Pflanze aufgenommen wurden. Die Elemente können im Biofilm durch verschiedene Mechanismen gebunden werden, neben der direkten Akkumulation durch Organismen werden viele Teilchen an Oberflächen adsorbiert (siehe Kapitel 2.3). Dadurch ist die ermittelte Konzentration der Elemente sehr viel höher als in Pflanzen und somit sind die Anreicherungsfaktoren sehr viel größer als die Transferfaktoren.

Moose besitzen analog den Biofilmen die Fähigkeit, Kationen an ihrer Oberfläche anzureichern [126]. Ihre Anreicherung von Elementen sollte daher mit denen von Biofilmen vergleichbar sein. KLEIN et al. gibt beispielsweise für Wassermoose folgende Affinitätsreihe für Kationen an [126]:



Das bedeutet, dass bei gleicher Konzentration im Wasser Schwermetalle, wie Pb und Cd, bevorzugt adsorbiert werden. Die für die Biofilmproben erhaltene Reihung der Elemente anhand ihrer Anreicherungsfaktoren, stimmt mit der von KLEIN et al. angegebenen recht gut überein. Auch in den Biofilmproben werden die Schwermetalle sehr viel stärker angereichert als die Erdalkali- und Alkalimetalle. Diese Einteilung kann somit als verifiziert angesehen werden.

6 Multivariate Datenauswertung

Eine hohe Stichprobenzahl und ein breites Spektrum an Analyten führt bei den durchgeführten Untersuchungen zu großen Datenmatrizen. Da die Variablen häufig miteinander wechselwirken, ist eine Auswertung mit univariat-statistischen Methoden meistens nicht ausreichend. Daher finden zahlreiche multivariat-statistische Methoden Anwendung. Die Berechnungen der Cluster-, Faktoren-, Diskriminanzanalyse und der ANN erfolgt mit STATISTICA [120]. Modelle mittels PLS werden mit UNSCRAMBLER [121] und Support-Vektor-Maschinen mit YALE [122] berechnet.

Für die chemometrische Auswertung erfolgt die sachlogische Einteilung der Analysendaten in vier Datenmatrizen: Saale - Teich (**ST**), Saale - Teich - Leutra (**STL**), Biofilme natürlicher Substrate (**BnS**) und Gesamtmatrix (**G**). Für alle multivariaten Auswertungsverfahren, werden jeder Biofilmprobe die Gehalte der entsprechenden Wasserprobe zugeordnet. Diese Gehalte ergeben sich bei den Proben der Saale und des Teiches aus dem Mittelwert der Wasserproben während des gesamten Probennahmezeitraumes.

6.1 Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Saale-Teich

Für die multivariate Auswertung der Daten wird eine Trennung der Variablen in Mikrobiologie und Chemie/Wetter durchgeführt. Es entstehen somit zwei Matrizen. Die erste (**B**) enthält für alle Proben die Anzahl der koloniebildenden Einheiten für die acht Mikroben Gruppen im Wasser sowie im Biofilm. Es handelt sich somit um eine Matrix mit 33 Fällen und 16 Merkmalen, welche die mikrobiologischen Eigenschaften der Proben zusammenfasst.

Die Objekte der zweiten Matrix **C** sind ebenfalls die verschiedenen Proben (33), während die analysierten Gehalte, die Wetterdaten und die Vor-Ort-Parameter die Merkmale dieser Matrix (33×51) darstellen.

6.1.1 Dimensionsreduzierung mittels Multidimensionaler Skalierung für die Variablen der mikrobiologischen Bestimmung

Aus der mikrobiologischen Untersuchung erhält man für jede Probe die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) im Wasser und im Biofilm für die acht in Kapitel 4.6 angegebenen Mikrobengruppen. Würde man für die statistische Auswertung die ermittelten cfu-Werte verwenden, so wäre eine nicht vorhandene Genauigkeit vorgetäuscht. Daher erfolgt die Einteilung der cfu in Klassen. Die Klassengrenzen werden auf Grund des logarithmischen Wachstums von Mikroben, wie in Tab. 6.1 angegeben, gewählt. Durch die Verwendung von Klassen ist ein kategorialer Datensatz entstanden. Für diese Art von Daten stellt die MDS ein Verfahren zur Dimensionsreduzierung dar (siehe Kapitel 3.1).

Tab. 6.1: Klassengrenzen für die cfu der Mikrobengruppen

Klasse	cfu in Anzahl/ml	Klasse	cfu in Anzahl/ml
1	0	4	< 10000
2	< 100	5	< 100000
3	< 1000	6	> 100000

Erfolgt für **B** die Berechnung der Konfiguration für die Probennahmeorte, so erhält man für die Konfiguration im dreidimensionalen Raum (Anhang A2) einen Stress von 0,06. Obwohl die Güte der Anpassung ausreichend ist, ist eine Interpretation der erhaltenen Konfiguration nicht möglich. Die bestimmten mikrobiologischen Parameter reichen nicht aus, eine Unterscheidung der Proben anhand ihrer Herkunftsgewässer zu berechnen. Für weitere Untersuchungen sollten daher nicht nur Gruppenparameter, sondern einzelne Bakterienspezies ausgewertet werden.

Der *STRESS* für die berechnete Konfiguration der mikrobiologische Parameter im dreidimensionalen Raum beträgt 0,012. Es handelt sich somit um eine ausgezeichnete Anpassung. Da das Ziel der MDS eine möglichst einfache, interpretierbare Konfiguration ist, wird diese nun für $R = 2$ berechnet. Man erhält einen *STRESS* von 0,029 (gute Anpassung)

und die in Abb. 6.1 gezeigte räumliche Anordnung der Variablen. Deutlich ist die Ausbildung von drei Gruppen: den Bakterien im Biofilm, den Mikroben im Wasser und den Pilzen im Biofilm zu erkennen. Die drei Gruppen unterscheiden sich in der Höhe ihrer Belastungen.

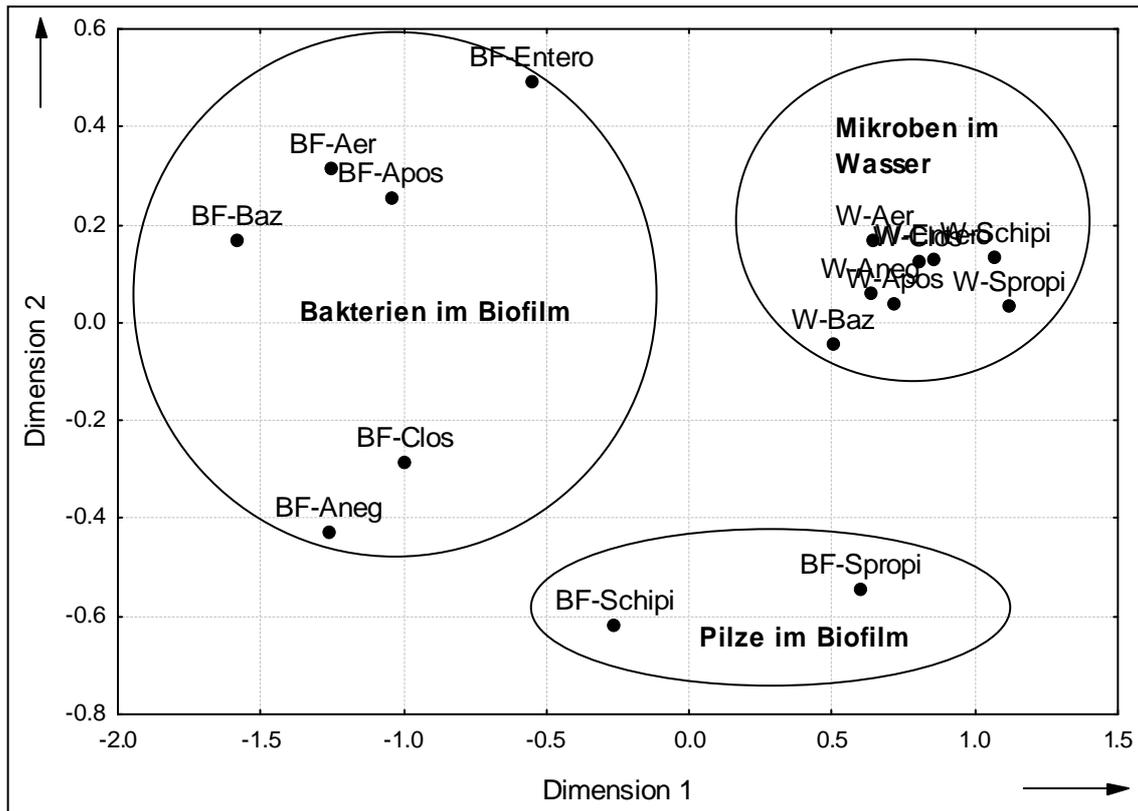


Abb. 6.1: Konfiguration der mikrobiologischen Parameter

Mit Hilfe der MDS ist es gelungen, eine Dimensionserniedrigung der 16 Variablen auf zwei Dimensionen durchzuführen, wobei auch eine kausale Interpretation der Ergebnisse möglich ist. Die MDS ist somit ein geeignetes Verfahren, die Zusammenhänge zwischen den Variablen dieser kategorialen Datenmatrix wiederzugeben.

6.1.2 Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes

Um erste Ergebnisse über Ähnlichkeiten zwischen den Proben sowie den Variablen des Datensatzes zu erhalten, erfolgt nach der Standardisierung von C eine hierarchische, agglomerative Clusteranalyse sowohl nach den Merkmalen als auch nach den Objekten.

Es findet der Fusionierungsalgorithmus nach Ward sowie das Distanzmaß Quadrierte Euklidische Distanzen Anwendung.

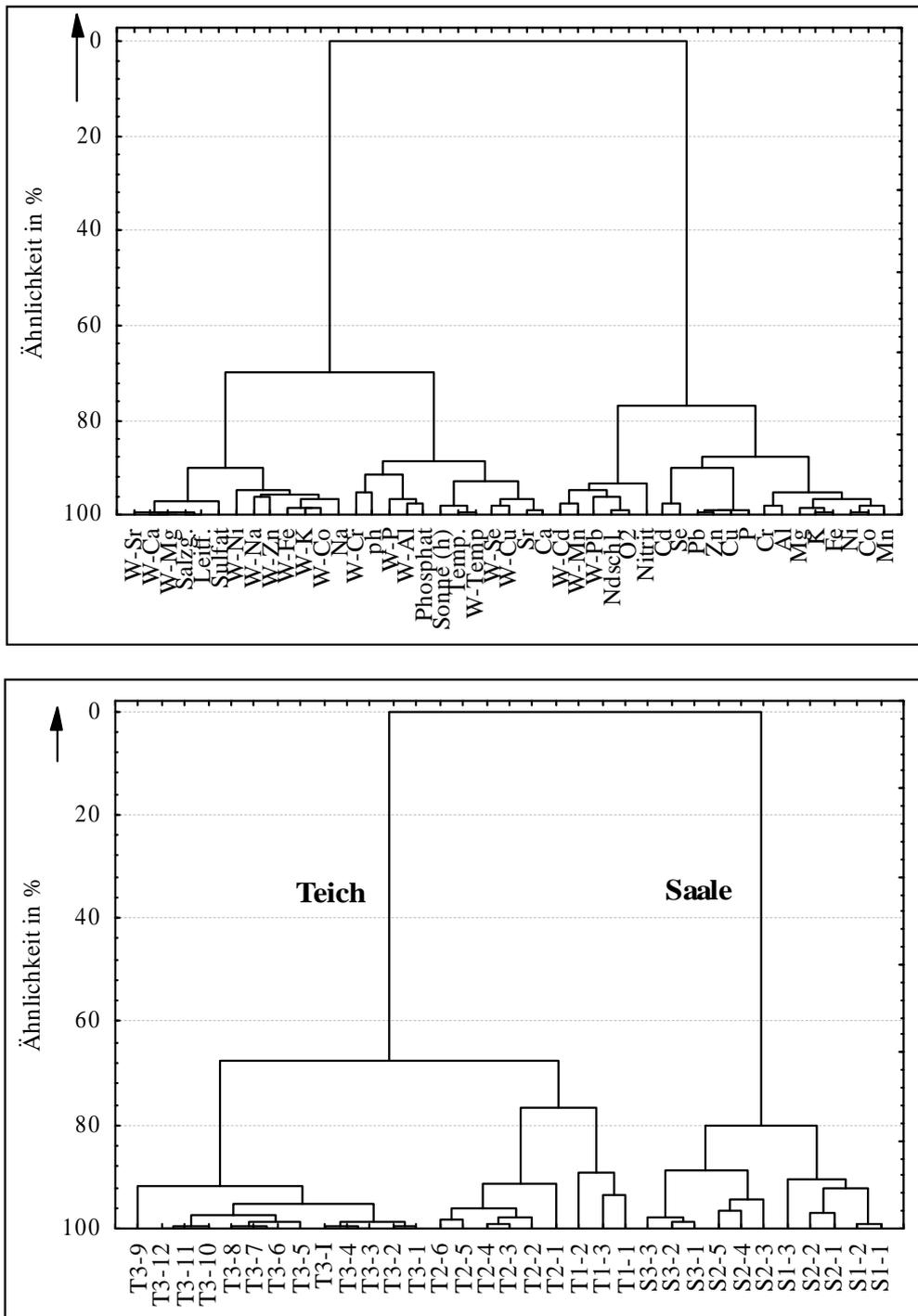


Abb. 6.2: Dendrogramme der Merkmale und Objekte für *ST*

Im Dendrogramm der Merkmale erkennt man deutlich die Trennung zwischen den Proben des Teichs und der Saale. Um Aussagen über die Variablen zu erhalten, welche für die

Unähnlichkeit der beiden Gruppen verantwortlich sind, wird das Clusterimaging angeschlossen (siehe Kapitel 3.2). Ausgehend von den beiden Dendrogrammen wird die standardisierte Matrix *C* neu geordnet und mit dem Programm EXCEL [127] grafisch dargestellt.

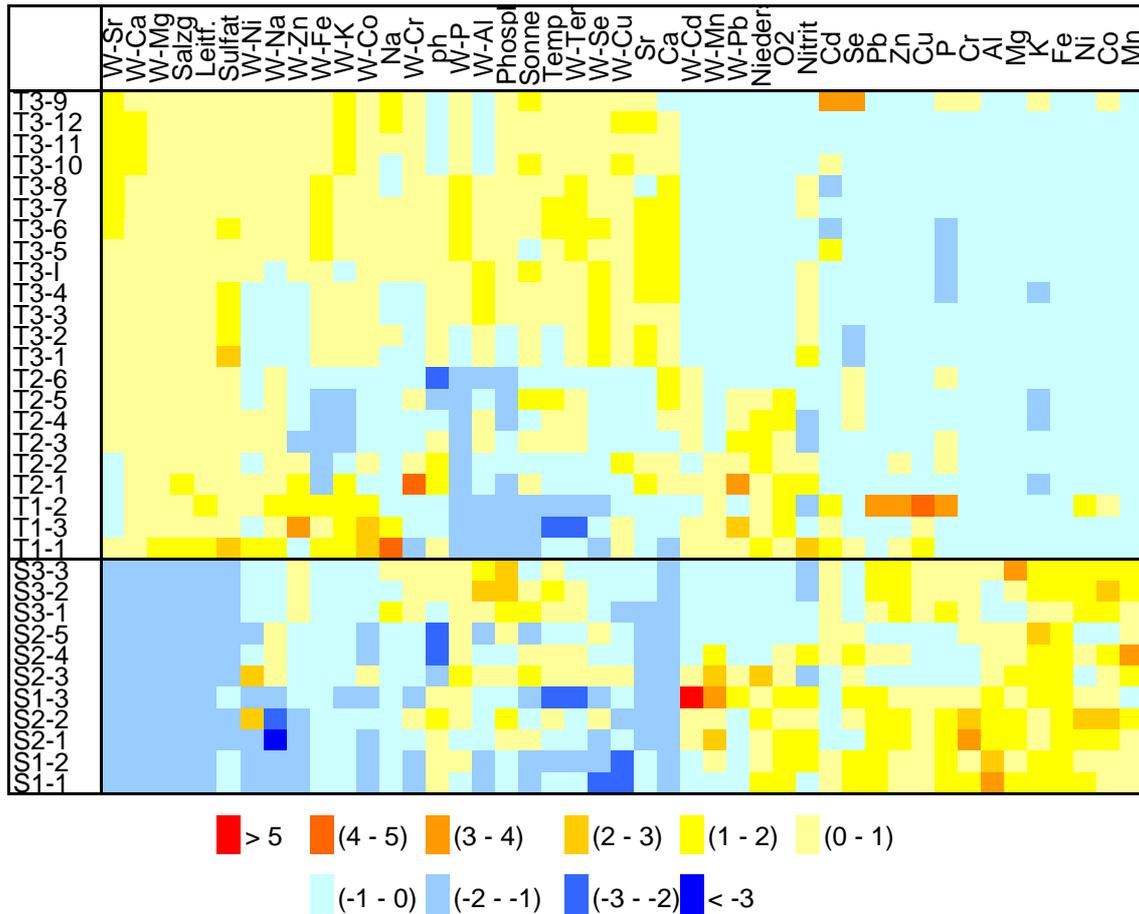


Abb. 6.3: Mit Clusterimaging erhaltene Farbkarte für die Daten der Saale und des Teiches

Auch in der Farbkarte wird die Trennung der Proben anhand ihrer Herkunft ersichtlich. Des weiteren erkennt man, dass die Gehalte von Ca, Mg und Sr im Wasser, der Salzgehalt, die Leitfähigkeit und die Konzentration der Sulfationen im Wasser den größten Einfluss auf die Trennung der beiden Gewässer haben.

6.1.3 Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse

Die 61 Variablen der Matrix **C** sollen auf möglichst wenige interpretierbare, latente Variablen reduziert werden. Daher erfolgt eine Faktorenanalyse (Extraktionsmethode: Hauptfaktorenanalyse, siehe Kapitel 3.3). Um die Interpretierbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern, wird eine Rotation der Achsen nach der Varimax-Methode angeschlossen.

Man erhält acht Faktoren mit einem Eigenwert größer Eins, die eine Gesamtvarianz von 82% erklären. Betrachtet man sich den Verlauf der Faktorwerte für den ersten Faktor (Abb. 6.4), so erkennt man, dass dieser die Proben in Saale und Teich trennt.

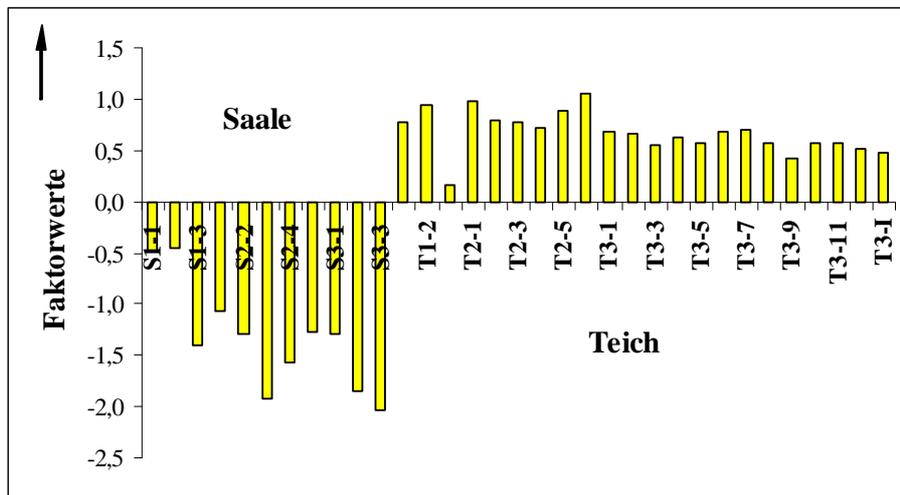


Abb. 6.4: Verlauf der Faktorwerte des 1. Faktors

Aus den Faktorladungen ergibt sich, welche Variablen den größten Einfluss auf den Faktor haben. In Analogie zum Clusterimaging sind die Gehalte an Ca, Mg, Sr und den Sulfationen im Wasser, der Salzgehalt, die Leitfähigkeit ergänzt durch die Gehalte an Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn und Ni im Biofilm für die Unterscheidung von Saale- und Teichproben verantwortlich. In Hinsicht auf die Zielstellung der Arbeit ist Faktor 1 (erklärt 38 % der Gesamtvarianz) der entscheidende. Daher wird auf die anderen Faktoren nicht weiter eingegangen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Faktorenanalyse sind in Anhang A3 dargestellt.

6.1.4 Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen

Die sachlogische und bisher stets berechnete Einteilung der Proben in Saale und Teich soll nun verifiziert werden. Hierzu wird eine weitere Variable eingeführt, die Klasse (T: Teichproben; S: Saaleproben).

Mit der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) erfolgt nun die Klassifikation der Daten. Die Bedingung der LDA ist, dass die Anzahl der Merkmale größer ist als die Anzahl der Objekte. Daher werden die zuvor berechneten Faktorwerte als unabhängige Variablen verwendet. Das Ergebnis der LDA ist eine Klassifikationsfunktion mit der alle Proben richtig zugeordnet werden. In Abb. 6.5 werden die quadrierten Mahalanobisdistanzen zu den Gruppen-Zentroiden grafisch dargestellt. Man erkennt deutlich die Trennung der beiden Klassen.

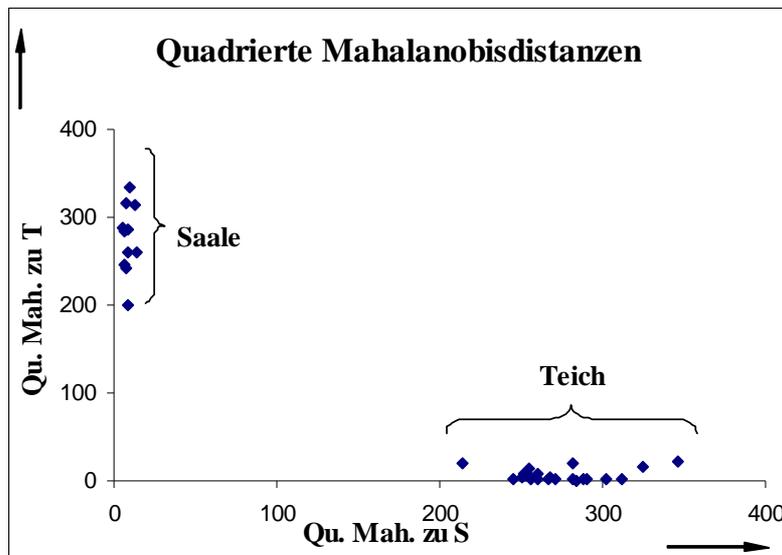


Abb. 6.5: Grafisch Darstellung der quadrierten Mahalanobisdistanzen zu den Gruppen-Zentroiden der Klassen S und T

Das Λ_{wilk} beträgt 0,016 (Λ_{wilk} : 0 - perfekte Trennung; 1 - keine Trennung), es ist also eine nahezu perfekte Trennung der beiden Klassen erreicht. Die Einteilung der Proben in Saale und Teich ist somit statistisch gesichert.

Als zweite Klassifikationsmethode werden Support-Vektor-Maschinen verwendet. Bei ihnen existiert keine Beschränkung der Variablenzahl im Hinblick auf die Zahl der Fälle. Somit kann die Datenmatrix C zur Modellbildung verwendet werden. Ein weiterer Unterschied zur LDA ist, dass das Modell mittels Kreuzvalidierung überprüft wird. Bei einer vollständigen Kreuzvalidierung wird jeweils eine Probe nicht zur Modellbildung herangezogen und im Anschluss vorhergesagt.

Es wird mit der polynomialen Kernfunktion ersten Grades ($C = 1$) ein lineares Modell berechnet (siehe Kapitel 3.7), mit dem eine richtige Zuordnung aller Proben zu ihren entsprechenden Klassen erreicht wird. Die Einteilung der Daten in Saale und Teich konnte mit zwei voneinander unabhängigen Methoden bestätigt werden. Sie ist somit verifiziert.

6.1.5 Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netze

Im Hinblick auf die Zielstellung der Arbeit sind zwei Arten von Modellen von Interesse. Zum einen soll das Gewässer und zum anderen sollen aus den Gehalten des Biofilms die Elementgehalte im Wasser modelliert werden. Zu diesem Zweck werden die Methoden PLS und ANN angewendet (siehe Kapitel 3.5 und 3.6).

Modellierung des Herkunftsgewässers

Hierfür werden mit STATISTICA Künstliche Neuronale Netze berechnet. Der Datensatz wird nach dem Zufallsprinzip in 17 Trainingsdaten, 8 Validierungsdaten und 8 Testdaten unterteilt. Das einfachste ANN, mit dem nur richtige Modellierungen getroffen werden, ist ein lineares Netz mit vier Eingangsvariablen. Die Variablen zur Unterscheidung von Teich und Saale stellen wiederum die Gehalte von Ca, Mg und Sr im Wasser sowie der Calciumgehalt im Biofilm dar. Mit einem ganz einfachen linearen Modell ist es somit möglich, unbekannte Proben dem richtigem Gewässer zuzuordnen.

Da die Indikatorfunktion von Biofilmen untersucht werden soll, finden die gleichen Berechnungen nur mit den Elementgehalten der Biofilmproben statt. Ein lineares Netz mit

drei Eingangsvariablen (Gehalte an Fe, K und Pb) stellt das einfachste Modell dar, mit dem alle unbekanntes Proben richtig zugeordnet werden. Man kann daher sagen, dass systematisch gezüchtete Biofilme ihre Wachstumsumgebung widerspiegeln, d. h. sie besitzen eine gewisse Indikatorfunktion. Durch die Bestimmung weniger Parameter (drei) ist eine Unterscheidung der Herkunftsgewässer möglich.

Modellierung von Elementgehalten der Wasserproben

PLS-Modellen werden mit dem Programm UNSCRAMBLER für die Modellierung von Wassergehalten aus den Elementgehalten der Biofilme berechnet. Es erfolgt für jedes Element die Berechnung von drei Modellen (Objekte: Saaleproben (S); Teichproben (T), Gesamtheit der Proben (ST)), mit einer internen Validierung, der Kreuzvalidierung (CV). Ein Ergebnis der PLS-Modellierung ist der Korrelationskoeffizient zwischen modellierten und gemessenen Werten. Er beträgt für ein perfektes Modell Eins. Der RMSEP stellt ein weiteres Gütekriterium dar, denn aus ihm lässt sich der relative Fehler berechnen. Exemplarische Ergebnisse für einige Modelle sind in Tab. 6.3 angegeben. Im Anhang A4 befindet sich eine Übersicht der Kenngrößen aller Modelle.

Tab. 6.3: Exemplarische Ergebnisse der PLS1-Modellierung für die Proben der Saale und des Teiches (r_v : Korrelationskoeffizient für CV)

Element	Gewässer	r_v	RMSEP _{CV}	Mittelwert	relativer Fehler in %
Al	S	0,38	14,99	22,28	67,29
	T	0,77	7,85	20,91	37,53
	ST	-0,27	13,72	21,37	63,21
Cu	S	0,67	1,74	4,96	35,09
	T	-0,51	1,26	7,39	17,06
	ST	0,65	1,37	6,58	20,83
Zn	S	0,54	2,70	11,39	23,70
	T	-0,39	4,98	15,35	32,44
	ST	0,37	4,23	14,03	30,15

Die Berechnung der Elementgehalten im Wasser aus denen des Biofilms ist mit den erzeugten PLS-Modellen nicht möglich. Ergänzend zur PLS1 werden Modelle mittels PLS2 berechnet. Hierbei ist es möglich, mehrere unabhängige Variablen aus mehreren abhängigen Variablen zu prognostizieren. Es werden drei Modelle (S, T, ST) berechnet. Dabei

werden jeweils alle Gehalte der Wasserproben als unabhängige Variablen aus den Elementgehalten im Biofilm (abhängige Variablen) vorhergesagt. Die erhaltenen Modelle besitzen höhere relative Fehler als die mit PLS1 berechneten. Die Partial-Least-Squares-Regression, als relativ einfache, lineare chemometrische Methode ist demnach nicht geeignet, den Zusammenhang zwischen den Elementgehalten im Biofilm und im Wasser zu beschreiben.

Mit der Anwendung von Künstlichen Neuronalen Netzen, können auch nichtlineare Zusammenhänge zwischen den Variablen berechnet werden. Analog dem Vorgehen bei der PLS-Modellierung werden drei Serien (S, T, ST) von Modellen berechnet. Die Biofilmproben des Teiches mit zweiwöchiger Aufwuchsdauer werden vernachlässigt, da man davon ausgehen muss, dass sich der Gleichgewichtszustand noch nicht eingestellt hat. In Tab. 6.4 ist die Einteilung der Daten für die Modellberechnung aufgezeigt.

Tab. 6.4: Gliederung des Datensatzes

	Training	Test	Anwendung
Saale	7	2	2
Teich	13	3	3
Beides	24	3	3

Die Beurteilung der Güte der berechneten Modelle erfolgt nach zwei Verfahren. Zum einen betrachtet man den RMSEP und somit den relativen Fehler des Modells. Bei der zweiten Methode wird die Wiederfindungsrate (WFR) der vorhergesagten Daten berechnet. Eine Modellierung wird als richtig gewertet, wenn die WFR zwischen 80 % und 120% liegt. Die Fehlergrenze von 20% wird aus der Abschätzung des Fehlers für das gesamte Analysenverfahren gewählt. Die angegebenen Kenngrößen berücksichtigen die vorhergesagten Daten aller drei Phasen. In Tab. 6.5 sind die Ergebnisse für eine Auswahl der berechneten Modelle angegeben. Anhang A5 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle berechneten ANN.

Tab. 6.5: Exemplarische Ergebnisse der ANN-Modellierung für die Matrix Saale-Teich

	Gewässer	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Ca	S	6587	58620	11,24	100	RBF 2:2-2-1:1
	T	15905	249406	6,40	95	MLP 6:6-7-5-1:1
	ST	19388	185810	10,86	97	RBF 1:1-5-1:1
Fe	S	44,83	338,06	13,26	82	GRNN 3:3-7-2-1:1
	T	33,11	666,30	5,16	95	MLP 14:14-7-1:1
	ST	139,20	556,89	26,22	87	GRNN 6:6-24-2-1:1
Se	S	0,12	0,72	16,82	73	Linear 9:9-1:1
	T	0,13	1,06	12,97	95	RBF 12:12-2-1:1
	ST	0,10	0,95	11,00	93	MLP 16:16-14-8-1:1

Die Modellkennung wird an einem Beispiel erläutert:

MLP 16:16-14-8-1:1

Mehrschichtiges Perceptron Netz mit 16 Eingangsvariablen; erste verdeckte Schicht mit 14 Perceptrons, zweite verdeckte Schicht mit 8 Perceptrons und eine Ausgangsvariable. Die Abkürzungen RBF und GRNN stehen für Radial Basis Funktion bzw. durch Regression Generalisierte Neuronale Netze (Generalized Regression Neural Networks).

Mit Künstlichen Neuronalen Netzen ist es gelungen, Modelle zu berechnen, mit denen eine Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Wasser und Biofilm möglich ist. Tendenziell sind die speziell für ein Gewässer berechneten Netze besser als die für Saale und Teich gemeinsamen. In Tab. 6.6 sind die Ergebnisse der ANN-Modellierung noch einmal zusammengefasst.

Tab. 6.6: Übersicht über die Modellierbarkeit der Elemente

	Gut modellierbar	Bedingt modellierbar	Nicht modellierbar
S	Ca, Cr, K, Mg, Na, P, Sr, Zn	Fe, Mn, Pb	Al, Cd, Co, Cu, Ni, Se
T	Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Se, Zn	Cd, K, P, Sr	Al, Cr, Pb
ST	Ca, K, Mg, Mn, Na, Se, Zn	Cd, Fe, P, Sr	Al, Co, Cr, Cu, Ni, Pb

Systematisch gezüchteten Biofilmen sind somit als Belastungsindikatoren für eine Vielzahl von Elementen anwendbar, denn sie spiegeln die Elementgehalte der entsprechenden Wasserproben relativ gut wider.

6.2 Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Saale-Teich-Leutra

Die bisher verwendete Datenmatrix wird durch Daten der Leutra ergänzt. Es handelt sich um Biofilmproben, die bei zwei Probenahmekampagnen von Steinen im Flussbett abgekratzt wurden. Die erste Probennahme, bei der im äquidistanten Abstand zehn Proben (L-1 bis L-10) entnommen wurden, erfolgte im Herbst 2005. Im Frühjahr 2006 sind an drei Orten (L-a bis L-b) Wiederholungsproben genommen worden. Nähere Informationen zur Probennahme, dem Analysenverfahren usw. sind in [123] enthalten. Die Elementgehalte der Biofilm- und Wasserproben sind von DC Mario Kallenbach zur Verfügung gestellt worden.

Für die multivariate Datenauswertung liegt nun eine Matrix mit 46 Objekten und 37 Merkmalen (Elementgehalte, pH-Wert, Leitfähigkeit, Wassertemperatur) vor.

6.2.1 Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes

Um einen ersten Überblick über die Struktur des Datensatzes zu bekommen, wird eine Clusteranalyse (Fusionierungsalgorithmus nach Ward, quadrierte euklidische Distanz) sowohl nach den Merkmalen als auch nach den Objekten durchgeführt. Die erhaltenen Dendrogramme werden zur Umordnung der standardisierten Datenmatrix verwendet. Die mit dem Clusterimaging erhaltene Farbkarte ist in Abb. 6.6 dargestellt.

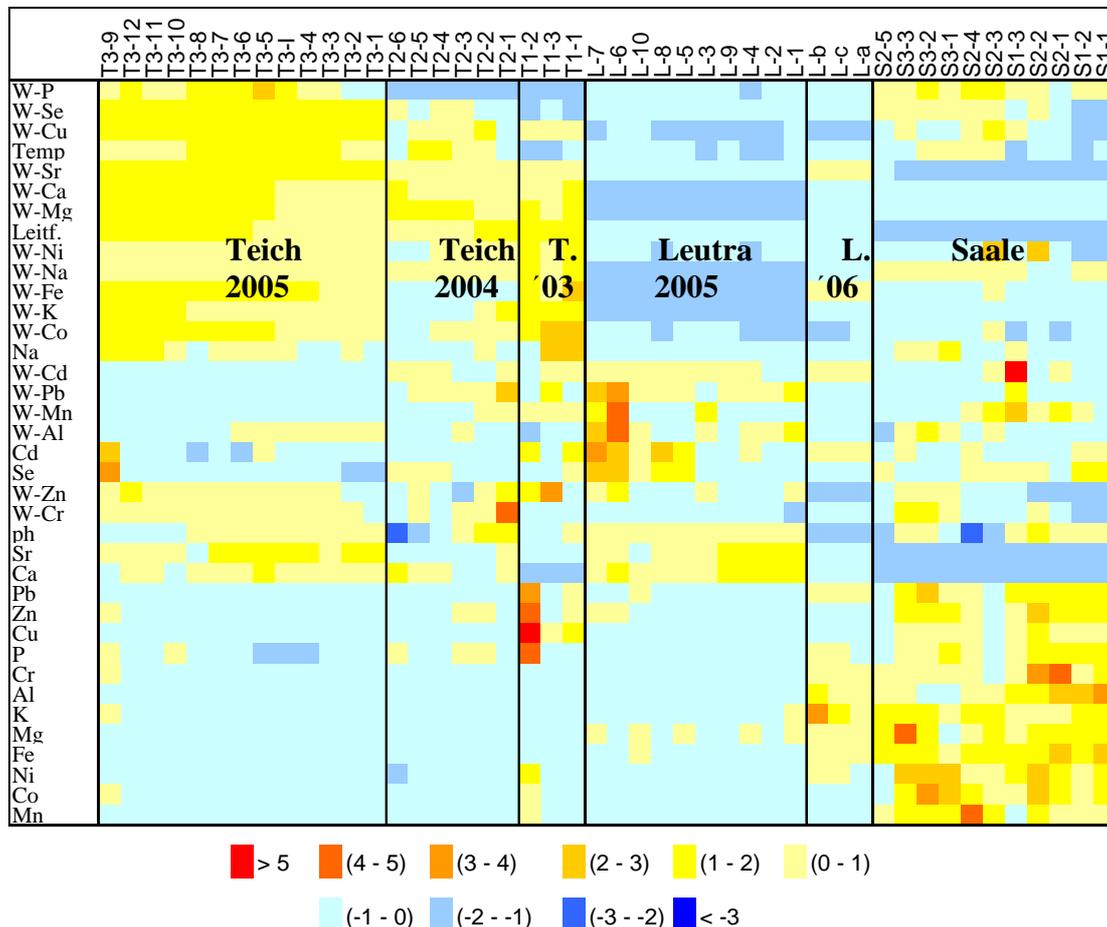


Abb. 6.6: Farbkarte der Matrix Saale-Teich-Leutra

Man erkennt die Trennung der Objekte anhand des Gewässers. Der Teich unterscheidet sich am deutlichsten von den beiden anderen Gewässern (gelber Bereich, links oben) durch die Elementgehalte von Ca, Cu, Co, Fe, K, Mg, Na, Ni, Se, Sr, P des Wassers sowie der Wassertemperatur und Leitfähigkeit. Unten rechts erkennt man einen gelben Bereich, der die Unterscheidungsmerkmale der Saale (Elementgehalte von Al, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Zn im Biofilm) darstellt. Für den Teich und die Leutra bilden sich Subcluster aus, die das Jahr der Probennahme widerspiegeln. Des weiteren erkennt man, dass sich die Cluster Leutra und Saale deutlich vom Teich unterscheiden. Man erhält einen ersten Hinweis auf den Unterschied zwischen Fließgewässer und stehendem Gewässer.

6.2.2 Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse

Um die Dimension der 37 Variablen zu erniedrigen, wird eine Faktorenanalyse durchgeführt. Man erhält sechs Faktoren mit einem Eigenwert größer Eins, die über 75% der Gesamtvarianz erklären. Mit den ersten beiden Faktoren kann man die drei Probengruppen voneinander unterscheiden. Diese Trennung ist in Abb. 6.7, die den Verlauf der Faktorwerte für die beiden ersten Faktoren darstellt, gut zu erkennen.

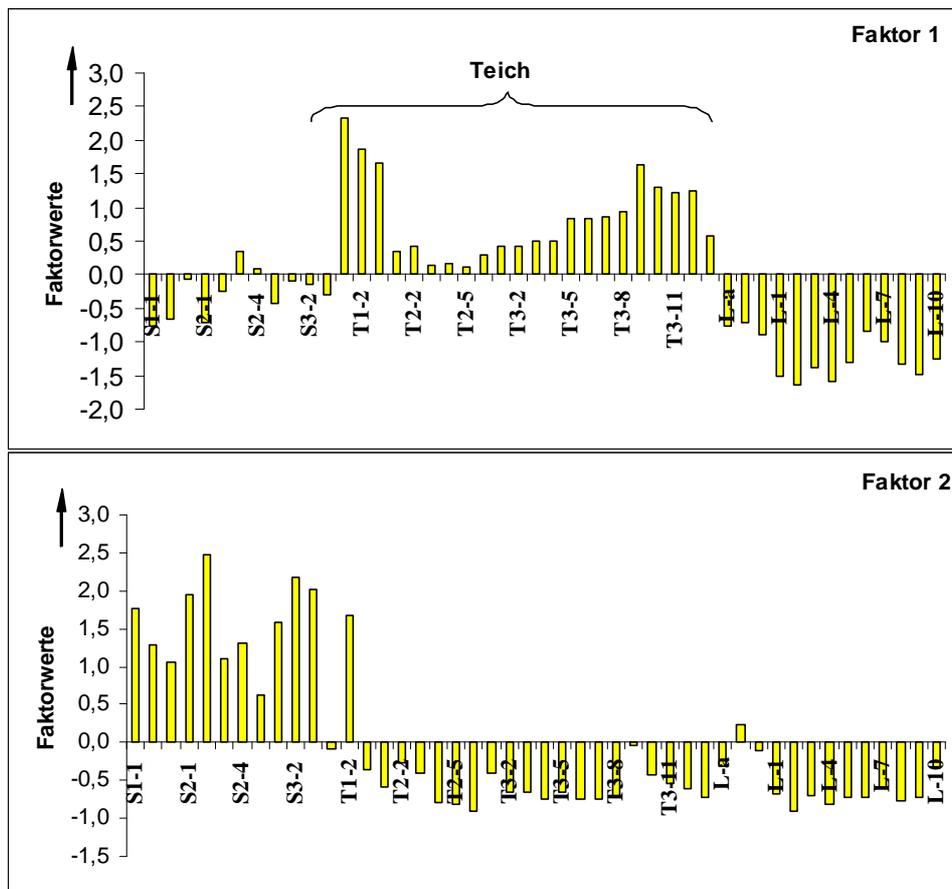


Abb. 6.7: Verlauf der Faktorwerte für die Matrix Saale-Teich-Leutra (Faktor 1 und 2)

Aus Tab. 6.7 kann man entnehmen, dass ein Teil der bereits mittels Clusterimaging ermittelten Variablen für die Trennung der drei Gewässer verantwortlich ist. Mit zwei Faktoren ist es somit möglich, die unterschiedlichen Verhältnisse in Saale, Teich und Leutra zu beschreiben. Die Faktoren 3 bis 6 stellen jeweils merkmalseigene Faktoren dar und sind im Hinblick auf die zu klärende Fragestellung nicht weiter von Interesse.

Tab. 6.7: Ergebniss der Faktorenanalyse der Matrix Saale-Teich-Leutra

Faktor	Eigenwert	erklärte Varianz in %	hochgeladene Variablen	Faktorladung	Interpretation
1	12,30	33,24	Co (W)	0,91	Trennung Saale/Leutra vom Teich
			Cu (W)	0,81	
			Fe (W)	0,83	
			Ni (W)	0,70	
			Na (BF)	0,73	
			Leitfähigkeit	0,72	
2	7,26	19,62	Ca (BF)	-0,81	Trennung Teich/Leutra von Saale
			Co (BF)	0,89	
			Cr (BF)	0,72	
			Fe (BF)	0,83	
			Mn (BF)	0,75	
			Ni (BF)	0,91	
			P (BF)	0,72	
			Pb (BF)	0,84	
			Sr (BF)	-0,71	
			Zn (BF)	0,79	
3	3,09	8,36	P (W)	0,70	merkmalseigen
4	2,34	6,33	Se (BF)	0,73	merkmalseigen
			Cd (BF)	0,86	
5	1,62	4,37	pH-Wert	0,66	merkmalseigen
6	1,31	3,53	Mn (W)	-0,69	merkmalseigen

6.2.3 Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen

Bisher haben sich für die Matrix **STL** zwei mögliche Klasseneinteilungen der Daten ergeben. Die erste stellt die Trennung Fließgewässer und stehendes Gewässer und die zweite die Unterscheidung der drei Gewässern dar. Analog dem Vorgehen für die Matrix **ST** werden die Faktorwerte als unabhängige Variablen verwendet.

Mit einer Klassifikationsfunktion ist die Trennung der Daten in Fließgewässer und stehendes Gewässer fehlerfrei möglich. Mit einem Λ_{willk} von 0,06 können die Klassen stehendes und fließendes Gewässer als statistisch abgesichert angesehen werden.

Wendet man die LDA auf die in drei Klassen unterteilte Matrix **STL** an, so erhält man zwei Diskriminanzfunktionen, mit denen eine fehlerfreie Klassifikation der Daten möglich ist. In Abb. 6.8 sind die Proben in der Ebene der beiden nicht-elementaren Diskriminanzfunktionen dargestellt. Man erkennt die Trennung der drei Klassen S, T und L. Des Weiteren sind die Streukreise für eine kritische Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05% eingezeichnet. Diese berechnen sich nach [96]:

$$r_i = \sqrt{\frac{b(n-g)}{n-g-b+1} \cdot \frac{n_i+1}{n_i} \cdot F(b, n-g-b+1)} \quad (6.1)$$

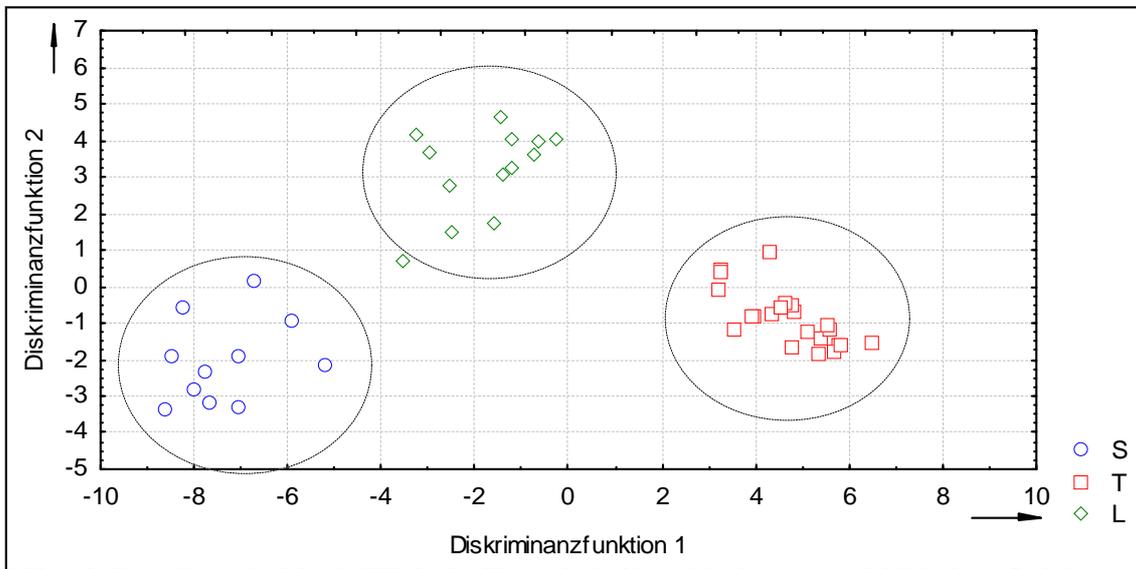


Abb. 6.8: Darstellung der Matrix STL in der Ebene der beiden nichtelementaren Diskriminanzfunktionen

Als zweite Klassifikationsmethode werden Support-Vektor-Maschinen angewendet. Da es sich um ein Verfahren handelt, bei dem nur zwei Klassen voneinander getrennt werden können, wird zunächst ein Modell für die Trennung des Fließgewässers vom stehenden Gewässer berechnet. Mit einem linearen Modell (polynomiale Kernfunktion: $p=1$; $C=1$; Kreuzvalidierung) ist eine vollständige Trennung der Gruppen möglich. In Abb. 6.9 sind die LAGRANGE-Multiplikatoren (κ) gegen die Funktionswerte aufgetragen und die Support-Vektoren markiert. Man erkennt deutlich die Trennung der beiden Klassen.

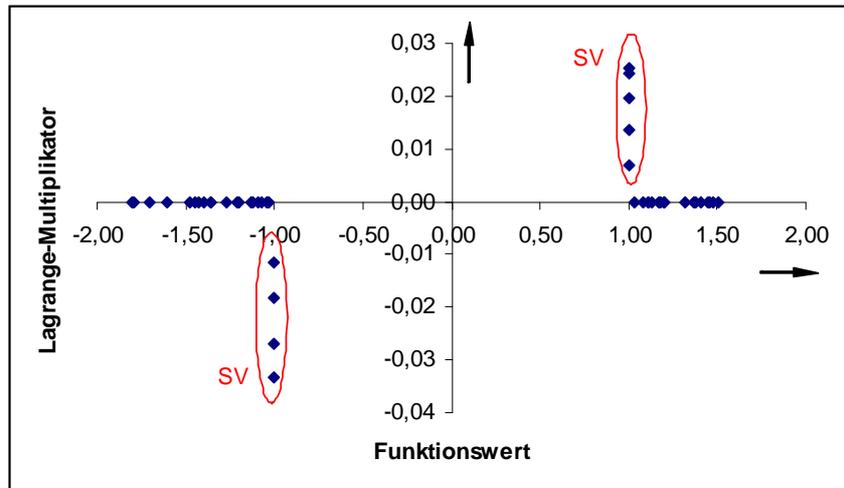


Abb. 6.9: Berechnete Funktionswerte und Lagrange-Multiplikatoren der Matrix **STL**

Im zweiten Modell werden nun die Proben der Leutra von denen der Saale getrennt. Auch hier erreicht man mit einem linearen Modell die richtige Klassifikation der Daten. Die Einteilung der Daten in die Klassen Saale, Teich und Leutra sind somit verifiziert.

6.2.4 Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen

Modellierung des Herkunftsgewässers

Die Einteilung des Herkunftsgewässers soll für unbekannter Proben mit Hilfe von Künstlichen Neuronalen Netzen berechnet werden. Der Datensatz wird nach dem Zufallsprinzip in 24 Trainings-, 11 Validierungs- und 11 Testdaten unterteilt.

Verwendet man alle Variablen für die Modellbildung, so stellt ein mehrschichtiges Perceptron Netz mit zwei verdeckten Schichten das einfachste ANN dar, mit dem eine fehlerfreie Einteilung der Daten erfolgt. In Abb. 6.10 ist das Schema des Netzwerkes angegeben. Man erkennt, dass drei Eingangsvariablen verwendet werden. Diese sind der Eisengehalt des Biofilms, die Leitfähigkeit und der Natriumgehalt des Wassers.

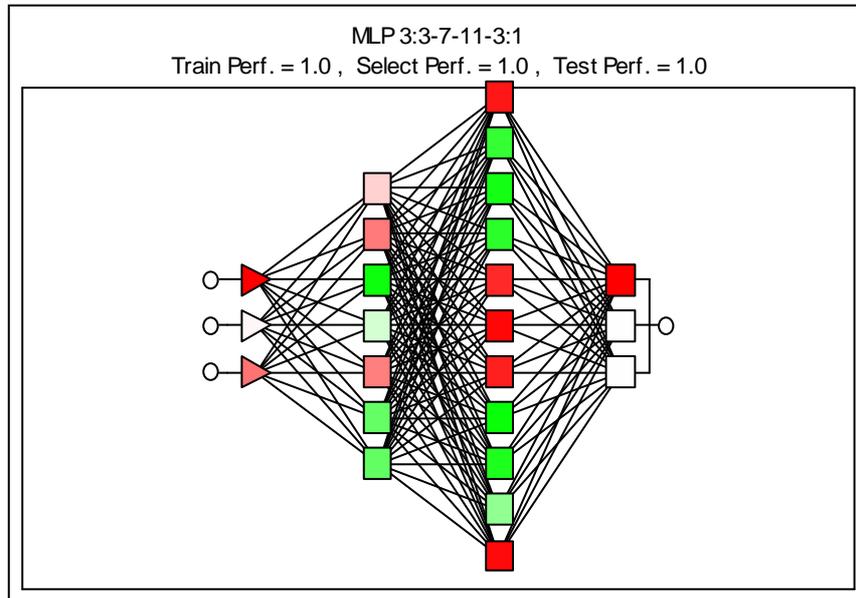


Abb. 6.10: Netzwerkillustration für die Modellierung des Herkunftsgewässers

Im Anschluss wird ein zweites ANN berechnet, bei dem nur die Elementgehalte der Biofilmpollen als Variablen angegeben werden. Ein RBF-Netz mit vier Eingangsvariablen (Gehalte an Co, Cr, Fe und Mg) stellt das einfachste Modell dar, mit dem alle unbekanntes Proben richtig zugeordnet werden. Man kann daher sagen, dass Biofilme ihre Wachstumsumgebung widerspiegeln, d. h. sie besitzen eine gewisse Indikatorfunktion. Durch die Bestimmung von vier Parametern ist eine Unterscheidung der Herkunftsgewässer möglich.

Modellierung von Elementgehalten in den Wasserproben

Die Eignung der analysierten Biofilme zur Prognose von Wasserbelastungen soll überprüft werden. Zu diesem Zweck werden Berechnungen mittels PLS und ANN durchgeführt.

Zunächst werden für jedes Element PLS1-Modelle (vollständigen Kreuzvalidierung) für die Proben der Leutra berechnet. Im Anschluss erfolgt die Berechnung von Modellen für die Matrix **STL**. Für einige exemplarische Beispiele sind die Ergebnisse in Tab. 6.8 dargestellt. Eine Übersicht über die Kenngrößen aller Modelle befindet sich im Anhang A6.

Tab. 6.8: Exemplarische Ergebnisse der PLS 1-Modellierung der Matrix **STL**
(r_v : Korrelationskoeffizient für CV)

Element	Gewässer	r_v	RMSEP _{CV}	Mittelwert	relativer Fehler in %
Co	Leutra	-0,92	0,042	0,17	25,37
	SLT	0,69	0,24	0,49	48,05
Fe	Leutra	0,98	45,93	110,23	41,64
	SLT	0,49	301,10	430,68	69,91
Sr	Leutra	0,98	376,14	1497,12	16,54
	SLT	0,69	4502,55	7775,20	56,14

Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse für die Leutraproben so erkennt man, dass für die Elemente Sr und Mg geeignete Modelle existieren. Sie besitzen einen hohen Korrelationskoeffizienten und einen relativen Fehler kleiner 20%. Mit der Darstellung vorhergesagte gegen gemessene Gehalte kann man die Modellgüte grafisch darstellen. Bei einem perfekten Modell, würde der Korrelationskoeffizient 1 betragen und alle Datenpunkte befänden sich auf der Ausgleichsgeraden. Für Sr, ist diese Darstellungsmethode in Abb. 6.11 zu sehen. Man erkennt, dass das berechnete Modell die gemessenen Werte recht gut wiedergibt.

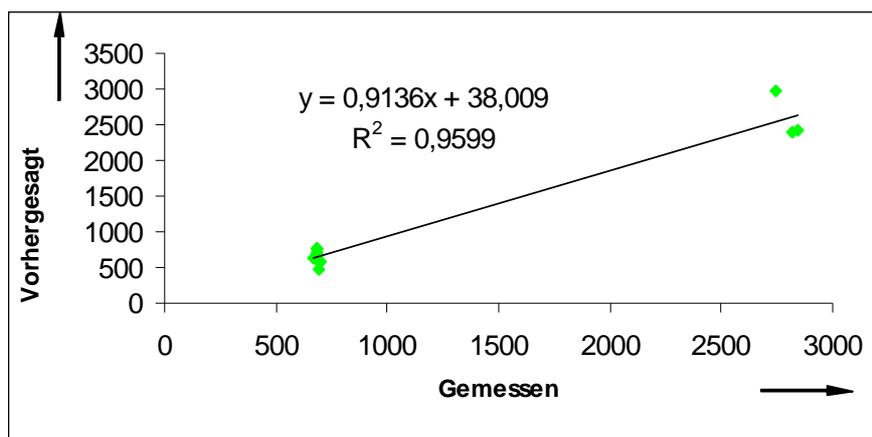


Abb. 6.11: vorhergesagte gegen gemessene Sr-Gehalte im Wasser

Für die Matrix **STL** ist es nicht möglich mit PLS1, Modellierungen unbekannter Elementgehalte der Wasserproben aus denen des Biofilms zu treffen. Mit dieser linearen Methode sind diese komplexen Zusammenhänge nicht beschreibbar. Auf Grund der für die Matrix

ST erhaltenen PLS2-Ergebnisse, werden keine Modelle für eine Matrix unabhängiger Variablen berechnet.

Analog der Vorgehensweise für die Matrix **ST** werden nun verschiedene Künstliche Neuronale Netze berechnet. Die Einteilung der Daten für die Berechnung des Modells sind in Tab. 6.9 aufgezeigt.

Tab. 6.9: Gliederung des Datensatzes STL

	Training	Test	Anwendung
Leutra	9	2	2
STL	36	5	5

Für die Beurteilung der Modellgüte werden der RMSEP und die Zahl der richtig modellierten Elementgehalte (siehe Kapitel 6.1.4) verwendet. Für einige exemplarische Beispiele sind die Ergebnisse der ANN-Modellierung in Tab. 6.10 angegeben. Anhang A7 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle berechneten Modelle.

Tab. 6.10: Exemplarische Ergebnisse der ANN-Modellierung für die Matrix STL

	Gewässer	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Ca	Leutra	3639,05	55872	6,51	100	Linear 4:4-1:1
	STL	12683,20	149089	9,18	96	MLP 18:18-15-10-1:1
Cu	Leutra	0,33	2,21	15,02	85	GRNN 12:12-9-2-1:1
	STL	1,27	5,34	23,73	63	Linear 12:12-1:1
Se	Leutra	0,02	0,46	4,49	100	RBF 5:5-4-1:1
	STL	0,14	0,83	17,38	76	GRNN 13:13-36-2-1:1

Eine Vielzahl von Elementgehalten der Leutrawasserproben lassen sich mit Hilfe von ANN durch die Elementgehalte der Biofilmproben beschreiben. Tab. 6.11 ordnet die Elemente bezüglich ihrer Modellierbarkeit.

Tab. 6.11: Einteilung des Datensatzes für die ANN-Modellierung

Modellierbar	Bedingt modellierbar	Nicht modellierbar
Ca, Co, Cr, Mg, Mn, Na, Ni, Se, Sr	Cd, Cu, Fe, P	Al, Mn, Pb, Zn

Obwohl die Biofilme der Leutra von den Steinen im Flussbett abgekratzt wurden, lassen sich zum Teil bessere Modelle berechnen als mit den systematisch gezüchteten Biofilmen in Saale und Teich. Die Biofilme der natürlichen Substrate stellen somit auch geeignete Indikatoren für Umweltbelastungen in Gewässern dar.

Die Modelle für die Matrix **STL** sind erwartungsgemäß schlechter als die für die einzelnen Gewässer. Daher sollten für die Vorhersage unbekannter Proben gewässerspezifische Modelle verwendet werden.

Aus den bisherigen Berechnungen zu den Matrizen **ST** und **STL** ergibt sich, dass Biofilme für ein Umweltmonitoring prinzipiell geeignet sind. Sie spiegeln die chemische Umgebung ihrer Ursprungsgewässer wider. Untersucht man zunächst systematisch von einem Gewässer sowohl Biofilm- als auch Wasserproben, so ist es möglich, aus dieser Datenmatrix geeignete Vorhersagemodelle zu berechnen. Für eine große Zahl von Elementen können dann mittelfristige Wasserbelastungen aus den Elementgehalten der Biofilmproben modelliert werden.

6.3 Chemometrische Auswertung und Interpretation der Matrix Biofilme natürlicher Substrate

Mit einer Auswahl nur einmalig entnommener, beliebiger Biofilm- und entsprechender Wasserproben soll überprüft werden, ob es möglich ist, Beziehungen zwischen Wasser und Biofilm bzw. zwischen den Proben zu beschreiben.

Für die folgenden Berechnungen werden die Elementgehalte (Wasser, Biofilm) der in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Proben verwendet. Man erhält somit eine Matrix mit 25 Objekten und 34 Merkmalen.

6.3.1 Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes

Um einen ersten Überblick über die Beschaffenheit des Datensatzes zu bekommen, wird analog dem Vorgehen in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 eine hierarchische, agglomerative Clusteranalyse mit dem Fusionierungsalgorithmus nach Ward und dem Distanzmaß quadrierte euklidische Distanzen durchgeführt. Es wird das Dendrogramm zum einen für die Merkmale und zum anderen für die Objekte berechnet. Diese werden für die Neuordnung des Datensatzes beim Clusterimaging herangezogen. Aus der gleichzeitigen Darstellung der Ähnlichkeiten von Objekten und Merkmalen resultiert eine Farbkarte (Abb. 6.12).

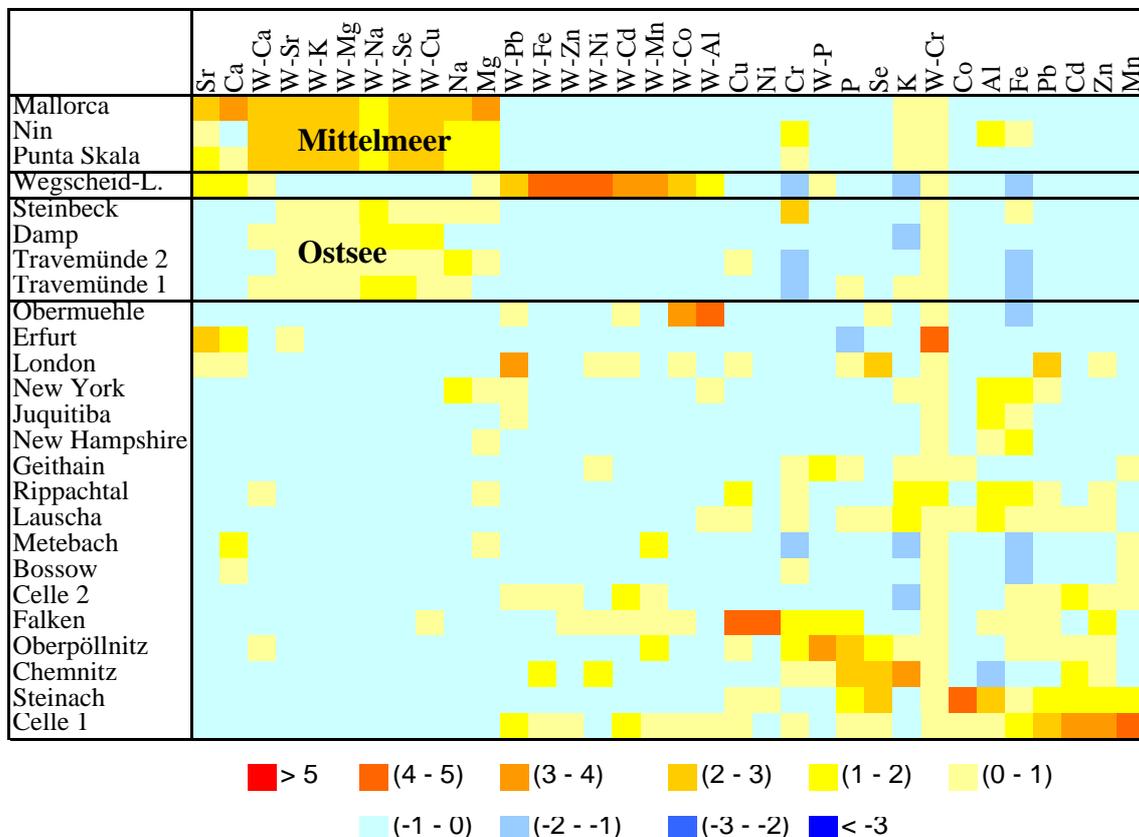


Abb. 6.12: Farbkarte der Matrix der Biofilmproben natürlicher Substrate

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Biofilmproben des Mittelmeeres von den restlichen stark unterscheiden. Eine exponierte Stellung nimmt die Probe aus Wegscheid-Lenggrieß ein. Diese Probe ist kurz nach der Quelle entnommen worden (noch kein richtiger Bachlauf) und unterscheidet sich somit von allen anderen Proben. Den dritten

Cluster bilden die Proben der Ostsee. Die restlichen Proben sind im vierten Cluster vereint. Aus den Ergebnissen lässt sich eine Gruppierung der Daten in Proben des Meeres und des Süßwassers vermuten.

6.3.2 Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse

Für die Anwendung der LDA ist es notwendig, dass die Zahl der Variablen kleiner als die Fallzahl ist. Daher wird zunächst eine Methode der Variablenreduktion, die Faktorenanalyse, eingesetzt.

Man erhält acht Faktoren mit einem Eigenwert größer eins, die insgesamt etwa 80% der Gesamtvarianz beschreiben. Betrachtet man sich den Verlauf der Faktorwerte für die ersten beiden Faktoren (Abb. 6.13), so erkennt man, dass der erste Faktor die Proben des Meeres von den restlichen abtrennt und das Faktor zwei die Probennahmestelle Wegscheid-Lenggriß charakterisiert.

Für die Unterscheidung der Meerwasser- von den Süßwasserproben sind hauptsächlich die Gehalte an Mg und Na im Biofilm und Ca, Cu K, Mg, Na und Sr im Wasser verantwortlich. Die Elementpalette spiegelt den unterschiedlichen Salzgehalt beider Probengruppen wider. Der Faktor 2 ist hochgeladen an den Gehalten von Cd, Fe, Mn, Ni und Zn im Wasser. Diese Elemente charakterisieren die Belastungen der Probe Wegscheid-Lenggriß.

Die Faktoren 3 bis 8 stellen merkmalseigene Faktoren dar, die im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit keinen Einfluss haben. Anhang A8 enthält eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse.

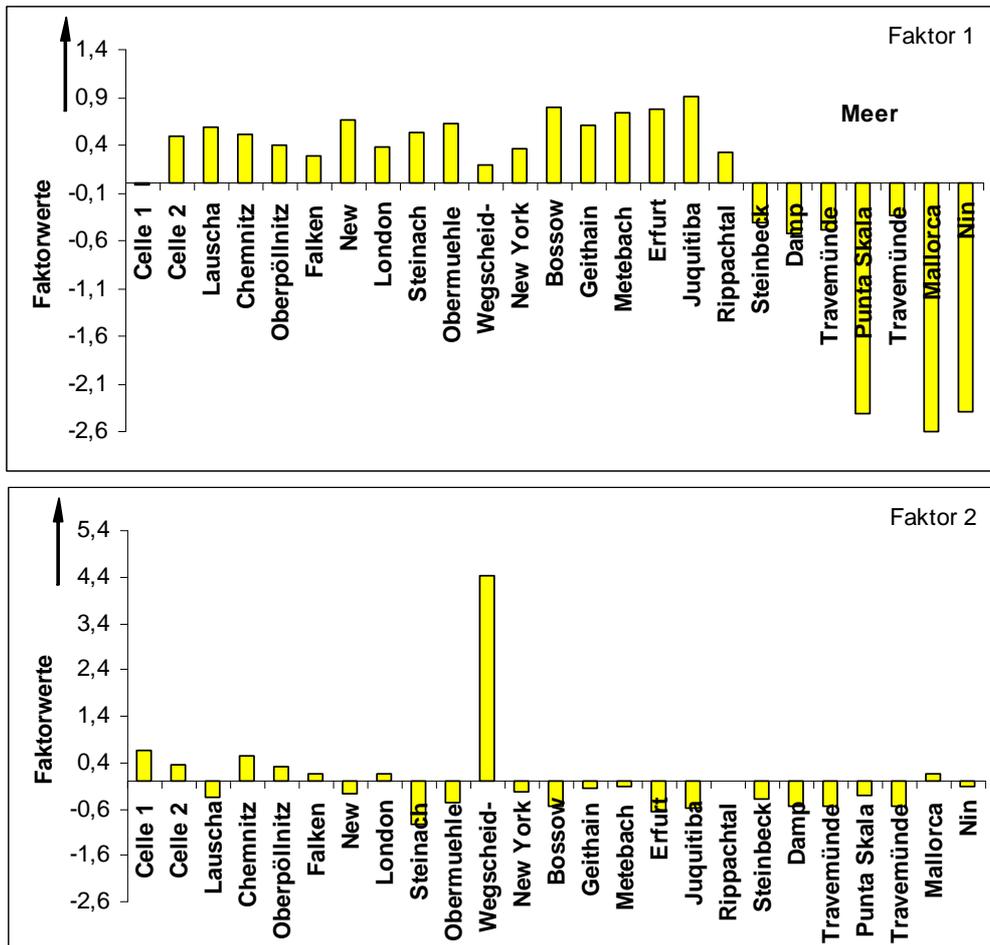


Abb. 6.13: Verlauf ausgewählter Faktorwerte für die Proben der natürlichen Substrate

6.3.3 Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen

Die durch Cluster- und Faktorenanalyse erhaltene Gruppierung der Daten soll nun bestätigt werden. Hierzu wird analog dem Vorgehen bei den Matrizen **ST** und **STL** eine lineare Diskriminanzanalyse mit den Faktorwerten als unabhängige Variablen durchgeführt. Das Ergebnis ist eine fehlerfreie Klassifikation der Daten in Meer und Süßwasser ($\Lambda_{\text{willk}}: 0.14$). In Abb. 6.14 wird diese Trennung grafisch dargestellt.

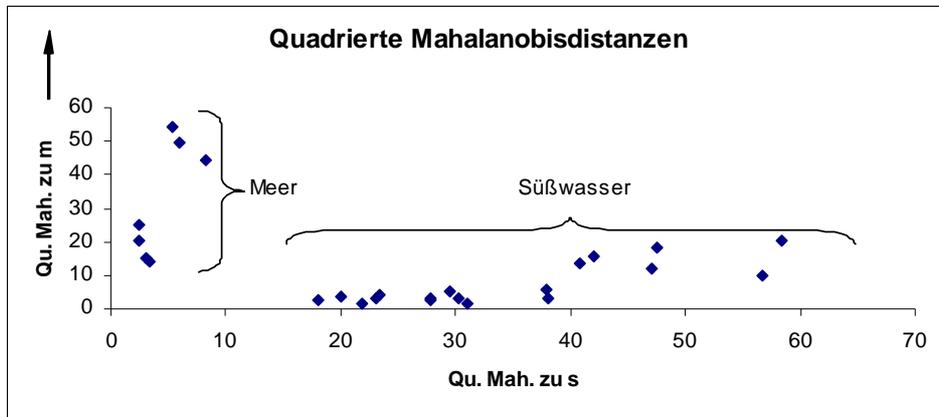


Abb. 6.14: Grafische Darstellung der quadrierten Mahalanobisdistanzen zu den Gruppen-Zentroiden der Klassen Süßwasser (s) und Meer (m)

Auch mit dem Support-Vektor-Maschinen wird ein lineares Modell (Kernelfunktion: polynomial (Grad 1); $C = 1$) berechnet, mit dem eine fehlerfreie Zuordnung der Daten in die entsprechenden Klassen möglich ist. Die Klassen Meer (m) und Süßwasser (s) sind somit verifiziert.

Aus sachlogischen Gründen ist es sinnvoll, die Proben des Süßwassers in fließendes (f) und stehendes Gewässer (s) zu unterteilen. Auf dieses Drei-Klassen-Problem wird nun zunächst das Verfahren der linearen Diskriminanzanalyse angewendet. In Tab. 6.12 ist die erhaltene Klassifikationsmatrix dargestellt. Man erkennt, dass trotz gutem Λ_{wilk} (0.084) vier Proben (Geithain, Juquitiba, New York, Rippachtal) falsch zugeordnet sind. Stellt man die Proben in der Ebene der beiden nicht-elementaren Diskriminanzfunktionen (Abb. 6.15) dar, erkennt man das Überlappen der Gruppen stehendes und fließendes Gewässer.

Tab. 6.12: Klassenzuordnung für die gegebenen Klassen f, m, s

Gruppe	Zuordnung	f	m	s
f	75 %	9	0	3
m	100 %	0	7	0
s	83 %	1	0	5
Gesamt	84 %	10	7	8

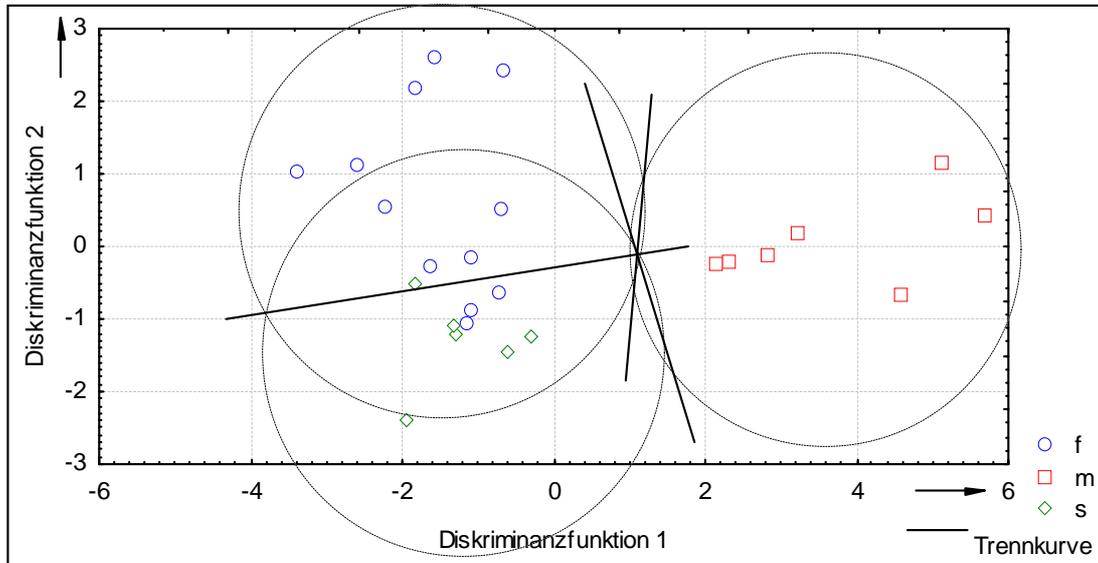


Abb. 6.15: Darstellung der Proben im Raum der beiden nicht-elementaren Diskriminanzfunktionen

Die Trennung dieser zwei Klassen ist mit der LDA nicht fehlerfrei möglich. Daher müssen komplexere, nichtlineare chemometrische Methoden angewendet werden. Eine dieser Methoden stellen die Support-Vektor-Maschinen dar. Mit ihnen ist es jedoch nur möglich, zwei Klassen voneinander zu trennen. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Modell berechnet das die Meerproben von den restlichen trennen soll. Das Ergebnis ist ein lineares Modell (Kernfunktion: polynomial; $C = 1$).

Im Anschluss wird ein Modell für die Trennung der Proben in fließendes und stehendes Gewässer berechnet. Es ist jedoch auch mit SVM (vollständige Kreuzvalidierung) nicht gelungen, die Klassen fehlerfrei von einander zu trennen. Dazu werden im folgenden Kapitel Rechnungen mit Künstlichen Neuronalen Netzen durchgeführt.

6.3.4 Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen

Modellierung des Herkunftsgewässers

Mit Hilfe von ANN soll berechnet werden, ob es möglich ist, für unbekannter Proben das Herkunftsgewässer zu modellieren. Der Datensatz wird nach dem Zufallsprinzip in 19 Trainings-, 3 Validierungs- und 3 Testdaten unterteilt.

Bei der Verwendung von allen Variablen für die Modellbildung, stellt ein Mehrschichtiges Perceptron Netz mit einer verdeckten Schicht und sieben Eingangsvariablen das einfachste ANN dar, mit dem alle Proben richtig zugeordnet werden. Die Gehalte von Al, K und Mg für den Biofilm und von Na, Se, P und Pb für das Wassers werden für das Modell verwendet.

Es ist nicht gelungen nur mit den Elementgehalten der Biofilmproben ein Modell zu berechnen, nach dem eine fehlerfreie Zuordnung der Proben in die entsprechenden Klassen erfolgt. Das beste Modell, ein Mehrschichtiges Perceptron mit zwei verdeckten Schichten und 16 Eingangsvariablen (alle Gehalte außer Cu), ordnet die Probe aus Metebach fälschlicherweise den fließenden Gewässern zu. Dieses Ergebnis wird jedoch akzeptiert.

Biofilme abgekratzt von natürlichen Substraten spiegeln ihre Aufwuchsumgebung wider. Die einmalige Untersuchung eines Gewässers reicht bereits aus, die Proben anhand ihres Herkunftsgewässers zu klassifizieren und somit zu unterscheiden.

Modellierung von Elementgehalten in den Wasserproben

Analog dem bisherigen Vorgehen werden zunächst Modelle mit PLS-Regression berechnet. Die Validierungsmethode stellt wiederum die vollständige Kreuzvalidierung dar. Es ist nicht möglich, ein geeignetes PLS-Modell für die Vorhersage von Elementgehalten in den Wasserproben aus den Gehalten der Biofilme zu berechnen. Für eine Vielzahl verschiedenartiger Proben ist diese lineare Regressionsmethode somit nicht geeignet, die komplexen Zusammenhänge zwischen Biofilm und Wasser zu beschreiben.

Im Anschluss werden Modelle mit Künstlichen Neuronalen Netzen berechnet. Der Datensatz wird hierzu nach dem Zufallsprinzip in 19 Trainings-, 3 Validierungs- und 3 Testdaten eingeteilt. Für die Beurteilung der Modellgüte werden der RMSEP und die Anzahl der richtig modellierten Elementgehalte verwendet. Für einige exemplarische Beispiele sind die Ergebnisse der ANN-Modellierung in Tab. 6.13 angegeben. Anhang A9 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle berechneten Modelle.

Tab. 6.13: Exemplarische Ergebnisse der ANN-Modellierung für die Matrix BnS

	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Al	179,5	93,0	195	24	Linear 1:1-1:1
Cr	0,6	5,9	10	96	GRNN 2:2-19-2-1:1
K	29844,6	92104,2	32	64	GRNN 4:4-19-2-1:1

Die Chromgehalte des Wassers sind aus den Elementgehalten des Biofilms berechenbar. Für Cd und Ni erhält man auch noch über 80% richtige Modellierungen, d. h. für mehr als 80% der Proben lag die Wiederfindungsrate zwischen 80 und 120% (näheres, siehe Kapitel 6.1.5). Bei allen anderen Elementen ist es jedoch nicht möglich, die Elementgehalte im Wasser mit den im Biofilm in Verbindung zu bringen. Der Zusammenhang zwischen Elementgehalten im Wasser und im Biofilm ist sehr komplex, so dass er nicht durch die einmalige Probennahme verschiedenartiger Biofilmproben beschrieben werden kann. Für die Anwendung der Biofilme als Belastungsindikatoren ist es daher notwendig, zunächst einen Datensatz aus einer Vielzahl von systematisch gewonnenen Proben (gezüchtet oder von natürlichen Substraten) zu erzeugen. Im Anschluss können Modelle berechnet werden, mit denen auch Vorhersagen von unbekanntem Proben möglich sind.

6.4 Chemometrische Auswertung und Interpretation der Gesamtmatrix

Fasst man alle Proben zusammen, so erhält man eine Datenmatrix mit 71 Objekten. Als Merkmale werden die 17 Metallgehalte im Wasser sowie im Biofilm verwendet. Für die folgenden Berechnungen liegt somit eine (71 X 34)-Matrix vor.

6.4.1 Clusteranalyse und Clusterimaging zur Visualisierung des Datensatzes

Analog dem bisherigen Vorgehen erfolgt eine hierarchische, agglomerative Clusteranalyse, der sich das Clusterimaging anschließt. Die erhaltene Farbkarte zeigt Abb. 6.16.

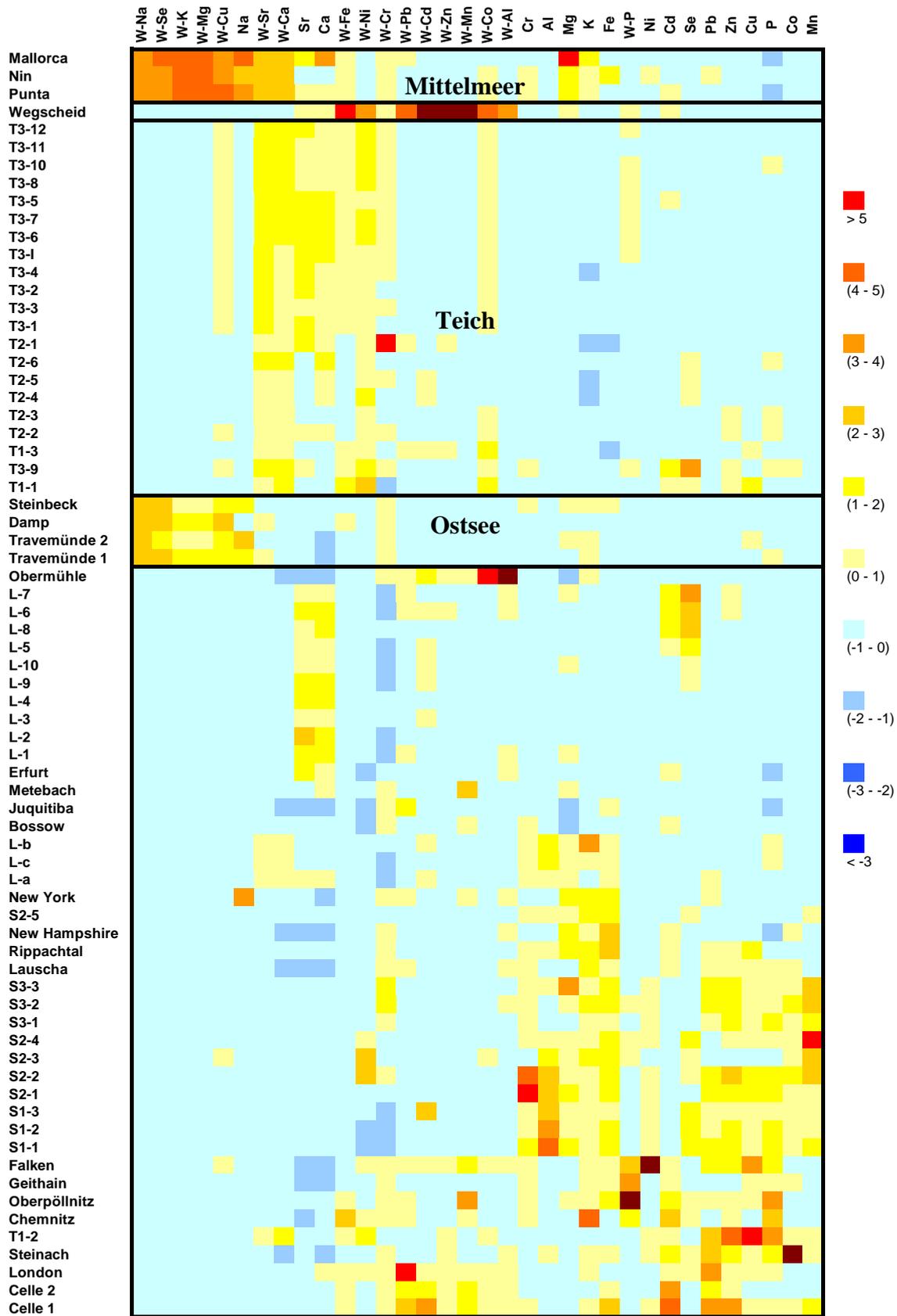


Abb. 6.16: Farbkarte der Gesamtmatrix

Es ist deutlich, die exponierte Stellung der Mittelmeerproben und der Probe aus Wegscheid-Lengrieß zu erkennen. Der dritte Cluster wird durch die Teichproben gebildet, welche durch hohe Ca und Sr-Gehalte charakterisiert sind. Die Proben der Ostsee sind in einem vierten Cluster zusammengefasst. Analog den Mittelmeerproben setzen sich beispielsweise auch die Natriumgehalte von den Süßwasserproben ab. Zwischen den restlichen Proben ist keine Unterscheidung mehr möglich. Sie bilden gemeinsam den fünften Cluster.

6.4.2 Variablenreduktion mit Hilfe der Faktorenanalyse

Wendet man eine Hauptfaktorenanalyse auf **G** an, so erhält man sieben Faktoren mit einem Eigenwert größer Eins, die eine Gesamtvarianz von etwa 70% erklären. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse enthält Tab. 6.14.

Tab. 6.14: Ergebnisse der Faktorenanalyse

Faktor	Eigenwert	erklärte Varianz in %	hochgeladene Variablen	Faktorladung	Interpretation
1	7,77	22,86	Na (BF)	-0,84	Meer
			Cu (W)	-0,92	
			Se (W)	-0,97	
			Mg (W)	-0,98	
			Na (W)	-0,93	
			K (W)	-0,98	
2	5,65	16,63	Cu (BF)	0,77	Schwermetalle Biofilm
			Zn (BF)	0,86	
			Pb (BF)	0,81	
3	4,24	12,48	Mn (W)	0,85	Schwermetalle Wasser
			Zn (W)	0,87	
			Cd (W)	0,84	
			Pb (W)	0,71	
4	2,10	6,16	Ni (W)	0,71	Teich
			Ca (W)	0,77	
5	1,42	4,16	Fe (BF)	0,70	Saale
			Al (BF)	0,74	
6	1,27	3,73	Se (BF)	-0,46	merkmalseigen
7	1,05	3,09	Al (W)	-0,69	merkmalseigen

Aus der Tabelle sowie aus dem Verlauf der Faktorwerte entlang der Probennahmestellen (Abb. 6.17) ergibt sich folgende Interpretation. Durch den ersten Faktor werden die Meeresproben von den Süßwasserproben getrennt. Die Faktoren 4 bzw. 5 repräsentieren die Teich- bzw. Saaleproben. Faktor 2 und 3 spiegeln die Schwermetallgehalte der Biofilm bzw. Wasserproben wider. Bei den beiden letzten Faktoren handelt es sich um merkmalseigene. Das Ergebnis der Faktorenanalyse ist eine Reduktion der 34 Variablen auf sieben, relativ gut kausal interpretierbare Faktoren.

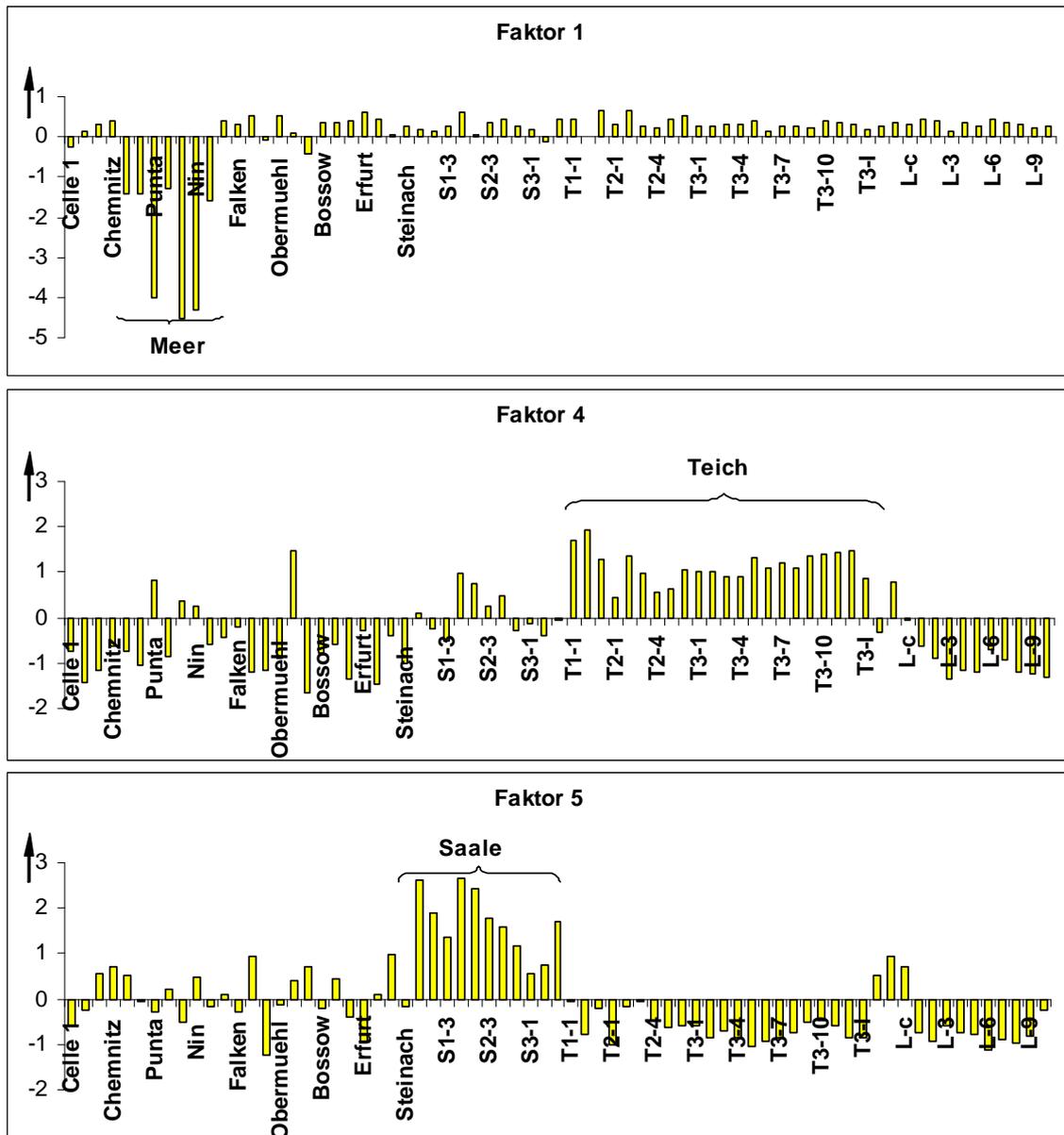


Abb. 6.17: Verlauf der Faktorwerte der Matrix **BnS** für die Faktoren 1, 4 und 5

6.4.3 Klassifikation der Daten mit linearer Diskriminanzanalyse und Support-Vektor-Maschinen

Mit der LDA wird nun überprüft, ob die Einteilung der Proben in Meer, stehendes Gewässer und Fließgewässer statistisch abgesichert werden kann. Für die Berechnung wird die standardisierte Gesamtmatrix verwendet. Auf die Verwendung der Faktorwerte kann verzichtet werden, da eine genügend große Anzahl an Objekten vorhanden ist. Im Gegensatz zu dem bisher verwendeten Standardverfahren, wird das Verfahren“schrittweise rückwärts” (F-Wert für den Ausschluss: 1) angewendet. Bei ihm werden zunächst alle Variablen in das Modell aufgenommen. In jedem Schritt eliminiert man diejenige Variable, die am wenigsten zur Modellierung der Gruppenzugehörigkeit beiträgt. Im berechneten Modell sind dann die Variablen enthalten die am meisten zur Trennung (Diskrimination) zwischen den Gruppen beitragen.

Das berechnete Modell enthält die Gehalte von Al, Co, Fe, Mg, Mn, Sr und Na im Biofilm sowie die Gehalte von Al, Ca, Co, Cr, Cu, Ni, Se, P und Pb im Wasser als Variablen. Mit ihm wird die richtige Zuordnung aller Proben erreicht. Die Trennung der drei Klassen wird in Abb. 6.18 verdeutlicht. Durch die unterschiedliche Skalierung der Achsen erscheinen die Streukreise als Ellipsen.

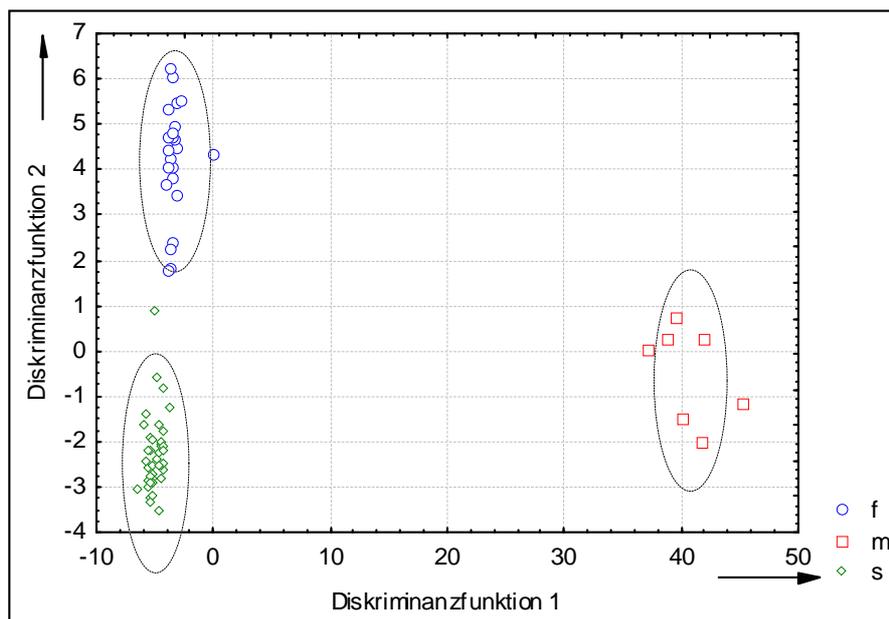


Abb. 6.18: Darstellung der Proben im Raum der zwei nicht-elementaren Diskriminanzfunktionen

Durch die hohe Probenzahl und somit die Durchführbarkeit der Modellbildung mit allen Variablen ist es im Gegensatz zum Datensatz BnS möglich, auch die Proben der Fließgewässer von denen der stehenden Gewässer zu trennen. Die Proben unterscheiden sich also signifikant voneinander.

Da Support-Vektor-Maschinen nur die Trennung von zwei Klassen ermöglichen, werden zwei verschiedene Modelle berechnet:

- Meer / restlichen Proben
- Fließgewässer / stehendes Gewässer

Die Überprüfung des Modells geschieht in diesem Fall durch zufälliges Teilen des Datensatzes in modellbildende Proben (34) und in Testdaten (30). Mit einer linearen Kernfunktion und einem C von Eins wird ein Modell berechnet, mit dem alle Proben des Testdatensatzes korrekt klassifiziert werden. Den größten Einfluss auf die Klassifikation haben hierbei die Gehalte von Al und Mg im Wasser.

Mit den SVM ist es gelungen, unbekannte Proben nach ihrem Herkunftsgewässer zu ordnen. Für die Berechnung eines geeigneten Modells ist es notwendig, einen umfangreichen Ausgangsdatsatz zu verwenden. Die Matrix BnS wird durch die systematisch gezüchteten Biofilme der Saale und des Teiches sowie durch den Datensatz der Leutra ergänzt. Es ist also erforderlich, zunächst ausführliche Untersuchungen an einem Gewässer durchzuführen. Aus den erhaltenen Zusammenhängen ist dann eine Verallgemeinerung auf unbekannte, auch nur einmalig entnommene Biofilmproben möglich.

6.4.4 Berechnung von Modellen mit Partial-Least-Squares-Regression und Künstlichen Neuronalen Netzen

Modellierung des Herkunftsgewässers

Die Daten werden zur Modellbildung und -überprüfung nach dem Zufallsprinzip in 61 Trainings-, 5 Validierungs- und 5 Testdaten eingeteilt. Eine fehlerfreie Modellierung des Herkunftsgewässers ist mit verschiedenen Modellen der Künstlichen Neuronalen Netze

möglich. In die bereits mittels LDA und SVM verifizierten Klassen können unbekanntes Proben richtig eingeordnet werden.

Modellierung von Elementgehalten in den Wasserproben

Sowohl mit Partial-Least-Squares-Regression als auch mit Künstlichen Neuronalen Netzen ist es nicht möglich, geeignete Modelle zu berechnen, die in der Lage sind, die Elementgehalte im Wasser aus denen im Biofilm vorherzusagen. Für diese Art von Berechnungen sind ausführliche, gewässerspezifische Daten notwendig.

6.5 Überblick

In den Tab. 6.15 und Tab. 6.16 wird eine Zusammenfassung aller Ergebnisse der multivariaten Datenauswertung gegeben. Für alle vier Matrizen erhält man bereits aus dem Clusterimaging Hinweise über eine entsprechende Einteilung des Datensatzes. Die aus der Faktorenanalyse gewonnenen Faktorwerte werden bei Notwendigkeit für die lineare Diskriminanzanalyse verwendet. Mit der LDA und den Support-Vektor-Maschinen erfolgt im Anschluss die Verifizierung der bisher angenommenen Klassen. Für die systematisch gezüchteten Biofilme der Saale und des Teiches sowie für die Daten der Leutra existieren geeignete PLS1-Modelle bzw. Künstliche Neuronale Netze zur Modellierung einer Vielzahl von Elementgehalten des Wassers aus denen des Biofilms. Man kann somit sagen, dass Biofilme in der Lage sind, die chemische Umgebung ihres Aufwuchsgewässers widerzuspiegeln.

Tab. 6.15: Überblick über die Modellierbarkeit der Elementgehalte

Teich	Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Se, Sr, Zn mit ANN modellierbar
Saale	Ca, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Sr, Zn mit ANN modellierbar
Leutra	Mg, Sr mit PLS modellierbar
	Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, P, Se, Sr mit ANN modellierbar

Tab. 6. 16: Zusammenfassung der multivariaten Datenauswertung

Proben	CA / CI	FA	LDA / SVM	PLS / ANN
Saale Teich	Cluster: Saale Teich	8 Faktoren Faktor 1: Trennung S/T	Verifizieren d. Klassen: S T	Ca, Cd, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr, Zn mit ANN modellier- bar
Saale Teich Leutra	Cluster: Saale Teich Leutra Subcluster: Charge (T, L)	6 Faktoren Faktor 1: Separation. T Faktor 2: Separation S	Verifizieren d. Klassen: S T L	Ca, Co, Fe, K, Mg, Na, Sr mit ANN mo- dellierbar
Biofilme natürli- cher Substrate	Cluster: Mittelmeer Wegscheid Ostsee restl. Proben	8 Faktoren Faktor 1: Separation. Meer Faktor 2: Separation Wegscheid	Verifizieren d. Klassen: Meer Süßwasser keine Trennung: fließendes Gewässer stehendes Gewässer	Cr, Cd, Ni mit ANN modellierbar
Gesamt- matrix	Cluster: Mittelmeer Wegscheid Ostsee Teich restl. Proben	7 Faktoren Faktor 1/ 4 / 5: Separation Meer / Teich / Saale	Verifizieren d. Klassen: Meer fließendes Gewässer stehendes Gewässer	keine Modellierung möglich

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Fragestellungen untersucht worden:

- Wie züchtet man die Biofilme?
- Wie kann man die Elementgehalte der Biofilme analysieren?
- Wie lange sollte die Aufwuchszeit für gezüchtete Biofilme betragen?
- Sind die Gehalte von parallel gezüchteten Biofilmen überhaupt vergleichbar?
- Haben die Jahreszeit und somit das Wetter Einfluss auf das Akkumulationsverhalten des Biofilms?
- Können verallgemeinerbare Anreicherungsfaktoren für jedes Element berechnet werden?
- Ist es möglich, Biofilme anhand ihres Herkunftsgewässers zu unterscheiden?
- Welche Elemente haben den größten Einfluss hinsichtlich der Differenzierung verschiedener Biofilmproben?
- Können aus den Elementgehalten im Biofilm Rückschlüsse auf die Belastungen des Wassers gezogen werden?

Zu Beginn der praktischen Arbeiten ist nach einer Möglichkeit gesucht worden, systematische Untersuchungen an Biofilmen durchzuführen. Zu diesem Zweck ist eine Probenahmebox konstruiert worden, in der acht Proben parallel gezüchtet werden können. Um Einflüsse des Substrates auszuschließen, sind Polycarbonatplatten als Aufwuchsoberflächen verwendet worden. Die Probenahmebox ist so in die Gewässer eingebracht worden, dass sich die Platten senkrecht und etwa 20 cm unter der Wasseroberfläche befanden. Des weiteren mussten die Probennahmestellen festgelegt werden. Um ein möglichst breites Spektrum an Einflussfaktoren abzudecken, ist die systematische Probennahme zum einem in einem anthropogen belasteten Fließgewässer (Saale) und zum anderen in einem stehendem Gewässer (Gartenteich) durchgeführt worden.

Die Analyse der Wasser sowie der Biofilmproben erfolgte mittels ICP-OES und ICP-MS. Da es sich bei Biofilmen um Feststoffe handelt, müssen diese bei der Verwendung dieser atomspektroskopischen Analysemethoden in eine flüssige Messprobe überführt werden.

Ein offener Aufschluss mit Perchlorsäure ist zunächst entwickelt und optimiert sowie im Anschluss angewendet worden.

Mit den ersten systematisch gezüchteten Biofilmen sollte die Frage der optimalen Aufwuchsdauer geklärt werden. Durch den Kälteeinbruch während dieser Versuchsreihe ist der Datensatz diesbezüglich nicht auswertbar. Es wurde dann sachlogisch festgelegt, dass die Aufwuchsdauer für die folgenden Biofilmproben sechs Wochen beträgt. Nach dieser Zeit ist eine genügend große Menge an Probensubstanz vorhanden und man kann davon ausgehen, dass die Biofilmbildung die Plateau-Phase erreicht hat. Letzteres konnte mit Biofilmen einer späteren Charge durch einen Standardadditionsversuch belegt werden.

Die Elementgehalte der acht parallel gezüchteten Biofilmproben sind mittels *t*-Test auf signifikante Unterschiede untersucht worden. Hierzu erfolgte die zufällige Einteilung der Proben in zwei Gruppen. Die berechneten Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant von einander. Für die weitere Betrachtung der Proben darf somit der Mittelwert einer Probenserie verwendet werden.

Während der ersten Charge sind die Biofilme im Herbst bzw. Winter gezüchtet worden. Durch den Vergleich der Biofilmgehalte mit der mittleren Tagestemperatur erkennt man, dass die Jahreszeit und somit die Temperatur das Akkumulationsverhalten der Biofilme beeinflusst.

Sowohl für die Saale als auch für den Teich sind Anreicherungsfaktoren berechnet worden. Ein verallgemeinerbares Ergebnis ist, dass von den untersuchten Elementen die Erdalkali-, und Alkalimetalle am wenigsten stark und Mangan und Blei am stärksten angereichert werden. Die für die Biofilmproben erhaltene Reihung der Elemente anhand ihrer Anreicherungsfaktoren stimmt mit denen in der Literatur recht gut überein. Es werden die Schwermetalle jeweils sehr viel stärker angereichert als die Erdalkali- und Alkalimetalle. Diese Einteilung kann somit als verifiziert angesehen werden.

Um die Eignung von Biofilmen als Belastungsindikatoren zu überprüfen, sind die Proben der systematisch gezüchteten Biofilme durch eine Vielzahl von Proben der Leutra und durch jeweils einmalig entnommene Biofilmproben (nationale und internationale Gewässer) ergänzt worden. Für die chemometrische Auswertung erfolgte die Einteilung der Proben in vier Matrizen.

Mit der Anwendung von chemometrischen Methoden sollte überprüft werden, ob es möglich ist, Biofilmproben hinsichtlich ihres Herkunftsgewässers zu unterscheiden. Die relativ einfachen Methoden der Clusteranalyse und des Clusterimaging trennten bereits die Proben:

- Saale - Teich (ST)
- Saale - Teich - Leutra (STL)
- Meer - Süßgewässer (BnS; G)

Die so erhaltene Gruppierung der Daten konnte stets mit den Verfahren der linearen Diskriminanzanalyse und den Support-Vektor-Maschinen verifiziert werden.

Einen Überblick über die Elemente, die den größten Einfluss auf die Unterscheidung von Biofilmproben verschiedener Herkunftsgewässer haben, gibt das Ergebnis der Faktorenanalyse. Durch betrachten der Faktorladungen und den Verlauf der Faktorwerte ist es möglich gewesen, jeder Probenklasse charakteristische Elementgehalte zuzuordnen. So ist, wie zu erwarten, beispielsweise der Natriumgehalt des Biofilms und des Wassers für die Unterscheidung der Proben des Meeres von denen des Süßwassers entscheidend.

Mit ANN sollte für unbekannte Proben das Herkunftsgewässer der Biofilme modelliert werden. Es ist für alle verwendeten Matrizen gelungen, geeignete Künstliche Neuronale Netze zu berechnen, mit denen eine fehlerfreie Vorhersage unbekannter Proben möglich ist.

Mit den Methoden PLS und ANN sind Modelle für die Vorhersage von Elementgehalten des Wassers aus denen des Biofilms berechnet worden. Erfolgt diese Modellierung gewässerspezifische, so ist es für eine Vielzahl von Elementen möglich, die Gehalte unbekannter

Proben vorherzusagen. Für die Proben der Leutra sind alle Elementgehalte außer Al, K, Pb und Zn mit einem akzeptablen relativen Fehler vorhersagbar. Eine allgemeingültige Modellierung (ein Modell für mehrere Gewässer) erweist sich nicht als sinnvoll, da sich Biofilme verschiedener Herkunftsgewässer zu stark unterscheiden.

Die Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass Biofilme als Belastungsindikatoren geeignet sind, wenn man zunächst systematische Untersuchungen für ein zu überwachendes Gewässer durchführt. Dann ist es möglich, aus zukünftigen Biofilmproben Rückschlüsse auf die Wasserqualität während des gesamten Aufwuchszeitraumes zu schließen. Für einen definierten Zeitraum kann die Gewässerbelastung durch die Züchtung und anschließende Analyse von Biofilmproben charakterisiert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Ergebnisse der Elbeforschung 1991–1995. Internationale Kommission zum Schutz der Elbe, Magdeburg, 1997, 29-30
- [2] Wimpenny, J. W. T., Klinniment, S. L., Scourfield, M. A.: The physiology and biochemistry of biofilm. In: Denyer, S. P., Gorman, S. P.: Microbial Biofilms: Formation and Control. Blackwell Scientific publications, Cambridge, 1993, 51-94
- [3] Martienssen, M.: Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Habilitation, 2001
- [4] Mages, M., v. Tümpling, W., Kröpfl, K.: Anal. Bioanal. Chem., 2004, 378, 1095-1101
- [5] Heintz, A., Reinhardt, G.: Chemie und Umwelt. Vieweg-Verlag, Braunschweig, 1996, a: 229-232, b: 369-378
- [6] Bliefert, C.: Umweltchemie. VCH, Weinheim, 2002, 369-378
- [7] Darimont, A., Frenay, J.: Metals in aqueous solutions. In: Volesky, B.: Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Florida, 1990, 66-79
- [8] Flemming, H. C., Wingender, J.: Chem. unserer Zeit, 2002, 1, 30- 42
- [9] Costerton, F. W.: Annu. Re. Microbiol., 1987, 41, 435-464
- [10] Flemming, H. C., Wingender, J.: Biol. unserer Zeit, 2001, 169-180
- [11] <http://wasser-wissen.de/abwasserlexikon/b/biofilm.htm>, 14.11.2004
- [12] Tiefenbrunner, F., Starlinger, R., Dierich, M. P.: Sanitär- und Heizungstechnik, 1997, 2, 66-72
- [13] Flemming, H. C.: GWF Wasser – Abwasser, 1991, 4, 197-207
- [14] Ferris, F. G., Shotyk, W., Fyfe, W. S.: Mineral formation and decomposition by microorganisms, In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria, John Wiley, New York, 1989, 413-441
- [15] Schopf, J., Hayes, J. M., Walter, M. R.: Evolution on earth's earliest ecosystems: Recent progress and unsolved problems. In: Schopf, J. W.: Earth's earliest biosphere, Princeton Univ. Press, New Jersey, 1983, 361-384
- [16] Ward, D. M., Weller, R., Cohen, Y.: Hot spring microbial mats: anoxygenic and oxygenic mats of possible evolutionary significance, In: Cohen, Y., Rosenberg, E.: Microbial Mats. American Society for Microbiology, Washington, 1989, 3-15

- [17] Schlegel H. G.: Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992, 5-6
- [18] Runge, B.: Direktbestimmung von Schwermetallen in Biofilmen und Entwicklung von Bezugsgrößen mit Hilfe der TRFA. Universität Hamburg, Dissertation, 2004
- [19] Characklis, W. G., Marshall, K. C.: Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: Biofilms. John Wiley, New York; 1990, 3-15
- [20] Einax, J. W., Kampe, O., Truckenbrodt, D.: Fresenius J. Anal. Chem., 1998, 361, 149-154
- [21] Christensen, B. E., Characklis, W. G.: Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: Biofilms. John Wiley, New York, 1990, 93-130
- [22] Characklis W. G., McFeters, G. A., Marshall, K. C.: Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: Biofilms. John Wiley, New York; 1990, 341-394
- [23] Kandeler, E., Tschirko, D., Amelung, W.: Biol. Fert. Soils, 2000, 32, 390-400
- [24] White, C., Sharman, A. K., Gadd, G. M.: Nat. biotechnol., 1998, 16, 572-575
- [25] Rodgers, M., Zhan, X., O'Reilly, E.: Bioprocess Biosyst Eng, 2006, 28, 323-330
- [26] Chen, L., Chai, L.: World J. Microbiol. Biotechnol., 2005, 21, 1455-1460
- [27] Röhricht, M., Weppen, P., Deckwer, W.: Chem.-Ing.-Tech., 1990, 7, 582-583
- [28] Flemming, H. C.: Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft 129, Oldenburg Verlag, 1994, München
- [29] Flemming, H. C.: Nachr. Chem., 2000, 48, 442-447
- [30] Varnam, A. H., Evans, M. G.: Environmental Microbiology. Manson Publishing, London, 2000, 8-12
- [31] Bryers, J. D.: Biochem. Eng. 1993, 4, 197-204
- [32] Flemming, H. C.: Biofouling bei Membranprozessen. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1995, 6-10
- [33] Flemming, H. C.: GWF Wasser Special, 1998, 13, 65-72
- [34] Flemming, H. C.: bbr, 1999, 8, 22-26
- [35] Vestrepen, K. J., Klis, F. M.: Mol. Microbiol., 2006, 1, 5-15
- [36] Mack, D.: Chemotherapie Journal, 1999, 5, 166-175
- [37] Szewzyk, U.: Biospektrum, 9. Jahrgang, 3, 2003, 253-255

- [38] Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002, 56, 187-209
- [39] Marshall, K. C., Power, K. N., Goodman, A. E.: Analysis of bacterial behavior during biofouling of surfaces. In: Geesy, G. G., Lewandowski, Z., Flemming, H. C.: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publisher, Florida, 1994, 1-14
- [40] Characklis, W. G.: Microbial fouling. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: *Biofilms*, John Wiley, New York, 1990, 523-584
- [41] Characklis, W. G.: Biofilm process. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: *Biofilms*. John Wiley, New York, 1990, 195-232
- [42] Baier, R. E.: Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: Bitton, G., Marshall, K. C.: *Adsorption of Microorganisms to surfaces*. John Wiley, New York, 1980, 59-104
- [43] <http://mlu.mw.tu-dresden.de/module/m018/Kap2/main.html>, 01.11.2004
- [44] Characklis, W. G., Turakhia, M. H., Zilver, N.: Transport and interfacial transfer phenomena. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: *Biofilms*. John Wiley, New York, 1990, 265-340
- [45] Christensen, B. E., Characklis, W. G.: Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: *Biofilms*. John Wiley, New York, 1990, 93-130
- [46] Costerton, J. W.: *Int. J. Antimicrobial Agents*, 1999, 11, 217-221
- [47] Costerton, J. W.: *J. Ind. Microbiol*, 1995, 15, 137-140
- [48] Costerton, J. W.: A short history of the development of the biofilm concept. In: Ghanoum, M., O'Toole, G. A. : *Microbial Biofilms*. ASM Press, Washington DC, 2004, 4-19
- [49] Costerton, J. W.: Structure of biofilms. In: Geesy, G. G., Lewandowski, Z., Flemming, H. C.: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publisher, Florida, 1994, 1-14
- [50] Flemming, H. C., Schmitt, J., Marshall, K. C.: Sorption properties of biofilms. In: Calmano, W., Förstner, U.: *Sediments and toxic substances*. Springer-Verlag, Berlin, 1996, 115-157
- [51] Flemming, H. C., Wingender, J.: *Vom Wasser*, 2000, 94, 245-266
- [52] Körstgens, V., Borchard, W., Flemming, H. C.: *Biospektrum*, 2001, 4, 333-335
- [53] Flemming, H. C.: *Forum Forschung*, 2000, 1-3

- [54] Characklis, W. G., Marshall, K. C., McFeters, G. A.: The Microbial Cell. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C.: Biofilms. John Wiley, New York, 1990, 131-160
- [55] Teitzel, G. M., Parsek, M. R.: Appl. Environ. Microbiol., 2003, 2313-2320
- [56] Mahler, I., Levinson, H. S., Wang, Y., Halvorson, H. O.: Appl. Environ. Microbiol., 1986, 1293-1298
- [57] Wiremann, J., Liebert, C. A., Smith, T., Summers, A. O.: Appl. Environ. Microbiol., 1997, 4494-4503
- [58] Nakamura, K., Silver, S.: Appl. Environ. Microbiol., 1994, 4596-4599
- [59] Rasmussen, L. D., Sorensen, S, J.: Curr. Microbiol., 1998, 36, 291-297
- [60] Eick, S., Seltmann, T., Pfister, W.: Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 2002, 5, 289-294
- [61] Borja, J. Q., Auresenia, J. L., Gallardo, S. M.: Chemosphere, 2006, 64, 555-559
- [62] Geesey, G. G., Jang, L.: Interactions between metal ions and capsular polymers. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 121-139
- [63] Kaim, W., Schwederski, B.: Bioanorganische Chemie. Teubner Studienbücher, Stuttgart, 1995, 10-18, 336f
- [64] Belliveau, B. H., Cotter, C., Trevors, J. T.: Biotech. Adv., 1987, 5, 101-127
- [65] Beveridge, T. J.: Metal ions and bacteria. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 1-29
- [66] Wackett, L. P., Walsh, C.: Transition metal enzymes in bacterial metabolism. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 165- 205
- [67] Collins, Y. E., Stotzky, G.: Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 31-90
- [68] Silver, S., Laddaga, R. A.: Bacterial resistance to toxic heavy metals. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 121-139
- [69] Schiewer, S., Volesky, B.: Biosorption processes for heavy metal removal. In: Lovley, D. R.: Environmental microbe-metal interactions. ASM Press, Washington DC, 2000, 329-362

- [70] Morel, F. M. M., Palenik, B.: The aquatic chemistry of trace metals in biofilms. In: Characklis, W. G., Wilderer, P. A.: Structure and function of biofilms. Wiley, 1989, New York, 289-300
- [71] Volesky, B.: Removal and Recovery of Heavy Metals by Biosorption. In: Volesky, B.: Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Florida, 1990, 7-43
- [72] Remacle, J.: The Cell Wall and Metal Binding. In: Volesky, B.: Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Florida, 1990, 83-92
- [73] Mc Lean, R. J. C., Beveridge, T. J.: Metal binding capacity of bacterial surfaces and their ability to form mineralized aggregates. In: Ehrlich, H. L., Brierley, C. L.: Microbial mineral recovery. McGraw-Hill Publishing Company, 1990, New York, 185-222
- [74] Mann, H.: Biosorption of Heavy Metals by Bacterial Biomass. In: Volesky, B.: Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Florida, 1990, 93-137
- [75] Gadd, G. M.: Fungi and yeasts for metal accumulation. In: Ehrlich, H. L., Brierley, C. L.: Microbial mineral recovery. McGraw-Hill Publishing Company, 1990, New York, 249-275
- [76] Volesky, B.: Biosorption by Fungal Biomass. In: Volesky, B.: Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Florida, 1990, 139-171
- [77] von Hullebusch, E. D. Lens, P. N. L.: Environ. Sci. Tech., 2003, 2, 9-33
- [78] Geesey, G. G., Jang, L.: Interactions between metal ions and capsular polymers. In: Beveridge, T. J., Doyle, R. J.: Metal ions and bacteria. John Wiley, New York, 1989, 121-139
- [79] Geesey, G. G., Jang, L.: Extracellular polymers for metal binding. In: Ehrlich, H. L., Brierley, C. L.: Microbial mineral recovery. McGraw-Hill Publishing Company, 1990, New York, 223-247
- [80] Voß, W.: Taschenbuch der Statistik. Fachbuchverlag Leipzig, 2000, Kösel, 578
- [81] Statistica for Windows, Volume III, Statistics II, Statsoft Inc., 1984-1994
- [82] Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R.: Multivariate Analysenmethoden, 7. Auflage, Springer-Verlag, 1994, XVI-XXI, 433ff
- [83] Borg, I., Groenen, P.: Modern Multidimensional Scaling. Springer-Verlag, 1997, New York, 3-397
- [84] Torgerson, W. S.: Theory and methods of scaling, John Wiley & Sons, Inc., 1965, New York, 247-297

- [85] Härdle, W., Simar, L.: Applied Multivariate Statistical Analysis. Springer, Berlin, 2003, 373-392
- [86] Hartung, J.: Statistik. Oldenbourg Verlag GmbH, München, 1993, 860
- [87] Einax, J. W., Truckenbrodt, D., Kampe, O.: Microchem. J., 1998, 58, 315-324
- [88] Furrer, R., Truckenbrodt, D., Müller, G., Einax, J. W.: Vom Wasser, 1997, 89, 83-96
- [89] Smolinski, A., Walczak, B., Einax, J. W.: Chemom. Intell. Lab. Sys., 2002, 64, 45-54
- [90] Brereton, R. G.: Chemometrics applications of mathematics and statistics to laboratory systems. Ellis Horwood, Avon, 1990, 241-245
- [91] Danzer, C., Hobert, H., Fischbacher, C., Jagemann, K. U.: Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen, Springer, Berlin, 2001, a: 90, b: 268ff c: 279ff
- [92] Einax, J. W., Zwanziger, H. W., Geiß, S.: Chemometrics in environmental analysis. VCH, Weinheim, 1997, 158
- [93] Anwendung der Clusteranalyse für Wasseruntersuchungen (A 80), Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Beuth, Berlin, 51. Lieferung, 2001
- [94] Kowalik, C., Einax, J. W.: Acta hydrochim.hydrobiol., 2006, 34, 425-436
- [95] Zehl, K.: Schwermetalle in Sedimenten und Böden unter besonderer Berücksichtigung der Mobilität und deren Beeinflussung durch Sauerstoff. Dissertation, FSU Jena, 2005
- [96] Otto, M.: Chemometrie. VCH, 1997, Weinheim, a: 141-164 b: 185-191 c:217-226
- [97] Henrion, R., Henrion, G.: Multivariate Datenanalyse. Springer, 1995, Berlin, 29
- [98] Beebe, K. R., Pell, R. J., Seasholtz, M. B.: Chemometrics: A practical guide. John Wiley, New York, 1998, 278-335
- [99] Zell, A.: Simulation neuronaler Netze. Addison-Wesley-Verlag, Bonn, 1994
- [100] Lawrence, J.: Neuronale Netze: Computersimulation biologischer Intelligenz. Systema, München, 1992
- [101] Jagemann, K.-U.: Untersuchungen zum Einsatz der Nahinfrarot-Spektroskopie für die nichtinvasive Blutglucosebestimmung mittels Künstlicher Neuronaler Netze. Dissertation, FSU Jena, 1998
- [102] Callan, R.: Neuronale Netze. Pearson Studium, München, 2003
- [103] Robert, K.: Prakt. Metallogr., 2003, 1, 1-15
- [104] Dahde, K.: Chem.-Ing.-Tech., 2003, 75, 753-757
- [105] Zomer, S., Brereton, R. G., Carter, J. F., Eckers, C.: Analyst, 2004, 129, 175-181

- [106] http://aifb.uni-karlsruhe.de/Lehre/Sommer2006/lernSys/Vorträge/07_SVMs_Vortrag.pdf, 24.10.2006
- [107] Eitner, A.: Struktur und Entwicklung benthischer Biofilme in Fließgewässern - Messungen und Simulation. TU Berlin, Dissertation, 2004
- [108] Friese, K., Mages, M., Wendt-Potthoff, K., Neu, T. R.: Spectrochimica Acta Part B, 52, 1997, 1019-1025
- [109] Lange, B., Vejdelek, Z. J.: Photometrische Analyse. VCH, a: 387-389, b: 372-375 c: 366-367
- [110] DIN 38 405 Teil 10: Anionen (Gruppe D) Bestimmung des Nitrit-Ions, Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth, Berlin, 1981
- [111] Harris, D. C.: Lehrbuch der Quantitativen Analyse. Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1997, 481-502
- [112] DIN 32 645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth-Verlag, Berlin, 1994
- [113] Danzer, K.: Analytical Chemistry. Springer, Berlin/Heidelberg, 2007, 217-224
- [114] Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G.: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. VCH, Weinheim, 1992, 121
- [115] Dörfel, K.: Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig, 1990, 116-120
- [116] Zertifikat: NRC-CNRC SLRS-3, Riverine Water Reference for Trace Metals
- [117] Zertifikat: NIES Certified Reference Material No 3, Chlorella, 1983
- [118] Zöfel, P.: Statistik verstehen. Addison-Wesley-Verlag, Heidelberg, 2002 92-96
- [119] Skoog, D. A., Leary, J. J.: Instrumentelle Analytik. Springer, Berlin/Heidelberg, 1996, 427-433
- [120] STATISTICA 6.1. Statsoft, Tulsa, Inc. 1984-2004.
- [121] The Unscrambler. Version 9.2. Camo Process AS 1986-2005
- [122] Yale - Yet Another Learning Environment, Copyright (C) 2001-2006
- [123] Kallenbach, M.: Biofilme natürlicher Substrate - Homogenitätsuntersuchungen und Eignungsprüfung zur Aufdeckung anthropogener Belastungen. FSU Jena, Diplomarbeit, 2006

- [124] Einax, J. W., Truckenbrodt, D., Kampe, O.: Analyse und chemometrische Bewertung von Schwermetallgehalten der Saale, Ilm und Unstrut als Bestandsaufnahme und zur Abschätzung der Auswirkungen von Sanierungsmaßnahmen. Abschlussbericht, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 1995
- [125] Schönbuchner, Heiko: Untersuchungen zu Mobilität und Boden-Pflanze-Transfer von Schwermetallen auf/in uranhaltigen Haldenböden. FSU Jena, Dissertation, 2002
- [126] Klein, R., Paulus, M.: Umweltproben für die Schadstoffanalytik im Biomonitoring. Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1995, 170-173
- [127] Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Copyright 1985-2003

Anhang

A1 - Nachweisgrenzen

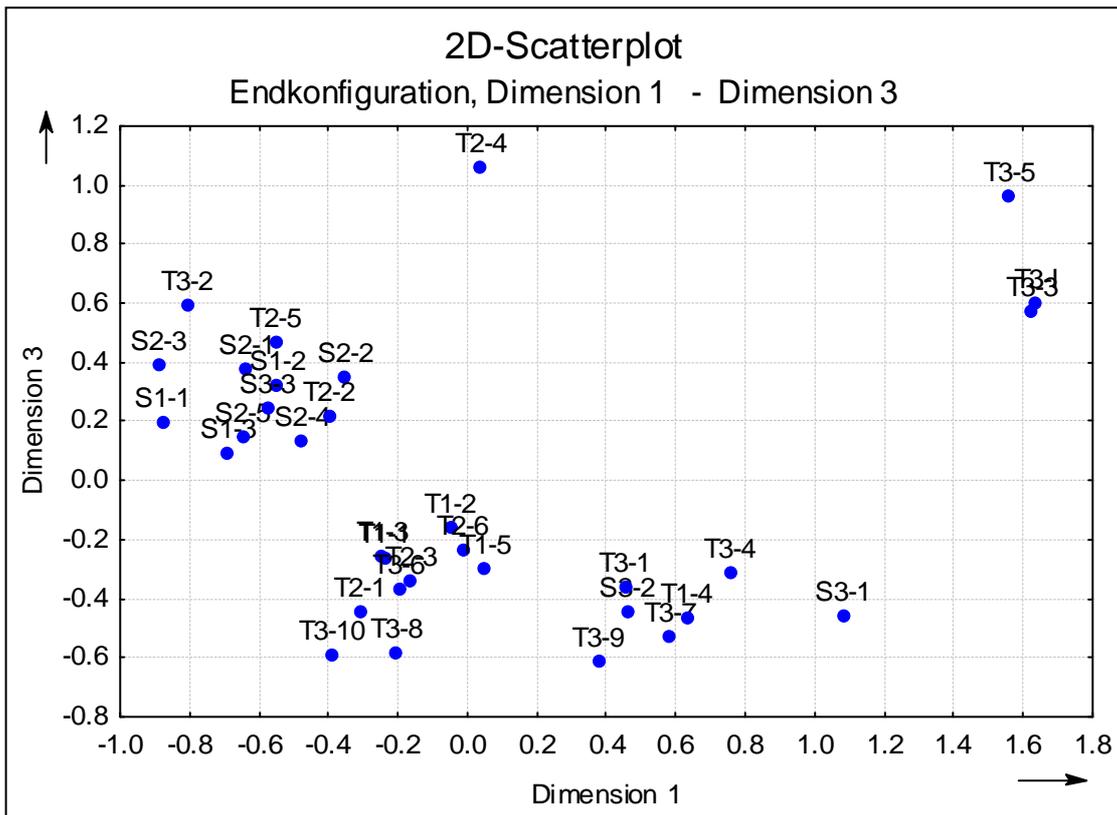
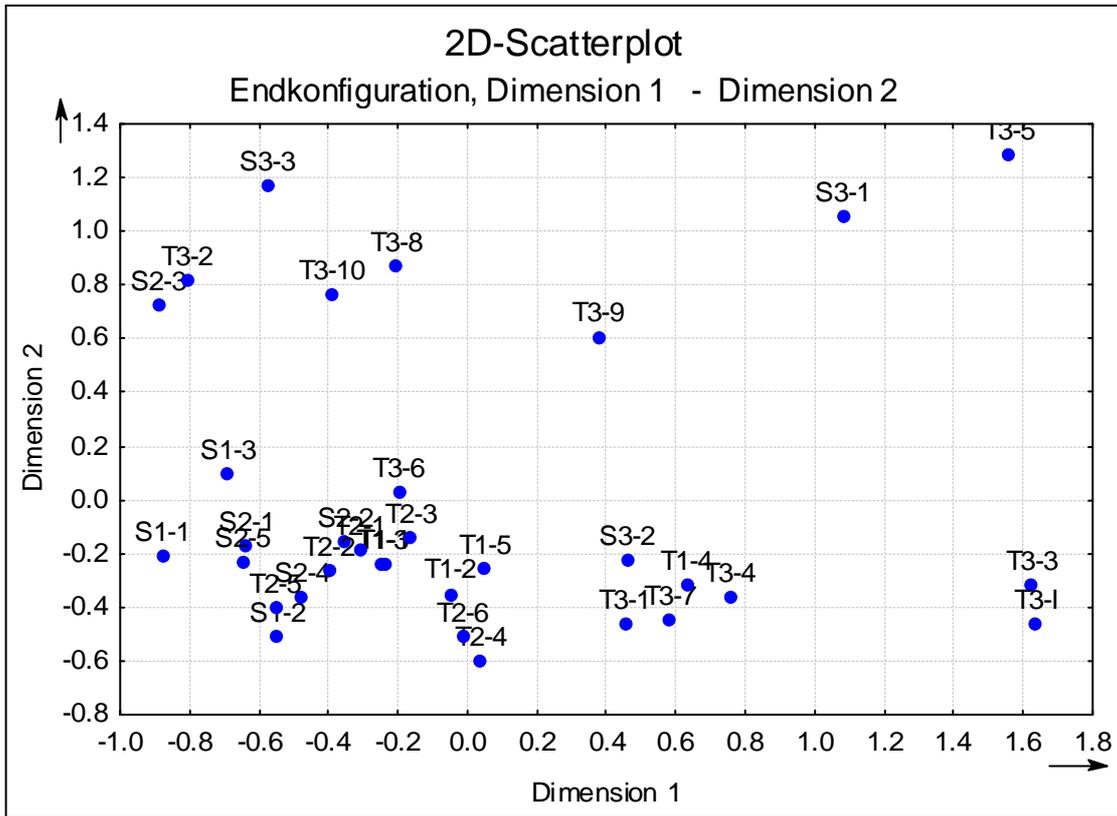
Tab. a: Nachweisgrenzen der analysierten Elemente in den Biofilmproben
(Angaben in $\mu\text{g/L}$)

Element	x_{NG} (ICP-MS)	Element	x_{NG} (ICP-OES)
Cd	0,01	Al	4,8
Co	0,01	Ca	3,6
Cr	0,3	Fe	2,2
Cu	0,6	K	8,8
Ni	0,2	Mg	4,4
P	10	Mn	0,3
Pb	0,07	Na	2,6
Se	0,3	Sr	1,2
Zn	0,8		

Tab. b: Nachweisgrenzen der analysierten Elemente in den Wasserproben (Angaben in $\mu\text{g/L}$)

Element	x_{NG} (ICP-MS)	Element	x_{NG} (ICP-MS)	Element	x_{NG} (ICP-OES)
Al	0,1	Mn	0,05	Ca	0,6
Cd	0,01	Ni	0,25	K	1
Co	0,01	P	4,4	Mg	2
Cr	2	Pb	0,3	Na	2
Cu	0,1	Se	0,1	Sr	1
Fe	0,8	Zn	0,1		

A2 - Konfiguration der Probenahmeorte



A3- Ergebnisse der Faktorenanalyse für die Proben der Saale und des Teiches

Faktor	Eigenwert	erklärte Varianz in %	hochgeladene Variablen	Faktorladung	Interpretation
1	17,29	38,41	Mn (BF)	-0,78	Gehalts- unterschiede Saale-Teich
			Fe (BF)	-0,88	
			Mg (BF)	-0,79	
			Ca (BF)	0,71	
			K (BF)	-0,87	
			Cu (BF)	-0,80	
			Ni (BF)	-0,73	
			Sulfat (W)	0,72	
			Leitfähigkeit	0,89	
			Salzgehalt	0,87	
			Mg (W)	0,92	
			Ca (W),	0,89	
			Sr (W)	0,84	
			2	6,41	
Cu (BF)	-0,82				
Zn (BF)	-0,84				
Pb (BF)	-0,75				
3	4,09	9,10	Mg (BF)	0,71	Teich 1. Charge
			Cu (W)	0,74	
			Fe (W)	0,77	
4	2,40	5,34	pH-Wert	0,66	merkmalseigen
5	2,00	4,44	Chrom (W)	0,80	merkmalseigen
6	1,87	4,16	Temperatur	0,84	Wetter
			Sonnenschein	0,77	
			Wassertemp.	0,91	
7	1,79	3,97	Sauerstoffgehalt	-0,74	Wetter 2
			Niederschlag	-0,86	
8	1,10	2,45	Se (BF)	-0,80	merkmalseigen

A4 - Kenngrößen der PLS1-Modelle für die Proben der Saale und des Teiches

Element	Gewässer	r_v	RMSEP _{CV}	Mittelwert	relativer Fehler in %
Al	Saale	0,38	14,99	22,28	67,29
	Teich	0,77	7,85	20,91	37,53
	Beide	-0,27	13,72	21,37	63,21
Ca	Saale	-0,76	8879	58620	15,15
	Teich	0,46	23520	249406	9,43
	Beide	0,92	36210	185810	19,49
Cd	Saale	-0,25	0,10	0,06	174,60
	Teich	-0,05	0,02	0,04	52,38
	Beide	-0,20	0,05	0,04	112,24
Co	Saale	0,32	0,17	0,32	52,30
	Teich	0,69	0,18	0,79	22,90
	Beide	0,74	0,20	0,63	31,65
Cr	Saale	0,57	2,07	3,74	55,32
	Teich	0,05	3,39	5,63	60,17
	Beide	0,30	3,08	5,00	61,56
Cu	Saale	0,67	1,74	4,96	35,09
	Teich	-0,51	1,26	7,39	17,06
	Beide	0,65	1,37	6,58	20,83
Fe	Saale	0,32	59,74	338,06	17,67
	Teich	-0,51	343,72	666,30	51,59
	Beide	0,39	280,85	556,89	50,43
K	Saale	-0,04	1020	5925	17,21
	Teich	0,74	3429	12410	27,63
	Beide	0,58	4166	10248	40,65
Mg	Saale	-0,77	2196	13966	15,72
	Teich	0,49	2611	46139	5,66
	Beide	0,92	5884	35415	16,61
Mn	Saale	-0,32	7,29	8,77	83,10
	Teich	0,69	1,63	3,20	50,88
	Beide	0,53	4,28	5,06	84,58
Na	Saale	0,87	4473	30999	14,43
	Teich	0,84	2232	39145	5,70
	Beide	0,57	5812	36430	15,95
Ni	Saale	-0,19	10,04	10,46	96,02
	Teich	0,09	3,02	14,84	20,35
	Beide	-0,03	6,12	13,38	45,74
P	Saale	0,73	15,05	117,08	12,85
	Teich	0,39	53,23	89,57	59,43
	Beide	0,37	47,07	98,74	47,67

Element	Gewässer	r_v	RMSEP_{CV}	Mittelwert	relativer Fehler in %
Pb	Saale	-0,39	0,21	0,17	122,22
	Teich	0,27	0,23	0,22	103,69
	Beide	-0,33	0,23	0,21	112,11
Se	Saale	0,80	0,17	0,72	23,49
	Teich	0,78	0,23	1,06	21,75
	Beide	0,74	0,24	0,95	25,37
Sr	Saale	0,23	113,46	379,24	29,92
	Teich	0,73	612,61	4278,28	14,32
	Beide	0,92	756,76	2978,60	25,41
Zn	Saale	0,54	2,70	11,39	23,70
	Teich	-0,39	4,98	15,35	32,44
	Beide	0,37	4,23	14,03	30,15

A5 - Kenngrößen der ANN-Modelle für die Proben der Saale und des Teiches

Element	Gewässer	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Al	Saale	9,24	22,28	41,50	45	RBF 5:5-2-1:1
	Teich	11,18	20,91	56,24	74	MLP 15:15-14-11-1:1
	Beide	5,33	21,37	25,81	70	MLP 15:15-14-8-1:1
Ca	Saale	6587	58620	11,24	100	RBF 2:2-2-1:1
	Teich	15905	249406	6,40	95	MLP 6:6-7-5-1:1
	Beide	19388	185810	10,86	97	RBF 1:1-5-1:1
Cd	Saale	0,16	0,06	276,65	36	MLP 1:1-2-1:1
	Teich	0,02	0,04	39,03	84	MLP 16:16-14-10-1:1
	Beide	0,01	0,04	13,43	87	GRNN 16:16-24-2-1:1
Co	Saale	0,13	0,32	40,80	64	MLP 1:1-1-1:1
	Teich	0,04	0,79	4,56	100	MLP 15:15-11-1:1
	Beide	0,13	0,63	21,37	67	Linear 10:10-1:1
Cr	Saale	0,45	3,74	11,68	91	MLP 17:17-16-7-1:1
	Teich	3,30	5,63	58,44	42	RBF 12:12-1-1:1
	Beide	2,61	5,00	53,16	63	GRNN 15:15-24-2-1:1
Cu	Saale	1,73	4,96	34,79	64	MLP 1:1-1-4-1:1
	Teich	0,41	7,39	5,65	100	MLP 4:4-5-1:1
	Beide	1,48	6,58	22,94	77	GRNN 4:4-24-2-1:1
Fe	Saale	44,83	338,06	13,26	82	GRNN 3:3-7-2-1:1
	Teich	33,11	666,30	5,16	95	MLP 14:14-7-1:1
	Beide	139,20	556,89	26,22	87	GRNN 6:6-24-2-1:1
K	Saale	821	5925	13,86	91	GRNN 5:5-7-2-1:1
	Teich	2736	12410	22,30	84	MLP 14:14-13-8-1:1
	Beide	2093	10248	20,91	90	Linear 2:2-1:1
Mg	Saale	1402	13966	10,04	100	GRNN 2:2-7-2-1:1
	Teich	1555	46139	3,36	100	GRNN 3:3-13-2-1:1
	Beide	3539	35415	10,29	97	RBF 2:2-12-1:1
Mn	Saale	0,62	8,77	7,09	82	MLP 2:2-4-3-1:1
	Teich	1,48	3,20	42,97	95	MLP 12:12-14-11-1:1
	Beide	1,20	5,06	22,33	93	GRNN 14:14-24-2-1:1
Na	Saale	2723	30999	8,78	91	GRNN 24:24-7-2-1:1
	Teich	2576	39145	6,56	100	GRNN 9:9-13-2-1:1
	Beide	2982	36430	8,24	100	GRNN 4:4-24-2-1:1
Ni	Saale	7,76	10,46	74,21	45	GRNN 2:2-7-2-1:1
	Teich	1,32	14,84	8,91	95	GRNN 5:5-13-2-1:1
	Beide	6,78	13,38	51,42	67	MLP 14:14-14-11-1:1

Element	Gewässer	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
P	Saale	2,17	117,08	1,85	100	Linear 11:11-1:1
	Teich	20,51	89,57	24,70	79	MLP 1:1-2-1:1
	Beide	11,73	98,74	12,50	87	GRNN 10:10-24-2-1:1
Pb	Saale	0,05	0,17	29,42	82	MLP 13:13-16-7-1:1
	Teich	0,20	0,22	82,53	63	MLP 4:4-4-1:1
	Beide	0,15	0,21	69,92	50	GRNN 2:2-24-2-1:1
Se	Saale	0,12	0,72	16,82	73	Linear 9:9-1:1
	Teich	0,13	1,06	12,97	95	RBF 12:12-2-1:1
	Beide	0,10	0,95	11,00	93	MLP 16:16-14-8-1:1
Sr	Saale	36,90	379,24	9,73	91	GRNN 10:10-7-2-1:1
	Teich	630,02	4278,28	15,04	89	MLP 1:1-2-1:1
	Beide	420,26	2978,60	15,07	83	GRNN 6:6-24-2-1:1
Zn	Saale	0,57	11,39	4,99	100	GRNN 23:23-7-2-1:1
	Teich	1,50	15,35	9,72	95	GRNN 13:13-13-2-1:1
	Beide	3,15	14,03	22,74	93	MLP 13:13-14-7-1:1

A6 - Kenngrößen der PLS1-Modelle für die Proben der Saale, des Teiches und der Leutra

Element	Gewässer	r_v	$RMSEP_{cv}$	Mittelwert	relativer Fehler in %
Al	Leutra	0,23	35,74	40,03	89,28
	STL	0,39	21,78	26,64	81,75
Ca	Leutra	0,96	13074	55871	23,40
	STL	0,71	71123	149089	47,71
Cd	Leutra	0,72	0,01	0,06	15,48
	STL	-0,18	0,04	0,05	93,80
Co	Leutra	-0,92	0,04	0,17	25,37
	STL	0,69	0,24	0,50	48,05
Cr	Leutra	0,31	0,37	1,94	19,10
	STL	-0,19	3,11	4,14	75,18
Cu	Leutra	0,38	0,51	2,21	23,05
	STL	0,41	2,21	5,34	41,35
Fe	Leutra	0,98	45,93	110,30	41,64
	STL	0,49	301,10	430,68	69,91
K	Leutra	0,96	376	1497	25,12
	STL	0,65	4502	7775	57,91
Mg	Leutra	0,98	1521	9857	15,44
	STL	0,71	12606	28192	44,71
Mn	Leutra	-0,45	7,99	6,82	117,24
	STL	0,12	5,52	5,56	99,34
Na	Leutra	0,98	998	4799	20,81
	STL	0,58	12894	27491	46,90
Ni	Leutra	-0,79	0,45	5,33	8,44
	STL	0,33	5,94	11,11	53,49
P	Leutra	0,34	16,02	62,21	25,75
	STL	0,27	44,62	88,42	50,46
Pb	Leutra	0,30	0,23	0,45	50,92
	STL	0,09	0,27	0,27	98,35
Se	Leutra	-0,58	0,03	0,46	5,40
	STL	0,39	0,35	0,81	43,27
Sr	Leutra	0,98	194	1173	16,54
	STL	0,69	1385	2468	56,14
Zn	Leutra	0,38	4,32	11,81	36,58
	STL	0,39	4,24	13,40	31,63

A7 - Kenngrößen der ANN-Modelle für die Proben der Saale, des Teiches und der Leutra

Element	Gewässer	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Al	Leutra	6,60	40,03	16,50	69	MLP 2:2-5-3-1:1
	STL	17,57	26,64	65,94	54	GRNN 13:13-36-2-1:1
Ca	Leutra	3639	55871	6,51	100	Linear 4:4-1:1
	STL	13683	149089	9,18	96	MLP 18:18-15-10-1:1
Cd	Leutra	0,01	0,06	17,14	85	GRNN 8:8-9-2-1:1
	STL	0,04	0,05	85,88	61	MLP 18:18-15-12-1:1
Co	Leutra	0,01	0,17	5,19	100	MLP 5:5-3-1:1
	STL	0,03	0,50	6,77	93	GRNN 16:16-36-2-1:1
Cr	Leutra	0,25	1,94	13,09	92	GRNN 6:6-9-2-1:1
	STL	2,16	4,14	52,24	52	MLP 14:14-15-11-1:1
Cu	Leutra	0,33	2,21	15,02	85	GRNN 12:12-9-2-1:1
	STL	1,27	5,34	23,73	63	Linear 12:12-1:1
Fe	Leutra	17,39	110,30	15,77	77	Linear 9:9-1:1
	STL	32,10	430,68	7,45	98	GRNN 13:13-36-2-1:1
K	Leutra	79,51	1497,12	5,31	100	MLP 4:4-6-3-1:1
	STL	557,29	7775,21	7,17	93	GRNN 15:15-36-2-1:1
Mg	Leutra	1969	9857	19,98	92	Linear 1:1-1:1
	STL	2148	28192	7,62	98	GRNN 4:4-36-2-1:1
Mn	Leutra	5,85	6,82	85,82	46	GRNN 12:12-9-2-1:1
	STL	5,74	5,56	103,25	15	MLP 1:1-2-1:1
Na	Leutra	296	4799	6,18	92	GRNN 17:17-9-2-1:1
	STL	2838	27491	10,33	80	MLP 17:17-10-1:1
Ni	Leutra	0,56	5,33	10,54	100	GRNN 1:1-9-2-1:1
	STL	3,99	11,11	35,97	76	GRNN 2:2-36-2-1:1
P	Leutra	24,53	62,21	39,43	85	MLP 16:16-14-3-1:1
	STL	11,10	88,42	12,55	76	MLP 15:15-14-5-1:1
Pb	Leutra	0,12	0,45	26,85	69	MLP 7:7-10-4-1:1
	STL	0,21	0,27	76,23	24	MLP 3:3-8-4-1:1
Se	Leutra	0,02	0,46	4,49	100	RBF 5:5-4-1:1
	STL	0,14	0,81	17,38	76	GRNN 13:13-36-2-1:1
Sr	Leutra	37,27	1173	3,18	100	MLP 13:13-4-1:1
	STL	215,71	2468	8,74	80	MLP 17:17-15-7-1:1
Zn	Leutra	1,68	11,81	14,18	69	MLP 2:2-3-6-1:1
	STL	2,30	13,40	17,18	74	MLP 14:14-15-9-1:1

A8 - Ergebnisse der Faktorenanalyse für die Proben der natürlichen Substrate

Faktor	Eigenwert	erklärte Varianz in %	hochgeladene Variablen	Faktorladung	Interpretation
1	9,80	28,83	Mg (BF)	0,73	Meer
			Na (BF)	-0,76	
			Cu (W)	-0,94	
			Se (W)	-0,92	
			Mg (W)	-0,96	
			Ca (W)	-0,91	
			Sr (W)	-0,94	
			Na (W)	-0,88	
			K (W)	-0,96	
2	5,59	16,43	Mn (W)	0,80	Wegscheid- Lenggrieß
			Ni (W)	0,88	
			Fe (W)	0,90	
			Zn (W)	0,90	
			Cd (W)	0,83	
3	3,55	10,44	Mn (BF)	-0,82	Schwermetalle Biofilm
			Zn (BF)	-0,85	
			Cd (BF)	-0,78	
			Pb (BF)	-0,79	
4	2,28	6,71	K (BF)	-0,78	Steinach / Chemnitz
			Se (BF)	-0,75	
5	1,85	5,47	Ni (BF)	0,86	Falken
			Cu (BF)	0,86	
6	1,51	4,43	Ca (BF)	-0,70	Erdalkali Biofilm
			Sr (BF)	-0,75	
7	1,27	3,78	Al (W)	-0,81	Obermühle
			Co (W)	-0,76	
8	1,16	3,42	Al (BF)	-0,80	merkmalseigen

A9 - Kenngrößen der ANN-Modelle für die Proben der natürlichen Substrate

Element	RMSEP	Mittelwert	relativer Fehler in %	Richtige Modellierung in %	Modell
Al	179,46	92,04	195	24	Linear 1:1-1:1
Ca	50102	105527	47	52	GRNN 14:14-19-2-1:1
Cd	0,11	0,08	140	84	GRNN 17:17-19-2-1:1
Co	0,39	0,67	59	72	MLP 15:15-7-1:1
Cr	0,49	5,93	10	96	GRNN 2:2-19-2-1:1
Cu	8,69	11,07	78	24	RBF 9:9-5-1:1
Fe	696,52	614,10	113	60	GRNN 7:7-19-2-1:1
K	29844	92104	32	64	GRNN 4:4-19-2-1:1
Mg	399289	229357	174	12	Linear 1:1-1:1
Mn	2336	74	31	60	GRNN 16:16-19-2-1:1
Na	768223	956202	80	20	MLP 4:4-10-4-1:1
Ni	2,14	6,11	35	80	MLP 11:11-14-9-1:1
P	388,80	194,62	200	24	MLP 11:11-14-9-1:1
Pb	1,23	1,29	95	20	GRNN 14:14-19-2-1:1
Se	8,98	12,17	74	28	MLP 13:13-9-1:1
Sr	461,85	1606,40	29	52	Linear 1:1-1:1
Zn	73,24	28,2	260	16	GRNN 7:7-19-2-1:1

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen W. Einax, der es mir ermöglichte diese interessante und vielseitige Themenstellung zu bearbeiten. Ich danke ihn weiterhin für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau PD Dr. S. Eick (Institut für Medizinische Mikrobiologie) danke ich für die Betreuung im Bereich der mikrobiologischen Untersuchungen, ihr Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen und für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Großer Dank gilt meinem Ingo, der für mich zahlreiche Probennahmen durchführte und der mich auch sonst jederzeit unterstützte. Dafür das er mir viel Kraft gab, möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Tim bedanken. Für die Bereitstellung ihres Gartenteiches als Untersuchungsobjekt danke ich Familie Kubik.

Vielen Dank auch allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrbereichs Umweltanalytik für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Kraft für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie Frau B. Dreßler, die mir bei allen Fragen bezüglich Labor- und Messarbeiten immer hilfreich zur Seite stand.

Frau B. Lengvogt und H. Schönfeld vom Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, die zahlreiche Elementaranalysen für mich durchführten sowie Frau R. Kaiser, mit der ich sehr interessanten REM-Untersuchungen durchführte, möchte ich herzlich danken. Für das zur Verfügung stellen der Wetterdaten möchte ich mich bei Frau C. Luge bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Probennehmern, ohne die der Teil "Biofilme natürlicher Substrate" nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend noch ganz besonderen Dank an alle weiteren (U. Risse-Buhl, C. Ranke, etc.), die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 13. April 2007

Andrea Kubik

Lebenslauf

Name: Kubik, geb. Dietrich-Scholz
Vorname: Andrea
Geburtsdatum: 05.03.1980
Geburtsort: Nordhausen

Schulbildung:

9/86-8/90 POS Theodor Neubauer
9/90-8/92 Regelschule Alfred Brehm
9/92-7/98 Ernst-Häckel-Gymnasium
Abschluss: Abitur

Studium:

10/98-9/2003 Studium der Chemie an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena
Abschluss: Diplom
seit 10/2003 Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tätigkeiten:

seit 04/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich
Umweltanalytik der Friedrich-Schiller-Universität

Jena, den 13.04.2007