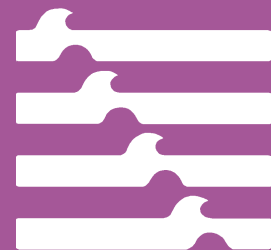




Bericht Nr. 25  
Büsum 2001

**Ruser, Andreas:**

**Untersuchungen zur  
Erkennung von  
Algengruppen und deren  
photosynthetischer  
Aktivität  
im marinen Bereich**



Forschungs-  
und  
Technologie-  
zentrum  
Westküste



Berichte aus dem  
Forschungs- und Technologiezentrum Westküste  
der Universität Kiel



Nr. 25

Ruser, Andreas

**Untersuchungen zur Erkennung  
von Algengruppen und deren photosynthetischer Aktivität  
im marinen Bereich**

Berichte, Forschungs- und Technologiezentrum Westküste d. Univ. Kiel,  
Nr. 25, 206 S., 102 Abb., 59 Tab., Büsum 2001

ISSN 0940 - 9475

© 2001 by Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Universität Kiel in Büsum

ISSN 0940-9475

Alle Rechte, auch die der auszugsweisen fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

Druck: Vervielfältigungsstelle, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur Erkennung  
von Algengruppen und deren photosynthetischer Aktivität  
im marinen Bereich**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Andreas Ruser**

**Kiel 2001**

Referent: .....Prof. Dr. Ulf Peter Hansen.....  
Koreferent: .....Prof. Dr. Franciscus Colijn.....  
Tag der mündlichen Prüfung: .....14. Juni 2001.....  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den .....

Dekan



Immer versucht.  
Immer versagt.  
Macht nichts.  
Versuchs noch mal.  
Versage wieder.  
Versage besser.

Samuel Beckett





# Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
2. Das BlueBox System	5
2.1. Das Prinzip	5
2.2. Das Wassersystem	7
2.3. Der Multi-Fluoreszenz Sensor	10
3. Das Phytoplankton	11
3.1. Die Einteilung der Algen	11
3.2. Die Pigmentkomposition des photosynthetischen Apparates	12
3.3. Die biophysikalischen Grundlagen	13
3.3.1. Die grundlegenden Reaktionen der Photosynthese	13
3.3.2. Das Photosystem II	13
3.3.3. Die lichtsammelnden Antennen des PS II	15
3.3.4. Photonenabsorption und prompte Fluoreszenz	16
3.3.5. Quenchmechanismen der Chlorophyll-Fluoreszenz	17
3.3.6. Das Chlorophyll-a und seine Zerfallsprodukte	18
4. Messverfahren zur Untersuchung von Wasserproben	21
4.1. Das inverse Mikroskop	21
4.2. Die HPLC-Analyse	23
4.3. Das Durchflusszytometer	24
4.4. Absorptions- und Fluoreszenzspektren	26
4.5. Fluorometer	28
5. Der Algae Online Analyser	31
5.1. Die Entscheidung für das Fluorometer	31
5.2. Die optischen Komponenten des AOA's	32
5.2.1. Die Messung der Chl.a-Fluoreszenz (f-Messung)	34

5.2.2. Die Messung der minimalen Fluoreszenz (fO-Messung)	34
5.2.3. Die Messung der maximalen Fluoreszenz (fM –Messung)	34
5.2.4. Die Messung der Transmission	34
5.3. Die Parameter und die Messabfolge des AOA's	35
5.4. Die Grundlage der fluorometrischen Algengruppenerkennung	37
5.4.1. Zucht der Algenspezies	37
5.4.2. Die Anregungsspektren von marinen Algenarten	38
5.5. Der Workshop „PriPro98“	40
5.5.1. Ergebnisse des PriPro98-Workshops	40
5.6. Die spektralen Fingerprints für die folgenden Untersuchungen	41
5.7. Theorie des Fitverfahrens zur Algengruppendifferenzierung	42
5.8. Die photosynthetischen Aktivität der Algengruppen	46
<b>6. Untersuchungen zu den spektralen Fingerprints</b>	<b>49</b>
6.1. Prüfung der linearen Unabhängigkeit der Fingerprints	49
6.2. Gegenseitige Erkennung der Algengruppen	50
6.2.1. Rohdaten der Messung und Hypothese des Fit's	50
6.2.2. Erkenntnisse der Untersuchung zur gegenseitigen Erkennung	52
6.2.3. Bewertung der Fitergebnisse	52
6.2.4. Auswirkungen des Weglassens eines Fingerprints	54
6.3. Der Einfluss von Rauschen auf die Algengruppenerkennung	55
6.3.1. Die Simulation	56
6.4. Ermittlung der Messungenauigkeit des AOA's	58
6.4.1. Untersuchung zur Bestimmung des relativen Rauschens des Systems	58
6.4.2. Bestimmung des absoluten Rauschens des AOA's	60
6.4.3. Das Rauschen der AOA-Messung	61
6.4.4. Zusammenfassung	64
<b>7. In situ Messung: Erste Ausfahrt</b>	<b>65</b>
7.1. Der Forschungskutter Südfall	65
7.2. Durchführung der Messungen	66
7.3. Messergebnisse der ersten Ausfahrt	67

7.3.1. Ergebnisse der FCM-Messungen	67
7.3.2. Die Zellzahlen und die Rotfluoreszenz aus der FCM-Messung	70
7.3.2.1. Chl.a-Bestimmung über die Zellzählung des FCM	70
7.3.2.2. Chl.a-Bestimmung durch die Messung der Rotfluoreszenz	71
7.3.3. Ergebnisse der HPLC-Analyse	73
7.3.4. Messergebnisse des Algae Online Analysers	74
7.3.4.1. Messungen an einzelnen Stationen (Hinfahrt)	75
7.3.4.2. Kontinuierliche Messung mit dem AOA (Rückfahrt)	76
7.3.5. Ergebnisse des Küvettenfluorometers	79
7.3.6. Ergebnisse der CTD-Sonde mit BackScat-Fluorometer	80
7.4. Vergleich der Chl.a-Ergebnisse der Messsysteme	81
7.4.1. Verifizierung der Algengruppenerkennung	83
7.4.1.1. Verifizierung des Nachweises der Diatomeen	83
7.4.1.2. Verifizierung des Nachweises der blauen spektralen Gruppe	84
7.4.1.3. Verifizierung des Nachweises der grünen spektralen Gruppe	84
7.5. Analyse der diskreten Anregungsspektren des AOA's	85
7.6. Anpassung der spektralen Fingerprints auf in-situ Bedingungen	88
7.6.1. Anpassung des Fingerprints der braunen spektralen Gruppe	88
7.6.2. Braune spektrale Fingerprints aus den in-situ Messungen	92
7.7. Die Erkenntnisse aus den Ergebnissen der ersten Ausfahrt	93
7.8. Aussichten	94

## 8. In situ Messung: Zweite Ausfahrt 95

8.1. Anordnung der Messgeräte	95
8.2. Das Untersuchungsgebiet	96
8.3. Messergebnisse: Die physikalischen Parameter	96
8.4. Messergebnisse: Die biologischen Parameter	97
8.4.1. Die Chl.a-Bestimmung durch das BackScat und die HPLC-Analyse	97
8.4.2. Der Ergebnisse der Chl.a-Bestimmung des AOA's	98
8.5. Verifizierung der Algengruppenerkennung des AOA's	100
8.6. Vergleich der Chl.a-Bestimmung von AOA, BackScat und HPLC	100
8.7. Ursachenforschung bezüglich der Chl.a-Bestimmungen	102
8.7.1. Einfluss der Tageslichtintensität auf	103
8.7.2. Absinken des Phytoplanktons	104

8.8. Die Güte des Fit's	108
8.8.1. Die Güte des Fit's	108
8.9. Zusammenfassung der Erkenntnisse	109
8.10. Rückblick auf die erste Ausfahrt	110
<b>9. Ursachen für eine schlechte Güte des Fit's</b>	<b>111</b>
9.1. Einfluss des Salzgehaltes	111
9.2. Einfluss der Trübung	113
9.3. Einfluss der Temperatur	114
9.3.1. Kalibrierung der Temperaturmessung des AOA's	115
9.3.2. Programmierung des Klimaschranks	115
9.3.3. Manipulation des Offset's des AOA's	116
9.3.4. Temperaturversuch 1	116
9.3.5. Temperaturversuch 2	117
9.3.6. Folgerungen aus den beiden Temperaturversuchen	118
9.4. Betrachtungen zu den in situ Daten der zweiten Ausfahrt	119
9.4.1. Einfluss des Salzgehaltes auf die Chl.a-Bestimmung	120
9.4.2. Einfluss der Transmission auf die Chl.a-Bestimmung	120
9.4.3. Einfluss der Temperatur auf die Chl.a-Bestimmung	121
9.5. Gelbstoffe als Störeinfluss?	122
9.5.1. Diskrete Anregungsspektren von Gelbstoffen	123
9.5.2. Die Verwendung als Gelbstoff-Fingerprints	123
9.6. Der Einfluss des Pigments Phaeophytin-a	124
9.6.1. Nachweis von Phaeophytin-a auf der zweiten Ausfahrt	125
9.6.2. Das Emissionsspektrum des Phaeophytin-a	125
9.6.3. Bildung eines Phaeophytin-a Fingerprints für den AOA	125
9.6.4. Einfluss des Phaeophytin-a auf die Algengruppenerkennung	127
9.6.5. Die Kalibrierung des Phaeophytin-a Fingerprints	128
9.6.6. Einschätzung des neuen Fit-Ergebnisses für die zweite Ausfahrt	129
9.6.7. Abschließende Bemerkung zu dem Phaeophytin-a	130
<b>10. Der Einfluss einer Pumpe auf das Phytoplankton</b>	<b>131</b>
10.1. Untersuchung am Mikroskop	131

10.2. Untersuchung mit dem AOA	133
10.2.1. Erkenntnis aus der photosynthetischen Aktivitätsmessung	135
10.2.2. Güte des Fit's für die vier Proben	136
10.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse des AOA's	137
10.3. Messungen mit dem Durchflusszytometer	138
10.4. Beurteilung des Einflusses der Pumpe auf das Phytoplankton	139
10.5. Rückschlüsse für die in situ Messungen	140
<b>11. Algengruppenerkennung mit verschiedenen Systemen</b>	<b>141</b>
11.1. Die Motivation	141
11.2. Untersuchung zur Vergleichbarkeit von Messsystemen	142
11.3. Die Zucht der Ausgangskulturen	143
11.4. Messungen an den Ausgangskulturen	143
11.4.1. Die HPLC-Analyse der Ausgangskulturen	143
11.4.2. Die Durchflusszytometermessung an den Ausgangskulturen	145
11.4.3. Die Fluoreszenzspektren der Ausgangskulturen	146
11.4.4. Die Algae Online Analyser Messung an den Ausgangskulturen	147
11.4.5. Die Absorptionsspektren der Ausgangskulturen	148
11.5. Test der Algengruppenerkennung der Messsysteme	149
11.5.1. Die Algenmischungen aus den Ausgangskulturen	149
11.5.2. Algengruppenerkennung mit der HPLC-Analyse	151
11.5.3. Algengruppenerkennung mit dem Durchflusszytometer	155
11.5.4. Algengruppenerkennung durch Fluoreszenzspektren	157
11.5.5. Algengruppenerkennung mit dem AOA	157
11.5.6. Algengruppenerkennung durch Absorptionsspektren	158
11.6. Bewertung der Ergebnisse zur Algengruppenerkennung	158
11.6.1. Beurteilung der Messsysteme anhand der Untersuchung	161
11.7. Untersuchungen zu den Auflösungsgrenzen der Messsysteme	161
11.7.1. Beurteilung der Algengruppenerkennung durch die HPLC-Analyse	165
11.7.2. Die Auflösungsgrenze der HPLC-Analyse	166
11.7.3. Anmerkung zur weiteren Beurteilung der Systeme	167
11.7.4. Die Auflösungsgrenze bei der Verwendung des Anregungsspektrums	167
11.7.5. Die Auflösungsgrenze bei der Verwendung des Emissionsspektrums	168

11.7.6. Die Auflösungsgrenze bei der Verwendung des Absorptionsspektrums	169
11.7.7. Auflösungsgrenze des AOA's	170
11.8. Zusammenfassung der Resultate beider Versuche	171
11.9. Die Eignung der besten Messsysteme als Referenz für den AOA	171
11.10. Eignung für eine Verifizierung von in situ Ergebnissen	172
<b>12. Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe</b>	<b>175</b>
12.1. Das Phytoplankton der Nordsee	175
12.2. Spektrale Unterschiede zwischen Diatomeen und Dinoflagellaten	176
12.3. AOA-Fingerprints der Diatomeen und Dinoflagellaten	177
12.4. Die Chl.a-Fluoreszenz für diskrete Anregungswellenlängen	178
12.5. Der relative Unterschied der Chl.a-Fluoreszenz	180
12.6. Festlegung der neuen diskreten Anregungswellenlängen	181
12.7. Änderung der AOA-LED's und deren Ansteuerung	183
12.8. Trennung der Diatomeen und Dinoflagellaten mit dem DOA	184
12.8.1. Die Ausgangskulturen	184
12.8.2. Bestimmung der Chl.a-Konzentration der Ausgangskulturen	185
12.8.3. Bestimmung der spektralen Fingerprints mit dem DOA	185
12.8.4. Die Fingerprints der Diatomeen und der Dinoflagellaten	186
12.9. Langzeitmessung an einer Diatomeen - Dinoflagellatenmischung	187
12.9.1. Erzeugung einer Algenmischung	187
12.9.2. Langzeitmessung an der Diatomeen - Dinoflagellaten Mischung	188
12.9.3. Diskussion der Ergebnisse der Langzeitmessung	189
12.10. Fazit des Umbaus vom AOA zum DOA	189
<b>13. Zusammenfassung</b>	<b>191</b>
<b>14. Ausblick</b>	<b>195</b>
<b>15. Literaturverzeichnis</b>	<b>197</b>
<b>Anhang A - E</b>	

## Abkürzungen:

AOA	Algae Online Analyser
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie
Chl.a	Chlorophyll- <i>a</i>
CANBUS	Controller Area Network
CTD	Conductivity, Temperature, Depth
DeW	Doppelt entionisiertes Wasser
DOA	Modifizierter AOA zur Unterscheidung von Diatomeen und Dinoflagellaten
$e^-$	Elementarladung
Euks	Eukareotische Algen
EuroGOOS	European Global Ocean Observing System
$f$	Aktueller Fluoreszenzyield
$f_o$	Minimaler Fluoreszenzyield bei geöffneten Reaktionszentren
FCM	Durchflusszytometer
FK	Forschungskutter
$f_M$	Maximaler Fluoreszenzyield bei geschlossenen Reaktionszentren
FTZ	Forschungs- und Technologiezentrum Westküste
FSC	Forward scatter
%F	Prozentuale Fehleinschätzung des Fit's
GPS	Global positioning system
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KSW	Künstliches Seewasser
LED	Lumineszenzdiode
LHC	Light harvesting complex
MERMAID	Marine Environmental Remote-controlled Measuring and Integrated Detection
MARNET	Marine Monitoring Network in the North and Baltic Seas
NADP	Nicotinadenindinucleotidphosphat
P680	Reaktionszentrum des Photosystems II
PAR	Photosynthetic Active Radiance
Phaeo	siehe Pheo
Pheo	Pheophytin bzw. Phaeophytin, uneinheitliche Nomenklatur in der Literatur
$M_D$	Quantenausbeute für thermische Zerfälle
$M_F$	Absolute Fluoreszenzquantenausbeute
$M_{PC}$	Quantenausbeute für photochemische Nutzung
PQ	Plastoquinon
PriPro98	2. Workshop „Primärproduktionsbestimmung in aquatischen Systemen“
PS	Photosystem
r.E.	Relative Einheiten
SCOR	Scientific Committee on Oceanic Research
SSC	Side Scatter, seitliches Streulichtsignal beim FCM
Xan	Xanthophyll





# Untersuchungen zur Erkennung von Algengruppen und deren photosynthetischer Aktivität im marinen Bereich

## 1. Einleitung

Die wasserbedeckten Flächen dieser Erde bilden eine der wichtigsten Lebensgrundlagen der Menschheit. Das starke Bevölkerungswachstum mit der Folge der für die Menschheit immer enger werdenden Lebensräume stellt für uns und unsere Umwelt eine zunehmende Belastung dar. Die Biosphäre (unser Planet Erde als bislang einziger sich selbst regenerierender Lebensraum für den Menschen) ist einer fortschreitenden globalen Industrialisierung ausgesetzt. Die Nutzung der Lebensräume in industrieller oder landwirtschaftlicher Weise bringen Veränderungen der Umwelt mit sich, in denen die meisten über lange Zeiträume entstandenen natürlichen Lebenskreisläufe am Rande des Kollapses stehen. Wer regt sich denn heute schon noch über das Waldsterben auf? Das Leben geht weiter, das wird es bestimmt! Doch für wen, oder besser gesagt, für welche Spezies? Eines ist auf alle Fälle sicher: Der Einfluss des Menschen auf seinen Lebensraum hat eine Dimension angenommen, in der seine eigene Grundversorgung, wie die Luft zum Atmen, das Wasser zum Trinken etc. durch ihn selbst bedroht wird.

So ist eine globale Überwachung der Umweltparameter zur Vermeidung von übermäßiger Belastung der Natur zu einem der wichtigsten Angelegenheiten der gesamten Menschheit geworden. Neben der grundlegenden Notwendigkeit, als Spezies Mensch auf diesem Planeten überleben zu können, besteht auch ein wirtschaftliches Interesse. Zum Beispiel beruhen Risikoabschätzungen für Versicherungen auf Klimamodellen. Auch die Tourismusindustrie ist nicht daran interessiert, Pauschalreisen an ein zweites totes Meer (z. B. die Nordsee) zu organisieren.

„Wir stehen heute vor dem schleichenden Tod der bisherigen, uns als Lebensraum vertrauten Nordsee, ihrer Lebensgemeinschaften und Lebensstätten“ [Buchwald 1990].

Um das Ausmaß der Gefährdung für die Umwelt abschätzen zu können, werden für die weltweite Überwachung der Meere innovative Messsysteme entwickelt. In bereits bestehenden

## Kapitel 1

Monitoringsystemen (MARNET, MERMAID) werden driftende Messbojen, verankerte Flöße und feste Stationen (z. B. Messpfähle, Landstationen) zur Erfassung umweltrelevanter Parameter eingesetzt. Daten des Wasserkörpers werden entweder punktuell (Flöße und Stationen) oder im Ästuarbereich der Küste durch Driftbojen erfasst.

Mit der Entwicklung der BlueBox soll diese Überwachung in der Form von Schiffsrouten-Monitoring ergänzt werden. Die BlueBox (Kap. 2) stellt einen wichtigen Beitrag zum Europäischen Global Ocean Observing System (EuroGOOS) dar. Die Möglichkeit, Schiffe zur Meeresüberwachung einzusetzen, hilft zutreffendere Zustandsberichte der Wasserkörper zu verfassen. Die Daten dieses Messsystems sollen mathematische Modelloptimierungen unterstützen und für das Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) verfügbar sein. Neben chemischen und physikalischen Parametern wird in der BlueBox ein Messgerät zur Erfassung von biologischen Parametern zum Einsatz kommen. So besteht ein stetig wachsendes wirtschaftliches Interesse an der frühzeitigen Erkennung von Algenblüten und damit z. B. an Vorhersagen über die Eutrophierung eines Seegebietes.

Von allergrößtem Interesse ist die Erfassung der Biomasse. Sie gilt als ein Maß für die Bindung von Kohlenstoff aus der Atmosphäre durch pflanzliches Wachstum. Die Standardmethode zur direkten Bestimmung der produzierten Biomasse ist ein sehr aufwendiges und langwieriges Verfahren. Seit einigen Jahrzehnten ist daher für Gewässeruntersuchungen die indirekte Bestimmung der Biomasse über den Chlorophyll-*a* (Chl.*a*) Gehalt von Algen im Wasserkörper üblich.

Die erste Standardmethode zur Bestimmung des Chl.*a*-Gehaltes wird im UNESCO-Monograph von 1966 beschrieben. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination einer nasschemischen Aufbereitung der Probe mit anschließender Absorptionsmessung [UNESCO 1966]. Diese Methode wurde weiterentwickelt [Wright & Mantoura 1997, Jeffrey 1997, Jeffrey & Humphrey 1975] und anstelle der Absorptionsmessung wurde die Bestimmung des Chl.*a*-Gehaltes über die Messung der Fluoreszenzemission verwendet [Yentsch & Phinney 1985, Yentsch & Menzel 1963]. Als beste Methode gilt heutzutage die „high performance liquid chromatography“ (HPLC) Analyse [Schlüter et al. 2000, Meyer-Harms & Bodungen 1997, Barlow et al. 1997]. Vor- und Nachteile dieser Methode werden im Kapitel 4.2 eingehend erörtert. Für einen automatisierten Einsatz in der BlueBox zur kontinuierlichen Chlorophyll-*a* Erfassung ist dieses System nicht geeignet.

Für die prompte Erfassung des Chl.*a*-Gehaltes von Wasserproben haben sich die

„Fluorometer“ bzw. „Fluorimeter“ für die meisten Anwendungen in Feldversuchen durchgesetzt. Diese Geräte basieren auf einer Anregung der Wasserprobe mit Licht aus dem sichtbaren Spektralbereich (400 – 700 nm) und der Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz Emission in dem Wellenlängenbereich von 680 – 720 nm [Dau 1998]. Die Tatsache, dass keine Probenaufbereitung vor der Messung nötig ist, sowie die geringe Größe und der verhältnismäßig geringe Preis und ihre Empfindlichkeit prädestinieren diese Systeme für *in-situ* Messungen. Neben der Bestimmung der Chl.a-Konzentration sind auch Messungen möglich, die über den Zustand des photosynthetischen Apparates Auskunft geben [Vanselow et al. 1997, Moldaenke et al. 1995, Schreiber 1994, Hansen et al. 1991, Genty et al. 1989]. Ein prinzipielles Problem der fluorometrischen Bestimmung des Chl.a-Gehaltes einer Wasserprobe sind die Algen selbst. Selbstverständlich nicht die Algen an sich, denn deren Chl.a-Gehalt soll ja gemessen werden, sondern die Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung der Antennen bzw. des Lichtsammelkomplexes (light harvesting complex; kurz: LHC) der Photosysteme (siehe Kap. 3). Je nach Zusammensetzung des LHC verändert sich die Form der Anregungs-, Emissions- und Absorptionsspektren für verschiedene Algen. Um diesem Einfluss Rechnung zu tragen, wurden Methoden entwickelt die durch eine Anregung mit verschieden farbigem Licht (durch mehrere diskrete Wellenlängen nacheinander) die Fluoreszenzemission erfassen. Durch eine entsprechende mathematische Analyse ist die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes einer Probe für verschiedene spektrale Algengruppen möglich [Ruser et al. 1999, Beutler 1998, Kolbowski & Schreiber 1995]. Dies bringt nicht nur eine grob taxonomische Klassifizierung der Algen mit sich, sondern verbessert durch eine Identifizierung von totem fluoreszierendem Material auch die Chl.a-Bestimmung.

Im Rahmen des Bluebox Systems wird mit dem „Algae Online Analyser“ (AOA) der Firma bbe Moldaenke (Kiel) eine fluorometrische Messung der Chl.a-Konzentrationen von spezifizierten (spektralen) Phytoplanktongruppen im Wasserkörper angestrebt. Die BlueBox ist als autark arbeitendes System konzipiert und entsprechend hoch sind die Anforderungen an die einzelnen Sensoren zur Erfassung der relevanten chemischen, physikalischen und biologischen Parameter (siehe Kap. 2). Die Chl.a-Konzentrationen in der Nordsee auf der geplanten Einsatzstrecke der BlueBox zwischen Büsum und der Insel Helgoland sind im Vergleich zu limnischen Gewässern im allgemeinen sehr gering ( $< 10 \mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ). Die Salzkonzentration des Seewassers ändert sich durch den Süßwasserzufluss der Elbe, und im Ästuarbereich des Wattenmeeres ist zudem der Anteil an Sediment sehr hoch. Durch den Einbau des Systems an Bord eines Fährschiffes ist mit Schwankungen der Umgebungstemperatur zu rechnen,

## Kapitel 1

ebenso wird die Wassertemperatur der Proben in den verschiedenen Jahreszeiten unterschiedlich sein. All diese Änderungen der Messbedingungen dürfen keinen Einfluss auf die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppen haben. Dies gilt es zu untersuchen und das Gerät entsprechend zu testen. Für Einflüsse auf die Ergebnisse der Messung soll die Ursache ermittelt und Möglichkeiten zur Kompensation gefunden werden. Ebenfalls muss die Konsistenz der Ergebnisse durch den Vergleich des AOA's mit weiteren Möglichkeiten der Algengruppenerkennung geprüft werden (Kap.11). So werden Vergleichsmessungen mit dem AOA, einem Durchflusszytometer und der HPLC-Analyse im Labor und auf Ausfahrten mit einem Forschungsschiff durchgeführt (Kap. 11, Kap. 7 & 8).

Das Forschungs- und Technologiezentrum Westküste (FTZ) bietet für die angestrebte Untersuchung der Einsetzbarkeit eines Gerätes zur fluorometrischen Algengruppenerkennung die besten Voraussetzungen. Das FTZ ist eine interdisziplinär ausgerichtete zentrale Einrichtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Arbeitsschwerpunkten in der regionalen Meeres-, Küsten- und Ökosystemforschung. Neben der Grundlagenforschung werden anwendungsbezogene Projekte und technologische Entwicklungen durchgeführt. Das FTZ gliedert sich in 7 Arbeitsgruppen: Küstenökologie / Umweltforschung / Umwelttechnik, Angewandte Physik / Meerestechnik, Küstengeologie / Küstenschutz, Küstengeographie, Küstenarchäologie / Landschaftsentwicklung, Bodenökologie und Ökologie der Vögel und Säugetiere. Dem Institut steht ein eigenes, mit modernster Technik ausgerüstetes Schiff, die SÜDFALL, für die Wattenmeer- und Küstenforschung zur Verfügung. In enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Küstenökologie / Umweltforschung / Umwelttechnik (Prof. Dr. F. Colijn, Dr. K.-J. Hesse), welche sich u.a. mit der Erforschung der Ökosysteme im Küstenbereich, insbesondere des Wattenmeeres mit den Ästuaren und im Rahmen der Monitoringforschung an der Definition geeigneter Bioindikatoren und an der Optimierung von Umweltmesstechniken und Überwachungskonzepten beschäftigt, arbeite ich in der Arbeitsgruppe Angewandte Physik / Meerestechnik (Prof. Dr. F. Colijn, Dr. K. Vanselow) im Rahmen des BlueBox Projektes an der Anpassung, dem Test und der Optimierung des biologischen Sensors.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit umfasst neben der Frage der Einsetzbarkeit der fluorometrischen Algengruppenerkennung im marinen Bereich die Quantifizierung der fluorometrischen Chlorophyll-*a* Erfassung. Die nachfolgenden Untersuchungen machen deutlich, dass durch einen Umbau des Sensors eine für die Nordsee geeignetere Unterteilung der Algen in spektrale Gruppen für den marinen gegenüber dem limnischen Bereich möglich wird.

## 2. Das BlueBox System

### 2.1. Das Prinzip

Ziel des Projektes ist es, ein sogenanntes „BlueBox“ System zu entwickeln und zum Einsatz zu bringen. Nach erfolgreichem Abschluss der Funktionsmuster-Demonstrationsphase sollen die Arbeiten im Rahmen des Projektes das System zu einem vermarktbareren Produkt führen. Daher wird von Projektbeginn an eine enge Zusammenarbeit zwischen Forschungseinrichtungen als Entwicklern (Institut für Angewandte Physik, später Zentrum für angewandte Meereswissenschaften (ZAM) , Forschungs- und Technologiezentrum Westküste (FTZ) der Universität Kiel, GKSS Forschungszentrum Geesthacht), einem Privatunternehmen als Hersteller (GO Systemelektronik GmbH, Kiel) und einer Überwachungsinstitution als möglichem Betreiber (BSH, Hamburg) angestrebt, um aus dieser Kooperation heraus anwendungsorientiert vorzugehen.

Das ZAM, das FTZ Westküste, das GKSS Forschungszentrum und die GO Systemelektronik GmbH (Kiel) werden das Messsystem entwickeln, als Funktionsmuster herstellen und erproben. Die Bundesanstalt für Seeschifffahrt und Hydrographie wird ihre Erfahrungen beim marinen Monitoring durch begleitende fachliche Beratung in das Projekt einbringen.

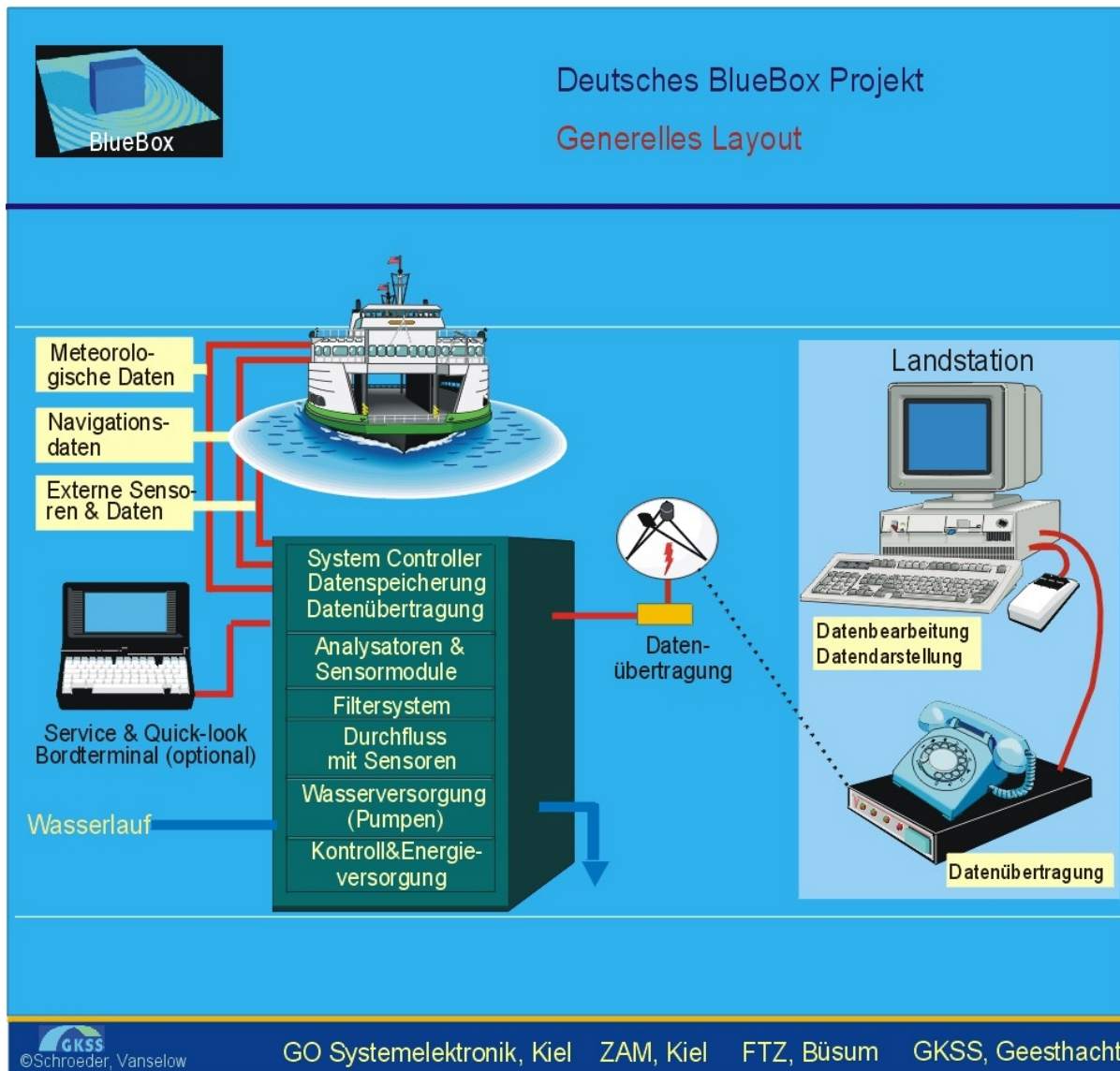
Das Vorhaben hat zum Ziel, ein automatisiertes, operationelles Messsystem zur Erfassung von Wasserparametern auf Schiffen, insbesondere Fährschiffen, zu entwickeln, im Schiffsbetrieb zu erproben und zu optimieren, und seine Funktionsfähigkeit im Betrieb zu demonstrieren. Auf diese Weise sollen routinemäßig Messdaten zur Wasserqualität entlang der Schiffsrouten aufgenommen und in Monitoringnetzwerke eingespeist werden.

Das „BlueBox“ Messsystem soll sich durch eine kompakte, robuste und modulare Bauweise auszeichnen und somit für eine breite Anwendung für marine Monitoring- und Überwachungsaufgaben geeignet sein. Die verwendete Messtechnik umfasst sowohl bereits bekannte, in vorangegangenen Entwicklungsvorhaben (z .B. MERMAID) qualifizierte Parameter und Verfahren als auch neu zu entwickelnde oder für den Routinebetrieb an Bord eines Schiffes zu modifizierende Methoden für besondere Parameter und Messgrößen. Die gewonnenen Daten werden sowohl im Messsystem selbst gespeichert, sollen aber auch über eine geeignete Datentelemetrie zu einer Landstation übertragen werden können.

Die qualitativ neuartige Systemlösung der BlueBox stellt eine Komplettlösung für eine schiffsgebundene automatische Monitoringstation inklusive der dazugehörigen Landstation dar. Es umfasst die Messung, Speicherung, Übertragung, Aufbereitung und nutzerorientierte Darstellung einer Vielzahl von Umweltparametern. Die Bedienoberfläche sowie die Datenstruktur und -speicherung, werden weitgehend an die bereits bestehenden Monitoringsysteme (z. B. MERMAID) angepasst. Die BlueBox ist damit so konzipiert, dass sie in diese Systeme integriert werden kann.

**Abbildung 2.1-1: Das BlueBox System**

Die BlueBox (Mitte) als Komplettlösung für ein schiffsgebundenes Monitoringsystem zur Erfassung wichtiger Wasserparameter. Allgemein werden externe Daten (z. B. Navigationsdaten vom GPS) von der BlueBox verwaltet und gespeichert. Die erfassten Daten können dann mittels einer geeigneten Verbindung von der Landstation abgerufen werden.



Eine offene Systemstruktur gestattet den Anschluss verschiedener Sensoren und Analysegeräte zur Messung oberflächennaher physikalischer Eigenschaften und Wasserinhaltsstoffe sowie die Integration von meteorologischen und navigatorischen Sensoren, wobei die Sensorbestückung je nach Aufgabenstellung und Bedarf des Anwenders erfolgen kann. Die Integration von Housekeeping-Sensoren sowie Überwachungs- und Steuersystemen soll einen sicheren, wartungsfreien und weitgehend bedienungsfreien mehrwöchigen Dauereinsatz ermöglichen. Alle Sensoren und Analysegeräte der Messstation werden über ein Bussystem (Controller Area Network, CANBUS) an den Messstellencontroller angeschlossen. Mit der Anwendung des CANBUS entspricht die interne Kommunikation der Messstation einem weit verbreiteten Industriestandard [Raab 1992]. Durch einen kompakten, modularen Aufbau ist die Messstation den spezifischen Bedingungen auf Seeschiffen hinsichtlich Platzbedarf und Energieverbrauch sowie Einsatz unter rauen Umgebungsbedingungen (z. B. im Maschinenraum) angepasst. Die Messstation ist transportabel und kann auch auf kleineren Schiffen z. B. Fischkutter) eingesetzt werden. Das Projekt wird vom BMBF für 3 Jahre und 4 Monate gefördert.

## 2.2. Das Wassersystem

Das Wassersystem stellt ein Kernstück der Schiffsstation dar, das mit seinen Eigenschaften maßgeblich die Qualität des Gesamtsystems bestimmt. Das System hat die Aufgabe, das zu untersuchende Oberflächenwasser für den Messprozess aufzubereiten, den verschiedenen Sensoren und Analysesystemen Wasser in der jeweils benötigten Art und Weise bereitzustellen und das Abwasser des Systems wieder ins Meer zu leiten.

Bei der Wasseraufbereitung ist insbesondere das Problem der den Messprozess störenden Luftblasen im Wasser zu lösen. Einfache technische Lösungen, wie z. B. ein großvolumiger Vorlagebehälter, lassen sich bei der BlueBox nicht anwenden. Dies würde zu einer Sedimentablagerung (Gefahr von Biofouling) und zu nicht vertretbaren langen Verweilzeiten des Wassers in dem System führen.

Bei der Entwicklung des Wassersystems kann auf praktische Erfahrungen bei verschiedenen Projektpartnern sowie auf international bekannte Lösungsansätze zurückgegriffen werden. Wegen den spezifischen Bedingungen der geplanten kompakten Schiffsmessstation ist jedoch eine vollständige Neuentwicklung nicht zu umgehen.

## Kapitel 2

Dies ergibt sich insbesondere aus den im folgenden dargelegten Anforderungen an das Wassersystem, die in ihrer Gesamtheit realisiert werden müssen:

- Das gesamte Wassersystem muss, wie alle anderen Komponenten der Schiffsmessstation, eine kleine Baugröße und einen möglichst kompakten Aufbau haben.
- Das Wassersystem muss das zu untersuchende Wasser für die verschiedenen Sensoren und Analysegeräte in der jeweils benötigten Art und Weise aufbereiten, um Messwertverfälschungen und Beeinträchtigungen des Messprozesses zu vermeiden. Dazu ist das Wasser blasenfrei zu machen (insbesondere für die Trübungs- und Sauerstoffmessung) und nach Bedarf zu filtern (insbesondere für die Nährstoffanalyse).
- Die Durchlaufgeschwindigkeit des Wassers durch das Wassersystem muss einer definierten räumlichen Messwertauflösung angepasst sein. Hierzu ist das Wasservolumen im Wassersystem klein zu halten.
- Totwasserzonen dürfen im Wassersystem nicht auftreten, um eine Sedimentation von suspendiertem Material zu vermeiden.
- In das Wassersystem müssen geeignete Maßnahmen zur Bewuchsvermeidung integriert werden. Dies gilt im besonderen Maße auch für die eingesetzten Wasserfilter.
- Das Wassersystem muss ein hohes Maß an Betriebssicherheit und Zuverlässigkeit, auch unter kritischen Bedingungen (Stromausfall, schwerer Seegang) aufweisen und ist dazu mit entsprechenden Sicherheitseinrichtungen ausgestattet.

Die Struktur des geplanten Wassersystems ist in der Abbildung 2.2-1 (nachfolgend) dargestellt. Hinsichtlich der Funktionalität kann das System in folgende Funktionsgruppen unterteilt werden:

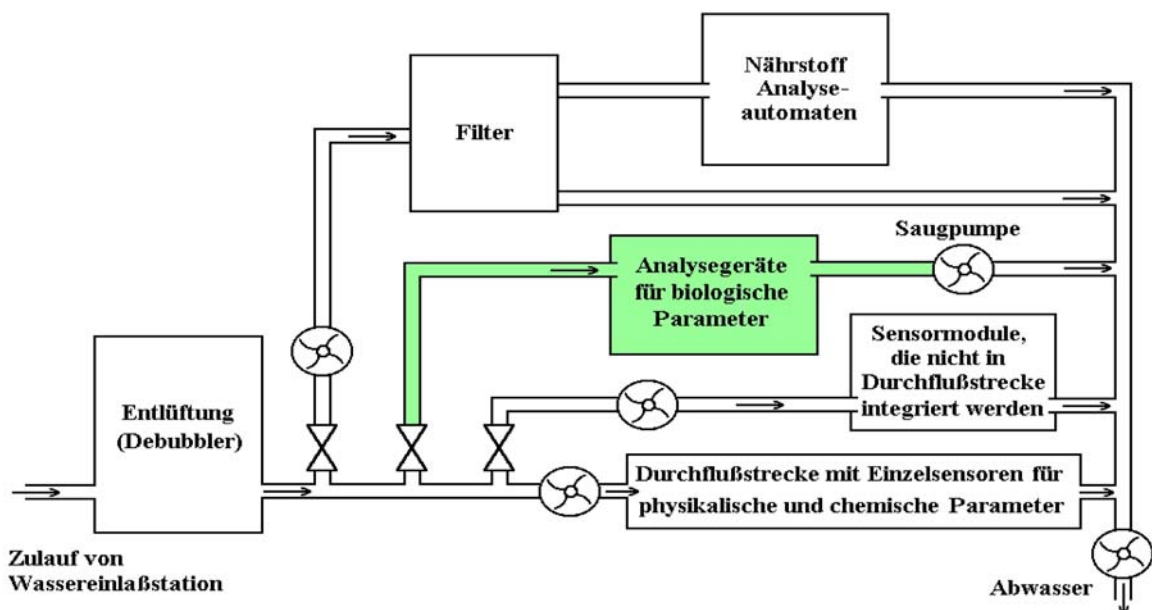
- Wasserbereitstellungseinheit, bestehend aus einem Entlüfter (Debubler), Pumpen zur Versorgung der Durchflussmessstrecke, der Filtereinheit und ggf. weiterer Messgeräte, sowie einer Pumpe zum Abpumpen des Abwassers der Messstation.



- Filtereinheit zur Versorgung der Analyseautomaten mit filtriertem Wasser. Die Art des verwendeten Filters richtet sich dabei nach den Einsatzbedingungen der Station.
- Durchflussstrecke mit physikalischen und elektrochemischen Sensoren. Die an die Durchflussstrecke anschließbaren Sensoren sind Einzelsensoren mit einem standardisierten Gehäuse. Damit wird ein einfacher Einbau in die Durchflussstrecke und im Bedarfsfall ein schnelles und problemloses Auswechseln ermöglicht. Die Sensorbestückung der Durchflussstrecke ist vom Anwender des BlueBox Systems entsprechend seiner Messaufgabe frei wählbar.

**Abbildung 2.2-1: Schema der Wasserstrecke der BlueBox**

Hinter der Entlüftung teilt sich der Wasserweg für die Versorgung der vier unterschiedlichen Sensorenblöcke. Jeder Block stellt mit seinen Sensoren verschiedene Anforderungen an die Vorbehandlung der zugeführten Wasserproben.



Die Wasserversorgung der Messstation erfolgt über eine separate Wassereinlaßstation. Nach der Entlüftung des dem System zugeführten Wassers unterteilt sich der Zufluss für die verschiedenen Sensorenblöcke. So ist für die Nährstoffanalysatoren (oberer Block in der Abbildung) eine Filterung des Probenwassers unabdingbar. Ohne eine Filterung verunreinigen die in den Analysatoren verwendeten Membranen innerhalb kürzester Zeit und wären unbrauchbar. Ein zu den Analysatoren paralleler Wasserweg hinter dem Filter ermöglicht die Einstellung der den Automaten zugeführten Wassermenge.

## Kapitel 2

Für die Messung der biologischen Parameter (mittlerer markierter Block) hingegen muss eine schonende Zuführung der Probe gewährleistet sein. Viele Algenspezies reagieren sehr empfindlich auf mechanische Beanspruchung und werden bei schnellen Druckänderungen (in einer Pumpe) zerstört. Dieser Wasserweg wird deshalb mit einer Saugpumpe betrieben. Die Erfassung der chemischen und physikalischen Parameter (Temperatur, Leitfähigkeit, usw.) können direkt im Durchfluss gemessen werden (unterer Block). Diese Sensoren werden durch das Seston („das Schwebende“) nicht beeinflusst. Für alle Messsysteme, die nicht in der BlueBox implementiert werden können oder sollen, steht ein Anschluss für die externe Wasseranbindung zur Verfügung.

### 2.3. Der Multi-Fluoreszenz Sensor

Für die Erfassung der biologischen Parameter wird ein „Algae Online Analyser“ (AOA) der Firma BBE Moldaenke (Kiel) eingesetzt. Die mit dem Multi-Fluoreszenz Sensor bestimmbaren Parameter aus der Algenfluoreszenz sollen Rückschlüsse auf die Artenzusammensetzung der Algen, den Chlorophyll-*a* Gehalt pro Liter Wasserprobe, die photosynthetische Aktivität der Algen und ihre Biomasseproduktion gestatten. Die Anbindung dieses Sensors an die Wasserstrecke der BlueBox wird aufgrund der Größe des Gerätes über einen nach außen geführten Wasserkreislauf erfolgen. Der in Abbildung 2.2-1 markierte Block bietet in der realen BlueBox nur Platz für einen einfachen Fluoreszenzsensor (Fluoreszenzanregung mit nur einem Wellenlängenbereich).

Da der AOA nicht zu der Grundausstattung der BlueBox gehört und diese in ihren Ausmaßen so klein wie möglich sein soll, wird der AOA extern mit ihr verbunden. Die Anpassung des kommerziell erhältlichen Gerätes für den Anschluss an die Wasserstrecke der BlueBox und an den CANBUS für die Messwertübertragung gehört zu den zu bewältigen Aufgaben des Projektes.

Generell soll der AOA im Projekt an die Verhältnisse im Salzwasser mit dem dort vorhandenen Phytoplankton angepasst und seine Einsetzbarkeit verifiziert werden.

### 3. Das Phytoplankton

Für die Untersuchung einer Wasserprobe ist nicht nur der Gehalt an Phytoplankton von Interesse, sondern auch Aussagen über die Algenartenzusammensetzung.

Seit den ersten Anfängen der Untersuchung von Algen mit dem Mikroskop gab es viele Versuche die Vielzahl an Algen einzuteilen. Dieses System wird auch heutzutage noch laufend verändert.

#### 3.1. Die Einteilung der Algen

Eine Möglichkeit der Klassifizierung wurde von van den Hoek [Hoek, v.d. 1993] vorgestellt.

Für die Einteilung in Algenstämme, -klassen und -gattungen wurden die Unterschiede der Pigmentkomposition (Kap. 3.2), die Form der Thylakoide und weitere unterscheidbare Merkmale herangezogen. Jeder Stamm enthält mindestens eine Klasse, jede Klasse Algen aus verschiedenen Gattungen, die wiederum mehrere Arten enthalten können.

**Tabelle 3.1-1: Einteilung der Algen**

In den Spalten Gattungen und Arten ist die bislang bekannte Anzahl angegeben.

Stamm	Klasse	Gebräuchlicher Name	Gattungen	Arten
Heterokontophyta	Bacillariophyceae	Diatomeen / Kieselalgen	200	6000
	Chrysophyceae	Goldalgen	200	1000
	Phaeophyceae	Braunalgen	250	2000
	Chloromondaophyceae		6	10
	Xanthophyceae	Gelbgrüne Algen	80	400
Dinophyta	Dinophyceae	Dinoflagellaten	120	1000
Cyanophyta	Cyanophyceae	Blualgen	150	2000
Haptophyta	Haptophyceae		45	250
Cryptophyta	Cryptophyceae		12	120
Rhodophyta	Rhodophyceae	Rotalgen	600	4500
Eustigmatophyta	Eustigmatophyceae			5
Chlorophyta	Chlorophyceae	Grünalgen	500	8000
	Prasinophyceae			
	Charophyceae			
Euglenophyta	Euglenophyceae		40	800

Die Einteilung nach van den Hoek [1993] unterscheidet nicht in Süß- und Salzwasserspezies. Die für das Phytoplankton der Deutschen Bucht relevanten Klassen sind vor allem die

Diatomeen, die Dinoflagellaten und die Haptophyceae. Vereinzelt treten aber auch Algen der Klassen der Cryptophyceae, Raphidophyceae, Chlorophyceae, Prasinophyceae und Cyanophyceae (Cyanobakterien) auf [Rademaker et al. 1998, Drebes 1974].

### 3.2. Die Pigmentkomposition des photosynthetischen Apparates

Für die späteren Untersuchungen sind vor allem die Unterschiede der Pigmentkompositionen der Antennen des photosynthetischen Apparates verschiedener Algenklassen von Interesse. Die Pigmente werden in Chlorophylle, Carotinoide, Phycobiliproteine und Xanthophylle eingeteilt. Diese Überbegriffe aber stehen für eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, die zu diesen Gruppen gezählt werden. Für die in Kapitel 3.1 erwähnten relevanten Algenklassen für die Nordsee werden in der folgenden Tabelle die wichtigsten Pigmente (markiert mit x) und die, die in einigen Fällen (markiert mit -) ebenfalls zu finden sind, aufgeführt.

**Tabelle 3.2-1: Übersicht über die Pigmente der relevanten Algenklassen der Nordsee**

Die Algenklassen unterscheiden sich in der Zusammensetzung der photosynthetischen Pigmente. Diese Unterschiede bilden die Grundlage der Möglichkeit zur messtechnischen Erfassung von Algenklassen.

Algenklasse	Chlorophylle			Carotine		Phycobiliproteine		Xanthophylle
	Chl.a	Chl.b	Chl.c	"-	\$-	Phyco-cyanin	erythrin	
Bacillariophyceae	x		x	-	x			Fuco-,Diadino-,Diatoxanthin
Dinophyceae	x		x		x			Peridinin
Cryptophyceae	x		x	x	-	x	x	Alloxanthin
Cyanophyceae	x			x		x	x	Myxo-,Zeaxanthin,Echinon
Haptophyceae	x		x		x			Fuco-(Diadino-,Diato-)xanthin
Chlorophyceae	x	x		-	x			Neo-,Viola-,Zeaxanthin,Lutein

Eine wesentlich detailliertere Liste der nachgewiesenen Pigmente in den verschiedenen Algenklassen ist van den Hoek [1993] oder Jeffrey & Vesk [1997] zu entnehmen.

Anhand der Komposition der Pigmente in den Algen können verschiedene Messverfahren eine Unterscheidung in die Klassen leisten. Nasschemische Verfahren sind in der Lage, die einzelnen Pigmente isoliert nachzuweisen (Kap. 4.2). Messsysteme, die auf der Messung der Fluoreszenzemission oder der Absorption basieren (Kap. 4.3 ff), machen sich die Unterschiede der Spektren der Pigmente zunutze. Alle gängigen Methoden zur Bestimmung von Algen und deren Konzentration werden in dem nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

### 3.3. Die biophysikalischen Grundlagen

Die jährlich von der Sonne auf die Erdoberfläche eingestrahlte Energiemenge beträgt ungefähr  $5,2 \cdot 10^{21}$  kJ, von der knapp die Hälfte in dem photosynthetisch nutzbaren Wellenlängenbereich liegt. Durch die Photosynthese von Pflanzen wird nur etwa 0,05 Prozent dieser Energie in organischen Molekülen gespeichert. Der überwiegende Teil wird in Form von Wärme in den Weltraum zurückgestrahlt [Lawor 1990].

Das marine Phytoplankton hat mit über 50 Prozent der gesamten Photosynthese einen beachtlichen Stellenwert unter den Primärproduzenten [Lawor 1990].

Jedes Jahr wird durch die Photosynthese  $5,2 \cdot 10^{11}$  Tonnen organisches Material gebildet [Lawor 1990]. Der Umsatz an Chlorophyll-*a* wird auf  $10^9$  Tonnen pro Jahr geschätzt, wobei nur 25 % davon auf das Absterben der Landpflanzen im Herbst entfallen. Der Rest von 75 % des Umsatzes ereignet sich in Flüssen, Seen und in den Ozeanen [Porra et al. 1997].

#### 3.3.1. Die grundlegenden Reaktionen der Photosynthese

Aus Kohlendioxid und Wasser bildet die Photosynthese durch absorbierte Strahlungsenergie organische Substanz in Form von Kohlenhydraten [Lawlor 1990]. Dieser komplexe endergonische Prozess besteht aus vielen Einzelschritten. Dieser Prozess wird in eine Licht- und Dunkelreaktion unterschieden [Buschmann & Grumbach 1985].

Die Lichtreaktion wandelt Adenosindiphosphat (ADP) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>) durch die Absorption von Lichtenergie in die energiereicheren Stoffe Adenosintriphosphat (ATP) und NADPH / H<sup>+</sup> um. Während der Dunkelreaktion werden diese beiden Stoffe für die Bildung von Kohlenhydraten benötigt. Die Primärreaktion der Photosynthese aber ist die Anregung der Chlorophyllmoleküle durch Licht.

Die Messung der Chl.a-Fluoreszenz, die in dieser Arbeit die Grundlage für die Algengruppenerkennung bildet, wird durch die Fluoreszenzemission des Photosystems II möglich.

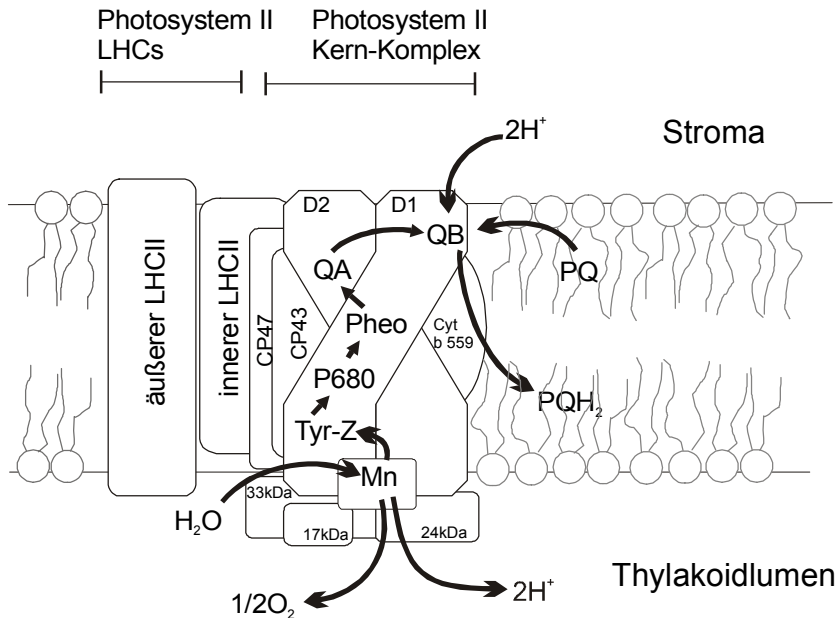
#### 3.3.2. Das Photosystem II

Die photochemischen Lichtreaktionen von Pflanzen finden an den Proteinkomplexen des

Photosystems II (PS II) und des Photosystems I (PS I) unter der Verwendung von  $e^-$  und  $H^+$  transportierenden Moleküle statt.

**Abbildung 3.3-1: Das Photosystem II**

Das Photosystem II untergliedert sich in einen Kern-Komplex und die lichtsammelnden Chlorophyll-Protein-Komplexe (LHCs). Geänderte Abbildung nach Hintze [2000].



Das Photosystem II ist eingebettet in die Doppellipidmembran des sogenannten Thylakoiden, die das Thylakoidlumen vom Stroma des Chloroplasten trennt.

Das LHC II (light harvesting complex of photosystem II) ist ein Proteinkomplex, der keine eigene photochemische Aktivität besitzt. Es wird in ein inneres und ein äußeres LHC II unterschieden [Lawlor 1990]. Das innere LHC II ist fest mit dem Kern-Komplex verbunden, wohingegen das äußere LHC II mobil ist.

Der PS II Kern-Komplex besteht aus chlorophyllhaltigen Antennenpigmenten (CP43 und CP47 in Abbildung 3.3-1), den Polypeptiden D1 und D2 mit dem Reaktionszentrum (P680) und seinen Akzeptoren und Donatoren, sowie dem wasserspaltenden Enzymkomplex (Mn).

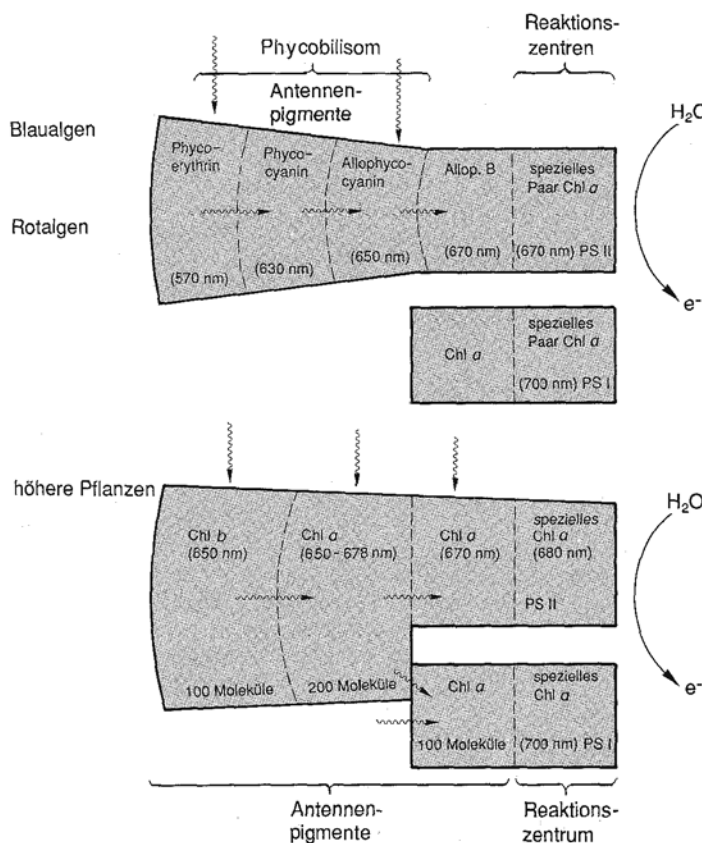
Auf D1, einem Polypeptid, befindet sich das Reaktionszentrum (P680) des PS II mit dem Donator Tyrosin-Z (Tyr-Z) und dem Akzeptor Pheophytin (Pheo). Das Elektron wird nach dem Pheophytin über  $Q_A$  und  $Q_B$  an den Plastoquinonpool (PQ bzw.  $PQH^+$ ) weitergereicht und verlässt über  $PQH_2$  das Photosystem.

### 3.3.3. Die lichtsammelnden Antennen des PS II

In Kapitel 3.2 wurde bereits auf die Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung der Antennensysteme des photosynthetischen Apparates für verschiedene Algenklassen hingewiesen. Alle diese Pigmente sind an der Absorption der Lichtenergie beteiligt, aber nur spezielle Formen des Chlorophyll-*a* (Chl.*a*) bilden die Reaktionszentren (P680 bzw. P700) bei Eukaryoten und den photosynthetisch aktiven Bakterien der Algenklasse der Cyanophyceae. Alle weiteren Pigmente werden als akzessorische Pigmente bezeichnet. Sie bilden die Antennen (LHC) für die Absorption der Photonen.

**Abbildung 3.3-2: Schemata der Energieabsorption und Anregungsübertragung in den Antennensystemen**

Übertragung der absorbierten Photonenenergie von den Antennenpigmenten auf das Reaktionszentrum bei verschiedenen photosynthetischen Organismen. Nach Lawlor [1990].



Die Pigmentzusammensetzung des LHC's von Blau- und Rotalgen weicht stark von der in höheren Pflanzen (Eukaryoten, außer Rotalgen) ab.

Während bei höheren Pflanzen die Chlorophylle, Carotinoide und Xanthophylle als akzessorische Pigmente vorhanden sind, übernehmen bei den Blau- und den Rotalgen die Phycobiline in den Phycobilisomen die Absorption der Energie und die Anregungsübertragung zum Reaktionszentrum.

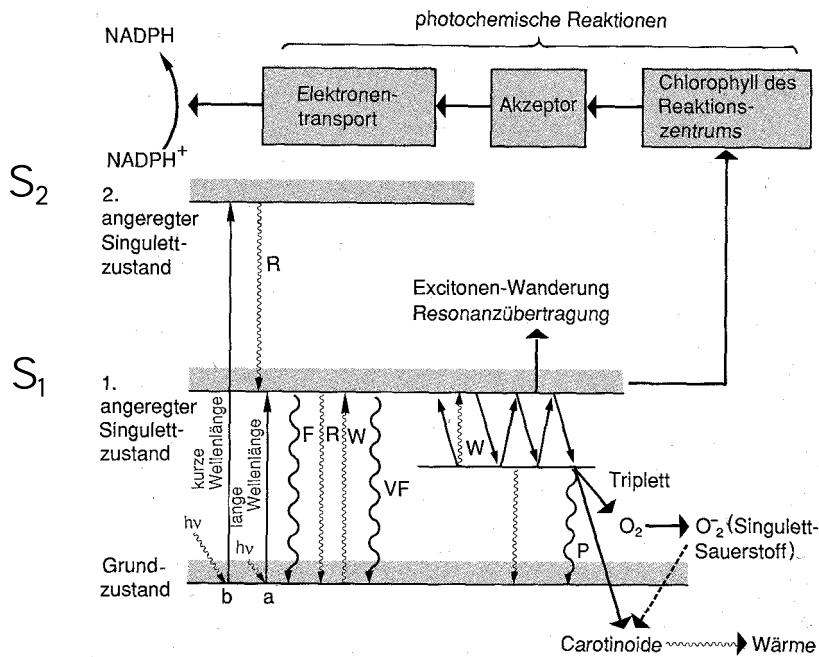
Die Antenne der höheren Pflanzen wird in ein inneres und ein äußeres LHC unterteilt. In der unteren Abbildung ist ein Quenchmechanismus angedeutet (Kap. 3.3.5), der auf einer Änderung des Absorptionsquerschnittes des Photosystems II beruht. Die Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen I und II verändert sich.

### 3.3.4. Photonenabsorption und prompte Fluoreszenz

Für die Absorption eines Photons durch die akzessorischen Pigmente müssen die Orbitale dieser Moleküle eine Energiedifferenz aufweisen, die mit der Energie des Lichtquants übereinstimmt.

**Abbildung 3.3-3: Schema der Absorption eines Photons durch ein Pigmentmolekül**

Die Hauptenergieniveaus werden (nach der Hauptquantenzahl) als Grundzustand, erster, zweiter (oder höherer) angeregter Zustand bezeichnet. Nach Lawlor [1990].



Die Wellenlänge des absorbierten Photons ist ausschlaggebend für die Anhebung eines Elektrons ( $e^-$ ) in den ersten angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ) oder den zweiten angeregten Zustand ( $S_2$ ) des Pigments. Durch Wärmestrahlung kann der  $S_1$ -Zustand ebenfalls erreicht werden.

Letztendlich aber erfolgen die wichtigsten Prozesse der Energieabgabe alle von dem ersten angeregten (Singulett-)Zustand des Pigments aus, da der zweite angeregte Zustand strahlungslos in  $S_1$  zurückfällt.

Mehrere Prozesse konkurrieren bei der Deaktivierung von  $S_1$ . Zum einen erfolgt ein strahlungsloser Übergang (R) des  $e^-$  in den Grundzustand. Zum anderen wird die Anregungsenergie in der Form von prompter Fluoreszenz (F), verzögerter Fluoreszenz (VF), Phosphoreszenz (P), photochemischer Reaktionen der Photosynthese (Übergabe des  $e^-$  an



den Akzeptor Pheophytin) und Energieübertragung, z. B. vom Triplettzustand auf Sauerstoff oder Carotinoide abgeleitet.

### 3.3.5. Quenchmechanismen der Chlorophyll-Fluoreszenz

Photosynthetisch aktive Pflanzen geben ca. 3 – 6 Prozent des eingestrahlenen Lichtes als Fluoreszenz wieder ab. Bei physiologischen Temperaturen stammt die variable Fluoreszenz fast ausschließlich von dem PS II [Krause & Weis 1991].

Ein Teil der absorbierten Lichtenergie kann photochemisch genutzt ( $\Phi_{PC}$ ) werden. Weitere Anteile werden als Fluoreszenz ( $\Phi_F$ ) oder als Wärme ( $\Phi_D$ ) in die Umgebung abgestrahlt.

Für die Fluoreszenzquantenausbeute gilt:

**Gleichung 3.3-1:**

$$\Phi_F + \Phi_D + \Phi_{PC} = 1$$

Die Chlorophyll-Fluoreszenz wird zur Bestimmung des Chl.a-Gehaltes von Wasserproben genutzt. Die Voraussetzung für eine absolute Bestimmung der Chl.a-Konzentration ist eine konstante Beziehung zwischen diesen beiden Größen. Es ist aber bekannt, dass verschiedene Prozesse die Chlorophyll-Fluoreszenz vermindern. Die fluoreszenzvermindernden Prozesse werden in photochemisches Quenching (photochemische Nutzung) und nicht photochemisches Quenching unterschieden [van Kooten & Snel 1990, Schreiber et al. 1986].

Ein großer Anteil des nichtphotochemischen Quenching wird mit dem Aufbau des pH-Gradienten über der Tylakoidmembran in Zusammenhang gebracht und auch als Energy-Quenching bezeichnet [Horton et al. 1996, Dau 1994a].

Ein weiterer Einfluss ist durch den Absorptionsquerschnitt des PS II gegeben. Wird dieser bei einer gleichbleibenden Lichtintensität kleiner, so vermindert sich durch die resultierende Verringerung der absorbierten Energie auch die emittierte Fluoreszenz. Einer der hierfür in Frage kommenden Prozesse wird als „state-transition“ bezeichnet und beruht auf einer Änderung der Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen I und II [Van Thor et al. 1998, Dau & Canaani 1990, Dau & Hansen 1988]. Die selektive Anregung des PS I mit dunkelrotem Licht führt zu einer momentanen Erhöhung des Absorptionsquerschnittes von PS II, während kurzwelliges Licht zu einer momentanen Abnahme des Absorptionsquerschnittes führt. Der Quenching-Mechanismus über die state transition

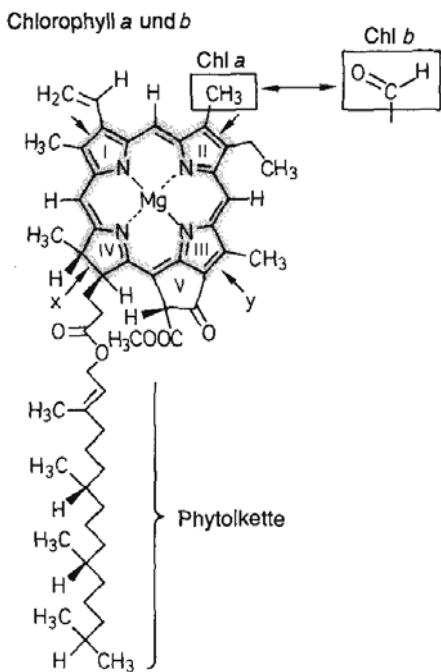
beruht auf einer reversiblen Phosphorylierung des äußeren LHC II [Allen 1992].

Die Fluoreszenzausbeute wird ebenfalls von einer Schädigung des Photosyntheseapparates durch hohe Lichtintensitäten beeinflusst [Nilawati et al. 1997, Sagert et al. 1997, Krause & Winter 1996, Krause et al. 1995, Baker & Bowyer 1994, Aro et al. 1993].

### 3.3.6. Das Chlorophyll-*a* und seine Zerfallsprodukte

Die jährliche Degradierung an Chlorophyll-*a* wird auf  $10^9$  Tonnen pro Jahr geschätzt (siehe Anfang Kap. 3.3), wobei sich 75 % des Umsatzes in Flüssen, Seen und in den Ozeanen ereignet.

**Abbildung 3.3-4: Der Molekülaufbau des Chlorophyll-*a* (- *b*). Nach Lawlor [1990].**



Der molekulare Unterschied zwischen dem Chl.a und Chl.b besteht „nur“ aus dem Austausch der Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) am zweiten Pyrrolring (II) durch eine Formylgruppe (CHO). Dieser Unterschied bringt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima sowie eine Veränderung des Absorptionskoeffizienten mit sich.

Die Hauptübergänge der Elektronen aus der Wasserspaltung sind durch Pfeile (mit x und y bezeichnet) angedeutet.

Die natürlich vorkommenden Chlorophyllproteinkomplexe der Antennen sind relativ stabil. Sie können aber durch chemische, photochemische und biologische Prozesse verändert werden (Tabelle 3.3-1).

Die Chlorophyll-Derivate entstehen zum Beispiel durch das Gefressen werden und der anschließenden Verdauung durch andere Organismen, durch mikrobiologische Zersetzung und das Absterben der Zellen.

Im Zusammenhang mit der nasschemischen Chromatographie ist recht viel über die Zerfallsprodukte der Chlorophylle bekannt. Durch den Einsatz von alkalischen Lösungsmitteln für die Extraktion von Pigmenten aus Algenzellen werden die Chlorophylle in einem Lösungsmittel (Azeton, Ethanol, usw.) gelöst. Diese gelösten freien Moleküle werden labiler in bezug auf eine chemische oder photochemische Behandlung und unterliegen damit leichter einer Veränderung.

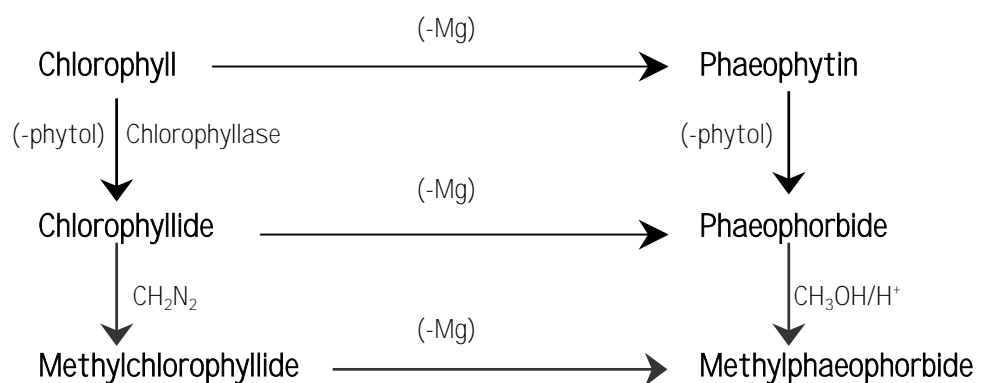
Freie Chlorophylle und Carotinoide sind in photosynthetisch aktiven Zellen nicht gefunden worden. Sie spielen für die Photosynthese keine Rolle [Poora et al. 1997].

Die Prozesse die zu einer Veränderung führen, werden als Allomerisation, Epimerisation, Demetalisation, Dephytylation, Halogenisation und Decarboxymethylasation unterschieden. Die einzelnen Prozesse sind ausführlich bei Poora et al. [1997] beschrieben.

Die Produkte der Degraduierung des Chlorophyll's werden in zwei Gruppen eingeteilt:

- Periphere Veränderung der ringförmig angeordneten Tetrapyrrole, unter anderem durch den Verlust der Phytolkette (-phytol).
- Oxidative Aufspaltung der Tetrapyrrole in eine lineare Anordnung mit dem Verlust des zentralen Magnesiumatoms.

**Tabelle 3.3-1: Schema des Chlorophyll Zerfalls**



In der allgemeinen Nomenklatur [Goodwin 1976] bezeichnet man die Derivate des Chlorophyll's als:

## Kapitel 3

- **Phylline:** Chlorophyll-Derivate, die das Zentralatom Mg enthalten.
- **Phaeophytine:** Chlorophyll-Derivate, die das Magnesiumatom nicht mehr enthalten.
- **Chlorophyllide:** aus einer enzymatischen oder chemischen Hydrolyse entstandenes Säure-Derivat des Chlorophylls.
- **Chlorophyllase:** Ein Enzym, das die Phytolkette von dem Chlorophyll abspaltet. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle bei dem Chlorophyll-Abbau bei Alterungsprozessen [Mohr & Schopfer 1992].
- **Phaeophorbide:** Diesen Derivaten fehlt sowohl das Magnesium-Zentralatom als auch die Phytolkette.

## 4. Messverfahren zur Untersuchung von Wasserproben

Generell gibt es eine große Anzahl von Möglichkeiten, Algen als biologische Sensoren zu nutzen [Hintze et al. 1999, Ruser et al. 1999], so z. B. zum Nachweis von Umweltgiften oder Überdüngung [z. B. Vanselow 2000]. Das große Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis lässt Phytoplankton sehr schnell auf die Umgebung und deren Veränderung reagieren. Algenblüten von toxischen Algen können für den Menschen zu lebensgefährlichen Konzentrationen von Giften in Muscheln, Fischen und auch in der Luft [Burkholder 2000] führen. In der Nordsee treten in unregelmäßigen Abständen Algenblüten einer bestimmten Haptophyceae und eines Dinoflagellaten [De Jong et al. 1999] auf. Im Sommer 1997 wurde eine toxische Raphidophyceae (*Fibrocapsa japonica*) in der Nähe von Sylt und im Büsumer Hafen nachgewiesen [Rademaker et al. 1998]. Aufgrund der Gesundheitsschädlichkeit kann das Auftreten zu offiziellen Badeverboten führen. Für Gebiete, die stark von dem Tourismus abhängen, können solche Algenblüten zu schweren wirtschaftlichen Problemen führen.

### 4.1. Das inverse Mikroskop

Eine der ältesten Methoden zur Untersuchung von in einer Wasserprobe enthaltenen Algen ist der Einsatz eines Mikroskops mit invertiertem Lichtweg. Die Vergrößerungsoptik wird von unten an den Objektträger geführt, während die Lichtquelle die Probe von oben beleuchtet. Für eine Zählung werden die Algen fixiert (z.B. mit Lugol). Durch das Abtöten sinken die schwebenden und die beweglichen Zellen auf den Boden des Objektträgers und können gezählt werden. Bei geringen Konzentrationen von Algen ist im allgemeinen eine Anreicherung nötig. Das Volumen der Objektträger für Flüssigkeiten lässt sich durch einen entsprechenden Aufsatz um ein Vielfaches vergrößern. Nach einer ausreichend langen Zeit zur Sedimentation der Zellen kann der Aufsatz wieder entfernt werden. Unter dem Mikroskop lassen sich die Algenspezies und nach der „Utermöhl“-Technik, einem standardisierten Verfahren, die Zellzahlen für ein definiertes Volumen bestimmen [Utermöhl 1958].

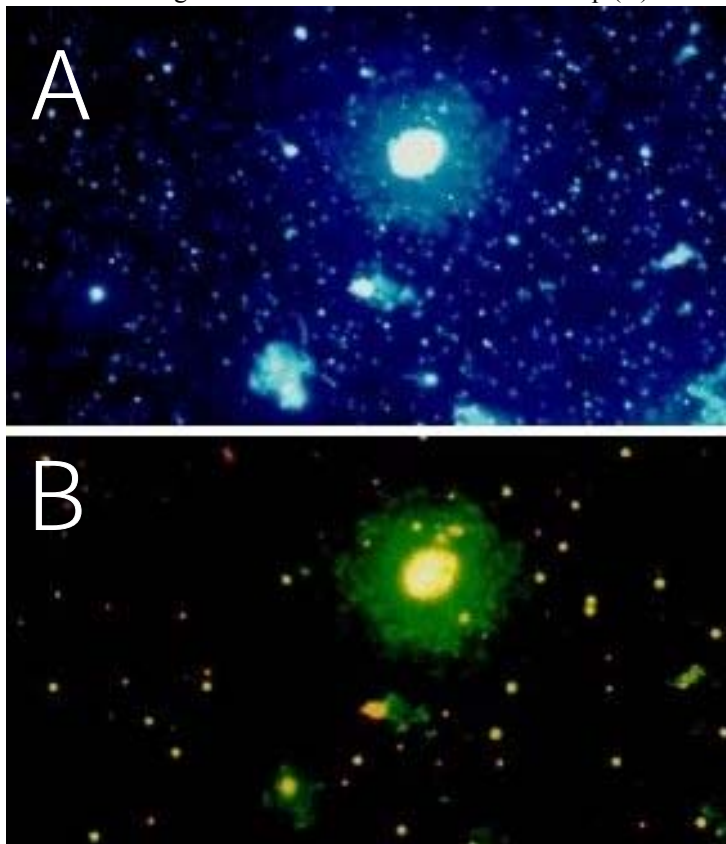
Doch dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig. Selbst für einen gut ausgebildeten Wissenschaftler ist es manchmal schwer, bestimmte Algenzellen zu unterscheiden und zu identifizieren. Picoplankton mit einer Größe kleiner als ein Mikrometer kann fast nie zugeordnet, geschweige denn gezählt werden. Algen, die Kolonien bilden, sind ein weiteres

Problem, denn jede Zelle müsste gezählt werden. Ein weiterer wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die große statistische Unsicherheit der Zählung. Selbst für einfach zu zählende Wasserproben (leicht zu unterscheidende Algenarten, wenig Schwebstoffe und Sediment, keine Kolonienbildung, usw.) sind die ermittelten Zellzahlen mit einigen hundert Zellen immer klein. Die Bestimmung ist deshalb in den meisten Fällen mit großen Abweichungen behaftet.

Um zumindest das Picoplankton zählen zu können und die Trennung zwischen Algen und anderen Partikeln zu erleichtern, wurde eine neue Methode angewendet. Bei einem Epi-Fluoreszenzmikroskop regt eine spezielle Lichtquelle die Chlorophyll-Fluoreszenz der Algen an [Largo et al. 1997, Wright et al. 1996, Schubert 1992]. Mit speziellen optischen Filtern ist dann die Orange- oder Rotfluoreszenz (Abbildung 4.1-1 B) der Algen zu erkennen. Da Sediment und die Hüllen von toten Algenzellen nicht fluoreszieren, ist eine leichte Trennung des Phytoplanktons von nicht-fluoreszierenden Partikeln möglich. Eine Unterscheidung der Algenklassen ist nur anhand der Farbe der Fluoreszenz möglich, eine genauere Spezifizierung ohne leistungsfähigere Mikroskope oder andere Bestimmungsmethoden aber nicht.

#### Abbildung 4.1-1 A & B: Das Epi-Fluoreszenz Mikroskop

Abbild einer Algenkultur mit einen inversen Mikroskop (A) und einem Epi-Fluoreszenz-Mikroskop (B)



Diese beiden Abbildungen verdeutlichen den Vorteil des Epi-Fluoreszenz Mikroskops. Abbildung 4.1-1 A zeigt eine Algenprobe unter einem üblichen Mikroskop bei der Verwendung von polarisiertem Licht. Der helle weiße Fleck ist eine große Algenzelle, die wolkenartigen Gebilde im unteren Bildbereich können eine Algenkolonie oder totes Material sein. Gleiches gilt für die vielen einzelnen Punkte, Algenzelle oder Detritus?

Durch eine Lichtquelle wird die Chl.a-Fluoreszenz angeregt und kann durch optische Filter für das menschliche Auge sichtbar gemacht werden. Dieses zeigt Abbildung 4.1-1 B. Deutlich ist die Fluoreszenz der Algen zu erkennen (Abb. B ist farbverfälscht, die Chl.a Fluoreszenz ist rot). Der Vergleich mit Abbildung 4.1-1 A zeigt den Anteil an Detritus, das bei der Zählung mit einem inversen Mikroskop die Zählung der einzelnen Zellen erheblich erschwert.

## 4.2. Die HPLC-Analyse

Seit 1983 wird die „high performance liquid chromatography“ (HPLC) für die Untersuchung von Wasserproben verwendet.

Die Partikel in einer Wasserprobe werden durch einen leichten Unterdruck auf einen feinporigen Filter gebracht. Dieser Filter wird dann in einer Zelmühle zerkleinert, wobei auch die Zellwände der Algen zerstört werden. Nun lassen sich die in den Algen enthaltenen Pigmente in einem Lösungsmittel (Azeton oder Ethanol) lösen und in einer Zentrifuge von den organischen Resten, dem Detritus und dem Filtermaterial trennen. Die gelösten Pigmente können nun in der HPLC detektiert werden [ausführliche Beschreibung bei Jeffrey et al. 1997].

Prinzipiell gehört diese Methode zu den genauesten in bezug auf die Bestimmung der Chlorophyll-*a* Konzentration von Wasserproben. Es können ca. 50 verschiedene Pigmente und deren Derivate (Zerfallsprodukte) des photosynthetischen Apparates identifiziert werden [Jeffrey et al. 1997]. Die HPLC-Analyse aber braucht ihre Zeit. Die Vorbereitung der Proben ist aufwendig. Die Pigmente zerfallen bei falscher Behandlung sehr schnell. Vorteilhaft ist daher die Möglichkeit, Derivate der Pigmente zu identifizieren, da so eine Kontrolle der Vorbehandlung möglich ist.

Für die Messung einer Probe wird bei laufendem System eine Zeit von ca. einer halben Stunde benötigt (ohne Vorbehandlung und Auswertung), und die Durchführung bedarf eines gut geschulten Personals. Durch einen automatischen Probenwechsler können aber 30 (oder mehr) Proben ohne Betreuung in einem Durchlauf abgearbeitet werden. Die Erfahrungen und Probleme mit der HPLC-Analyse führten zu dem ersten Treffen der Arbeitsgruppe SCOR (Scientific Committee on Oceanic Research) in Halifax im Jahre 1963.

Theoretisch ist die Genauigkeit der Messung durch die Vergrößerung der filtrierte Wassermenge linear zu steigern, doch in der praktischen Anwendung zeigen sich gerade für Freilandproben starke Einschränkungen. Für stark sedimenthaltige Wasserproben aus dem Ästuarbereich des Wattenmeeres ist die Menge an Probenwasser für eine Filtration begrenzt (die obere Grenze liegt nach eigener Erfahrung bei einer Wassermenge von 400 ml für einen Whatman GF/F Filter mit einem Durchmesser von 25 mm).

Der Vergleich der Pigmentkomposition des photosynthetischen Apparates für verschiedene Algenklassen (Kap. 3.2) ließ eine Erkennung von Algenklassen über bestimmte Pigmente zu. Pigmente, die (möglichst) nur in einer Klasse zu finden sind, werden als Markerpigmente

bezeichnet. Sie ermöglichen durch den Nachweis des Markerpigmentes in einer Wasserprobe den Rückschluss auf die Anwesenheit einer bestimmten Algenklasse [Schlüter et al. 2000, Meyer-Harms & Bodungen, v. 1997]. Über das Markerpigment-zu-Chlorophyll-*a* Verhältnis soll auch der Anteil der Algenklassen zum Gesamtchlorophyll-*a* Gehalt der Wasserprobe bestimmbar sein [Wilhelm et al. 1995, 1991]. Diese Aussage wird in Kapitel 11 ausführlich zur Diskussion stehen.

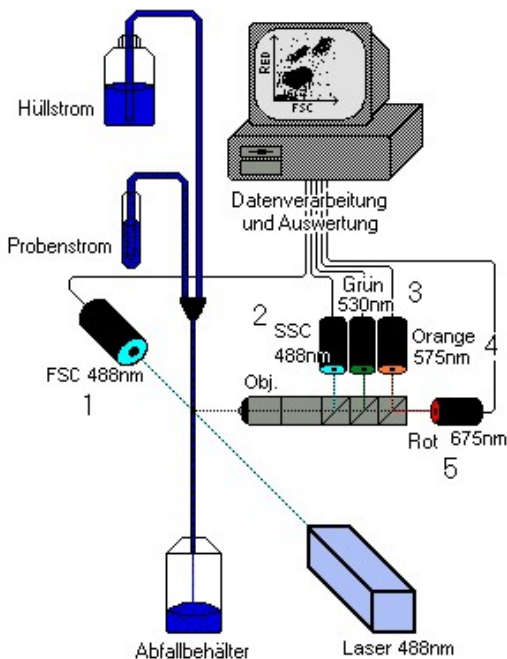
Eine neue Methode ist die Verwendung von Pigment-Fingerprints zur Identifikation der Algenklassen [Zapata et al. 2000, Mackey et al. 1996, Wright et al. 1996].

### 4.3. Das Flowzytometer

Seit etwa 10 Jahren wird die Flowzytometrie für die Analyse von Phytoplankton eingesetzt. Das Messsystem wurde in der Medizintechnik für die Blutzellenzählung entwickelt. Es fand seinen Weg in die Planktonuntersuchung durch die Suche nach einer neuen Methode, die Phytoplanktonzusammensetzung von Wasserproben zu untersuchen, ohne die zeitaufwendige Zellzählung nach der „Utermöhl“-Methode durchführen zu müssen.

**Abbildung 4.3-1: Schema der Flowzytometermessung**

Die im Flüssigkeitsstrahl befindlichen Algen werden mit einem Laser angeregt und die Emission bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Nach Reckermann [2000].



Das Messprinzip des Flowzytometers (FCM) basiert auf einem hydrodynamischen Trick. Durch eine Umhüllungsflüssigkeit kann das Probenwasser zu einem sehr dünnen Strahl verengt werden. Die Algen werden in der Messstrecke wie Perlen an einer Schnur aufgereiht, ohne dass die Gefahr einer dauerhaften Verstopfung besteht, denn der Strahl kann wieder aufgeweitet werden.

Die Algen werden von einem Laser mit einer



Wellenlänge von 488 nm angeregt. Verschiedene Detektoren messen gleichzeitig das Streulicht (FSC und SSC: forward und side scatter) sowie die Fluoreszenzemissionen bei 530 (Grün), 575 (Orange) und 675 (Rot) nm. Die Detektierung von mehreren Emissionswellenlängen erlaubt es, die Partikel der Wasserprobe verschiedenen Algengruppen zuzuordnen.

Die Daten werden von einem Computer aufgezeichnet und lassen sich in Graphen einander gegenüberstellen. In den verschiedenen Darstellungen lassen sich Partikel mit gleichen Eigenschaften in Gruppen zusammenfassen, welche mit bestimmten Algenklassen in Beziehung gebracht werden können (Beispiele in Kap. 7 & Kap. 11). Die Graphen besitzen Achsen mit logarithmischer Teilung über 3-4 Dekaden (je nach Gerät).

**Abbildung 4.3-2: Ein Flowzytometer Arbeitsplatz**

Ein Becton Dickinson FacsVantage Flowzytometer für die Analyse von Wasserproben



Die einzelnen Algenarten können nicht identifiziert werden, doch dafür ist die Messung der Zellzahlen im Vergleich zur Mikroskopzählung wesentlich schneller und genauer.

Das Gerät aber ist sehr teuer und benötigt zur Bedienung des Instrumentes geschultes Personal. Die Limitierung auf 3 - 4 Dekaden in der graphischen Darstellung unterschätzt in der normalen Routine der Messung das Picoplankton. Eine Darstellung über 7 Dekaden ist für natürliche Wasserproben notwendig, und so sind häufig zwei Durchläufe für die Messung notwendig. Dies verdoppelt entsprechend die Messzeit für eine Probe.

Der Anteil von Phytoplankton als Partikel in einer Nordseewasserprobe neben dem Sediment und den Bakterien (die ja auch Partikel sind) ist gerade im Gebiet des Wattenmeeres sehr gering (vgl. Tab. 7.3-1). Entsprechend müssen viele fluoreszierende Partikel vermessen werden.

Für die Kalibrierung des Messsystems werden der Probe kleine fluoreszierende Partikel

(sogenannte Fluoreszenz- oder Standardbeads) zugesetzt. Sie dienen der Kontrolle der Ergebnisse. Durch die Verwendung der Beads aber verringert sich die zur Verfügung stehende Fläche in der 2-dimensionalen Darstellung der Messergebnisse und ist für die Erkennung von Algen verloren.

Die Messung an sich ist mit etwa einer halben Stunde pro Durchlauf schnell. Die Flussrate (Anzahl an detektierten Partikeln pro Sekunde) bestimmt die Geschwindigkeit der Zählung und somit die Messdauer. Eine beliebige Steigerung der Flussrate ist durch die Totzeiten des Detektors nach einer Detektierung nicht möglich. Das Maximum der Zählung liegt bei etwa 500 fluoreszierenden Partikeln pro Sekunde.

### 4.4. Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Die Bestimmung des Chlorophyll-*a* Gehaltes von Wasserproben durch eine Absorptionsmessung wurde 1966 in dem UNESCO Monograph „Determination of photosynthetic pigments in seawater“ [1966] als Standardmethode vorgestellt. Viele Versuche der Nutzung der Absorption [Jeffrey & Humphrey 1975] oder der Messung der Fluoreszenzanregung zur Bestimmung des Chl.a-Gehaltes von Proben wurden unternommen. Doch für diese Messungen muss das Plankton abfiltriert und die auf dem Filter verbleibenden Rückstände dann in Lösung gebracht werden. Auf der einen Seite kostet dieses Verfahren Zeit, auf der anderen Seite ist es für Feldversuche zu kompliziert.

Um die Filtrierung zu umgehen, wurde auch versucht, an unbehandelten Wasserproben zu messen. Aber für die Messung der Absorption treten eine Reihe von Schwierigkeiten auf. So variiert z.B. der Absorptionskoeffizient des Wassers bei Änderungen der Temperatur, des Salzgehaltes u.s.w und beeinflusst damit das Ergebnis der Messung [Lutz et al. 1996]. Die Partikel in der Wasserprobe (Phytoplankton und Detritus) rufen eine Streuung des Lichtes hervor. Das gestreute Licht geht für die Messung der Absorption bei einer normalen Versuchsanordnung verloren und erhöht damit die vermeintliche Absorption der Probe. Durch die Verwendung einer „Ulbrich“-Kugel lässt sich der Verlust an Licht durch Streuung und somit der Fehler für die Absorptionsmessung minimieren.

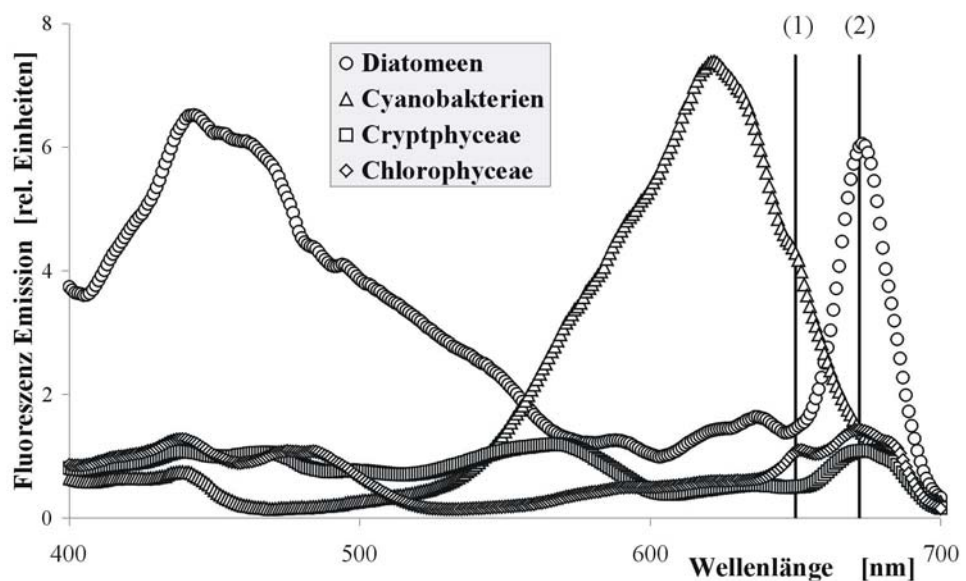
Doch es hat sich gezeigt, dass für die meisten Felduntersuchungen die Auflösung der Absorptionsmessung bislang zu gering ist. Eine Vorbehandlung durch die Aufkonzentrierung der Probe mittels einer Zentrifuge ist noch möglich, erhöht aber die Fehler der Messung und

ist für den unmittelbaren Feldeinsatz ebenfalls zu kompliziert und aufwendig. Um all diesen Problemen von vornherein aus dem Wege zu gehen, wurde ein anderer Weg beschritten.

Anstelle der Absorptionsspektren wurden Chlorophyll-Fluoreszenzspektren von Wasserproben zur Bestimmung des Chlorophyll-*a* Gehaltes der Wasserprobe analysiert.

#### Abbildung 4.4-1: Vergleich der normierten Anregungsspektren für 4 Algenklassen

Von den Kulturen der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*, des Cyanobakterium *Synechocystis spec. 6803*, der Cryptophyceae *Pyrenomonas helgolandii* und der Chlorophyceae *Dunaliella salina* wurden die Anregungsspektren mit einem Spektrofluorophotometer (RF5001PC von Shimadzu) für eine Emissionswellenlänge von  $720 \pm 5$  nm aufgenommen und anschließend auf  $100 \mu\text{g Chl.}a$  pro Liter normiert.



Die Spektrenform für die vier Algenarten ist deutlich unterscheidbar. Die Pigmentzusammensetzung der Antennenkomplexe des Photosyntheseapparates bedingt den Verlauf (Kap. 3.2) der Kurven. Bei der näheren Betrachtung der Algenspektren (Abbildung 4.1-1) wird deutlich, dass für bestimmte Wellenlängenbereiche die Unterscheidbarkeit signifikant ist.

Eine qualitative Untersuchung über *in vivo* gemessene Fluoreszenzspektren von 30 Algenarten wurde schon 1989 durchgeführt [Hilton et al. 1989]. In dieser Arbeit ging es um die Evaluierung der Wellenlängenbereiche der Fluoreszenzspektren, die für eine Identifizierung von Algen repräsentativ sind.

Als Ergebnis ergaben sich drei repräsentative Wellenlängenbereiche. Unter der Verwendung der Bereiche von 435 – 460 nm, 360 – 390 nm und 510 – 580 nm ist die größte Anzahl von Klassen unterscheidbar. Bereiche, die sich hingegen zwischen den Algenklassen nicht signifikant unterscheiden, enthalten nur redundante Informationen und sollten für die mathematische Analyse nicht mit betrachtet werden. Deutlich wurde auch die spektrale Ähnlichkeit einiger Algenklassen.

Durch die Untersuchung der Absorptionsspektren von 24 marinen Algenspezies wurde nachgewiesen, dass die Analyse eines gesamten Spektrums zur Erkennung einzelner Algenarten nicht notwendig ist. Eine Reduktion auf 3 – 5 diskrete Anregungswellenlängen reicht für eine recht gute Klassifizierung von Algengruppen aus [Johnson et al. 1994]. Dabei wurden vier Hauptgruppen klar unterschieden: Das Vorkommen von Chl.b bei Prasino-, Eugleno- und Chlorophyceae, Chl.c<sub>1</sub> und/oder c<sub>2</sub> bei Bacillario-, Dino-, Hapto-, Chryso-, Raphido-, Cryptophyceae, Chl.c<sub>3</sub> bei (toxischen) Hapto- und Dinophyceae und Phycobiliproteine bei Cyanobakterien. Bei der Verwendung der diskreten Wellenlängen von 481, 535 und 649 nm wurden 60 % der Algen bei Johnson et al. [1994] richtig identifiziert.

Die für diese Untersuchung verwendeten Algen wuchsen unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen heran. Wurde die Klassifizierung auf die adaptiven Vorbedingungen bezogen, also eine Unterscheidung der Klassifizierung für die unter Stark- und Schwachlicht aufgezogenen Algen, so konnten sogar 93 % der Arten richtig identifiziert werden. Unter der Verwendung zweier weiterer Wellenlängen von 586 und 628 nm, konnte die Zuordnung auf 86 % bzw. bei einer Berücksichtigung der Vorbedingungen auf 99 % verbessert werden. Bei der Wellenlänge von 586 nm befindet sich das Absorptionsmaxima des Chl.c<sub>3</sub> und bei 628 ein Absorptionspeak, der mit dem Chl.c<sub>1</sub> und Chl.c<sub>2</sub> in Verbindung gebracht wird [Johnson & Sakshaug 1996, Johnson et al. 1994].

### 4.5. Fluorometer

Für die Konstruktion von Fluorometern bringen die Erkenntnisse der Untersuchungen von Absorptions- und Fluoreszenzspektren erhebliche Vereinfachungen mit sich. Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz von nur wenigen diskreten Anregungswellenlängen lässt sich unproblematisch durch Lumineszenzdiode (LED) erreichen. Diese sind klein, robust, erzeugen

wenig Wärme und verbrauchen wenig Strom. Seit einigen Jahren gibt es LED's für den gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (Übersicht über die Emissionsspektren der erhältlichen LED's im Anhang B). Die Probe wird mit einer bestimmten Wellenlänge (oder eines Wellenlängenbereiches) des sichtbaren Lichtes beleuchtet und die Chlorophyll-Fluoreszenz des Photosystems II Komplexes im Bereich von 685 – 720 nm gemessen.

Für die Messung der Fluoreszenz für „niedrige“ Algenkonzentrationen spielt die Änderung des Absorptionskoeffizienten des Wassers im Vergleich zur Absorptionsmessung eine geringe Rolle, ebenso wie die Streuung an den Partikeln der Probe.

Für diese Messung sind aber Effekte, z. B. durch den „spill-over“ zwischen PS I und PS II und das „self-shading“, in Betracht zu ziehen. Beim „spill-over“ handelt es sich um einen Effekt, der von der Energieverteilung zwischen dem PS I und PS II beeinflusst wird. Das „self-shading“ ist ein Beschatten der Algenzellen durch sich selbst oder durch andere Algen in der Wasserprobe [Grzyski et al. 1997]. Das Beschatten nimmt mit der Konzentration der Algen zu und reduziert die Fluoreszenz.

Für *in situ* Messungen ist die Fluoreszenzmessung heutzutage in der Anwendung. Sie ist wesentlich schneller als alle anderen Standardmethoden und benötigt selbst bei geringen Konzentrationen keine Aufbereitung der Proben. Außerdem kann durch eine geeignete Messprozedur die photosynthetische Aktivität ermittelt werden [Hintze 2000, Hintze et al. 1999, Moldaenke et al. 1995, Schreiber 1994, Genty et al. 1989]. Sie ist ein Maß für die „Fitness“ der Algen, d.h. für die Fähigkeit, das anregende Licht zur Photosynthese zu nutzen.

Für den Feldeinsatz stehen je nach Anwendungsanforderungen seitens der Industrie Tauchsonden (für Vertikalprofile), Küvettenfluorometer (Proben werden in einer 1 x 1 cm oder 2,5 x 2,5 cm Küvette vermessen) und Online-Geräte (selbstständiges Einpumpen der Probe in eine Messkammer) zur Verfügung.

Ein prinzipielles Problem bei der Verwendung dieser Fluorometer ist die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz bei nur einer Anregungsfarbe.

Aufgrund der unterschiedlichen Pigmentzusammensetzung der Antennen des PS II weisen die Algenklassen (Kap. 3.1) unterschiedliche Spektren auf. Dieses gilt für die Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren (Kap. 11). Für eine Messung des Chlorophyll-*a* Gehaltes einer Probe stellt sich nun die grundsätzliche Frage, auf welche Algen das Fluorometer

## Kapitel 4

geeicht werden soll. Ist der Mittelwert einer Mischung aus verschiedenen Algenklassen richtiger als die Festlegung auf eine bestimmte Art?

Für reine Kulturen einer einzelnen Art im Labor ist die Entscheidung einfach. Für das Freiland muss aber immer ein Kompromiss gefunden werden. Diese Problematik wird in der Abbildung 4.4-1 deutlich. Die Anregungsspektren für die dort dargestellten vier Algenklassen unterscheiden sich deutlich voneinander. Wird die Eichung eines Fluorometer nun anhand einer Diatomeen-Spezies vorgenommen, z. B. für eine Anregung mit einer Wellenlänge von 650 nm (Linie (1) in Abbildung 4.4-1) oder bezüglich des Maximums der Emission für Chlorophyll-*a*, so werden im ersten Fall die Cyanobakterien stark überschätzt, alle anderen aber unterschätzt. Für die zweite Linie (Linie (2) in Abbildung 4.1-1) werden alle anderen Klassen stark unterschätzt.

Für den Einsatz dieser Ein-Farben-Fluorometer im Feldeinsatz muss ohne das Wissen über die genaue Zusammensetzung des Phytoplanktons mit Fehlbestimmungen gerechnet werden. Um den unterschiedlichen Formen der Spektren bei der Chlorophyll-*a* Bestimmung Rechnung zu tragen, ist eine Anregung der Fluoreszenz mit nur einer Farbe (sei sie auch weiß) meistens nicht ausreichend.

## 5. Der Algae Online Analyser

Der im Rahmen der BlueBox eingesetzte Sensor zur Erfassung der biologischen Parameter ist der Algae Online Analyser (AOA).

### 5.1. Die Entscheidung für das Fluorometer

Zum Zeitpunkt des Projektstarts standen für die Anschaffung des Fluoreszenzensors zwei Firmen (Walz, Effeltrich und bbe Moldaenke, Kiel) mit ihren Geräten zur Auswahl. Diese Firmen boten Küvettenfluorometer mit einer Algengruppenerkennung an. Im Rahmen des BlueBox Projektes wird jedoch ein Messsystem benötigt, das online betrieben werden kann und über die nötige Auflösung zur Erfassung der Chlorophyll-*a* Konzentration verfügt. Ein solcher Fluoreszenzsensor wurde zu Beginn des Jahres 1998 von beiden Firmen nicht angeboten.

Geräte von beiden Firmen werden für die Forschung an Algen schon seit einigen Jahren im Institut verwendet. Die Erfahrung mit diesen Geräten als auch die Gespräche mit den beiden Firmen brachten die Entscheidung zugunsten eines Gerätes von der Firma bbe Moldaenke.

**Abbildung 5.1-1: Der Algae Online Analyser (AOA)**



Die Elektronik des Fluorometers ist in einem IP54 Gehäuse untergebracht. An der Frontseite befinden sich die Messkammer, die Schlauchpumpe zur Probennahme und die Magnetventile. Unten links ist das Display zur Anzeige der Messwerte zu sehen.

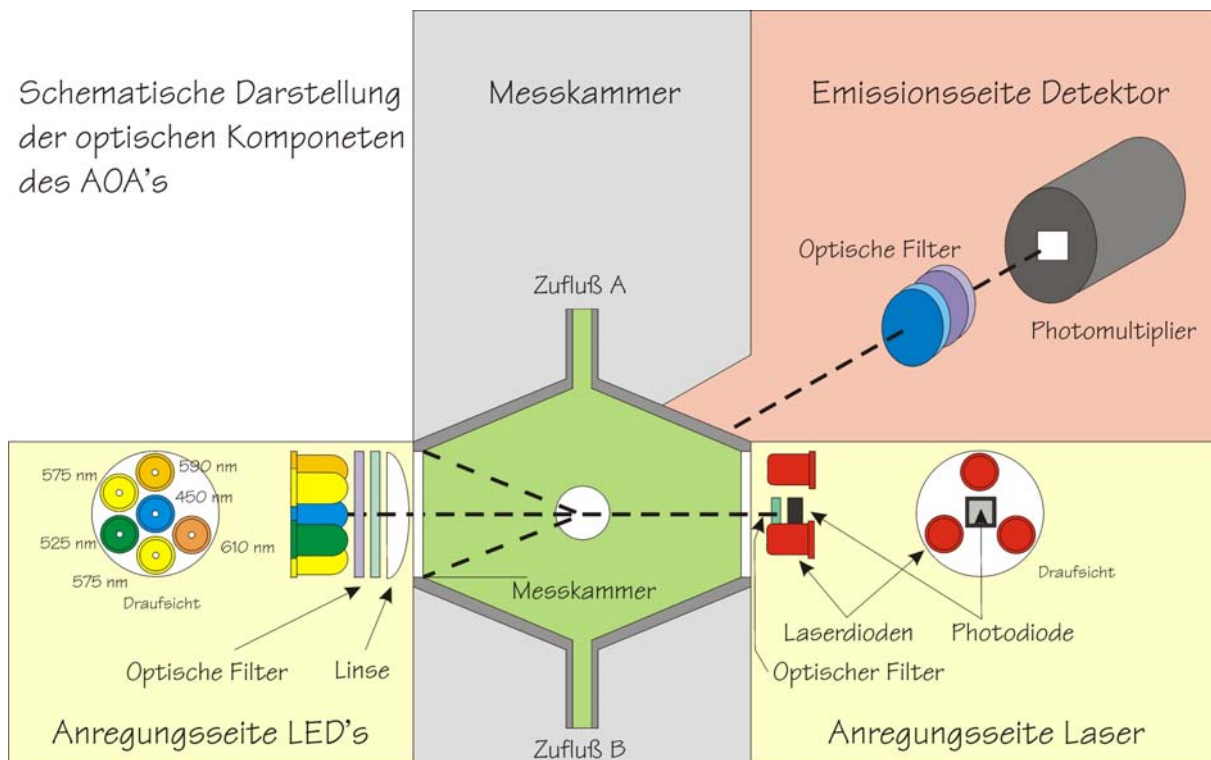
Das Gerät ist Mikrokontroller gesteuert und speichert intern bis zu 1000 Datensätze. Die Proben werden mittels der Schlauchpumpe in die Messkammer gepumpt oder im Durchflussbetrieb über eine Magnetventilsteuerung zugeführt.

## 5.2. Die optischen Komponenten des AOA's

Die optischen Komponenten des AOA's lassen sich in vier Bereiche aufteilen. Die nachfolgende schematische Darstellung zeigt deren Anordnung:

**Abbildung 5.2-1: Skizze der optischen Komponenten des AOA's und deren Anordnung**

Die optischen Komponenten des AOA's lassen sich in die vier markierten Bereiche unterteilen. Die „Anregungsseite LED's“ und die „Anregungsseite Laser“ liegen auf einer Achse, die „Emissionsseite Detektor“ befindet sich in einem Winkel von 90° dazu.



Die Messung des AOA's zur Algengruppendifferenzierung basiert auf den spektralen Unterschieden des Antennenapparates von Algen verschiedener Klassen (Kap. 5.5-1). Für die Differenzierung der Algen in vier verschiedene spektrale Gruppen genügen fünf diskrete Anregungswellenlängen und die Detektierung der jeweiligen resultierenden Chl.a-Fluoreszenz.

Die bei der Messung an einer Algenprobe durch den AOA aufgenommenen Parameter sind die Transmission, die Chl.a-Fluoreszenz ( $f$ ), die minimale Fluoreszenz ( $f_0$ ) und die maximale Fluoreszenz ( $f_M$ ). Diese Messungen werden in den nachfolgenden Unterkapiteln beschrieben.



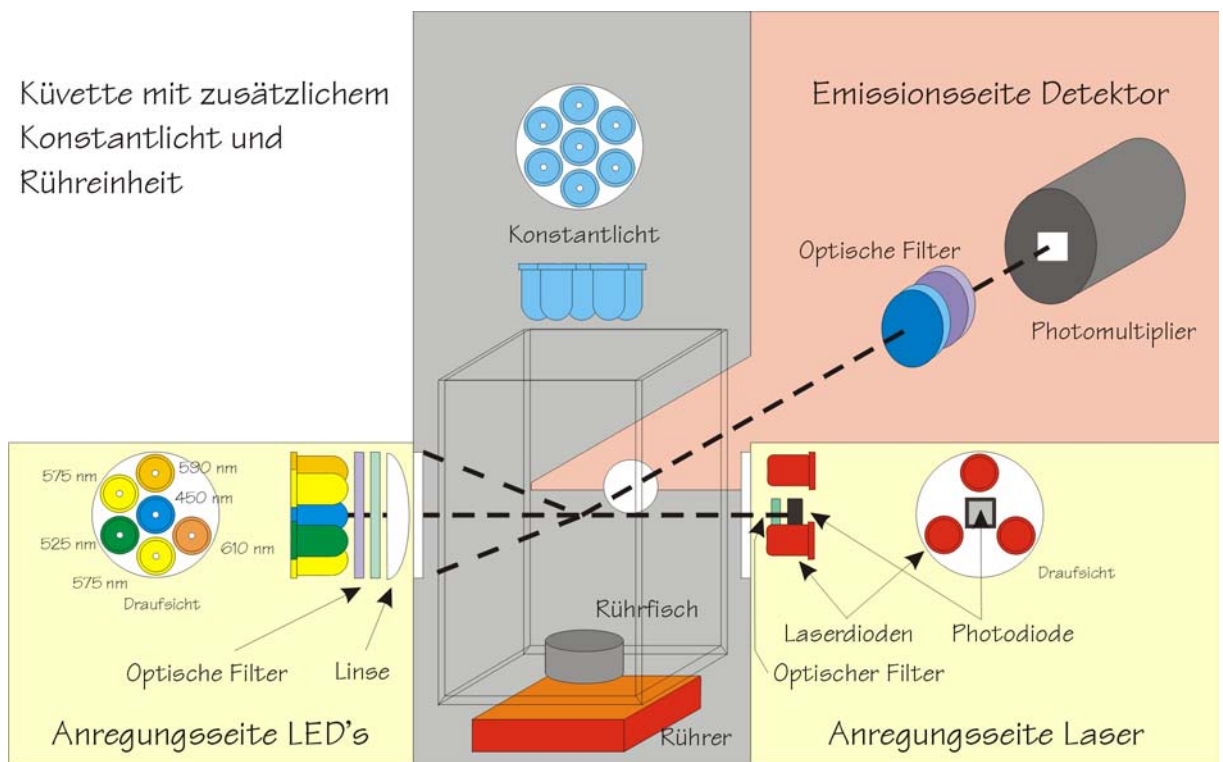
Die fünf Anregungsfarben des AOA's werden durch Lumineszenzdioden erzeugt. Die Maxima der Wellenlängen der LED's liegen bei 450, 525, 575, 590 und 610 nm (vgl. Anhang D).

Die LED's sind kreisförmig angeordnet und werden durch eine Linse auf einen Punkt in der Mitte der Messkammer fokussiert (Abbildung 5.2-1: Anregungsseite LED's). Die LED mit der Wellenlänge von 575 nm (575er LED) hat die schwächste Lichtintensität und ist deshalb doppelt vorhanden. Optische Filter blocken alle Wellenlängen größer als 650 nm ab.

Für die Laboruntersuchungen wurde ein Küvettenhalter konstruiert, der die Messkammer ersetzt. Denn für die Untersuchung an Monokulturen verschiedener Algenklassen erwies sich die Messkammer als nicht besonders geeignet. Die Reinigung der Messkammer und die der Silikonschläuche stellt sich als extrem aufwendig und zeitraubend heraus.

**Abbildung 5.2-2: Küvettenhalterung für Laborversuche**

Die Algenproben können gerührt werden um eine Sedimentation der Zellen zu verhindern. Durch ein Konstantlicht kann eine variable Lichtintensität zwischen 0 – 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in der Küvette eingestellt werden.



### 5.2.1. Die Messung der Chl.a-Fluoreszenz (f-Messung)

Um die Chl.a-Fluoreszenz für jede Anregungsfarbe zu messen, werden die LED's (Anregungsseite LED's) nacheinander getaktet (amplitudenmoduliertes Anregungslicht). Nur eine der LED's leuchtet zur Zeit, während alle weiteren dunkel bleiben (detaillierte Zeitabläufe bei Beutler 1998).

Die Erfassung der Fluoreszenz über den Photomultiplier (Emissionsseite Detektor) erfolgt durch eine Yildmessung [Hintze 2000, Sundberg et al. 1997, Falkowski & Kolber 1995, Ruser 1992]. Diese Korrelationsmethode verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Auflösung des Gerätes.

### 5.2.2. Die Messung der minimalen Fluoreszenz ( $f_0$ -Messung)

Für die Bestimmung der photosynthetischen Aktivität [Kap. 5.8] ist die Messung der minimalen Fluoreszenz notwendig. Die Lichtintensität des Messlichtes ist gegenüber der f-Messung um ein Vielfaches geringer. Das Verhältnis der Intensität der f- zur  $f_0$ -Messung ist zwischen 1 bis 1000 ( $f/f_0$ -Teiler, einstellbarer Parameter des AOA's) frei wählbar.

Es ist durch die Wahl des  $f/f_0$ -Teilers sicherzustellen, dass die Intensität der  $f_0$ -Messung so gering ist, dass keine aktinische Wirkung auf die Photosynthese erzielt wird. Ziel der Messung ist die Erfassung der Fluoreszenz, wenn alle Reaktionszentren offen sind ( $k_{pH}=\text{maximal}$ ) [Hintze 2000, van Kooten & Snel 1990].

### 5.2.3. Die Messung der maximalen Fluoreszenz ( $f_M$ -Messung)

Auf der gegenüberliegenden Seite der Anregungsseite der LED's liegt die „Anregungsseite Laser“. Auf dieser Seite befinden sich die Laserdioden, mit denen das sättigende Licht zur Messung der maximalen Fluoreszenz ( $f_M$ ) erzeugt wird. Durch das sättigende Licht werden alle Reaktionszentren geschlossen ( $k_{pH}=0$ ), die Chl.a-Fluoreszenz wird maximal.

### 5.2.4. Die Messung der Transmission

Die Photodiode zur Messung der Transmission befindet sich auf der „Anregungsseite Laser“ zwischen den Laserdioden. Sie misst das Licht der LED's, die ihr gegenüberliegen. Es wird die Transmission für jede LED gemessen.

Nur die LED in der Mitte der „Anregungsseite LED's“ (450er LED in Abbildung 5.2-1) liegt der Photodiode direkt gegenüber. Durch die Fokussierung des LED-Messlichtes mittels Linse auf die Mitte der Messkammer liegen alle weiteren LED's (außer der 450er) nicht auf einer optischen Achse mit der Photodiode. Es wird nur ein Anteil des Streulichtes gemessen, der stark von der Reflexion an Partikeln abhängt.

Ein Vergleich mit der Transmissionsmessung einer CTD-Sonde (ECO144, ME Trappenkamp, kurz: CTD) zeigt eine Übereinstimmung mit der Transmissionsmessung des AOA's in bezug auf die 450er LED. Für alle weiteren LED'S aber zeigt sich kein linearer Zusammenhang zu der gemessenen CTD-Transmission.

### 5.3. Die Parameter und die Messabfolge des AOA's

Der AOA führt an einer Wasserprobe unterschiedliche Messroutinen durch. Zu diesen zählt die Messung der minimalen Fluoreszenz ( $f_0$ ), der maximalen Fluoreszenz ( $f_M$ ), der Transmission (Trans) und der variablen Fluoreszenz ( $f$ ).

**Tabelle 5.3-1: Beispiel einer Parametereinstellung des AOA's**

Parameter	f	$f_0$	$f_M$	Trans.	Probe
	[s]	[s]	[ms]	[s]	einpumpen
Dunkelphase		60			[s]
Adaptation	30	60			30
Messung	60	60	2000	10	auspumpen
Integrationszeit			200		[s]
$f_0$ / f-Teiler		1 / 100			5

Der Ablauf der Messroutinen mit der gewählten Parametereinstellung verläuft folgendermaßen:

- Nach einer 60 Sekunden langen Dunkelphase wird die Wasserprobe für 60 Sekunden an das Licht zur Messung der minimalen Fluoreszenz adaptiert.

Die Dunkelphase vor der Messung dient der Dunkeladaptation der Algenzellen.

- Die minimale Fluoreszenz wird für 60 s gemessen.

Die geringe Messlichtintensität ohne eine aktinische Wirkung auf die Photosynthese der Algen wird durch ein variabel einstellbares Tastverhältnis ( $f_0$ /f-Teiler) gewährleistet (vgl. Tabelle 5.3-1). Die mittlere

## Kapitel 5

Lichtintensität für die  $f_0$ -Messung beträgt dadurch nur 1 Hundertstel der (normalen) Fluoreszenzmessung.

- Nach der Durchführung der  $f_0$ -Messung wird die maximale Fluoreszenz ( $f_M$ ) gemessen.

Durch Laserdioden wird ein den Photosyntheseapparat sättigendes Licht erzeugt. Das Maximum der Fluoreszenz wird ermittelt. Über die Messung der Parameter  $f_0$  und  $f_M$  lässt sich die photosynthetische Aktivität bestimmen.

- Anschließend wird das Phytoplankton an das Licht zur Messung der variablen Fluoreszenz ( $f$ ) für 30 s adaptiert.

Durch die Vorbeleuchtung der Probe mit dem Messlicht wird die Photosyntheseleistung der Algen auf diese Lichtintensität für die nachfolgende Messung der variablen Fluoreszenz eingestellt.

- Die Messprozedur wird durch die Messung (60 s) der variablen Fluoreszenz abgeschlossen.

Die Messdaten der variablen Fluoreszenz für die verschiedenen diskreten Anregungsfarben machen eine Algendifferenzierung und eine Bestimmung des Chlorophyll-*a* Gehaltes möglich [Beutler et al. 2001, Ruser et al. 1999, Kolbowski & Schreiber 1995].

- Als letztes wird die Transmission, sowie die Temperatur und die Lichtintensität der LED's (Anregungsseite LED's , Abbildung 5.2-1) gemessen.

Die Temperatur der LED's dient ausschließlich zur internen Kontrolle. Die Messung der Fluoreszenz wird durch das Verhältnis der aktuellen Lichtintensität zu einem festgelegten Referenzwert korrigiert.

Alle diese Parameter für den Messablauf sind frei wählbar und können je nach Bedarf geändert werden. Die optimalen Einstellungen für die Messung an Seewasserproben werden sich im Laufe der online-Messungen herauskristallisieren.

## 5.4. Die Grundlage der fluorometrischen Algengruppenerkennung

Die fluorometrische Algengruppenerkennung basiert auf den Unterschieden der Pigmentzusammensetzung der Antennensysteme des photosynthetischen Apparates der Algenklassen. Je nach dem Vorkommen der Pigmente und dem Pigment-zu-Chl.a-Verhältnis für eine Algenklasse verändert sich die Form der Anregungsspektren der Chl.a-Fluoreszenz.

Die Anregungsspektren von marinen Algenarten aus verschiedenen Algenklassen werden für die späteren Untersuchungen ermittelt. Die Algenspezies aus unterschiedlichen Algenklassen stammen entweder aus der hauseigenen Sammlung oder der Algensammlung der Göttinger Universität (SAG). Im Anhang B ist eine Übersicht über die Algen wiedergegeben, deren Zucht in künstlichem Salzwasser (KSW 2, Anhang A) mit unterschiedlichem Erfolg durchgeführt wurde.

### 5.4.1. Zucht der Algenspezies

Laborflaschen (400 ml Schott) mit Medium (KSW 2) werden mit den 46 Algenspezies aus Anhang B angeimpft. Bei einem 12 Stunden Hell-Dunkelzyklus (Hellzyklus, Lichtintensität:  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und einer Temperatur von  $18^\circ \text{C}$  wuchsen die Algen in 14 Tagen auf die nötigen Konzentrationen für eine Untersuchung heran. Von den angesetzten 46 Kulturen erwiesen sich die folgenden 23 Algenspezies als geeignet. Viele der Spezies vertrugen die Anzucht bei einer Salinität von 30 ‰ nicht oder die Kultur wies eine „Verseuchung“ durch eine Fremdspezies auf.

**Tabelle 5.4-1: Marine Algenspezies**

In KSW 2 aufgezogene Kulturen, die für die Untersuchung geeignet waren.

<b>Haptophyceae</b>	<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanophyceae</b>
<i>Isochrysis spec.</i>	<i>Dunaliella primolecta</i>	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>
<i>Prymnesium parvum</i>	<i>Dunaliella salina</i>	
	<i>Chlamydomonas parkeae</i>	<b>Cryptophyceae</b>
		<i>Pyrenomonas helgolandii</i>
<b>Diatomeen</b>	<b>Prasinophyceae</b>	
<i>Cyclotella cryptica</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	<b>Dinoflagellaten</b>
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	<i>Pyranimonas amyliifera</i>	<i>Amphidinium carterae</i>
<i>Thalassiosira punctigera</i>	<i>Tetraselmis chui</i>	<i>Amphidinium höferli</i>
<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Tetraselmis striata</i>	<i>Prorocentrum cassubicum</i>
<i>Pheaodactylum tricorntutum</i>	<i>Pseudocourfieldia marina</i>	<i>Prorocentrum micans</i>
<i>Thalassiosira weissflogii</i>		<i>Scrippstella trochoidum</i>

Von den Cyanobakterien (4 Spezies angesetzt) und der Klasse der Cryptophyceae (3 Spezies angesetzt) stand zur Aufnahme der Spektren nur je eine Spezies zur Verfügung.

#### 5.4.2. Die Anregungsspektren von marinen Algenarten

Von Algenspezies aus verschiedenen Algenklassen werden die Fluoreszenzanregungsspektren gemessen. Die Parametereinstellungen für das verwendete Spektrofluorophotometer RF5001PC (Shimadzu) für die Messungen an den Algenkulturen wurden wie folgt gewählt:

**Tabelle 5.4-2: Parametereinstellung des RF5001PC:**

Anregungswellenlängen	380 – 700 nm
Emissionswellenlänge	720 nm
Spaltbreite der Anregungsseite (ex-slit)	3 nm
Spaltbreite der Emissionsseite (em-slit)	± 20 nm
Sensitivity	high
Resolution	1 nm
Response (Tiefpass)	0,02 s
PM Gain	fixed
Zusätzliche optische Filter	auf der Emissionsseite ein RG9 (1 mm, Schott)

Für jede Kultur wird das Anregungsspektrum für einen Wellenlängenbereich von 380 – 700 nm bei einer Schrittweite von 1 nm und einer Spaltbreite der Anregungswellenlänge von 3 nm aufgenommen. Die Emission der Chl.a-Fluoreszenz wird bei der Wellenlänge  $720 \pm 20$  nm gemessen.

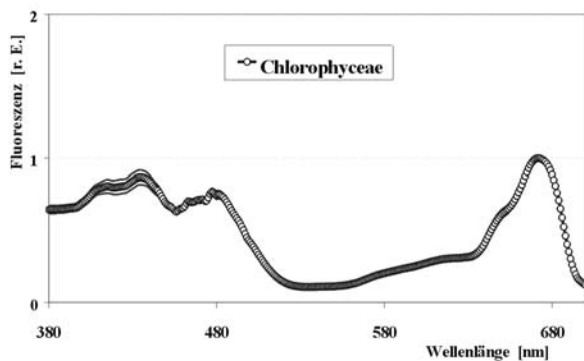
Jede Kultur wird dreimal vermessen und die Messdaten bezüglich der Intensität des Anregungslichtes korrigiert. Anschließend erfolgt eine Normierung der Spektren der Algenspezies auf den Mittelwert der Fluoreszenzemission für den Wellenlängenbereich von 667 – 677 nm (Chl.a Peak). Die Spektren aller Algenarten einer Algenklasse (nach Tabelle 5.4-1) werden gemittelt und die Standardabweichung berechnet (Abbildung 5.4-1 bis 7).

Die geringen Standardabweichungen der gemittelten Spektren der Klasse der Diatomeen, der Chlorophyceae und der Dinoflagellaten zeigen die sehr vergleichbaren Spektrenformen der einzelnen Spezies einer Klasse auf.

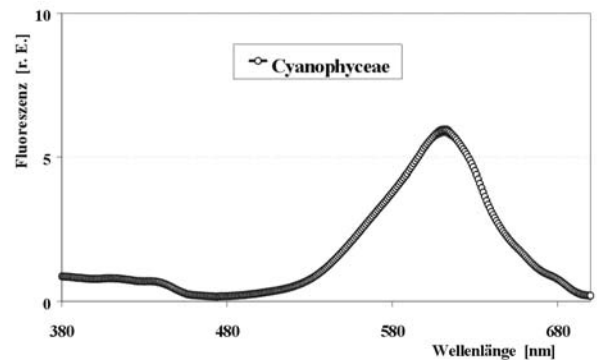
Die aus den Spezies gemittelten Spektren der Algenklassen bilden die Grundlagen für eine Einteilung in verschiedene spektrale Algengruppen. Die unterschiedliche Form der Algengruppenspektren ermöglicht die Erkennung der Zugehörigkeit zu einer Gruppe.

Die Anregungsspektren der Algenklassen:

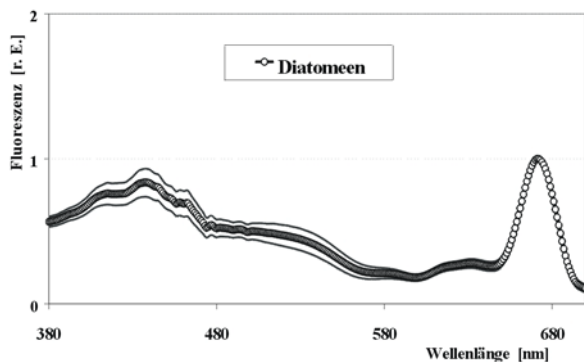
**Abbildung 5.4-1: Spektrum der Chlorophyceae**



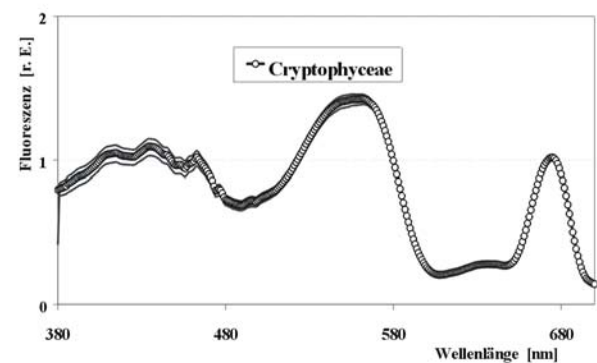
**Abbildung 5.4-2: Spektrum der Cyanophyceae**



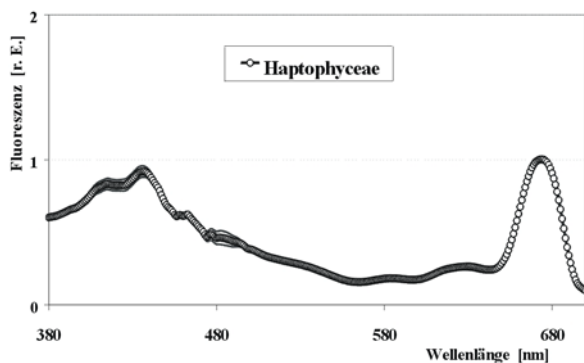
**Abbildung 5.4-3: Spektrum der Diatomeen**



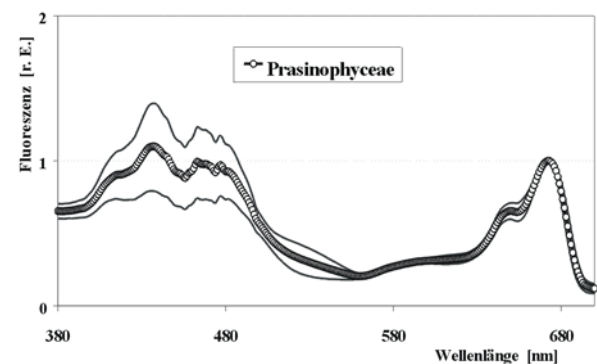
**Abbildung 5.4-4: Spektrum der Cryptophyceae**



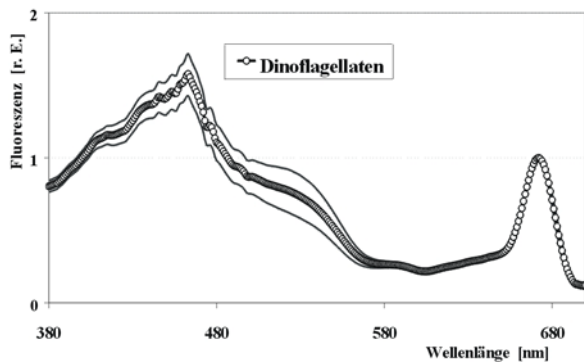
**Abbildung 5.4-5: Spektrum der Haptophyceae**



**Abbildung 5.4-6: Spektrum der Prasinophyceae**



**Abbildung 5.4-7: Spektrum der Dinoflagellaten**



Die Anregungsspektren wurde bei einer Emissionswellenlänge von  $720 \pm 5$  nm aufgenommen und anschließend auf den Wellenlängenbereich von 667 – 677 nm normiert.

Die Fehlerbalken der gemittelten Spektren sind als dünne Linien dargestellt. In einigen Fällen ist die Abweichung so gering, dass sie von den gemittelten Spektren überdeckt sind.

## 5.5. Der Workshop „PriPro98“

Auf dem 2. Workshop „Primärproduktionsbestimmungen in aquatischen Systemen“ in Büsum am FTZ-Westküste vom 5. – 8.10.1998 wurden in mehreren Arbeitsgruppen verschiedene Problematiken dieses Themas aufgegriffen, untersucht und intensiv diskutiert.

Auf dem Workshop wurde der erste Vergleich von Messgeräten zur fluorometrischen Algengruppenerkennung durchgeführt, die erst seit einer sehr kurzen Zeit kommerziell angeboten wurden. Es wurden das PhytoPAM von Walz (Effeltrich), der Algae Online Analyser (AOA) von bbe Moldaenke (Kiel), ein Durchflusszytometer von Beckton & Dickinson und eine nasschemische Methode, die HPLC-Analyse, anhand von mehreren Algenmischungen getestet.

Als Ausgangsalgenkulturen standen eine Diatomeenart, eine Alge aus der Klasse der Chlorophyceae und eine Cyanobakterienspezies zur Verfügung. Die benötigten Werte der Chlorophyll-*a* Konzentrationen der Ausgangsalgenkulturen für die Mischungen wurde über eine nasschemische Methode, die HPLC-Analyse, und zusätzlich über die Methoden von Jeffrey & Humphrey [1975] und Lorenzen [1967] ermittelt.

Die Ergebnisse wurden in der Berichtsreihe des FTZ-Westküste unter dem Titel „Comparison of different measurement systems based on the analysis of chlorophyll-fluorescence for algae-group detection and determination of the chlorophyll-*a* concentration“ veröffentlicht [Ruser et al. 1999].

### 5.5.1. Ergebnisse des PriPro98-Workshops

Zusammenfassend lässt sich zu der Untersuchung der fluorometrischen Algengruppenerkennung sagen, dass die Algengruppendifferenzierung für bekannte Spezies von allen Geräten qualitativ vergleichbare Ergebnisse ergab.

Aufgrund der sehr kurzen Zeit für die Versuchsdurchführung kann eine Güte der Ergebnisse nicht angegeben werden. Vermeidbare Fehlerquellen der Versuchsvorbereitung sowie der Messungen wurden bei der Auswertung offensichtlich. Der Vergleich der einzelnen Messsysteme gestaltete sich als äußerst schwierig, was sich in der Auswertung entsprechend niederschlägt. Doch gerade die Erkennung von Fehlerquellen war wichtig, um in



Zukunft bei Vergleichsmessungen die Vorbereitungen noch präziser durchzuführen.

Die qualitative Vergleichbarkeit der fluorometrischen Methoden mit der nasschemischen Analyse ließ auf eine gute Anwendbarkeit der Fluorometer bei Feldexperimenten hoffen. Diese zeichnen sich durch eine einfache Handhabung und eine kleine Größe aus. Sie sind z. B. im Vergleich zur HPLC-Analyse auch preislich sehr attraktiv.

Quantitativ ließen sich die Ergebnisse des PriPro-Workshops zur Algengruppenerkennung nicht einordnen [Ruser et al. 1999].

Im Verlauf der Untersuchungen dieser Arbeit zur Algengruppenerkennung an Wasserproben der Nordsee wird sich zeigen, dass für eine Verifizierung der Ergebnisse des AOA's eine quantitative Beurteilung der verschiedenen Messsysteme notwendig ist.

Eine an die Versuche vom PriPro98 angelehnte, erweiterte Untersuchung zur Algengruppenerkennung mit auf verschiedenen Messmethoden basierenden Messsystemen wird in Kapitel 11 beschrieben.

## 5.6. Die spektralen Fingerprints für die folgenden Untersuchungen

Nach den Ergebnissen für die aufgenommenen Fluoreszenzvollspektren der verschiedenen marinen Algenspezies in Kapitel 5.4.2 zeigt sich für die meisten gemittelten Anregungsspektren der Algenklassen (Mittelung über mehrere Arten) eine geringe Standardabweichung. Aus diesem Grund werden für die nachfolgenden Untersuchungen die Fingerprints einer einzelnen Algenart aus einer spektralen Algengruppe verwendet. Für die Fingerprints der grünen und der braunen spektralen Gruppen des AOA's werden die Messergebnisse für die Chlorophyceae und die Diatomee des PriPro-Workshops herangezogen. Die Cyanophyceae *Synechocystis spec.* des Workshops und die Cryptophyceae *Pyrenomonas helgolandii* wurden in Analogie zu den in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Bedingungen in KSW 1 (Anhang A) kultiviert und die Fingerprints ermittelt.

Im nächsten Kapitel sind diese vier Fingerprints in Tabelle Tabelle 5.7-1 wiedergegeben.

## 5.7. Theorie des Fitverfahrens zur Algengruppendifferenzierung

Die vier spektralen Algengruppen bilden die Basis für die Differenzierung von Algen und die Chlorophyll-*a* Bestimmung in Wasserproben. Charakterisiert sind die spektralen Gruppen durch das ihnen eigene diskrete Anregungsspektrum, den spektralen Fingerprint [Beutler 1998].

**Tabelle 5.7-1: Fingerprints der spektralen Algengruppen**

Fingerprints	LED1	LED2	LED3	LED4	LED5
Grüne spektrale Gruppe	2,982	1,408	0,382	1,682	1,356
Blaue spektrale Gruppe	1,760	2,192	3,979	17,747	15,084
Braune spektrale Gruppe	3,178	2,377	0,566	1,493	1,046
Gemischte spektrale Gruppe	2,187	2,075	1,071	1,858	0,769

Durch ein Curve-fitting Verfahren können aus der komplexen Fluoreszenzantwort einer Wasserprobe die Anteile von Einzelkomponenten in Form von Algengruppen berechnet werden.

Die gemessene Fluoreszenz einer Probe wird durch die Fingerprints der vier spektralen Algengruppen ausgedrückt. Dies führt zu einem inhomogenen linearen Gleichungssystem der Form:

**Gleichung 5.7-1: Gleichungssystem zur Algengruppenerkennung**

$$c_1 = a_1x_{11} + a_2x_{12} + \Lambda + a_4x_{14}$$

$$c_2 = a_1x_{21} + a_2x_{22} + \Lambda + a_4x_{24}$$

**M**

$$c_5 = a_1x_{51} + a_2x_{52} + \Lambda + a_4x_{54}$$

mit  $c_i$ : Intensität der Fluoreszenzemission der zu analysierenden Probe für die Anregung mit der  $i$ .ten LED

$x_{ij}$ : Fluoreszenzintensität der spektralen Algengruppe  $j$  für die Anregung mit der  $i$ .ten LED

$a_j$ : Chlorophyll-*a* Konzentration der spektralen Algengruppe  $j$

In der kürzeren Summenschreibweise:

$$c_i = \sum_{j=1}^4 a_j x_{ij}$$

mit  $i = 1 \dots 5$

Die Normkurven (Fingerprints) der Algengruppen aus Tabelle 5.7-1 sind auf den Chlorophyll-a Gehalt pro Liter normiert. Die gesuchten  $a_j$  geben deshalb direkt den Chl.a-Gehalt der Algengruppe wieder.

Wird die Streuung der Fingerprints bei der Lösung des Gleichungssystems berücksichtigt, so ergibt sich der folgende Lösungsansatz, der zu einer Gewichtung des Fehlers mit  $F_i$  führt (Willkomm 1987, Press 1989):

**Gleichung 5.7-2: Lösungsansatz unter Berücksichtigung der Streuung**

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^5 \frac{1}{\sigma_i^2} \left( c_i - \sum_{j=1}^4 a_j x_{ij} \right)^2$$

mit  $F_i$ : Messungenaugigkeit der Intensität der Fluoreszenzemission der Probe für die Anregung mit der i.ten LED

Unter der Voraussetzung der Konstanz der  $F_i$  wird die Funktion für  $P^2$  minimal, wenn die partiellen Ableitungen nach  $a_k$  gleich Null werden:

**Gleichung 5.7-3:**

$$0 = \frac{\partial \chi^2}{\partial a_k} = \frac{\partial}{\partial a_k} \left[ \sum_{i=1}^5 \frac{1}{\sigma_i^2} \left( c_i - \sum_{j=1}^4 a_j x_{ij} \right)^2 \right] = 2 \sum_{i=1}^5 \frac{1}{\sigma_i^2} \left( x_{ik} \left( \sum_{j=1}^4 a_j x_{ij} - c_i \right) \right)$$

$$= \sum_{j=1}^4 a_j \sum_{i=1}^5 \frac{x_{ik} x_{ij}}{\sigma_i^2} - \sum_{i=1}^5 \frac{x_{ik} c_i}{\sigma_i^2} \quad \text{mit } k = 1 \dots 4$$

Es werden die Vektoren  $\mathbf{a}$  und  $\mathbf{c}$ , sowie die Matrix  $\mathbf{A}$  folgendermaßen definiert:

$$\mathbf{a} = \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ a_4 \end{pmatrix} \quad \mathbf{A} = \begin{pmatrix} \frac{x_{11}}{\sigma_1} & \frac{x_{12}}{\sigma_1} & \Lambda & \frac{x_{14}}{\sigma_1} \\ \frac{x_{21}}{\sigma_2} & \frac{x_{22}}{\sigma_2} & & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} & & \mathbf{O} & \mathbf{M} \\ \frac{x_{51}}{\sigma_5} & \Lambda & \Lambda & \frac{x_{54}}{\sigma_5} \end{pmatrix} \quad \mathbf{c} = \begin{pmatrix} \frac{c_1}{\sigma_1} \\ \frac{c_2}{\sigma_2} \\ \mathbf{M} \\ \frac{c_5}{\sigma_5} \end{pmatrix}$$

## Kapitel 5

Für die Produkte  $A^T A$ ,  $(A^T A)\mathbf{a}$  und  $A^T \mathbf{c}$  gelten:

$$A^T A: z_{jk} = \sum_{i=1}^5 \frac{x_{ij}x_{ik}}{\sigma_i^2} \quad ; \quad (A^T A)\mathbf{a}: q_j = \sum_{k=1}^4 z_{jk}a_k = \sum_{k=1}^4 a_k \sum_{i=1}^5 \frac{x_{ij}x_{ki}}{\sigma_i^2} \quad ; \quad A^T \mathbf{c}: c_k = \sum_{i=1}^5 \frac{x_{ik}c_i}{\sigma_i^2}$$

Eingesetzt in Gleichung 5.7-3 ergibt sich nach dem Umstellen die als Gauß'sche Normalgleichung bekannte Form [Bronstein & Semendjajew 1985]:

**Gleichung 5.7-4:**

$$(A^T A)\mathbf{a} = A^T \mathbf{c}$$

Für die auftretenden Messungenauigkeiten der Normkurven der Algengruppen  $\mathbf{F}_i$  zeigte sich nach Beutler [1998] eine wellenlängenspezifische Abhängigkeit des  $\mathbf{F}_i$  für jede Algengruppe „i“. Mit einbezogen sein müsste danach im Lösungsansatz die Messungenauigkeiten  $\mathbf{F}_{ij}$  für jede Algengruppe „i“ in Abhängigkeit von der Wellenlänge der LED „j“. Bei der Bildung der partiellen Ableitung von  $\mathbf{P}^2$  führt dies zu einem nicht-linearen Fall. Nicht-lineare Lösungsmethoden, wie z. B. der Simplex-Algorithmus, wurden für eine online-Berechnung aufgrund der benötigten langen Rechenzeit verworfen.

Stattdessen wird ein Iterationsverfahren angewandt:

Im ersten Iterationsschritt lässt sich das Verfahren der Gewichtung des Fit's durch die Annahme vereinfachen, dass alle Algengruppen in der gleichen Konzentration vorliegen. Dann lässt sich  $\mathbf{F}_i$  ausdrücken als:

**Gleichung 5.7-5:**

$$\sigma_i^2 = \sum_{j=1}^4 \sigma_{ji}^2$$

Nun lässt sich die Gauß'sche Normalgleichung (Gleichung 5.7-4) lösen und die Konzentrationen der spektralen Algengruppen bestimmen. Mit den berechneten Konzentrationen ( $a_j$ ) werden im nächsten Schritt die Messungenauigkeiten neu bestimmt:

**Gleichung 5.7-6:**

$$\sigma_i^2 = \sum_{j=1}^4 (a_j \sigma_{ji})^2$$

Mit der neu berechneten Gewichtung werden die Konzentrationen der Algengruppen erneut bestimmt. Dieses iterative Verfahren zur Gewichtung des Fit's zeigte sich als äußerst konvergent. Nach der dritten Iteration zeigten die  $a_i$  nur noch Veränderungen kleiner als  $10^{-4}$  und so wird der Algorithmus nach der zweiten Iteration gestoppt.

Obwohl die beschriebene Gewichtung äußerst sinnvoll ist, da sie den Einfluss der Ungenauigkeit der Messwerte verringert, musste für den AOA auf die Gewichtung des Fit's vollständig verzichtet werden.

Durch die Messroutine des AOA's zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität fallen so viele Messwerte an, dass der Algorithmus zur Gewichtung des Fit's zu einer enormen Erhöhung der Rechenzeit führt (Aussage der Firma bbe Moldaenke) und deshalb wegen des internen 16 MHz- $\mu$ -Controllers des AOA's nicht verwendet werden kann. Ohne die Gewichtung des Fit's lässt sich das Gleichungssystem (Gleichung 5.7-1) sofort durch die folgende Gleichung lösen:

**Gleichung 5.7-7: Matrixschreibweise des Gleichungssystems**

$$\mathbf{a} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{c} \quad \text{mit} \quad \mathbf{a} = \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ a_4 \end{pmatrix} \quad \mathbf{A} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \mathbf{\Lambda} & x_{14} \\ x_{21} & x_{22} & & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} & & \mathbf{O} & \mathbf{M} \\ x_{51} & \mathbf{\Lambda} & \mathbf{\Lambda} & x_{54} \end{pmatrix} \quad \mathbf{c} = \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \mathbf{M} \\ c_5 \end{pmatrix}$$

Die Komponenten des Vektors  $\mathbf{a}$  entsprechen den Chlorophyll- $a$  Konzentrationen der spektralen Algengruppen, die Komponenten des Vektors  $\mathbf{c}$  den Messwerten der Fluoreszenzemission der Probe und die Matrix  $\mathbf{A}$  wird aus den Fingerprints gebildet.

Nach der Berechnung werden die  $a_i$ 's darauf geprüft, ob sie größer gleich Null sind. Alle negativen Konzentrationen sind nicht erlaubt und es wird die Algengruppe mit dem

negativsten  $a_i$  verworfen. Das bedeutet, dass die Dimension des Vektors  $\mathbf{a}$  um eins verringert und in der Matrix die Spalte mit dem Fingerprint der entsprechenden Algengruppe eliminiert wird. Die Bestimmung der Konzentrationen wird nun erneut durchgeführt und dieses Verfahren so lange wiederholt, bis alle  $a_i$ 's der Bedingung größer gleich Null genügen.

## 5.8. Die photosynthetische Aktivität der Algengruppen

Die Erfassung der minimalen ( $f_0$ ) und maximalen ( $f_M$ ) Fluoreszenz durch den AOA ermöglicht die Berechnung der photosynthetischen Aktivität  $\Phi$  der Algen [Hollinderbäumer et al. 1997, Baba et al. 1996, Park et al. 1995]:

### Gleichung 5.8-1:: Die photosynthetische Aktivität

$$\Phi = \frac{(f_M - f_0)}{f_M}$$

Da der AOA aber fünf diskrete Anregungsfarben verwendet, kann die Berechnung der minimalen und maximalen Fluoreszenz für jede einzelne Algengruppe für die Messwerte der  $f_0$  und der  $f_M$ -Messung entsprechend den nachfolgenden Gleichungen durchgeführt werden.

Die Anteile  $\mathbf{a}$  der spektralen Algengruppen werden für die Messwerte ( $\mathbf{d}$ ) der  $f_0$  und der  $f_M$ -Messung durch den Fit bestimmt.

### Gleichung 5.8-2: Berechnung der Vektoren $\mathbf{a}_0$ und $\mathbf{a}_M$

$$\mathbf{p}_{\mathbf{a}_0} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{p}_{\mathbf{d}_0} \quad \text{und} \quad \mathbf{p}_{\mathbf{a}_M} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{p}_{\mathbf{d}_M}$$

**A:** Matrix der Fingerprints

Die Vektoren  $\mathbf{a}_0$  und  $\mathbf{a}_M$  haben eine Dimension, die der Anzahl der Algengruppen entspricht. Die Komponenten von  $\mathbf{a}_0$  bzw.  $\mathbf{a}_M$  geben die Höhe der Fluoreszenz der einzelnen Algengruppen für die Messung der minimalen bzw. der maximalen Fluoreszenz in bezug auf die Fingerprints der entsprechenden Gruppen ( $x^{\text{Algengruppe}}$ ) an.

Es gilt:

$$\mathbf{p}_{f_0}^{\text{Algengruppe}} = \mathbf{p}_{d_0}^{\text{Algengruppe}} \cdot \mathbf{x}^{\text{Algengruppe}}$$

Dabei entspricht  $\mathbf{x}$  dem Fingerprintvektor der Algengruppe, also der Höhe der Fluoreszenz-emission der Algengruppe für die Anregung mit den verschiedenen LED's. Für die maximale Fluoreszenz gilt entsprechendes.

Die Fluoreszenz für  $f_0$  und  $f_M$  einer Algengruppe kann somit durch den Normkurvenfit aus den Messdaten extrahiert werden. Unter der Voraussetzung das sich die Form der diskreten Anregungsspektren, also der Fingerprints, bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten nicht verändert, geht die Gleichung 5.8-1 in die folgende Form über:

**Gleichung 5.8-3: Algengruppenspezifische Aktivität**

$$\mathbf{p}_{\Phi}^{\text{Algengruppe}}: \Phi^i = \frac{\langle (A^T A)^{-1} A^T \mathbf{p}_M \rangle^i - \langle (A^T A)^{-1} A^T \mathbf{p}_0 \rangle^i}{\langle (A^T A)^{-1} A^T \mathbf{p}_M \rangle^i} \quad \text{mit } \mathbf{p}_{\Phi} = \begin{pmatrix} \Phi^1 \\ \Phi^2 \\ \Phi^3 \\ \Phi^4 \end{pmatrix}$$

Durch diese Gleichung kann die photosynthetische Aktivität der Algengruppen direkt über die  $f_0$  und  $f_M$ -Fluoreszenzmesswerte berechnet werden.





## 6. Untersuchungen zu den spektralen Fingerprints

Die Grundlage für die Algendifferenzierung des AOA's anhand von diskreten Anregungsspektren bilden die spektralen Fingerprints der Algengruppen. Nach Untersuchungen von Beutler [1998] lassen sich vier Algengruppen unterscheiden.

### 6.1. Prüfung der linearen Unabhängigkeit der Fingerprints

Das lineare Gleichungssystem zur Berechnung der Anteile der Algengruppen ist nur dann lösbar, wenn das lineare inhomogene Gleichungssystem (Gleichung 5.7-7) die folgende Bedingung erfüllt:

$$\text{Rang}(\mathbf{A}) = \text{Rang}(\mathbf{A}, \mathbf{c})$$

Der Rang der Matrix  $\mathbf{A}$  muss gleich dem Rang der erweiterten Koeffizientenmatrix  $(\mathbf{A}, \mathbf{c})$  sein [Bronstein & Semendjajew 1985].

Der Rang der Fingerprint-Matrix  $\mathbf{A}$  selbst ist für die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit der Algen in einer Probe von Bedeutung. Ist der  $\text{Rang}(\mathbf{A})$  kleiner als die Anzahl der in  $\mathbf{A}$  verwendeten Fingerprints, so bedeutet dies, dass ein Fingerprint aus der Linearkombination der anderen Fingerprints gebildet werden kann.

Zur Bestimmung des Ranges wird  $\mathbf{A}$  durch elementare Matrizenalgebra unter Verwendung des Gauß'schen Algorithmus auf Trapezgestalt gebracht. Für die transponierte Matrix  $\mathbf{A}^T$  der Fingerprints aus Gleichung 5.7-7 ergibt sich nach der Umformung:

$$\mathbf{A}^T = \begin{pmatrix} 2,982 & 1,408 & 0,382 & 1,682 & 1,356 \\ 0 & 1,362 & 3,754 & 16,755 & 14,284 \\ 0 & 0 & -2,257 & -11,084 & -9,592 \\ 0 & 0 & 0 & -1,973 & -2,308 \end{pmatrix}$$

Der Rang von  $\mathbf{A}^T$  ist gleich Vier und somit gleich der Anzahl der verwendeten spektralen Algengruppen. Die vier Fingerprints sind linear unabhängig. Für den praktischen Einsatz ist die alleinige Prüfung des Ranges der Matrix  $\mathbf{A}^T$  nicht ausreichend, da die Messungenauigkeit des Gerätes nicht berücksichtigt wird.

Wird die Reihenfolge der Zeilen der Matrix  $\mathbf{A}^T$  vor dem Umformen vertauscht (jetzt gewählte

## Kapitel 6

Reihenfolge: grüne, braune, gemischte und blaue Gruppe), so ergibt der Gauß'sche Algorithmus für die Matrix:

$$\mathbf{A}^{\text{T}*} = \begin{pmatrix} 2,982 & 1,408 & 0,382 & 1,682 & 1,356 \\ 0 & 0,877 & 0,159 & -0,300 & -0,398 \\ 0 & 0 & 0,602 & 0,981 & 0,249 \\ 0 & 0 & 0 & 11,503 & 13,452 \end{pmatrix}$$

Diese Matrix zeigt eine Wahl der Reihenfolge der Zeilen, die die kleinsten Unterschiede zwischen den Fingerprints in der Trapezform der Matrix ergibt.

Eine sehr starke Ähnlichkeit der Fingerprints würde den Fit zur Berechnung der Koeffizienten der Chlorophyll-*a* Konzentrationen der Gruppen anfällig gegenüber Messungenauigkeiten bei der Erfassung der Fluoreszenzemission machen. In der Diagonalform einer beliebigen Matrix würde dies durch solche Zeilen offensichtlich, in denen alle Komponenten gegen Null gehen. Dies ist für die Matrix  $\mathbf{A}^{\text{T}*}$  nicht der Fall. Es lässt sich aber nicht sagen, wie die Auswirkung von verrauschten Daten auf die Algengruppenerkennung ist.

Deshalb soll dies in den nächsten Kapiteln genauer untersucht werden.

## 6.2. Gegenseitige Erkennung der Algengruppen

Die lineare Unabhängigkeit der Fingerprints wurde anhand der Matrix der Basisvektoren (Fingerprints) gezeigt. Hier soll nun ein alternativer Ansatz erfolgen. Es wird untersucht, inwieweit es möglich ist, einen Fingerprint als Linearkombination der drei anderen darzustellen.

Anders formuliert wird somit untersucht, wie sich die Lösung des Gleichungssystems zur Algengruppenerkennung verhält, wenn für die Lösung der Algengruppenzusammensetzung einer hypothetischen Probe der Fingerprint einer Gruppe fehlt.

### 6.2.1. Rohdaten der Messung und Hypothese des Fit's

Als Fluoreszenzmesswerte einer fiktiven Probe werden nacheinander die Fingerprints der spektralen Gruppen verwendet. Der Fit zur Algengruppenzuordnung wird nun unter der

Einschränkung durchgeführt, dass der Fingerprint, der den Messwert darstellt, für die Lösung nicht zugelassen ist. Der Fit wird somit nur mit drei von vier möglichen spektralen Gruppen durchgeführt.

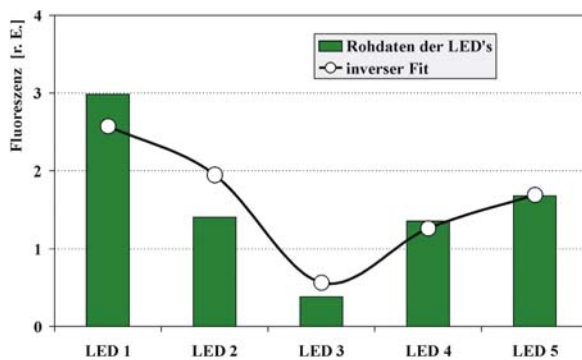
Die fiktiv gemessene Fluoreszenz für die einzelnen LED's (Komponenten des Messwertvektors  $c$ , auch Rohdaten genannt) wird in den nachfolgenden Abbildungen 6.2-1 A – D der Hypothese des Fit's gegenübergestellt.

Die Gegenüberstellungen zeigen, wie gut die Übereinstimmung zwischen den genäherten Fluoreszenzwerten des Fit's und den Fingerprints (als Rohdaten) sind:

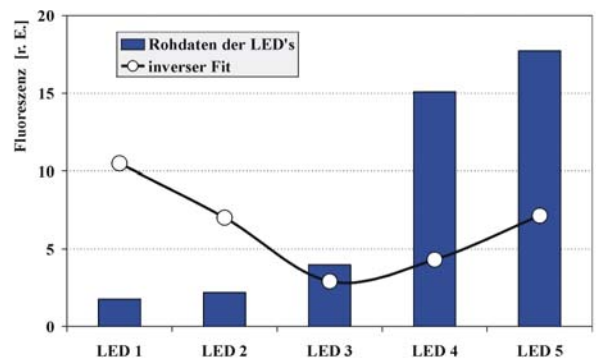
**Abbildungen 6.2-1 A – D: Gegenseitige Erkennung der Fingerprints**

Der Fingerprint einer spektralen Gruppe wird durch die drei anderen Fingerprints (unter Auslassung des betrachteten Fingerprints) genähert.

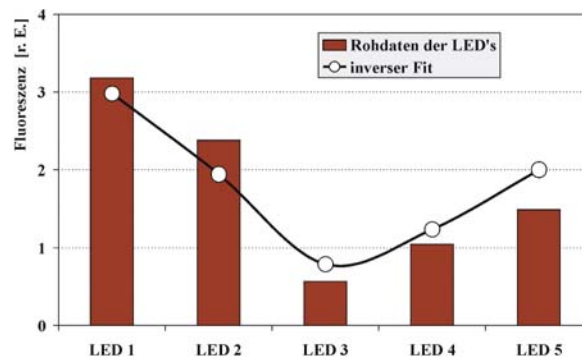
**A:** Rohdaten: Fingerprint der grünen Gruppe,  
Fit: ohne die grüne Gruppe



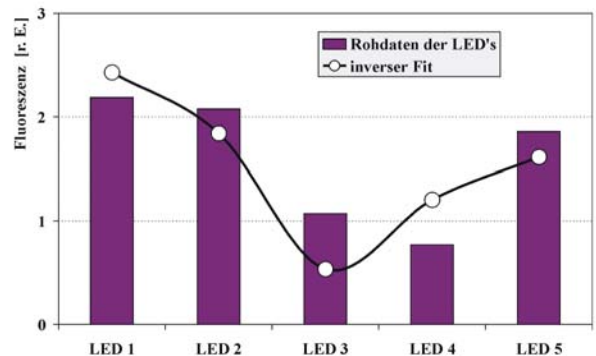
**B:** Rohdaten: Fingerprint der blauen Gruppe,  
Fit: ohne die blaue Gruppe



**C:** Rohdaten: Fingerprint der braunen Gruppe,  
Fit: ohne die braune Gruppe



**D:** Rohdaten: Fingerprint der gemischten Gruppe,  
Fit: ohne die gemischte Gruppe



## Kapitel 6

In der Abbildungen 6.2-1 A zeigt sich eine überraschend gute Übereinstimmung der Hypothese des Fit's zu dem Fingerprint der grünen Gruppe, und das, obwohl die grüne Gruppe für die Lösung des Gleichungssystems nach der vorgegebenen Einschränkung nicht zur Verfügung steht. Dies gilt ebenfalls für die Abbildungen 6.2-1 C, wo der Fingerprint der braunen Gruppe die Rohdaten bildet.

Eine nur mäßige Übereinstimmung zwischen der Hypothese und den Messdaten wird hingegen die gemischte Gruppe (Abbildungen 6.2-1 D) unter Auslassung ihres eigenen Fingerprints erreicht.

Für die blaue Gruppe als Rohdaten findet der Fit durch die Kombination der drei anderen Gruppen keine wirkliche Annäherung, eine sehr gute Trennung dieser Algengruppe von den anderen spektralen Gruppen ist zu erwarten.

### 6.2.2. Erkenntnisse der Untersuchung zur gegenseitigen Erkennung

Die Untersuchung der gegenseitigen Erkennung der Fingerprints macht anhand der Abbildungen 6.2-1 A und C die relativ geringen Unterschiede der Hypothese des Fit's zu den Fingerprints der grünen und der braunen Gruppe deutlich. Für ideale Messdaten stellt dies kein Problem für die Erkennung der Algengruppen dar. Im allgemeinen sind Messgrößen aber immer mit einem Fehler behaftet. Es muss geprüft werden, wie stark sich Messfehler auf die Zuordnung der spektralen Algengruppen durch den Fit auswirken (Kap. 6.4).

### 6.2.3. Bewertung der Fitergebnisse

Für den Unterschied zwischen den Rohdaten der LED's und den Hypothesen des Fit's soll eine mathematische Größe geschaffen werden, die eine Beurteilung der Annäherung durch einen einzigen Parameter ausdrückt. Aus dem Gleichungssystem zur Bestimmung der Algengruppen (Gleichung 5.7-7) folgt nach dem Auflösen der Gleichung für die Messdaten der Fluoreszenz (Rohdaten der LED's oder kurz Rohdaten):

#### Gleichung 6.2-1:

$$\mathbf{P}_d = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{P} \xrightarrow{\text{Rückrechnung über die gefittete Konzentration}} \mathbf{P}^* = (\mathbf{A}^T)^{-1} (\mathbf{A}^T \mathbf{A}) \mathbf{P}_d$$

Der gefittete Rohdatenwert „ $c_i^*$ “ als Hypothese des Fit's für die Lumineszenzdiode  $i$  ergibt sich somit aus der Summe der Produkte der Komponente  $i$  der Fingerprints der Algengruppen  $j$  und der berechneten Chl.a-Konzentration dieser Gruppe ( $a_j$ ):

**Gleichung 6.2-2: Hypothese des Fit's für die einzelnen LED's**

$$c_i^* = \sum_{j=1}^4 a_j x_{ij} \quad \text{mit } c_i^* \text{ gleich der Hypothese des Fit's}$$

Durch die Gleichung 6.2-2 lässt sich eine Größe für die Abweichung zwischen den gefitteten Rohdatenwerten und den gemessenen Rohdatenwerten berechnen. Der absolute Fehler zwischen den gemessenen Fluoreszenzwerten für die Anregung durch die verschiedenen einzelnen LED's und die durch den inversen Fit genäherten Rohdaten der Fluoreszenzwerte ergibt sich durch:

**Gleichung 6.2-3: Absoluter Fehler des Fit's**

$$\delta_{Fit} = \sum_{i=1}^5 |c_i - c_i^*| = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^4 |c_i - a_j x_{ij}|$$

Der absolute Fehler  $\delta_{Fit}$  ist von der Höhe der detektierten Fluoreszenz der einzelnen LED's abhängig und steigt mit einer Vergrößerung der ermittelten Rohdaten der Chlorophyll- $a$  Fluoreszenz. Um von der Konzentration unabhängig zu werden, wird die relative Abweichung zwischen Messdaten und gefitteten Rohdaten betrachtet, die auf die Summe der gefitteten Rohdaten normiert wird.

**Gleichung 6.2-4: Relativer Fehler des Fit's**

$$\Delta_{Fit} = \frac{\delta_{Fit}}{\sum_{i=1}^5 c_i^*} = \frac{\sum_{i=1}^5 |c_i - c_i^*|}{\sum_{i=1}^5 c_i^*} = \frac{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^4 |c_i - a_j x_{ij}|}{\sum_{i=1}^5 c_i^*}$$

Durch die Einführung des absoluten und des relativen Fehlers des Fit's lässt sich die offensichtliche Abweichung in den Abbildungen 6.2-1 A – D zwischen den Rohdaten und den gefitteten Rohdaten berechnen und durch die Größen  $\delta_{Fit}$  bzw.  $\Delta_{Fit}$  ausdrücken.

**Tabelle 6.2-1: Fehler des Fit's für die gegenseitige Erkennung der Fingerprints**

Absoluter und relativer Fehler des Fit's für die Betrachtung der gegenseitigen Erkennung eines Fingerprints durch alle weiteren Fingerprints in den Abbildungen 6.2-1 A – D. Hohe Werte für die beiden eingeführten Größen zeigen dabei eine schlechte Annäherung an (vgl. Abb. 6.2-1 A – D).

Absoluter und relativer Fehler des Fit's	$\delta_{Fit}$	$\Delta_{Fit}$
Abbildungen 6.2-1 A: Grüne spektrale Gruppe	0,709	90,8
Abbildungen 6.2-1 B: Blaue spektrale Gruppe	18,129	444,8
Abbildungen 6.2-1 C: Braune spektrale Gruppe	0,757	87,4
Abbildungen 6.2-1 D: Gemischte spektrale Gruppe	0,806	101,3

### 6.2.4. Auswirkungen des Weglassens eines Fingerprints

Ausgangspunkt dieser Betrachtung ist die Überlegung, ob die Anzahl der Fingerprints reduziert werden kann und welche Auswirkungen auf die Gruppenerkennung zu erwarten sind. Wird zum Beispiel aufgrund eines Vorwissens über das Phytoplankton in den Proben die grüne spektrale Gruppe für den Fit ausgeschlossen, und diese Gruppe ist dann wieder erwarten doch in der Probe enthalten. Welcher spektralen Gruppe würden dann die Algen der grünen Gruppe zugeordnet werden ?

Für diese Betrachtung wird davon ausgegangen, dass die Messung der Fluoreszenz einen Vektor **c** ergibt, der genau einem der vier Fingerprints entspricht. Die Fingerprints sind auf eine Chlorophyll-a Konzentration von 1 µg pro Liter normiert. Wird die Konzentration der Algengruppen nach Gleichung 5.7-7 berechnet, so ergibt sich die Konzentration für die entsprechende Gruppe selbstverständlich zu 1 µg Chl.a pro Liter. Wenn der Fingerprint dieser Algengruppe für die Lösung aber nicht zur Verfügung steht?

**Tabelle 6.2-2: Gegenseitige Erkennung der Algengruppen**

Ergebnis des Fit's für die Messwerte **c**, die einem der Fingerprints der Algengruppen entsprechen, bei gleichzeitigem Weglassen dieses Fingerprints für den Fit (weggelassene spektrale Algengruppe mit X markiert).

	Grüne Gruppe [µg Chl.a /l]	Blaue Gruppe [µg Chl.a /l]	Braune Gruppe [µg Chl.a /l]	Gemischte Gruppe [µg Chl.a /l]	Gesamt-Gehalt [µg Chl.a /l]
C := „grüner“ Fingerprint	X	0,03	0,79	0,00	0,82
C := „blauer“ Fingerprint	2,06	X	0,00	1,99	4,05
C := „brauner“ Fingerprint	0,62	0,00	X	0,52	1,14
C := „gemischter“ Fingerprint	0,00	0,03	0,75	X	0,78

Die erzwungene Fehlzuordnung des Fit's zeigt bei Fluoreszenzmesswerten für 1 µg Chl.a pro Liter der grünen spektralen Algengruppe unter dem Auslassen des grünen Fingerprints für die Lösung des Gleichungssystems eine Zuordnung zur braunen spektralen Algengruppe mit einer Konzentration von 0,79 µg Chl.a pro Liter bei gleichzeitiger Zuordnung von 0,03 µg Chl.a für die blaue spektrale Gruppe. Der Chlorophyll-*a* Gesamtgehalt, die Summe der Chl.a-Konzentrationen der einzelnen Gruppen, ergibt sich zu 0,82 µg pro Liter.

Für die Chlorophyll-*a* Bestimmung der Gesamtkonzentration ergibt sich eine Unterschätzung von 18 % der wahren Konzentration, wenn sich Algen der grünen spektralen Gruppe in einer Probe befinden, der Fingerprint dieser Gruppe aber für die Lösung nicht berücksichtigt wird.

Analog lassen sich durch diese Betrachtung vergleichbare Aussagen über die Zuordnung der weiteren „Fingerprint“-Messergebnisse machen. Messergebnisse, die der gemischten spektralen Gruppe entsprechen, werden fast ausschließlich der braunen spektralen Gruppe zugeordnet (Unterschätzung des Ch.a-Gesamtgehaltes um 22 %). Messergebnisse, die der braunen spektralen Gruppe entsprechen, werden durch eine Kombination der grünen und gemischten spektralen Gruppe genähert (Überschätzung des Ch.a-Gesamtgehaltes um 14 %).

Die blaue spektrale Gruppe wird ohne ihren eigenen Fingerprint durch den Fit der grünen und gemischten spektralen Gruppe zugeordnet. Es zeigt sich aber eine extreme Überschätzung des Chlorophyll-*a* Gesamtgehaltes von 400 %.

### 6.3. Der Einfluss von Rauschen auf die Algengruppenerkennung

Messgrößen sind grundsätzlich mit Fehlern behaftet. Zu den Fehlerquellen gehören die Ungenauigkeit der Messung der Chlorophyll-*a* Fluoreszenzmessung durch den Detektor, das Rauschen der Intensität der Lumineszenzdioden für die Anregung der Fluoreszenz, usw. .

Ziel dieser Untersuchung ist die Abschätzung des Einflusses des Messfehlers auf die Erkennung der Algengruppen. Zu diesem Zweck werden die Fingerprints der Algengruppen als Messwert genommen und mit einem stochastischen Rauschen belegt. Der Fit zur Ermittlung der Chl.a-Konzentrationen der Algengruppen wird durchgeführt. Als Ergebnis wird eine Einschätzung der Fehlbestimmung der spektralen Gruppenzugehörigkeit durch den Messfehler stehen.

### 6.3.1. Die Simulation

Für diese Untersuchung wird davon ausgegangen, dass die reale Messung der Fluoreszenz ( $c_i$ ) für jede LED „i“ mit einem stochastisch gleichverteilten Rauschen behaftet ist. Sei das Ergebnis einer theoretischen Fluoreszenzmessung gleich dem Fingerprint einer der vier spektralen Algengruppen. Die Komponenten des jeweilig als Messwert gewählten Fingerprints sollen einen maximalen relativen Fehler ( $f$ ) aufweisen. Die Größe von  $f$  wird für die Untersuchung variiert. Unter der Voraussetzung, dass der Fehler für jede LED-Strecke von dem Rauschen der anderen LED's unabhängig ist, lässt sich der simulierte verrauschte Messwert wie folgt berechnen:

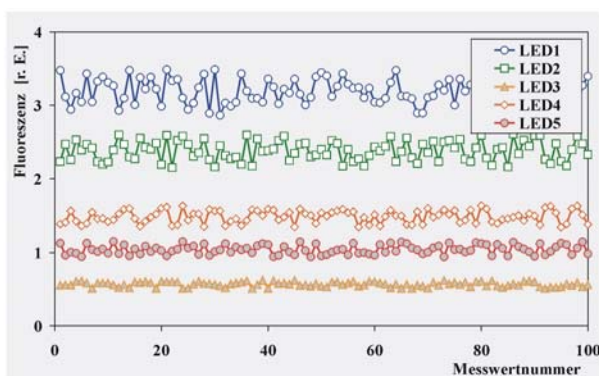
**Gleichung 6.3-1:**

$$c_i^{\text{Sim}} = c_i \cdot \left( 1 + f \cdot \left( 2 \cdot (\text{Zufallszahl}[0..1] - \frac{1}{2}) \right) \right)$$

Die maximale Abweichung des Messwertes wird durch  $f$  festgelegt. Für  $f$  gleich 0,2 beträgt die Schwankung des simulierten Rohdatenwertes ( $c_i^{\text{Sim}}$ ) maximal  $\pm 20\%$ . Der Vektor  $\mathbf{c}$  wird gleich einem der spektralen Fingerprints gesetzt und entspricht damit einer detektierten Konzentration von  $1 \mu\text{g Chl.a}$  pro Liter dieser Algengruppe.

Durch die Anwendung der Gleichung 6.3-1 werden die Messwerte für die Simulation erzeugt. Für eine Anzahl von 5000 Messwerten zeigte sich nach entsprechenden Voruntersuchungen eine ausreichende statistische Sicherheit für die nachfolgenden Betrachtungen.

**Abbildung 6.3-1: Verrauschte Messdaten für die Simulation**



Die Abbildung zeigt die erzeugten Messdaten aus dem Fingerprint der braunen Gruppe, die mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 20\%$  verrauscht wurden. Zur besseren Übersicht wurde die Darstellung auf die ersten 100 Werte der Rohdaten beschränkt.

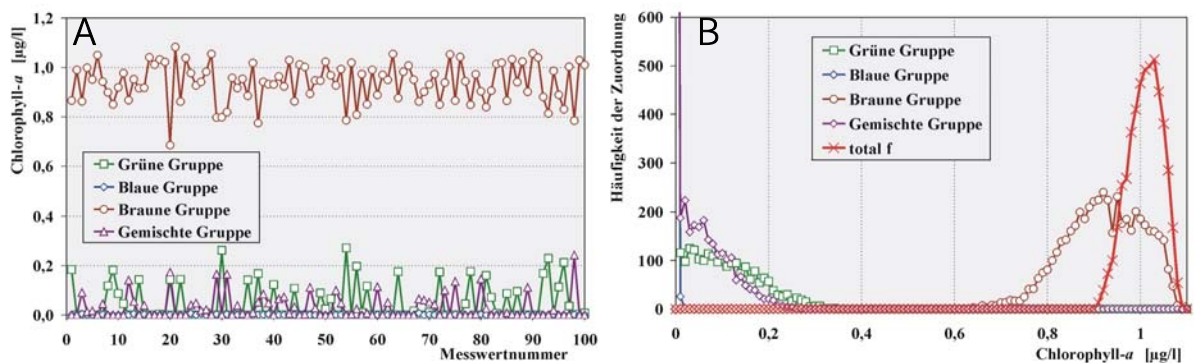


Aus dem erzeugten Satz von Messdaten wird mit den Fingerprints für die spektralen Gruppen durch den Normkurvenfit nach Gleichung 5.7-7 die Konzentration jeder Gruppe bestimmt.

Für die Messdaten aus Abbildung 6.3-1, die aus dem Fingerprint für die braune Gruppe gebildet wurden, zeigen die Ergebnisse des Fit's neben der Erkennung dieser Gruppe auch Chl.a-Konzentrationen von bis zu 0,3 µg pro Liter für die grüne bzw. 0,2 µg pro Liter für die gemischte Gruppe (Abbildung 6.3-2 A nachfolgend). Um die Höhe der berechneten Chl.a-Konzentration einer Gruppe in ihrer Häufigkeit zu bestimmen, werden über alle 5000 Bestimmungen der Zugehörigkeit diese in Intervallen von 10 ng Chl.a pro Liter zusammengefasst und dann in einem Häufigkeitsdiagramm dargestellt (Abbildung 6.3-2 B).

**Abbildung 6.3-2 A & B: Algengruppenerkennung und Häufigkeitsverteilung der Zuordnung für die Daten der Simulation**

A: Algengruppenerkennung für die ersten 100 verrauschten Messwerte der Simulation (Abbildung 6.3-1).  
 B: Häufigkeitsverteilung der zugeordneten Chl.a-Konzentration der Algengruppen.



Durch das Diagramm der Häufigkeitsverteilung wird der Einfluss des Rauschens auf den Fit deutlich. Die zu detektierende Ausgangskonzentration von 0,8 – 1,2 µg Chl.a pro Liter bei einem 20 %-igem Rauschen der braunen spektralen Gruppe wird durch einen zugeordneten Anteil an Algen der grünen und / oder der gemischten Gruppe noch weiter verringert.

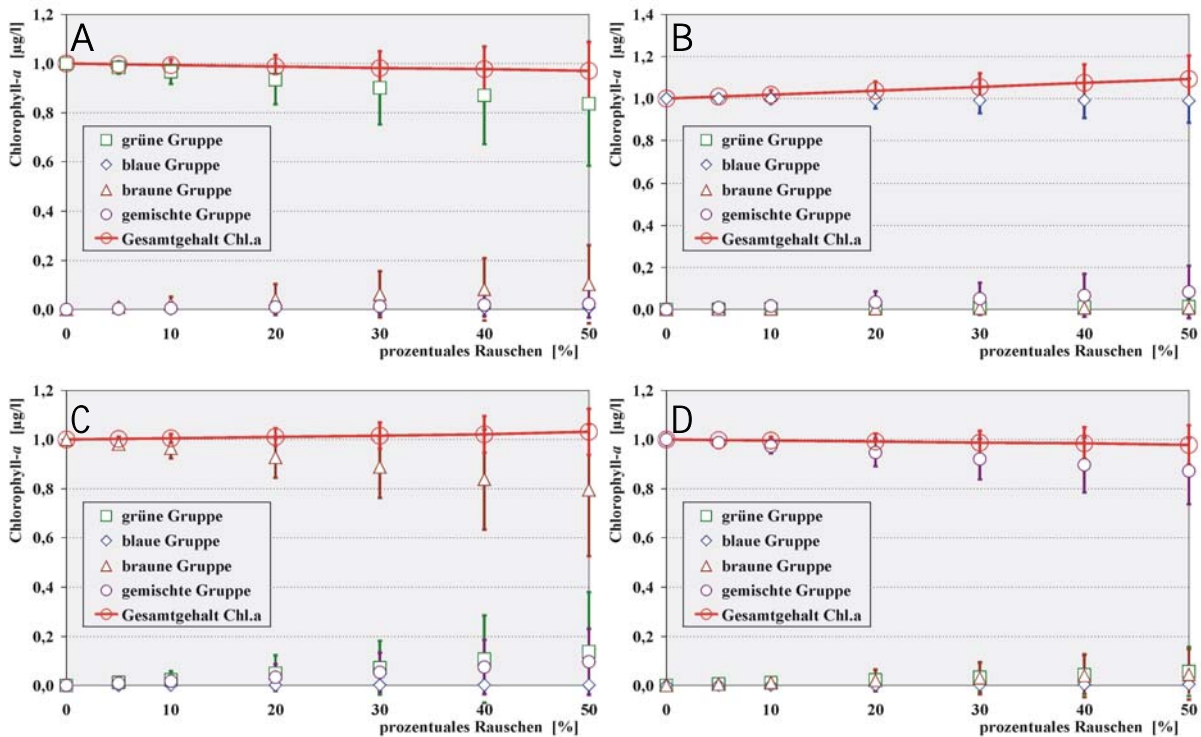
Speziell von Interesse ist dabei die Tatsache, dass allein durch die Messungenauigkeit der Fluoreszenzerfassung Chl.a Anteile von bis zu maximal 0,3 bzw. 0,2 µg pro Liter der grünen bzw. gemischten Gruppe zugeschlagen werden.

Um die Entwicklung der Fehlzuordnung in Abhängigkeit des prozentualen Rauschens abschätzen zu können, wird die Simulation für jeden Fingerprint als theoretischer Messwert

bei unterschiedlich großem Rauschen durchgeführt. Von den 5000 Ergebnissen einer Simulation wird der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und in den Abbildungen einander gegenübergestellt.

**Abbildung 6.3-3 A - D: Fehlzuordnung der Algengruppenerkennung in Abhängigkeit des Rauschens**

A zeigt die Abhängigkeit der Algengruppenerkennung vom Messfehler für die grüne spektrale Gruppe. B – D zeigen entsprechende Abhängigkeiten der blauen, braunen und gemischten spektralen Gruppe.



## 6.4. Ermittlung der Messgenauigkeit des AOA's

Nach den Erkenntnissen des vorherigen Abschnittes kann der Einfluss eines Rauschens auf die Algengruppenerkennung des AOA's theoretisch abgeschätzt werden. Anhand von realen Messungen soll nun die Messgenauigkeit des AOA's spezifiziert werden.

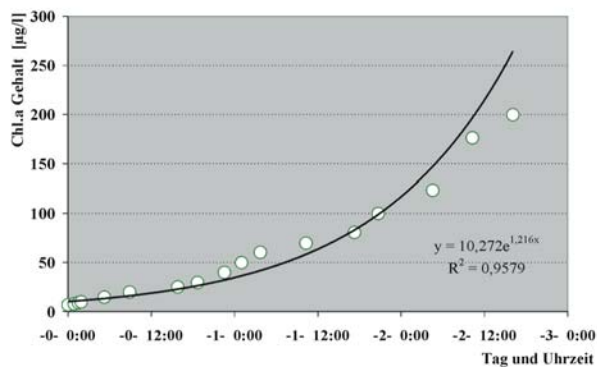
### 6.4.1. Untersuchung zur Bestimmung des relativen Rauschens des Systems

Es wird die Grünalge *Dunaliella spec.* im KSW 2 Medium (400 ml) mit Nährstoffen (Anhang A) in einer Batchkultur angesetzt. Mit dem AOA wird alle fünf Minuten die Chlorophyll-a Konzentration durch das Einpumpen einer neuen Probe bestimmt. Nach der Messung wird die

Probe in den Batch zurückgepumpt. Die über achthundert Einzelmessungen werden über drei Messwerte gleitend gemittelt (gl. Mittel) und die Standardabweichung berechnet. Zur Datenreduktion werden nun im weiteren nur die Konzentrationen von 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 125, 175 und 200 µg Chl.a pro Liter betrachtet. Die zeitliche Entwicklung der Konzentrationszunahme an Chl.a ergab sich wie in Abbildung 6.4-1 dargestellt.

**Abbildung 6.4-1: Entwicklung des Chl.a-Gehaltes der Chlorophyceae – Batchkultur**

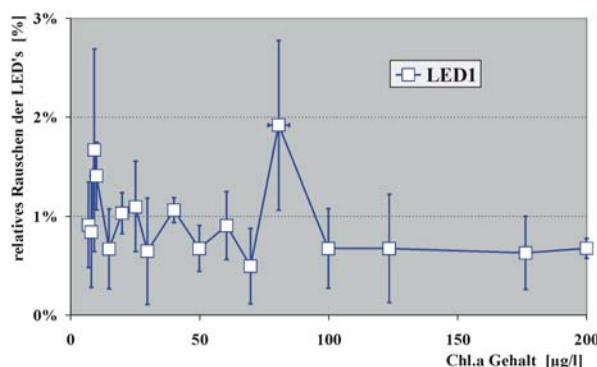
Die Messwerte der Chl.a-Bestimmung (o) werden mit einer Exponentialfunktion genähert (–). Die Fehlerbalken der Chl.a-Bestimmung aus der Mittelung über drei Messwerte werden von den Punkten überdeckt.



Die Batchkultur der Chlorophyceae zeigt ein exponentielles Wachstum über einen Zeitraum von 2 Tagen. Die Trendlinie der Wachstumsentwicklung weist ein  $R^2$  von 0,96 auf. Ab einer Konzentration von 175 µg Chl.a pro Liter zeigt sich ein verlangsamtes Wachstum.

Zur Bestimmung des relativen Fehlers ( $f_{\text{relativ}}$ ) der Fluoreszenzmessung durch den AOA wird die Standardabweichung des Messwertes (gl. Mittel) für die Anregung mit der LED „i“ durch den Messwert geteilt. Für die vorher gewählten Chl.a-Konzentrationen zeigt sich am Beispiel der LED1 mit einer Wellenlänge von 450 nm das folgende Bild:

**Abbildung 6.4-2: Gegenüberstellung des  $f_{\text{relativ}}$  zum Chl.a-Gehalt**



Das relative Rauschen der LED1 (450 nm) weist einen recht konstanten Wert von knapp einem Prozent über einen Chl.a-Bereich von 15 – 200 µg pro Liter auf.

Für Chl.a-Konzentrationen kleiner gleich 10 µg pro Liter kann das absolute Rauschen des

Messsystems zusätzlich zum Tragen kommen. Für die Abschätzung des relativen Rauschens wird daher nur der Bereich für Konzentrationen über 10 µg Chl.a pro Liter berücksichtigt. Die zwei Prozent für einen Chl.a-Gehalt von 80 µg pro Liter werden als Ausreißer angesehen.

Für alle weiteren LED's ergibt sich ein vergleichbares Ergebnis, auf dessen Darstellung hier verzichtet wird. Auch für diese LED's liegt der relative Fehler bei knapp einem Prozent, es kommen aber ebenfalls vereinzelt Ausreißer vor, deren Wert aber immer unter zwei Prozent bleibt. Im Zweifelsfall sollte lieber die schlechte Abschätzung des Fehlers gewählt werden, darum:

--- Die Höhe des relativen Rauschens beträgt für alle LED's höchstens zwei Prozent ---

#### 6.4.2. Bestimmung des absoluten Rauschens des AOA's

Für die Offseteinstellung des AOA's wird die Messkammer mit Salzwasser (doppelt entionisiertes Wasser mit 30 Gramm NaCl pro Liter) gefüllt. Als Ergebnis der Fluoreszenzmessung sollte für jede LED „i“ der Wert Null bestimmt werden.

Für ideale optische Filter zur Trennung des Anregungslichtes von der Fluoreszenz würde dieser Wert auch erreicht werden, wie ein Test mit abgedunkelten LED's zeigt (kein Offset durch die Detektorelektronik).

Mit realen Filtern wird die vollständige Unterdrückung des Anregungslichtes aber nicht erreicht. Zur Kompensation ist deshalb eine Offsetkorrektur im AOA vorgesehen. In einer speziellen Messroutine wird der Offset bestimmt. Dieser Offset wird bei allen weiteren Messungen von der gemessenen Fluoreszenz abgezogen, um die „wirkliche“ Fluoreszenz zu ermitteln.

An der Salzwasserprobe wird der Offset ermittelt. Anschließend wird eine Messreihe über 100 Messwerte an dem Salzwasser durchgeführt, um das Rauschen des Offsets zu ermitteln:

**Tabelle 6.4-1: Absolutes Rauschen der Fluoreszenzmessung des AOA's**

<b>Absolutes Rauschen des AOA's</b>	<b>LED1</b>	<b>LED2</b>	<b>LED3</b>	<b>LED4</b>	<b>LED5</b>
Maximale Abweichung zum Mittelwert Null	0,093	0,076	0,079	0,080	0,157
Standardabweichung zum Mittelwert Null	0,014	0,012	0,011	0,013	0,024

Das Rauschen des Offsets ist unabhängig von der Höhe der gemessenen Fluoreszenz. Es handelt sich deshalb um ein absolutes Rauschen (Grundrauschen) der Messwerterfassung.

### 6.4.3. Das Rauschen der AOA-Messung

Durch die Daten eines Wachstumsversuches einer Grünalge konnte das relative Rauschen (Kap. 6.4.1) und durch eine Offsetuntersuchung (Kap. 6.4.2) das absolute Rauschen der Fluoreszenzdetektierung für jede LED ermittelt werden.

Der Wert des relativen Rauschens beträgt 2 Prozent. Das Grundrauschen des AOA's ist der Tabelle 6.4-1 zu entnehmen.

Für die Simulation mit verrauschten Rohdaten wurde bislang nur der Einfluss des relativen Rauschens untersucht. Die zur Erzeugung der verrauschten Daten verwendete Gleichung (Gleichung 6.3-1) wird um den konstanten Betrag durch das Grundrauschen erweitert.

#### **Gleichung 6.4-1:**

$$c_i^{\text{Sim}} = c_i + (c_i \cdot f_{\text{relativ}} + f_{\text{absolut}}) \cdot 2 \cdot (\text{Zufallszahl}[0..1] - \frac{1}{2})$$

Mit einem relativen Fehler von 2 % und der maximalen Abweichung des absoluten Rauschen aus Tabelle 6.4-1 für die einzelnen LED's werden für die Simulation erneut Datensätze mit 5000 Werten erzeugt (vgl. Kap. 6.3.1).

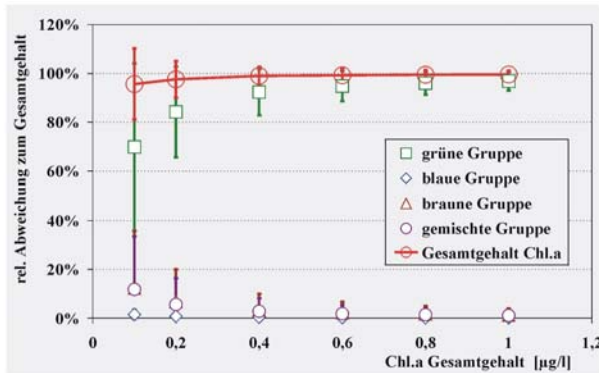
Die Grundlage für den Fluoreszenzvektor ( $c_i$ ) bildet der grüne spektrale Fingerprint, der einer Chl.a-Konzentration von 1 µg pro Liter dieser Gruppe entspricht. Der Fit zur Algengruppenzuordnung wird durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung für die spektralen Gruppen werden berechnet. Die nächste Simulation wird mit einem Wert für  $c_i$  durchgeführt, der einem Vielfachen des grünen Fingerprints entspricht.

Speziell für Konzentrationen kleiner als 1 µg Chl.a pro Liter ist die Entwicklung einer fehlerhaften Zuordnung zu den spektralen Gruppen aufgrund des absoluten Rauschens gemäß Tabelle 6.4-1 bei den zu erwartenden geringen Phytoplanktonkonzentrationen der Nordsee von Interesse.

In der ersten Betrachtung werden die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der gefitteten Konzentrationen auf den vorgegebenen Chl.a-Gehalt der grünen Gruppe bezogen.

**Abbildung 6.4-3: Relativer Fehler der Algengruppenzuordnung des AOA's**

Für kleine Konzentrationen der grünen Gruppe als vorgegebener Rohdatenwert der LED's zeigt sich der wachsende Einfluss der Messungenauigkeit auf die Algengruppenzuordnung.



Mit geringer werdender Konzentration der vorgegebenen Gruppe zeigt sich eine Unterschätzung dieser Gruppe durch die Zuordnung eines Chl.a Anteils zu weiteren Gruppen.

Für einen vorgegebenen Chl.a-Gehalt von 0,1 µg pro Liter für die grüne Gruppe zeigt die Algengruppenerkennung des AOA's durch den Einfluss des Rauschens eine mittlere Unterschätzung dieser Gruppe von 35 %. Gleichzeitig wächst der mittlere Chl.a-Gehalt der weiteren spektralen Gruppen durch die Fehlzuordnung des Fit's aufgrund des Rauschens. Die Fehlerbalken in der Abbildung des Chl.a Mittelwertes dieser Gruppen wird (nur nach oben) durch die Standardabweichung angezeigt.

Für eine Konzentration von 0,4 µg Chl.a pro Liter wird der vorgegebene Gehalt zu 92 % ± 10 % ermittelt. Mit größer werdender, vorgegebener Konzentration nimmt die Unterschätzung ab. Für die Standardabweichung gilt dasselbe.

Der Mittelwert des Chl.a-Gesamtgehaltes als die Summe der Konzentrationen der spektralen Gruppen zeigt kaum Änderungen.

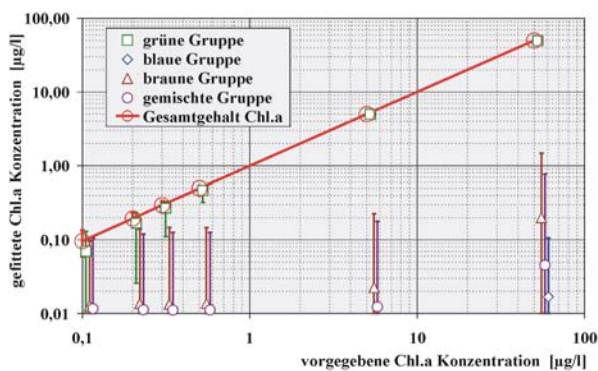
Als abschließende Betrachtung zu der Messungenauigkeit des AOA's und deren Auswirkung muss der maximal auftretende Fehler der Algengruppenerkennung noch genauer betrachtet werden.

Für die online-Algenklassifizierung an Wasserproben besteht im allgemeinen nicht die Möglichkeit der Mittelung mehrerer Messungen an der gleichen Station. Im Fall einer Installation an Bord eines Schiffes wird die Messung während der Fahrt durchgeführt werden. Inwieweit ist also einer einzigen Messung zur Algenklassifizierung an dem Wasserkörper zu trauen. Diese Frage stellt sich nicht allein für die online-Messung, sondern für alle Untersuchungen mit einer geringen Anzahl an Messdaten. Durch die Mehrfachbestimmung eines Parameters können untypische Ausreißer leichter erkannt werden. Die nun folgende Darstellung lässt eine Beurteilung eines durch das Messsystem bedingten Fehlers zu. Das Wissen darüber macht die Trennung zu nicht gerätebedingten Fehlerquellen möglich.

Als Basis für diese Simulation dient die grüne spektrale Gruppe in den Konzentrationen 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 5 und 50 µg Chl.a pro Liter für den Rohdatenvektor  $c_i$ . Die Algenklassifizierung wird gefittet und für jede Simulation der Mittelwert der Chl.a-Konzentration der Gruppen ermittelt.

**Abbildung 6.4-4: Absoluter Fehler der Algenklassifizierung des AOA's**

Für verschiedene vorgegebene Chl.a-Konzentrationen der grünen spektralen Gruppe ist der Chl.a Mittelwert der gefitteten Gruppen mit den maximal möglichen Abweichungen (als Fehlerbalken) dargestellt.



Das Minimum und Maximum des gefitteten Chl.a-Gehaltes der Gruppen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen sind zur bessern Übersicht leicht gegeneinander in der x-Achse versetzt.

Die Abbildung verdeutlicht eindeutig die Entwicklung der Fehlzuordnung der Algenklassifizierung in der Abhängigkeit vom Chl.a-Gehalt. Unter der vorgegebenen Konzentration von 0,5 µg Chl.a pro Liter zeigt sich ein immer größer werdender relativer Fehler für die grüne Gruppe. Die Fehlerbalken geben den Bereich an, in dem die gefittete Chl.a-Konzentration dieser Gruppe liegen könnte.

## Kapitel 6

Die Wahrscheinlichkeit für extreme Abweichungen von dem wahren Chl.a-Gehalt ist von der Chl.a-Konzentration der Gruppe abhängig. Wird bei *in situ* Messungen nur ein einziges Mal gemessen, so kann nur durch einen Vergleich zu weiteren Messwerten beurteilt werden, ob die jeweilige gefittete Konzentration eine gewisse Signifikanz widerspiegelt.

Der größer werdende Fehler in der Algengruppenzuordnung für geringer werdende Konzentrationen ist nicht überraschend. Die Betrachtung der möglichen Erkennung der braunen und gemischten spektralen Gruppe lässt eine Abschätzung der Nachweisgrenze des Gerätes zu. Für die vorgegebenen Konzentrationen bis zu 5 µg Chl.a pro Liter für die grüne spektrale Gruppe kann durch das Rauschen der Nachweis von maximal 0,11 µg Chl.a pro Liter für die braune und die gemischte spektrale Gruppe erfolgen.

Für absolute Chl.a-Konzentrationen einzelner Gruppen, die unter 0,12 µg Chl.a pro Liter liegen, kann es sich um eine Fehlzuordnung des Fit's handeln.

Für sehr hohe Chl.a-Konzentrationen (in dieser Simulation die vorgegebenen 50 µg Chl.a / l) verschiebt sich diese absolute Grenze zu größeren Werten (Abbildung 6.4-4). Als untere Nachweisgrenze einer einzelnen Algengruppe ist für hohe Konzentrationen ein Algengruppengehalt von 2,5 % des Chl.a-Gesamtgehaltes anzusehen.

### 6.4.4. Zusammenfassung

Für alle Simulationen wurden die Angaben für die relativen und absoluten Fehler grundsätzlich nach oben abgeschätzt. Für Chl.a-Gesamtkonzentrationen bis zu 5 µg Chlorophyll-*a* pro Liter ergibt sich für eine einzelne Messung eine Auflösungsgrenze des AOA's von 0,12 µg Chl.a pro Liter für die einzelnen spektralen Gruppen.

Für Konzentrationen größer als 5 µg Chlorophyll-*a* pro Liter ist die untere gerätebedingte Nachweisgrenze der einzelnen spektralen Gruppen mit einem Gehalt von 2,5 % der Chl.a-Gesamtkonzentration für eine einzelne Bestimmung anzusetzen.



## 7. In situ Messung: Erste Ausfahrt

### Büsum – Helgoland – Büsum

#### 7.1. Der Forschungskutter Südfall

Nach dem ersten erfolgreichen Versuch der Algendifferenzierung unter Laborbedingungen [Ruser & Vanselow 1999, Ruser et al. 1999, Beutler 1998] wurde der AOA auf einer Ausfahrt mit dem FK Südfall getestet.

##### Abbildung 7.1-1: Der FK Südfall

Der Forschungskutter FK Südfall steht dem FTZ-Westküste für die wissenschaftlichen Untersuchungen im Wattenmeer zur Verfügung.

Technische Daten :	
Gesamtlänge	19,0 m
Breite	5,0 m
Tiefgang	1,6 m
Motorenleistung	2 x 165 kW
Max. Geschwindigkeit	9 kn



Die Südfall ist ein Forschungskutter, der dem Institut zur Verfügung steht und die wissenschaftlichen Untersuchungen im Wattenmeer ermöglicht.

Zur weiteren Ausrüstung der Südfall gehören: Radar, Autopilot, UKW-Seefunk, Echolot, Sedimentecholot, 2 x Differential-GPS, 2 elektronische Seekartensysteme, Flossenstabilisatoren, hydraulischer A-Galgen mit Winde, Bordkran mit 800 kg und elektrischer Kran mit 500 kg Tragkapazität. Das Schiff bietet Platz für 6 Wissenschaftler und 2 Mann Besatzung. Das Bordnetz bietet 220 Volt Wechselspannung, sowie 12 und 24 Volt Gleichspannungsversorgung.

Auf der ersten Ausfahrt mit der Südfall wurde der AOA auf der Strecke Büsum – Helgoland unter *in situ* Bedingungen getestet. Es galt Erfahrungen mit den eingesetzten Messgeräten zu sammeln und die Einsatzmöglichkeiten der Systeme zu optimieren.

## 7.2. Durchführung der Messungen

Auf der Fahrt am 29.3.99 mit der FK Südfall nach Helgoland wurden an mehreren Stationen Wasserproben der Nordsee entnommen. Um 11:30 lief das Schiff kurz vor dem Erreichen des höchsten Wasserstandes (HW 12:19 Uhr) Richtung Helgoland aus. Um 12:10 Uhr wurde die erste Station bei  $54^{\circ}7'93''$  nördlicher Breite und  $8^{\circ}43'33''$  östlicher Länge erreicht. Das Schiff wurde an der Station gestoppt und mit einem 10 Liter Eimer Oberflächenwasser (Tauchtiefe des Eimers ca. 1 m) abgeschöpft. Messungen an 5 Stationen auf dem Transect (siehe Abbildung 7.2-1) wurden realisiert. Die Anzahl der Stationen war im wesentlichen von der für die Abfiltrierung der HPLC-Proben benötigten Zeit bestimmt.

Für die Messungen sind drei Bereiche der Nordsee zu unterscheiden. Die Proben der ersten Station wurden im Tidebereich des Wattenmeeres genommen. Die zweite Station erfasste den Wasserkörper in den äußeren Ausläufern des Wattenmeeres. Für die dritte Station wurde der Übergang in den Tiefwasserbereich gewählt, während die letzten beiden Proben an Positionen genommen wurden, in denen die Nordsee eine Tiefe von über 30 Meter hat.

**Abbildung 7.2-1: Die fünf Stationen der ersten Ausfahrt**

Auf der Fahrt von Büsum nach Helgoland wurden an den Stationen (weiße Punkte) Wasserproben genommen. Das Echolot ermittelte die Tiefe (durchgezogene Linie), die zugehörige Skala befindet sich am linken Rand.



Das entnommene Wasser wurde sofort mit dem AOA und dem Küvettenfluorometer analysiert. Der AOA entnahm die Proben durch eine Schlauchpumpe selbstständig direkt aus

dem an Deck gehaltenen Eimer. Für das Küvettenfluorometer wurde eine Glasküvette (25 x 25 x 45 mm) direkt aus dem Eimer befüllt und vermessen. Temperatur und Salzgehalt wurden mit einer CTD-Sonde ermittelt. Diese Tauchsonde wurde auf die Probenentnahmetiefe von 1 Meter gebracht. Parallel dazu wurde eine Probe für die HPLC-Analyse aufbereitet. An jeder Station wurde eine Probe von 200 ml und eine von 400 ml Seewasser unter einem leichten Unterdruck von 0,2 bar auf einen Whatman GF/F Filter (47 mm Durchmesser) abfiltriert. Der Filter wurde gefaltet in ein PP-Röhrchen (14 ml, Greiner) gesteckt und dann bei einer Temperatur von -18°C eingefroren. Zusätzlich wurde eine Probe von 10 ml Seewasser in PP-Röhrchen mit 100 µl Formol versetzt und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Diese Proben dienten der späteren Analyse mit dem Durchflusszytometer (FCM). Die Positionen der Stationen wurden über das GPS (Global Positioning System) des Schiffes ermittelt. Die Daten der Fluorometer stehen direkt nach der Messung zur Verfügung. Die Proben für die HPLC-Analyse und das FCM können erst nach der Rückkehr im Labor analysiert werden, eine Bestimmung der Pigmente bzw. der Zellzahlen des Phytoplanktons ist so meistens erst Tage später möglich.

### 7.3. Messergebnisse der ersten Ausfahrt

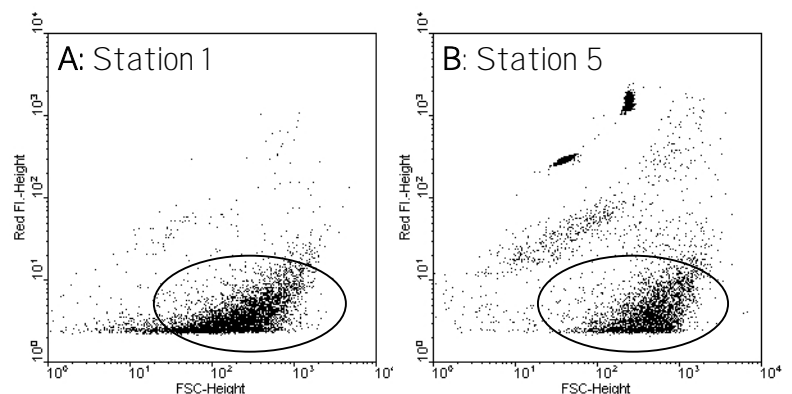
Die Ergebnisse der verschiedenen Messsysteme von den Nordseeproben werden nun nacheinander vorgestellt.

#### 7.3.1. Ergebnisse der FCM-Messungen

Für die Untersuchung wurden die Proben für das FCM mit fluoreszierenden Partikeln (Beads) versetzt. Diese Beads dienen der Kontrolle, um die Einstellung der Verstärkung des Gerätes kontrollieren zu können. Die Ergebnisse der Durchflusszytometermessungen für die Proben zeigen für die Stationen 1 und 5 das folgende Bild:

**Abbildung 7.3-1 A & B:**  
**FCM-Messdaten der ersten Ausfahrt**

Diese beiden Darstellungen zeigen die Messdaten des FCM's für die erste und die letzte Station. Gegeneinander aufgetragen sind die Rotfluoreszenz (Red Fl. – Height) gegen die Größe der Partikel (FSC-Height).

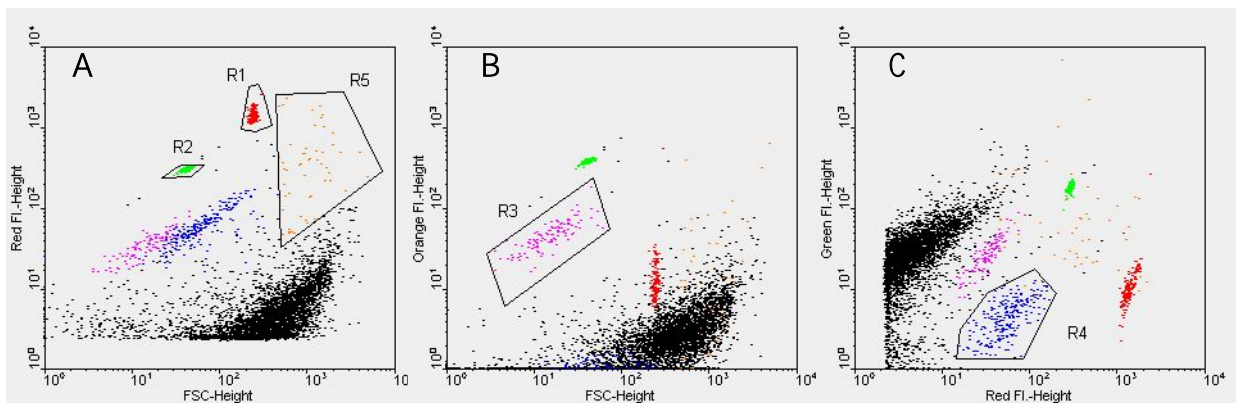


Beide Graphen (Abbildung 7.3-1 A & B) zeigen eine starke Ansammlung von Partikeln mit einer geringen Rotfluoreszenz für ein recht starkes FSC Signal (~ Größe der Partikel). Für Freilandproben werden die Partikel eines solchen Pulks (markiert durch die Ellipsen in Abbildung 7.3-1 A & B) als Sediment oder photosynthetisch nicht mehr aktives Material, im allgemeinen als Untergrund bezeichnet, identifiziert. Im Vergleich zum Untergrund fällt die geringe Menge an fluoreszierenden Partikeln auf.

**Abbildung 7.3-2 A-C: Festlegung der Regionen der Phytoplanktongruppen für die erste Ausfahrt**

Die Regionen am Beispiel der Ergebnisse für die vierte Station der Ausfahrt nach Helgoland.

- A: R1 und R2 sind die hinzugefügten Kontrollbeads, R5 sind Diatomeen oder Dinoflagellaten,
- B: durch R3 sind Picoprokaryoten markiert, also eine sehr kleine Cyanobakterienart,
- C: Picoeukaryoten in R4, wahrscheinlich eine Prasinophyceae,



Die den Proben der Stationen hinzu gegebenen Kontrollbeads sind durch die Regionen R1 und R2 in Abbildung 7.3-2 A markiert. In Abbildung 7.3-2 B ist deutlich ein Puls von Phytoplankton zu erkennen, welcher sich von dem Untergrund absetzt und eine hohe Orangefluoreszenz zeigt. Das deutet auf Algen hin, die das Pigment Phycoerythrin enthalten. Für die Nordsee lässt sich aufgrund der Erfahrung sagen, dass es sich bei dieser Gruppe um Picoprokaryoten und hierbei speziell um Cyanobakterien handelt. Die Region R4 in Abbildung 7.3-2 C hingegen markiert Picoeukaryoten. Für die Nordsee handelt es sich dabei typischerweise um Chloro- oder Prasinophyceae. Die Algenzellen der Region R5 sind Diatomeen oder Dinoflagellaten. Dies ist nicht direkt aus diesen Graphen zu erkennen. Durch das Ergebnis der HPLC-Analyse ist bekannt, dass es sich bei der dominierenden Algenklasse um Diatomeen handelt. Das Phytoplankton aus R5 ist im Vergleich zu den Gruppen R3 und R4 wesentlich größer und enthält damit auch entsprechend mehr Chlorophyll-*a*.

Die Lage der Regionen wird durch den Anwender festgelegt. Es bedarf einer großen Erfahrung im Arbeiten mit dem FCM, um eine sinnvolle Einteilung der Algen durch die entsprechende Positionierung der Regionen vorzunehmen. Die Bestimmung der Algenklasse einer Region wiederum anhand der FCM-Daten ist nur durch langjährige Untersuchungen an dem Seegebiet und dem Wissen über zu erwartendes Phytoplankton möglich. Im Zweifelsfall ist immer eine mikroskopische Kontrolle nötig.

Die Auswertung der FCM-Daten mittels der Festlegung der Regionen ergibt die Anzahl der Partikel der Region (und damit für die identifizierten Algenklassen die Zellzahlen). Für alle Stationen wird nun der prozentuale Anteil der Partikel einer Region an der Gesamtmenge bestimmt:

**Tabelle 7.3-1: Prozentualer Anteil der Zellzahl der Algenklassen an der mit dem FCM gezählten Gesamtpartikelmenge**

Die angegebene korrigierte Gesamtzahl ist die gezählte Gesamtmenge minus der Anzahl der Kontrollbeads. In den eckigen Klammer ([ ]) ist die festgelegte Region der Algenklasse angegeben (vgl. Abbildung 7.3-2 A – C).

FCM	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Korr. Gesamtzahl	10963 Partikel	47404 Partikel	10754 Partikel	5182 Partikel	5143 Partikel
Cyanobakterien [R3]	0,43%	0,36%	2,30%	3,01%	3,01%
Prasinophyceae [R4]	0,73%	0,92%	4,77%	7,41%	8,38%
Diatomeen [R5]	0,38%	0,58%	1,03%	3,13%	3,73%

Der prozentuale Anteil der Phytoplanktongruppen an der Anzahl der gezählten Partikel ist gering. Der Anteil steigt von Station 1 bis zur Station 5 stetig an. Gezählt werden neben den Algenzellen auch Sedimentkörner, Bakterien und organische Fragmente, von denen eine scheinbare Fluoreszenz (Streulicht) ausgeht. Im Ästuarbereich des Wattenmeeres ist grundsätzlich mit einem hohen Gehalt an Sediment zu rechnen. Für die Stationen 1 und 2 waren deshalb geringere prozentuale Anteile der Zellzahlen des Phytoplanktons an der Gesamtzahl der Partikel zu erwarten.

Eine quantitative Bestimmung des Chlorophyll-*a* Gehaltes der drei Phytoplanktongruppen ist mit den vorliegenden Ergebnissen nur unter bestimmten Annahmen möglich. Zur Bestimmung der Chl.a-Konzentration pro Liter muss der mittlere Chl.a-Gehalt einer Zelle der Algengruppe bekannt sein. Über die Zellzahlen der einzelnen Gruppen und den Chl.a-Gehalt pro Zelle kann dann der Chl.a-Gehalt der einzelnen Gruppen bestimmt werden.

Für die Gruppen von Phytoplankton in einer Freilandprobe ist der Chl.a-Gehalt pro Zelle im allgemeinen aber nicht bekannt.

### 7.3.2. Die Zellzahlen und die Rotfluoreszenz aus der FCM-Messung

Über die drei Algenklassen, die durch die Regionen in Abbildung 7.3-2 A – C vom FCM getrennt werden konnten, lassen sich bis auf Zugehörigkeit zu den drei Klassen keine spezifischeren Aussagen über die Algen machen. Dazu ist eine mikroskopische Untersuchung vonnöten. Um weitere Schlussfolgerungen ziehen zu können, wird angenommen, dass sich Ergebnisse des PriPro-Workshops [Ruser et al. 1999] auf die *in situ* Daten übertragen lassen.

#### 7.3.2.1. Chl.a-Bestimmung über die Zellzählung des FCM

Auf dem PriPro-Workshop wurden die mittleren Chlorophyll-*a* Konzentrationen pro Algenzelle für die Algenarten *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Synechocystis spec. 6803* (Cyanobakterie) und *Thalassiosira weissflogii* (Diatomee) ermittelt.

Unter der Annahme, dass der Chl.a-Gehalt pro Zelle der Chlorophyceae gleich dem der Prasinophyceae ist und dieses auch für die weiteren Algenklassen gilt, könnte die Chl.a-Konzentration der drei Algenklassen über die Zellzahl berechnet werden.

Der Chl.a-Gehalt einer Algenzelle hängt (selbstverständlich auch) von der Größe der Zellen ab. Durch einen Vergleich der Werte für das Streulichtsignal (FSC ~ Größe), Kap 4.3) zeigt sich eine vergleichbare Größe der Algenzellen für die Diatomeen und die Cyanobakterien der Spezies auf dem Workshop zu den Algen in den Wasserproben der Stationen (Regionen R3 und R5 in Abbildung 7.3-2). Dies lässt die Annahme zu, dass der Chl.a-Gehalt pro Zelle der PriPro98-Ergebnisse auf die Freilandspezies für die beiden Algenklassen mindestens in der Größenordnung vergleichbar ist. Für die Grünalge *Dunaliella salina* wurde auf dem PriPro98 ein mittleres FSC dieser Algenart ermittelt, dass um mindestens einen Faktor 10 größer als das mittlere FSC der Prasinophyceae in den *in situ* Proben ist. Ist dann entsprechend der Chl.a-Gehalt pro Zelle für die Prasinophyceae gegenüber der Chlorophyceae aufgrund der Volumenverringerung ( $\sim r^3$ ) um den Faktor 1000 kleiner? Dies ist sehr unwahrscheinlich!

Die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes pro Zelle an Prasinophyceae Arten aus dem Atlantik [Simon et al. 1995, Simon et al. 1994] ergab einen Chl.a-Gehalt pro Zelle von 2,5 – 13,0 fg bei einer Größe der dort betrachteten Zellen zwischen 1,2 – 2,6  $\mu\text{m}$ . Nimmt man deshalb „nur“ einen um den Faktor 100 geringeren Chl.a-Gehalt pro Zelle für die Prasinophyceae gegenüber der Alge *Dunaliella salina* an, so ergibt sich der Chl.a-Gehalt pro Zelle der Prasinophyceae zu 15 fg Chl.a pro Zelle.

**Tabelle 7.3-2: Angenommener mittlerer Chl.a-Gehalt pro Algenzelle und zugeordnete Regionen der in situ Daten (Abbildung 7.3-2)**

		<i>Dunaliella salina</i>	<i>Synechocystis spec. 6803</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>
<b>Verhältnis:</b>		<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>Diatomeen</b>
Chlorophyll- <i>a</i> Gehalt pro Zelle	[fg Chl.a Zelle <sup>-1</sup> ]	15,0	19,4	622,0
Region Abbildung 7.3-2 A – C		R4	R3	R5

Damit lässt sich die Chlorophyll-*a* Konzentration pro Liter der Freilandalgenklassen berechnen.

**Tabelle 7.3-3: Hypothetische Chl.a-Konzentration der Algenklassen nach den ermittelten Zellzahlen**

<b>FCM Zellzahlen</b>	<b>Chl.a</b>	<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>	<b>Station 4</b>	<b>Station 5</b>
Prasinophyceae	[µg/l]	0,03	0,02	0,03	0,04	0,02
Cyanobakterien	[µg/l]	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00
Diatomeen	[µg/l]	7,36	12,05	13,80	5,03	7,59

### 7.3.2.2. Chl.a-Bestimmung durch die Messung der Rotfluoreszenz

Um von der Größe der Zellen und ihrem Chl.a-Gehalt unabhängig zu werden, wird die Hypothese der Übertragbarkeit der PriPro-Ergebnisse auf die *in situ* Daten für eine weitere Betrachtung modifiziert.

Die Vergleichbarkeit des ermittelten Chl.a-Gehaltes pro Zelle für die Algenklassen auf dem PriPro98 und den Freilandalgenklassen braucht nicht mehr gefordert zu werden.

Es soll nun die Bestimmung der Chl.a-Konzentration über die Integration der Rotfluoreszenz (~ Chl.a) der durch die Regionen R3 – R5 markierten Algenklassen in Abbildung 7.3-2 A erfolgen. Die gesamte gemessene Rotfluoreszenz einer Algenklasse ergibt sich zu:

#### **Gleichung 7.3-1**

$$F_{\text{Chl.a}}(\text{Region}) = \sum_{\text{Region}} F_{\text{Zelle}}$$

Auf dem PriPro-Workshop wurden die Chl.a-Gehalt zu Rotfluoreszenz Verhältnisse für die drei Algenarten bestimmt. Die Annahme ist nun, dass sich diese Verhältnisse für die Arten auf die ganze Algenklasse im Freiland übertragen lassen.

**Tabelle 7.3-4: Mittleres Chl.a-Gehalt zu Rotfluoreszenz Verhältnis der Algenarten (PriPro98)**

		<i>Dunaliella salina</i>	<i>Synechocystis spec. 6803</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>
<b>Verhältnis:</b>		<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>Diatomeen</b>
Chlorophyll- <i>a</i> / Rotfluoreszenz	[µg Chl.a ]	1,72E-09	9,22E-10	1,84E-09
Region Abbildung 7.3-2 A		R4	R3	R5

Nach der Bestimmung der gesamten Rotfluoreszenz einer Region ( $F_{\text{chl.a}}$ (Region)) kann durch eine einfache Gleichsetzung mit dem Ergebnis des Workshops der Chl.a-Gehalt der Algenklassen der Wasserproben der Ausfahrt bestimmt werden.

Voraussetzung hierfür ist ein ähnliches Chl.a-zu-Rotfluoreszenz Verhältnis der Klassen der Chloro- und der Prasinophyceae.

**Tabelle 7.3-5: Hypothetische Chl.a-Konzentration der Algenklassen nach der ermittelten Rotfluoreszenz**

<b>FCM Rotfluoreszenz</b>	<b>Chl.a</b>	<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>	<b>Station 4</b>	<b>Station 5</b>
Prasinophyceae <sup>(*)</sup>	[µg/l]	0,12	0,09	0,16	0,19	0,08
Cyanobakterien	[µg/l]	0,01	0,01	0,03	0,02	0,00
Diatomeen	[µg/l]	0,33	0,70	0,95	0,26	0,38

**Zwischenbewertung der FCM-Ergebnisse:**

Im Vergleich der Bestimmung der Chl.a-Konzentrationen der drei Algenklassen über die Zellzahlen und die Rotfluoreszenz zeigt sich, dass der Chl.a-Gehalt pro Liter der Picoprokaryoten (Cyanobakterien) unter 30 ng Chl.a pro Liter liegt. Für die Picoeukaryoten (Prasinophyceae) ergibt die Abschätzung über die Zellzahlen einen maximalen Chl.a-Gehalt dieser Algenklasse von 0,04 µg Chl.a pro Liter, über die Rotfluoreszenz einen Gehalt von 0,19 µg Chl.a pro Liter. Uneinheitlich werden die Ergebnisse der beiden Abschätzungen aber für die Diatomeen. Dem Chl.a-Gehalt nach der Bestimmung über die Zellzahlen von maximal 14 µg Chl.a pro Liter steht ein Gehalt von nur 1 µg Chl.a pro Liter nach der Bestimmung durch die Rotfluoreszenz gegenüber.

Der gravierende Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Arten der Chl.a-Berechnung lässt sich mit den Daten des FCM's alleine nicht aufklären. Die Chl.a-Gehaltsbestimmung von Wasserproben durch das FCM durch die Verwendung der Gesamtrofluoreszenz sowie der Anzahl der Algenzellen einer Region wird im Kapitel 11 untersucht.



### 7.3.3. Ergebnisse der HPLC-Analyse

Die während der Fahrt für die HPLC-Analyse filtrierte und dann in PP-Röhrchen (14ml, Greiner) eingefrorenen Probenfilter (Whatman GF/F Glasfiberfilter, Ø 47 mm) wurden unter der Zugabe von 5 ml Azeton und Glaskügelchen mit einer Zelmühle (Vibrogenzelmühle VI4, Bühler) für 3 Minuten gemahlen. Anschließend wurde die Probe bei 4000 Umdrehungen pro Minute (mit 72.5facher Erdbeschleunigung) für 10 Minuten zentrifugiert, um die Rückstände des Glasfiberfilters entfernen zu können. Nach einer weiteren Filterung durch einen 0.2 µm Teflonfilter (Spritzenvorfilter; PTFE no name product) wurde ein 0.75 ml großer Anteil der Probe mit 0.25 ml Ammoniumazetat für drei Minuten inkubiert.

Das Extrakt wurde mit einem HPLC-System von Thermo Separation Products (mit einem PC400, automatischem Probenwechsler AS300 mit Kühlung und Preparation Mixer, Fluoreszenzdetektor FL2000, Photometer Spectrafocus, Nucleosil C18-Säule, Lösungsmittel A bestehend aus 80% Methanol, 10% ion-pairing Lösung und 10% destilliertem Wasser, Lösungsmittel B bestehend aus 60% Methanol und 40% Azeton) nach einer leicht abgewandelten Methode von Mantoura & Llewellyn [1983], Details bei Meyerhöfer [1994], vermessen. Mit diesem Messsystem ist der Nachweis von 16 Pigmenten des Photosyntheseapparates möglich. Zu diesen Pigmenten gehören das Zea-, Fuco-, Allo-, Prasino-, Neo-, Viola-, 19-hex-fuco- und Diadinoxanthin sowie Lutein, Peridinin, Phaeophytin-a, α- and β-Carotin, und Chlorophyll-a, -b und -c. Die Menge an detektiertem Chl.c besteht aus der Summe an Chl.c<sub>1</sub> und c<sub>2</sub>. Ebenso lassen sich die Pigmente Lutein und Zeaxanthin mit der verwendeten Methode nicht trennen. Bei einem einzelnen Vorkommen nur eines dieser Pigmente kann es identifiziert werden, ansonsten wird immer das in der größeren Menge vorhandene Pigment angezeigt.

Die Ergebnisse für die Proben der einzelnen Stationen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Aufgrund der sehr langen Filtrationszeit von bis zu 30 Minuten für die 400 ml Probe stellte sich die Frage nach der Degradierung der photosynthetischen Pigmente durch eine Schädigung der Algenzellen. Die unterschiedlichen Mengen von 200 und 400 ml für die parallelen Bestimmungen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die beiden Ergebnisse einer Station wurden jeweils zusammengefasst und der Mittelwert gebildet.

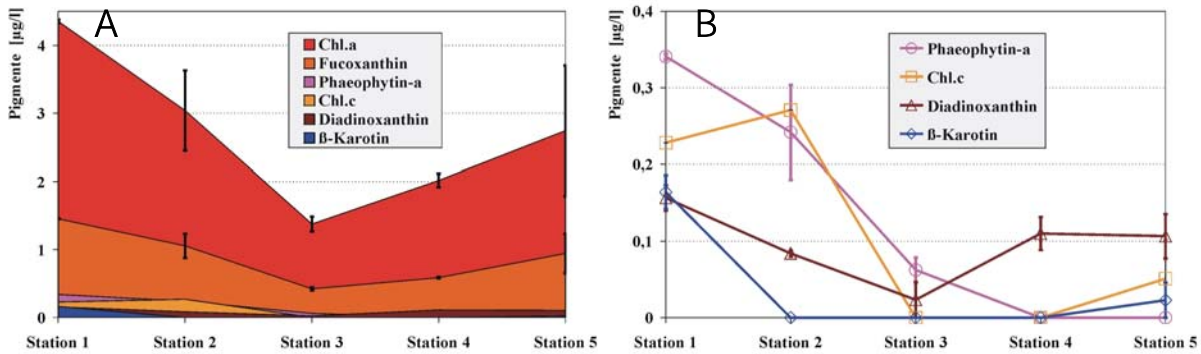
**Tabelle 7.3-6: Ergebnisse der HPLC-Pigmentanalyse für die erste Ausfahrt**

Von den 16 identifizierbaren Pigmenten konnten 6 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden aus dem Mittelwert zweier Proben ermittelt. Nicht angegebene Werte (markiert durch -) für die Standardabweichung bedeuten, dass nur ein Wert ermittelbar war.

HPLC	Chl.a	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Fucoxanthin	[µg/l]	<b>1,45</b> ± 0,01	<b>1,05</b> ± 0,18	<b>0,42</b> ± 0,02	<b>0,59</b> ± 0,01	<b>0,94</b> ± 0,29
Phaeophytin a	[µg/l]	<b>0,34</b> ± 0,00	<b>0,24</b> ± 0,06	<b>0,06</b> ± 0,02	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00
Diadinoxanthin	[µg/l]	<b>0,16</b> ± 0,02	<b>0,08</b> ± 0,00	<b>0,02</b> ± 0,02	<b>0,11</b> ± 0,02	<b>0,11</b> ± 0,03
Chlorophyll-c	[µg/l]	<b>0,23</b> -	<b>0,27</b> -	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,05</b> ± 0,05
β –Carotin	[µg/l]	<b>0,16</b> ± 0,02	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,02</b> ± 0,02
Chlorophyll-a	[µg/l]	<b>4,35</b> ± 0,02	<b>3,04</b> ± 0,59	<b>1,38</b> ± 0,11	<b>2,02</b> ± 0,10	<b>2,74</b> ± 0,96

**Abbildung 7.3-3 A & B: Ergebnisse der HPLC-Pigmentanalyse für die erste Ausfahrt**

Die HPLC-Ergebnisse aus Tabelle 7.3-6 in der graphischen Darstellung. Die Abbildung B zeigt einen Ausschnitt für Pigmentkonzentrationen bis 0,4 µg/l der Abbildung A.



Alle Pigmente, die nicht unter der Nachweisgrenze der HPLC-Analyse liegen, sind für die Klasse der Diatomeen typisch (siehe Kap. 3.2). Dieses trifft zwar auch auf die Klasse der Dinoflagellaten zu, aber da das Pigment Peridinin nicht nachgewiesen werden konnte, welches als Markerpigment für diese Klasse gilt, gilt der Zuschlag den Diatomeen. Weitere Algenklassen sind ebenfalls nicht nachzuweisen. Keines der Markerpigmente anderer Klassen wie Zeaxanthin, Alloxanthin, Peridinin, Prasinoxanthin, Chlorophyll-*b*, Lutein, Neoxanthin oder Violaxanthin war zu identifizieren. Dies bedeutet nicht, dass diese Algenklassen nicht vorhanden sein können, deren Konzentration ist aber so gering, dass ihr Beitrag zum Gesamtpigmentgehalt unter der Auflösungsgrenze liegt.

### 7.3.4. Messergebnisse des Algae Online Analysers

Die von der Firma bbe Moldaenke voreingestellten Werte für die Fingerprints des AOA's erwiesen sich für die Messungen an Nordseewasser als ungeeignet. Die spektralen

Unterschiede zwischen den Süßwasseralgen und Salzwasserspezies sind zu groß, und so wurden zum Teil die auf dem PriPro98-Workshop [Ruser et al. 1999] ermittelten Fingerprints (vgl. Kap. 5.6) für diese Ausfahrt verwendet.

#### 7.3.4.1. Messungen an einzelnen Stationen (Hinfahrt)

Die Messungen mit dem AOA wurden direkt an Bord der Südfall an den genommenen Wasserschöpferproben durchgeführt. Die Ergebnisse standen nach wenigen Minuten Messzeit zur Verfügung. An jeder Station wurden mit dem AOA drei Messungen durchgeführt. Die Zuführung einer Probe in die Messkammer des Gerätes erfolgte durch das Einpumpen mit einer am Gerät installierten Schlauchpumpe in 30 Sekunden.

**Tabelle 7.3-7: Parametereinstellung des AOA's auf der ersten Ausfahrt**

Parameter	f	f <sub>0</sub>	f <sub>M</sub>	Trans.	Probe
	[s]	[s]	[ms]	[s]	einpumpen
Dunkelphase		60			[s]
Adaptation	30	60			30
Messung	60	60	2000	10	auspumpen
Integrationszeit			200		[s]
f <sub>0</sub> / f-Teiler		1 /100			5

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Ermittlung der Algengruppen sind die spektralen Fingerprints, durch die eine Algendifferenzierung und die Chlorophyll-*a* Bestimmung erst möglich wird (Kap. 5.5.2). Mittels dieser Einstellungen wurden die folgenden Ergebnisse an den Stationen ermittelt:

**Tabelle 7.3-8: Algengruppenerkennung durch den AOA auf der ersten Ausfahrt**

Diese Ergebnisse wurden aus drei Messungen gemittelt. Die blaue und gemischte Gruppe wurden nicht identifiziert.

AOA	Chl.a	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Grüne Gruppe	[µg/l]	<b>1,45</b> ± 0,03	<b>1,44</b> ± 0,11	<b>0,37</b> ± 0,05	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00
Blaue Gruppe	[µg/l]	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00
Braune Gruppe	[µg/l]	<b>7,84</b> ± 0,31	<b>6,18</b> ± 0,31	<b>2,94</b> ± 0,25	<b>4,09</b> ± 0,31	<b>5,45</b> ± 0,80
gemischte Gruppe	[µg/l]	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00	<b>0,00</b> ± 0,00
Gesamtgehalt	[µg/l]	<b>9,29</b> ± 0,34	<b>7,63</b> ± 0,20	<b>3,31</b> ± 0,31	<b>4,09</b> ± 0,31	<b>5,45</b> ± 0,80

Von den vier möglichen spektralen Gruppen wurden die braune und die grüne Gruppe in der Wasserprobe durch den AOA identifiziert.

Für die Nordsee sind als typische Vertreter der braunen Gruppe Diatomeen und Dinoflagellaten anzusehen, für die grüne Gruppe sind es die Algenklassen der Chloro- und der Prasinophyceae. Die Größe der Standardabweichungen der Ergebnisse der Algen-differenzierung liegt bei ca. 10% und besser.

Die Erfassung der minimalen ( $f_o$ ) und maximalen ( $f_M$ ) Fluoreszenz durch den AOA ermöglicht die Berechnung der photosynthetischen Aktivität  $\Phi$  für jede der spektralen Algengruppen.

Die Lösung der Gleichung 5.4-3 (Kap. 5.4) zur Bestimmung der Aktivität der Algengruppen wird vom AOA im Anschluss an die Messung berechnet.

**Tabelle 7.3-9: Bestimmung der photosynthetischen Aktivität durch den AOA auf der ersten Ausfahrt**

Leere Zellen stehen für eine nicht bestimmbare Aktivität (Division durch Null für  $f_M$  gleich Null). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus 3 Messungen berechnet.

AOA		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Grüne Gruppe	r.E.		<b>0,34</b> ± 0,05	<b>0,76</b> ± 0,12		
Braune Gruppe	r.E.	<b>0,31</b> ± 0,07	<b>0,29</b> ± 0,09	<b>0,33</b>	<b>0,35</b> ± 0,20	<b>0,41</b> ± 0,07
Gesamtgehalt	r.E.	<b>0,19</b> ± 0,04	<b>0,23</b> ± 0,07	<b>0,28</b> ± 0,01	<b>0,35</b> ± 0,20	<b>0,41</b> ± 0,07

Die photosynthetische Aktivität des gesamten Phytoplanktons zeigt eine von 0,19 bis zu 0,41 ansteigende Tendenz von Station zu Station. Die spezifische Aktivität der braunen Algengruppe dagegen steigt im Vergleich mit der Aktivität des gesamten Phytoplanktons „nur“ von 0,29 auf 0,41. Der absolute Fehler beträgt bis zu 0,2 (Station 4).

Physiologischer Stress durch eine Änderung der Wassertiefe, höhere Lichtintensitäten oder Veränderungen der Temperatur im küstennahen Bereich der Wattflächen können die Ursache für die Verminderung der physiologischen Aktivität sein. Möglicherweise werden die Algenzellen durch den hohen Sedimentgehalt und die hohen Strömungsgeschwindigkeiten in den Prielen auch einfach geschädigt (vgl. Abbildung 7.3-5).

7.3.4.2. Kontinuierliche Messung mit dem AOA (Rückfahrt)

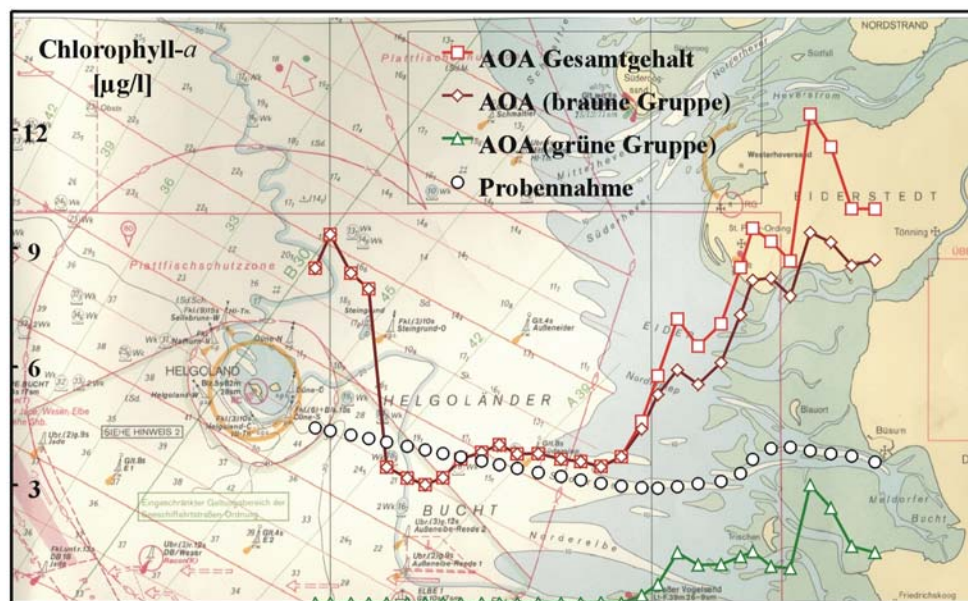
Für die Rückfahrt wurde der Messablauf des AOA's geändert. Die Messungen wurden nicht an einzelnen Stationen wie auf der Hinfahrt durchgeführt, sondern ein vollständiger Schnitt gefahren, ohne die Fahrt durch einzelne Probennahmen zu unterbrechen.

Auf die Probennahme für die HPLC sowie auf Messungen mit der CTD-Sonde und dem Küvettenfluorometer wurde verzichtet, da keine Ergebnisse zu erwarten waren, die nicht

schon durch die Fahrt nach Helgoland gemessen wurden. Ziel dieser Messung war die Verifizierung der Ergebnisse der einzelnen Stationen der Hinfahrt, eine Übersicht über die Phytoplanktonverteilung zwischen Büsum und Helgoland und die Prüfung der Messung der photosynthetischen Aktivität. Die Parametereinstellung des AOA's wurde von der Hinfahrt übernommen (Tabelle 5.3-1). Die Proben wurden über die Schlauchpumpe des AOA's direkt angesaugt. Um eine „frische“ Probe untersuchen zu können, war eine Einpumpzeit von 2 ½ Minuten nötig. Das Intervall wurde deshalb auf 6 Minuten eingestellt. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Koordinaten der Probennahme, welche während der Fahrt genommen wurden (weiße Punkte in Abbildung 7.3-4) und die Ergebnisse der Messung mit dem AOA für die ermittelten spektralen Gruppen, sowie den ermittelten Gesamtgehalt an Chlorophyll-*a* pro Liter.

**Abbildung 7.3-4: Messung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppen auf der Rückfahrt der ersten Ausfahrt**

Auf der Rückfahrt wurde die Messung mit dem AOA kontinuierlich durchgeführt. Die Positionen, ermittelt durch das GPS, der während der Fahrt entnommenen Proben sind durch die weißen Kreise markiert.



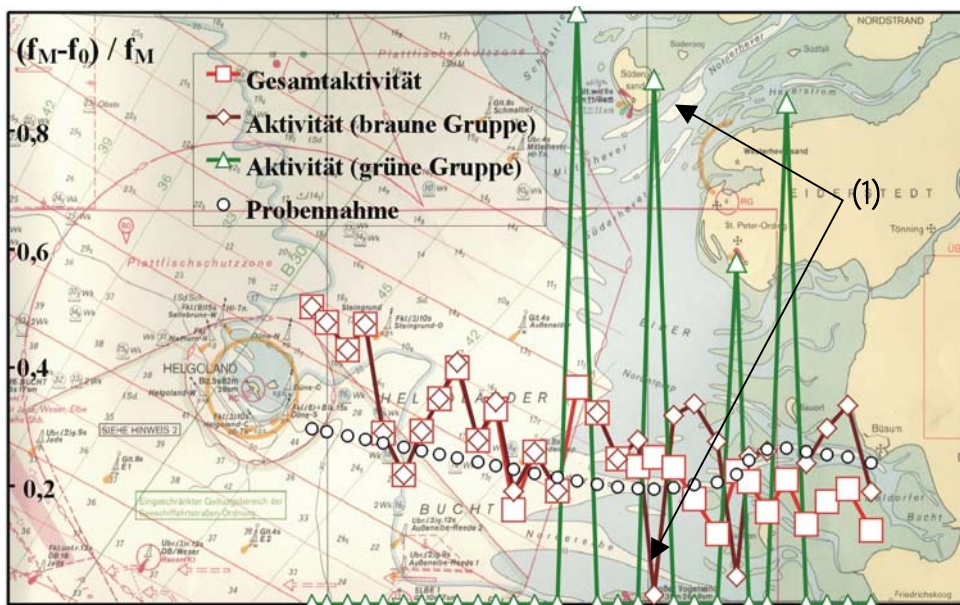
Nach dem Start der Messung vor Helgoland zeigen die ersten Messwerte eine Chlorophyll-*a* Konzentration von bis zu 9 µg Chl.a pro Liter an. Schlagartig sinkt dann aber die Konzentration auf Werte zwischen 3 – 4 µg Chl.a pro Liter ab. Erst in Küstennähe des Wattenmeeres steigt die Konzentration wieder auf höhere Werte (9 – 12 µg Chl.a/l) an. Dominiert wird der Gesamtgehalt der Chl.a-Konzentration durch Algen der braunen spektralen Gruppe. Mit dem Anstieg der Konzentration im Tidebereich geht die Detektierung von Algen einher, die der grünen spektralen Gruppe zugeordnet werden.

Wie schon auf der Fahrt nach Helgoland an den 5 Stationen festgestellt werden konnte, zeigt sich für die Rückfahrt ein sehr ähnliches Bild für die Verteilung des Phytoplanktons auf dem Transsect (vgl. Tabelle 7.3-8). Für die Hinfahrt wurden ebenfalls nur im Nahbereich des Wattenmeeres der grünen spektralen Gruppe zugehörige Algen nachgewiesen.

Zusätzlich zur Bestimmung der Algengruppen wurde die photosynthetische Aktivität gemessen. Diese gibt einen Eindruck über den physiologischen Zustand der Algen. In Tabelle 7.3-9 werden die Ergebnisse zur Messung der photosynthetischen Aktivität an den Stationen der Hinfahrt dargestellt. An den Stationen der Probenahme auf der Hinfahrt wurden je drei Messungen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Auf der Rückfahrt jedoch wird für jede Probenahme nur ein Messwert ermittelt, es können deshalb keine Standardabweichungen angegeben werden.

**Abbildung 7.3-5: Photosynthetische Aktivität der Algengruppen auf der 1.ten Ausfahrt (Rückfahrt)**

Die gruppenspezifische photosynthetische Aktivitätsbestimmung für das Phytoplankton wurde zusammen mit der Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Wasserproben durchgeführt. Die weißen Kreise in der Abbildung entsprechen den Koordinaten der Probenentnahme.



Die Aktivität des Gesamtgehaltes zeigt einen stetig abfallenden Trend in Richtung der Küste. In der Nähe von Helgoland wurde eine Aktivität von 0,5 ermittelt, die bis zum Erreichen von Büsum auf unter 0,2 gefallen ist.

Für die erste Hälfte des Transsekt stimmen die Ergebnisse der braunen spektralen Gruppe

mit denen des Gesamtgehaltes nahezu überein. Da für diesen Abschnitt der Fahrt nur Algen der braunen spektralen Gruppe identifiziert wurden, ist dieses Ergebnis zu erwarten. Mit dem Beginn der Identifizierung der grünen spektralen Gruppe (vgl. Abbildung 7.3-4) ab der Hälfte der Strecke Helgoland – Büsum laufen die Kurven für die Gesamtaktivität und der Aktivität der braunen Gruppe auseinander. Während die Gesamtaktivität weiter fällt, schwankt der Wert für die braune Gruppe sehr stark und kann in einigen Fällen gar nicht bestimmt werden ( $\Phi$  für die braune Gruppe gleich Null). Die Werte der Aktivität für die grüne Gruppe werden nur für vier Probenahmen vom Fitverfahren als ungleich Null bewertet, wobei dann aber die Aktivität der braunen Gruppe nicht erfasst wird oder einen stark verminderten Wert (markiert durch (1) in der Graphik) aufweist.

Anmerkung:

Hier wird das Problem der Ähnlichkeit der Fingerprints für die grüne und die braune spektrale Gruppe sichtbar (Kap. 6.3). Allerdings ist doch beruhigend, dass in der Mehrzahl der Fälle die grüne spektrale Gruppe eindeutig eliminiert wird und nur in vier Fällen das Rauschen oder ein nicht berücksichtigter Fluoreszenzstoff zu einer Fehleinschätzung führt.

### 7.3.5. Ergebnisse des Küvettenfluorometers

Das Küvettenfluorometer (kurz: Küvette) bestimmt, wie auch der AOA, den Chlorophyll-*a* Gehalt der Wasserproben durch die Messung der Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich von 680 – 720 nm. Die Anregung der Probe erfolgt durch das Licht von LED's mit einer Wellenlänge von 470nm. Die Kalibrierung der Fluoreszenzemission auf den Chlorophyll-*a* Gehalt erfolgte an der Diatomee *Thalassiosira weissflogii* im Labor (Aufzucht der Alge erfolgte in Analogie zu den Bedingungen in Kapitel 5.5.1).

**Tabelle 7.3-10: Parameter des Küvettengerätes für die erste Ausfahrt**

Parameter	f	f <sub>0</sub>	f <sub>M</sub>	Trans	Probe
	[s]	[s]	[ms]	[s]	
Dunkelphase		60			Rühren
Adaptation	60	60			[s]
Messung	60	10	1000	10	10
Int. Zeit			200		
f <sub>0</sub> /f-Teiler		1/100			

In der festgelegten Abfolge der Messroutinen wird zunächst f<sub>0</sub>, dann f<sub>M</sub>, anschließend f und zum Schluss die Transmission (Trans) bestimmt.

Der Ablauf der Messroutinen des Küvettenfluorometers ist mit der des AOA's identisch (siehe Kap. 5.3 für eine ausführliche Beschreibung) Nach der Probenahme von Seewasser an den Stationen wurde die Küvette sofort befüllt, ein Rührfisch hinzugegeben und vermessen.

Um die Sedimentation des Phytoplanktons bis zur Messung zu verhindern und eine homogene Verteilung der Algenzellen zu gewährleisten, wird die Probe für fünf Sekunden mittels des Rührfisches durchgemischt.

**Tabelle 7.3-11: Messergebnisse des Küvettengerätes für die erste Ausfahrt**

Mittelung der Messung an je drei Proben der einzelnen Stationen.

<b>Küvette</b>		<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>	<b>Station 4</b>	<b>Station 5</b>
Chlorophyll- <i>a</i>	[ $\mu\text{g/l}$ ]	<b>8,23</b> $\pm$ 0,12	<b>6,42</b> $\pm$ 0,12	<b>2,87</b> $\pm$ 0,10	<b>3,26</b> $\pm$ 0,35	<b>5,21</b> $\pm$ 0,36
$(f_M - f_0) / f_M$	[r.E.]	<b>0,41</b> $\pm$ 0,03	<b>0,41</b> $\pm$ 0,02	<b>0,30</b> $\pm$ 0,05	<b>0,53</b> $\pm$ 0,06	<b>0,58</b> $\pm$ 0,11
Transmission	[%]	<b>61,3</b> $\pm$ 0,2	<b>66,9</b> $\pm$ 0,1	<b>92,2</b> $\pm$ 0,5	<b>99,0</b> $\pm$ 0,8	<b>98,2</b> $\pm$ 0,4

Der Chlorophyll-*a* Gehalt zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Stationen im Tidebereich und der offenen See. In Landnähe wurde mit über 8  $\mu\text{g}$  Chl.a pro Liter die höchste Konzentration an Phytoplankton gemessen. In Richtung der offenen See verringert sich die Menge an Phytoplankton auf etwa die Hälfte. Die letzte Station kurz vor Helgoland weist mit mehr als 5  $\mu\text{g}$  Chl.a-Gehalt pro Liter einen erhöhten Wert auf.

Die photosynthetische Aktivität liegt für die Stationen 1 und 2 bei 0,4, fällt an Station 3 auf 0,3 und nimmt dann für die Stationen 4 und 5 Werte über 0,5 an. Die Transmission (kalibriert auf einen Wert von 100 % für künstliches Seewasser mit einer Salinität von 30 ‰) steigt von 61 % im Wattenmeer auf 99 % für den Tiefenwasserbereich.

### 7.3.6. Ergebnisse der CTD-Sonde mit BackScat-Fluorometer

An jeder Station wurde die CTD-Sonde (ECO 144 Tauchsonde, ME Trappenkamp) auf einen Meter Wassertiefe der Probenentnahme gebracht. Der Salzgehalt, die Transmission und die Temperatur wurden ermittelt. Die zusätzliche Ausrüstung der CTD-Sonde mit einem BackScat-Fluorometer (Haardt, Klein-Barkau) ermöglicht die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz. Das BackScat-Fluorometer wurde von der Herstellerfirma auf die Messung des Chlorophyll-*a* Gehaltes pro Liter kalibriert ausgeliefert (1992).



**Tabelle 7.3-12: Messergebnisse der CTD-Sonde mit BackScat-Fluorometer für die erste Ausfahrt**

Mittelung der Messung an je drei Proben der Stationen.

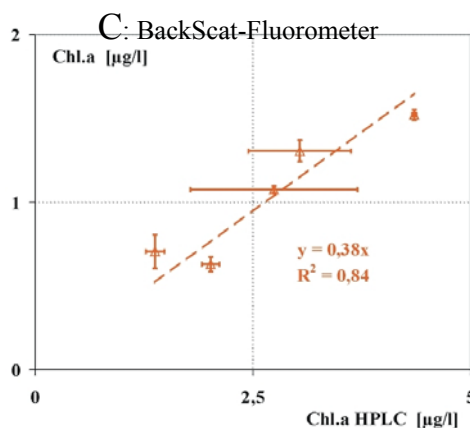
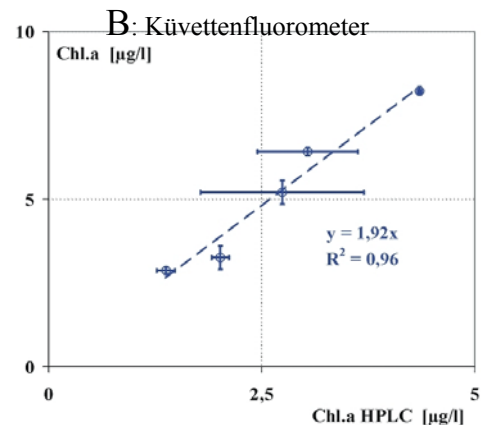
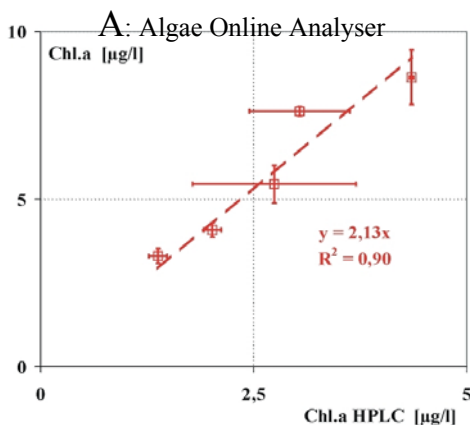
CTD-Sonde		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Transmission	[%]	67,13 ± 0,21	71,87 ± 0,31	86,23 ± 0,12	86,10 ± 1,22	89,43 ± 0,21
Temperatur	[°C]	6,94 ± 0,01	6,49 ± 0,04	6,49 ± 0,01	6,68 ± 0,05	6,38 ± 0,01
Salzgehalt	[ppt]	21,06 ± 0,04	23,73 ± 0,12	28,15 ± 0,02	31,41 ± 0,14	31,83 ± 0,07
Chlorophyll-a	[µg/l]	1,52 ± 0,03	1,31 ± 0,06	0,71 ± 0,10	0,63 ± 0,04	1,08 ± 0,02

## 7.4. Vergleich der Chl.a-Ergebnisse der Messsysteme

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Chlorophyll-a Bestimmung der Messsysteme zeigt einen Unterschied in der Höhe der erfassten Phytoplanktonkonzentrationen. Die Ergebnisse des AOA's, des Küvettengerätes und das BackScat werden nun einander mit der HPLC-Analyse als Standard gegenübergestellt.

**Abbildungen 7.4-1 A-C: Vergleich der Chl.a-Ergebnisse der ersten Ausfahrt**

Die Fehlerbalken der Fluoreszenzmessungen entsprechen der Standardabweichung aus 3 Messungen, für die HPLC-Analyse aus 2 Messungen.



Im Vergleich zur HPLC-Analyse detektieren der AOA und das Küvettenfluorometer eine doppelt so hohe Konzentration an Chl.a an den Stationen der Probennahmen. Das BackScat-Fluorometer hingegen ermittelt einen um eine Faktor von 0,4 geringern Chl.a-Gehalt pro Liter.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der fluorometrischen Chl.a-Erfassung zu den Ergebnissen der nasschemischen Methode in den Abbildung 7.1-1 A – C zeigt im Rahmen der Messgenauigkeit einen linearen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Methoden.

Durch lineare Regression lassen sich Korrekturfaktoren für die Angleichung der Ergebnisse der Chl.a-Bestimmung der Fluorometer zu der HPLC-Analyse ermitteln.

**Tabelle 7.4-1: Korrekturfaktoren für die Fluorometer**

Die Gewichtungsfaktoren zur Korrektur der fluorometrischen Chl.a-Bestimmung an Freilandproben bei einer Eichung der Geräte an im Labor gezogenen Algen.

<b>Chl.a Messung</b>	<b>Korrekturfaktor</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
AOA (Gesamtgehalt)	0,479	0,90
AOA (braune Gruppe)	0,535	0,90
Küvettenfluormeter	0,521	0,96
BackScat-Fluorometer	2,632	0,84

Die Kehrwerte der Steigungen der Regressionsgeraden bilden diese Korrekturfaktoren, um die Laborkalibrierung der Fluorometer auf den Chl.a-Gehalt pro Liter für Freilandproben der Nordsee zu korrigieren. Für die Berechnung der Regressionsgeraden wurde der zusätzliche Punkt (0,0) hinzugefügt. Wie der Vergleich mit der Regression ohne den Schnittpunkt in (0,0) ergab, ändern sich die Gewichtungsfaktoren nur geringfügig.

Anmerkung:

Eine additive Konstante in der linearen Regressionsgleichung würde für einen falsch eingestellten Offset der Geräte sprechen. Da die Geräte offsetkorrigiert wurden, gibt es keinen Grund für einen mathematischen Ansatz mit additiver Konstante. Die geringe Anzahl an Stationen und die sehr hohe Standardabweichung für die Chl.a-Bestimmung der HPLC-Analyse für zwei von fünf Stationen macht eine gesicherte Aussage über eine eventuelle Offsetverschiebungen statistisch zu unsicher.

Die Kalibrierung der Fluorometer wurde an im Labor gezogenen Algen durchgeführt. Wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, lassen sich die Eichungen mittels Laborkulturen nicht direkt auf Algenpopulationen in einer natürlichen Umgebung übertragen, weil die Algen im Labor unter Standardbedingungen, im Freiland jedoch unter variablen Bedingungen wachsen.

Für die Anpassung der Ergebnisse der Fluorometer zu der nasschemischen Bestimmung des Chl.a's müssen die Kalibrierungen der Fluorometer mit den in Tabelle 7.4-1 dargestellten

Faktoren korrigiert werden. Durch weitere Freilanduntersuchungen der Phytoplanktonverteilung in der Nordsee wird zu prüfen sein, ob durch diese „Nachkalibrierung“ der Fluorometer die Ergebnisse zur Chl.a-Bestimmung zu denen der HPLC-Analyse vergleichbar bleiben.

Es ist ein bekanntes Problem, dass die Höhe der Chlorophyll-Fluoreszenz zur vorhandenen Menge an Chl.a im allgemeinen eine Abhängigkeit von verschiedenen Anzuchts- und momentanen Umweltbedingungen zeigt (siehe Kap. 3.3).

#### 7.4.1. Verifizierung der Algengruppenerkennung

Die Möglichkeit, Phytoplankton grobtaxonomisch zu unterscheiden, ist mit dem Durchflusszytometer, der HPLC-Analyse und dem AOA prinzipiell möglich (PriPro98). Bei einer Gegenüberstellung der *in situ* Ergebnisse der Ausfahrt zeigen sich aber Unterschiede in den Zuordnungen des Phytoplanktons.

##### 7.4.1.1. Verifizierung des Nachweises der Diatomeen

Der AOA identifiziert Algen aus der braunen spektralen Gruppe. Sie dominieren die Phytoplanktonpopulation (Tabelle 7.3-8). Das FCM weist Algenzellen nach, die sich unter dem Mikroskop als Diatomeen erweisen (Region R5 in Abbildung 7.3-2 A). Die Bestimmung der Chl.a-Konzentration der Diatomeen durch die Zellzahlen und durch die Rotfluoreszenz ergibt stark voneinander abweichende Ergebnisse (Tabelle 7.3-3 & Tabelle 7.3-5). Die Pigmentanalyse mittels der HPLC identifiziert die Xanthophylle Fucoxanthin und Diadinoxanthin (Tabelle 7.3-6). Beide Pigmente sind für die Klasse der Diatomeen typisch.

#### **Fazit:**

Damit wurde die qualitative Identifikation von Diatomeen, bzw. von Algen der braunen spektralen Gruppe, von den drei Messsystemen für die Freilandproben geleistet. Im Vergleich der HPLC-Analyse mit dem AOA aber zeigt sich die Notwendigkeit einer Nachkalibrierung des braunen spektralen Fingerprints. Für die FCM Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Diatomeen zur HPLC-Analyse wird deutlich, dass die Berechnung über die Zellzahlen den Gehalt um einen Faktor 2 – 3 überschätzt, die Berechnung über die Rotfluoreszenz hingegen zu einer Unterschätzung um einen Faktor zwischen 1,5 – 13,0 führt. Die Nachweisgrenze und die Eignung der Messsysteme muss überprüft werden.

### 7.4.1.2. Verifizierung des Nachweises der blauen spektralen Gruppe

Außer dem Durchflusszytometer erfasst kein anderes Messsystem (AOA und HPLC) diese Algenklasse. Es zeigt sich in der Berechnung der Chl.a-Konzentration der Cyanobakterien anhand der Messdaten des FCM's, dass der Gehalt von maximal 0,03 µg pro Liter unter der Auflösungsgrenze des AOA's und der HPLC-Analyse liegt.

### 7.4.1.3. Verifizierung des Nachweises der grünen spektralen Gruppe

Als zweite Algengruppe wurden vom AOA Algen der grünen spektralen Gruppe identifiziert. Das Vorkommen dieser Gruppe beschränkt sich auf die ersten drei Stationen der Ausfahrt. Nach der dritten Station werden Algen dieser Gruppe nicht mehr nachgewiesen (Tabelle 7.3-8). Der auf den Chl.a-Gesamtgehalt bezogene prozentuale Chl.a-Gehalt der Gruppe beträgt 15 und 18 % für die ersten beiden Stationen, 11 % für die Dritte.

Eine Verifizierung dieses Ergebnisses durch die HPLC-Analyse ist nicht möglich. Die zum Nachweis von Algen der grünen spektralen Gruppe nötigen Xanthophylle Lutein oder Prasinonanthin wurden nicht nachgewiesen. Da aber die Möglichkeit besteht, dass der Gehalt dieser Pigmente unter der Auflösungsgrenze des Analyseverfahrens liegt, widerspricht es nicht notwendigerweise den Ergebnissen des AOA's.

Die Untersuchung der Proben mit dem FCM weist Picoeukaryoten nach, bei denen es sich um Algen der Klasse der Prasinophyceae handelt. Die Chl.a-Konzentration nach der Bestimmung über die Rotfluoreszenz beträgt zwischen 0,08 – 0,2 µg Chl.a pro Liter (Tabelle 7.3-5) für alle Stationen. Nach der Abschätzung über die Zellzahlen liegt der Chl.a-Gehalt pro Liter sogar unter 0,03 µg.

#### **Fazit:**

Eine Abschätzung, ob die Erkennung der grünen spektralen Gruppe durch den AOA einen Bezug zur Realität hat, ist zu diesem Zeitpunkt schwierig. Laut FCM sind Algen der grünen spektralen Gruppe im Wasserkörper vorhanden, die Höhe des ermittelten Chl.a-Gehaltes der Prasinophyceae aber sehr gering. Nach der Betrachtung der Verifizierung der Diatomeen bestehen aber auch Zweifel an Ermittlung der Höhe des Chl.a-Gehaltes. Insgesamt keine sehr befriedigende Aussage! Zur Prüfung einer möglichen Fehleinschätzung durch den AOA ist eine genauere Betrachtung des Ergebnisses zur Algengruppenerkennung notwendig.

## 7.5. Analyse der diskreten Anregungsspektren des AOA's

Die gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz für die fünf Anregungsfarben (Rohdaten) des AOA's wird mit den Fingerprints der spektralen Algengruppen gemäß Gleichung 5.7-7 verrechnet. Die Lösung des linearen Gleichungssystems ergibt die Chl.a-Konzentration der spektralen Gruppen. Die Hypothese des Fit's ergibt die Konzentrationen der spektralen Gruppen:

Aus  $\hat{\mathbf{p}} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{d}$  folgt nach dem Fit der hypothetische Rohdatenvektor

$$\hat{\mathbf{d}} = (\mathbf{A}^T)^{-1} (\mathbf{A}^T \mathbf{A}) \hat{\mathbf{p}}$$

Im Idealfall wäre  $\hat{\mathbf{d}} = \mathbf{d}$ , aber durch Rauschen und Fitfehler ergeben sich Abweichungen, was sich darin widerspiegelt, dass die gefittete Kurve für das diskrete Anregungsspektrum (Vektor  $\hat{\mathbf{d}}$ ) nicht genau durch das gemessene diskrete Anregungsspektrum (Vektor  $\mathbf{d}$ ) geht.

Einfacher ausgedrückt ergibt sich die Hypothese des Fit's für die Lumineszenzdiode  $i$  aus der Summe der Produkte der Komponente  $i$  der Fingerprints der Algengruppen und der berechneten Chl.a-Konzentration dieser Gruppe:

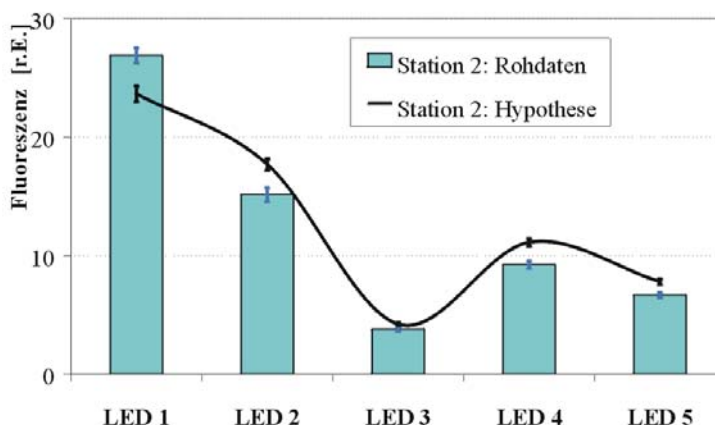
### Gleichung 7.5-1: Hypothetisches Anregungsspektrum des Fit's (kurz: Hypothese)

$$[\text{Fit } d]_i = \sum_g ([\text{Fingerprint}(g)]_i \cdot \text{Konzentration}(g))$$

Für die erste Station der Ausfahrt ergibt sich das folgende Bild, wenn die *in situ* gemessenen Rohdaten mit dem Ergebnis des Fit's verglichen werden.

### Abbildung 7.5-1: Vergleich der Rohdaten mit der Hypothese

Am Beispiel der Station 2 werden die Rohdaten der LED's mit dem Fitergebnis verglichen



Durch den direkten Vergleich der gemessenen Chl.a-Fluoreszenz mit der Hypothese des Fit's für jede LED nach der Gleichung 6.2-2 wird ein deutlicher Unterschied offensichtlich.

Während der Fit die Fluoreszenz für die erste LED (470 nm) unterschätzt, werden die Fluoreszenzen für die LED 2, 4 und 5 überschätzt. Dieses Ergebnis zeigt sich ebenfalls für alle anderen Stationen:

**Tabelle 7.5-1: Vergleich der Rohdaten zur Hypothese des Fit's**

Die prozentuale Differenz (% Differenz) zwischen den Rohdaten der Chl.a-Fluoreszenz Messung und der Hypothese ist auf die Rohdaten der Chl.a-Fluoreszenz normiert.

		<b>LED 1</b>	<b>LED 2</b>	<b>LED 3</b>	<b>LED 4</b>	<b>LED 5</b>
<b>Station 1</b>	Rohdaten	<b>30,4</b> ± 3,7	<b>17,5</b> ± 2,4	<b>4,4</b> ± 0,6	<b>10,5</b> ± 1,6	<b>7,5</b> ± 1,3
	Hypothese	<b>27,2</b> ± 3,6	<b>19,3</b> ± 2,5	<b>4,7</b> ± 0,6	<b>13,1</b> ± 1,8	<b>9,4</b> ± 1,3
	% Differenz	<b>10,6%</b>	<b>-9,9%</b>	<b>-6,0%</b>	<b>-25,1%</b>	<b>-25,9%</b>
<b>Station 2</b>	Rohdaten	<b>26,9</b> ± 0,6	<b>15,1</b> ± 0,6	<b>3,8</b> ± 0,2	<b>9,2</b> ± 0,3	<b>6,7</b> ± 0,2
	Hypothese	<b>24,0</b> ± 0,6	<b>16,7</b> ± 0,6	<b>4,1</b> ± 0,1	<b>11,7</b> ± 0,3	<b>8,4</b> ± 0,2
	% Differenz	<b>11,0%</b>	<b>-10,4%</b>	<b>-6,8%</b>	<b>-26,4%</b>	<b>-26,3%</b>
<b>Station 3</b>	Rohdaten	<b>12,1</b> ± 1,0	<b>6,7</b> ± 0,6	<b>1,5</b> ± 0,1	<b>3,7</b> ± 0,4	<b>2,6</b> ± 0,3
	Hypothese	<b>10,4</b> ± 1,0	<b>7,5</b> ± 0,7	<b>1,8</b> ± 0,2	<b>5,0</b> ± 0,5	<b>3,6</b> ± 0,3
	% Differenz	<b>13,5%</b>	<b>-12,5%</b>	<b>-20,7%</b>	<b>-36,9%</b>	<b>-36,1%</b>
<b>Station 4</b>	Rohdaten	<b>14,4</b> ± 1,1	<b>9,3</b> ± 0,7	<b>1,9</b> ± 0,0	<b>4,6</b> ± 0,3	<b>3,3</b> ± 0,4
	Hypothese	<b>13,0</b> ± 1,0	<b>9,7</b> ± 0,7	<b>2,3</b> ± 0,2	<b>6,1</b> ± 0,5	<b>4,3</b> ± 0,3
	% Differenz	<b>9,5%</b>	<b>-4,0%</b>	<b>-24,0%</b>	<b>-32,4%</b>	<b>-27,7%</b>
<b>Station 5</b>	Rohdaten	<b>19,6</b> ± 3,3	<b>11,9</b> ± 1,6	<b>2,6</b> ± 0,3	<b>6,3</b> ± 0,5	<b>3,9</b> ± 0,3
	Hypothese	<b>17,3</b> ± 2,5	<b>13,0</b> ± 1,9	<b>3,1</b> ± 0,5	<b>8,1</b> ± 1,2	<b>5,7</b> ± 0,8
	% Differenz	<b>11,8%</b>	<b>-8,6%</b>	<b>-18,9%</b>	<b>-29,5%</b>	<b>-45,9%</b>

Zur Bewertung der Güte des Fitergebnisses wird die Summe der quadratischen Abweichung zwischen den Rohdaten der LED's und dem inversen Fitergebnis nach der folgenden Formel betrachtet:

**Gleichung 7.5-2: Quadratische Abweichung des Fit**

$$\sigma = \sqrt{\sum_{LED(i=1)}^5 (\text{Rohdaten LED}(i) - \text{Hypothese des Fit LED}(i))^2}$$

Die quadratische Abweichung **F** ist von der Größe der Messwerte abhängig. Für einen von der Höhe der Chl.a-Fluoreszenz unabhängigen Bewertungsmaßstab (Güte) des Fit's muss die Summe der Hypothese mit in die Betrachtung einbezogen werden:

**Gleichung 7.5-3: Güte des Fit's ( $F_{rel.}$ )**

$$\sigma_{rel.} = 10^3 \cdot \sigma \cdot \left( \sum_{LED(i=1)}^5 (\text{Hypothese des Fit LED}(i)) \right)^{-1}$$

Für die Werte von  $F$  und  $F_{rel.}$  gilt im allgemeinen: Je besser der Fit, desto kleiner beide Größen.

Nach der Abbildung 7.5-1 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den gemessenen Chl.a-Fluoreszenzen für die verschiedenen Anregungsfarben (Rohdaten) durch die fünf LED's und der Hypothese.

**Tabelle 7.5-2: Güte der Fitergebnisse der ersten Ausfahrt**

Die Größen  $F$  und  $F_{rel.}$  sind aus dem Mittelwert der Berechnung der Algengruppenzugehörigkeit für 3 Messungen an jeder Station gemittelt. Zum besseren Vergleich wurde  $F_{rel.}$  mit 1000 multipliziert.

Güte des Fit's		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
$F$		5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,7 ± 1,3
$F_{rel.}$	[10 <sup>-3</sup> ]	63,6 ± 1,9	69,5 ± 2,7	87,9 ± 5,4	65,4 ± 2,6	76,1 ± 18,0

Da das Vorkommen von Algen der grünen spektralen Gruppe in der vom AOA ermittelten Konzentration durch das FCM und die HPLC-Analyse nicht geklärt werden konnte, werden die Daten offline erneut berechnet. Es soll geprüft werden, ob sich die Größen für die Bewertung der Hypothese verschlechtern, wenn auf die grüne spektrale Gruppe zur Findung der Lösung verzichtet wird. Der Fingerprint der grünen Gruppe wird im Lösungsansatz eliminiert:

**Tabelle 7.5-3: Fit der Rohdaten ohne den Fingerprint der grünen spektralen Gruppe**

Güte des Fit's		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
$F$		5,2 ± 0,0	4,7 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,7 ± 1,3
$F_{rel.}$	[10 <sup>-3</sup> ]	66,0 ± 1,9	72,9 ± 3,2	89,0 ± 5,3	65,4 ± 2,6	76,1 ± 18,0

Für die ersten drei Stationen zeigt sich eine leichte Verschlechterung des Fit's. Für diese Stationen wurden Algen der grünen Gruppe detektiert (Tabelle 7.3-8). Die geringe Verschlechterung von  $F$  und  $F_{rel.}$  für den Fit ohne den Fingerprint der „Grünen“ impliziert eine große Ähnlichkeit der Fingerprints für die braune und grüne spektrale Gruppe.

## 7.6. Anpassung der spektralen Fingerprints auf *in-situ* Bedingungen

Die Übertragung der Fingerprints von Laborkulturen auf Freilandspesies zeigt bei der Zuordnung der Algengruppen und der anschließenden Betrachtung der Güte des Fit's eine nur mäßige Übereinstimmung der Messdaten mit der Hypothese des Fit's.

### 7.6.1. Anpassung des Fingerprints der braunen spektralen Gruppe

Die Zuordnung von Algen zur grünen spektralen Gruppe durch den AOA lässt sich nicht bestätigen. Die Erfahrungen über die Phytoplanktonspesies in der deutschen Bucht lassen das Ergebnis als unwahrscheinlich erscheinen. Es besteht die Möglichkeit, dass der Fingerprint der braunen spektralen Gruppe einer Laborkultur ein anderes Spektrum aufweist, als die Freilandspesies. Variationen des Spektrums hängen direkt mit einer Veränderung der Pigmentverhältnisse des Antennenkomplexes des Photosystems zusammen. Die Pigmentkomposition ist abhängig von den Nährstoffbedingungen, der Lichtintensität und der Temperatur [Schlüter et al. 2000, Goericke & Montoya 1998, Geider et al. 1997].

Eine Betrachtung des Pigmentverhältnisses von Fucoxanthin-zu-Chlorophyll-*a* des verwendeten Fingerprints der Alge *Thalassiosira weissflogii* zu den fünf Proben zeigt nur geringfügige Unterschiede.

**Tabelle 7.6-1: Xanthophyll zu Chl.a-Verhältnisse (PriPro98 Workshop und Freilanddiatomeen)**

Xanthophyll (Xan)-zu-Chl.a Verhältnis der Diatomee *Thalassiosira weissflogii* (verwendeter Fingerprint der braunen spektralen Gruppe) zu denen der Algen in den Wasserproben. Das Verhältnis ist mit einem Faktor  $10^{-3}$  behaftet ( Xanthophyll in ng, Chl.a in  $\mu\text{g}$ )

<b>Xan / Chl.a</b>		<b>PriPro98</b>				
Fuco/Chl.a	$10^{-3}$	<b>323,1</b> -				
<b>Xan / Chl.a</b>		<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>	<b>Station 4</b>	<b>Station 5</b>
Fuco/Chl.a	$10^{-3}$	<b>334,1</b> $\pm$ 0,3	<b>348,8</b> $\pm$ 8,9	<b>307,7</b> $\pm$ 8,1	<b>292,5</b> $\pm$ 19,9	<b>349,7</b> $\pm$ 16,4
Phaeo/Chl.a	$10^{-3}$	<b>78,3</b> $\pm$ 0,4	<b>78,6</b> $\pm$ 5,1	<b>44,7</b> $\pm$ 8,4	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0

Der Mittelwert des Xanthophyll zu Chlorophyll-*a* Verhältnisses über die fünf Stationen beträgt  $327 \pm 11 \cdot 10^{-3}$  für das Fucoxanthin. Die Algen der Proben und die im Labor gezogene Alge weisen ein nahezu gleiches Pigmentverhältnis auf.

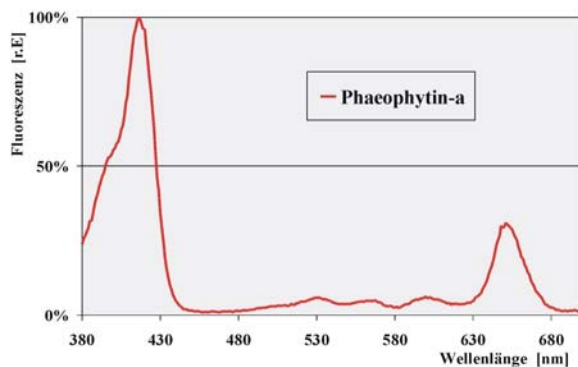
Mit in der Tabelle aufgeführt ist das Phaeophytin-a (Phaeo)-zu-Chl.a Verhältnis. Das Phaeophytin-a ist ein Derivat des Chl.a und weist im allgemeinen auf eine Schädigung der



Algenzellen hin. Speziell für die ersten drei Stationen, für die Algen der grünen spektralen Gruppe vom AOA ermittelt wurden, ist von einer eventuellen Schädigung der Zellen auszugehen. Die Messung der photosynthetischen Aktivität mit dem AOA (Tabelle 7.3-9) und dem Küvettenfluorometer (Tabelle 7.3-11) bestätigt diese Vermutung. Das Phaeophytin-a muss in den Algenzellen vorliegen, da die HPLC-Analyse dieses Pigment nachweist. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass dieses Pigment zusätzlich auch noch im Wasser gelöst vorhanden ist. Das Anregungsspektrum von in Azeton gelöstem Phaeophytin-a zeigt das folgende Fluoreszenzanregungsspektrum. Die Messung erfolgte mit einem RF5001PC Spektralfluorophotometer (Shimadzu) bei einer Emissionswellenlänge von  $720 \pm 5$  nm.

**Abbildung 7.6-1: Anregungsspektrum des Phaeophytin-a**

Anregungsspektrum für in Azeton gelöstes Phaeophytin-a. Das Spektrum ist maximumsnormiert.



Es besteht die Möglichkeit eines Einflusses dieses Pigments auf die Messung des diskreten Anregungsspektrums durch den AOA.

Ein Effekt des Phaeophytin-a auf die Messung der diskreten Anregungsspektren mit dem AOA wird am stärksten die Detektierung der Fluoreszenzemission für eine Anregungswellenlänge von 450 nm (blaue LED) betreffen.

Zur Prüfung wird der Fingerprint der braunen spektralen Gruppe verändert. Bei einer erneuten Berechnung der Lösung des Gleichungssystems (Gleichung 5.7-7) wurde zunächst die erste Komponente des Vektors für den braunen spektralen Fingerprint vergrößert. Es zeigte sich schon bei geringen Änderungen eine Verbesserung der Güte des Fitergebnisses. Um den besten Wert für eine Minimierung des  $F_{rel.}$  zu erhalten, wird ein Konvergenzverfahren (Newton) eingesetzt. Dieses variiert den Wert der ersten Komponente des „braunen“ Fingerprintvektors bis zum Erreichen des Minimums von  $F_{rel.}$ . Als Lösung ergibt sich ein Multiplikator von 1,345. Um diesen Faktor wird der Wert für die erste Komponente des „braunen“ Fingerprintvektors (neue braune Gruppe A) erhöht. Die Messdaten werden erneut gefittet:

**Tabelle 7.6-2: Die ursprünglichen (alten) und neuen Ergebnisse der Algengruppenenerkennung**

Durch die Modifikation des braunen Fingerprint werden die Algen der grünen spektralen Gruppe nicht mehr identifiziert und die Güte des Fit's verbessert.

Alte Berechnung		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Grüne Gruppe	[µg/l]	1,45 ± 0,03	1,44 ± 0,11	0,37 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Braune Gruppe	[µg/l]	7,84 ± 0,31	6,18 ± 0,31	2,94 ± 0,25	4,09 ± 0,31	5,45 ± 0,80
Gesamtgehalt	[µg/l]	9,29 ± 0,34	7,63 ± 0,20	3,31 ± 0,31	4,09 ± 0,31	5,45 ± 0,80

Neue Berechnung		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
Grüne Gruppe	[µg/l]	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Braune Gruppe A	[µg/l]	7,70 ± 0,27	6,31 ± 0,17	2,78 ± 0,25	3,45 ± 0,26	4,62 ± 0,69
Gesamtgehalt	[µg/l]	7,70 ± 0,27	6,31 ± 0,17	2,78 ± 0,25	3,45 ± 0,26	4,62 ± 0,69

Durch die Veränderung des Fingerprints verringert sich die Chl.a-Gesamtkonzentration auf etwa 82% des ursprünglichen Wertes.

**Tabelle 7.6-3: Vergleich der Güte des Fit der ursprünglichen und neuen Berechnung**

Alte Berechnung		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
$\sigma$		5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,7 ± 1,3
$F_{rel.}$	[10 <sup>-3</sup> ]	63,6 ± 1,9	69,5 ± 2,7	87,9 ± 5,4	65,4 ± 2,6	76,1 ± 18,0

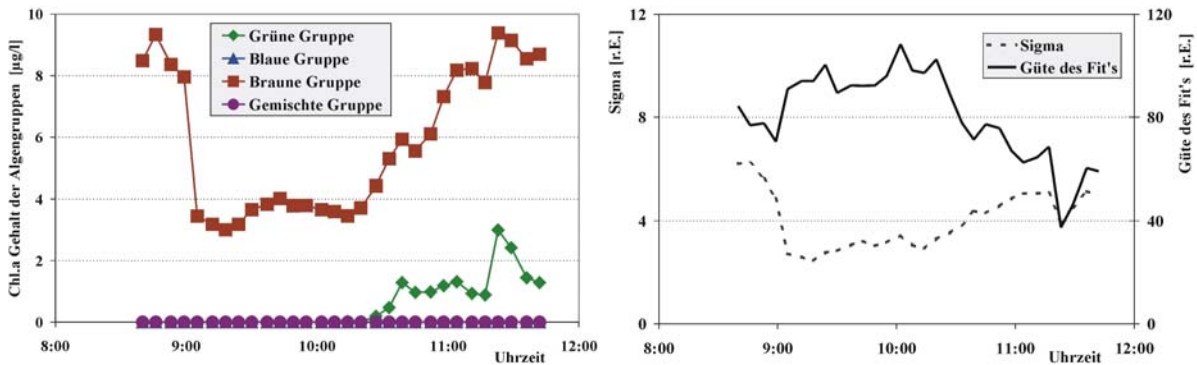
  

Neue Berechnung		Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
F		0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,4
$F_{rel.}$	[10 <sup>-3</sup> ]	10,6 ± 1,6	6,4 ± 1,8	23,0 ± 4,6	40,8 ± 4,2	36,4 ± 4,5

Für die ersten zwei Stationen zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Güte des Fit's. Ab der dritten Station hat die Veränderung der ersten Komponente des Fingerprintvektors der braunen spektralen Gruppe nur einen geringen Einfluss auf die Güte des Fit's, die sich nur noch geringfügig verbessert. Eine Erhöhung der ersten Komponente des Fingerprintvektors „neue braune Gruppe A“ allein erscheint nicht ausreichend, wie auch die Rückfahrt zeigt:

**Abbildung 7.6-2: Algengruppenzuordnung und Güte des Fit's für die (alten) PriPro98-Fingerprints**

Sigma (F) und die Güte (F<sub>rel.</sub>) des Fit's für die Algengruppenzuordnung des AOA's auf der Rückfahrt.

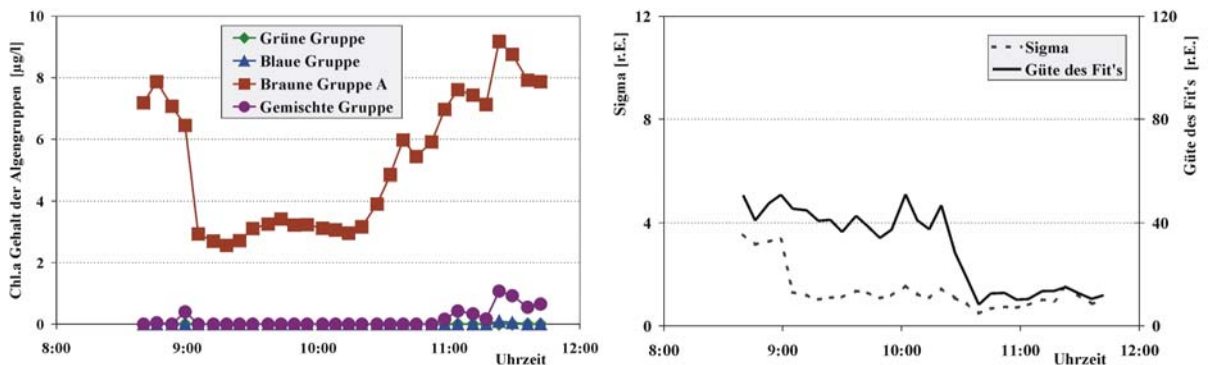


Für den Vergleich der Hypothese des Fit's nach Gleichung 6.2-2 mit den vom AOA gemessenen Rohdaten der Fluoreszenz zeigt sich ein mit Abbildung 7.5-1 von der Form vergleichbares Ergebnis.

Auch für die Rückfahrt ist die Chl.a-Fluoreszenz für die blaue LED höher als es durch die Näherung des Fit mit den Fingerprints der vier spektralen Gruppen abgedeckt werden kann. Die Modifikation des braunen Fingerprints nach den Erkenntnissen der Daten der Hinfahrt (Vergrößerung der 450er Komponente des braunen Fingerprints) werden für die Daten der Rückfahrt übernommen und die Berechnung der Algengruppenzugehörigkeit erneut durchgeführt:

**Abbildung 7.6-3: Algengruppenzuordnung und Güte des Fit's für den modifizierte Fingerprint der braunen Gruppe**

Der modifizierte „neue braune Fingerprint A“ verbessert Sigma und die Güte (rel. Sigma) des Fit's.



Die Übertragung des modifizierten Fingerprints „braune Gruppe A“ für die braune Gruppe auf die Analyse der Messdaten der Rückfahrt zeigt deutlich zwei Dinge.

Zunächst verbessert sich die Güte des Fit's über alle Probennahmen. Andererseits zeigt die Güte  $F_{rel.}$  einen deutlichen Sprung um die Uhrzeit zwischen 10:20 und 10:39. Die Modifikation des „braunen“ Fingerprints kommt erst nach 2/3 der Fahrstrecke für eine massive Verbesserung des  $F_{rel.}$  zum tragen.

Außerdem werden durch die Verwendung des Fingerprints „braune Gruppe A“ anstelle von Algen der grünen spektralen Gruppe nun Algen der gemischten spektralen Gruppe identifiziert. Die berechnete Konzentration dieser Gruppe ist zwar gering, zeigt aber gleichzeitig, dass die Übertragung der Erkenntnisse der Hinfahrt auf die Rückfahrt Fehler mit sich bringt. Die nach der Analyse der Tabelle 7.6-3 gestellte Vermutung, dass eine Erhöhung

der ersten Komponente des braunen Fingerprintvektors nicht ausreichend erscheint, spiegelt sich deutlich in diesen Ergebnissen wieder.

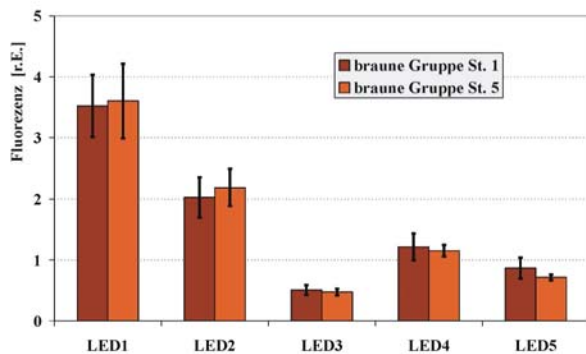
### 7.6.2. Braune spektrale Fingerprints aus den *in-situ* Messungen

Die grundlegende Idee für diese Betrachtung ist die Anpassung des Fingerprints der braunen spektralen Gruppe aus den *in-situ* Daten der Wasserproben. Dazu wird die Annahme vertreten, dass in den Wasserproben kein Chl.a der grünen spektralen Gruppe in nachweisbarer Menge vorhanden ist.

Für die Betrachtung werden die Ergebnisse des AOA's der Stationen 1 und 5 der Hinfahrt zur Erzeugung zweier neuer Fingerprints verwendet. Unter der erneuten Annahme, dass Algen der grünen spektralen Gruppe nicht in den Wasserproben vorhanden sind, werden die Mittelwerte der Fluoreszenzrohdaten für die Stationen 1 und 5 (St.1 und St.5) in die neuen Fingerprints „braune Gruppe St. 1“ und „braune Gruppe St. 5“ umgerechnet. Als Normierung der neuen Fingerprints auf Chl.a pro Liter werden die vom AOA mit den „alten“ Fingerprints ermittelten Chl.a-Konzentrationen für den Gesamtgehalt verwendet.

#### Abbildung 7.6-4: Die Fingerprints aus den Rohdaten der Station 1 und Station 5

Gegenüberstellung der beiden neuen Fingerprints. Beide sind Chl.a normiert, aber nicht intensitätskorrigiert.

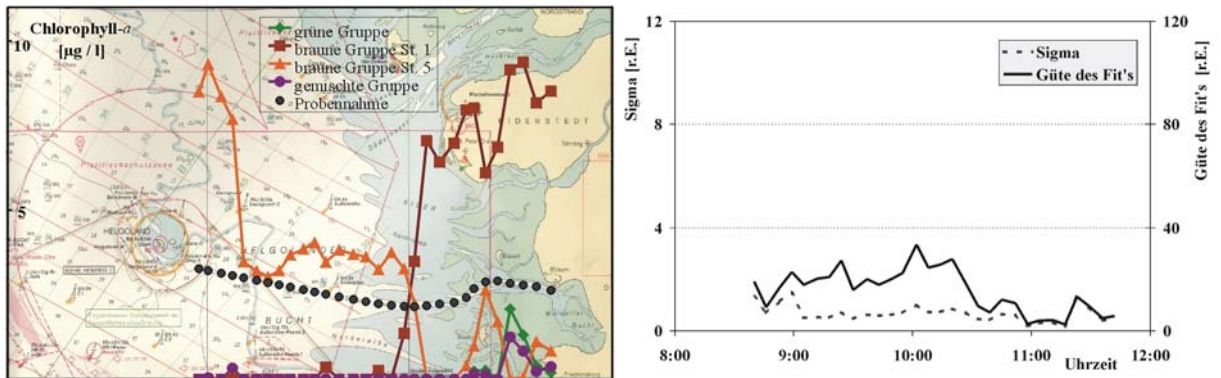


Die Unterschiede für die beiden Fingerprints sind klein und liegen innerhalb der Fehlerbalken der Standardabweichung. Mit diesen beiden braunen Fingerprints sollen die Daten der Rückfahrt erneut gefittet werden.

Für die erneute Berechnung der Gruppenzugehörigkeit werden die Fingerprints der braunen und blauen spektralen Algengruppe (Algen der blauen Gruppe wurden in keinem Fit zugeordnet) durch die neuen Fingerprints – braune Gruppe St. 1 und St. 5 – ersetzt. Mit den beiden neuen braunen spektralen Gruppen ergibt der Fit die nachfolgende Zuordnung:

**Abbildung 7.6-5: Fitergebnis der Rückfahrt mit den Fingerprints – braune Gruppe St. 1 und St. 5 – .**

Darstellung der neuen Berechnung der Algengruppenzuordnung des AOA's mit den Positionen der Probenentnahme, sowie der zeitliche Verlauf von Sigma und der Güte des Fit's.



Gegenüber der Einführung des Fingerprints – braune Gruppe A – wird die Güte des Fit's erneut verbessert.

Für die Zuordnung der Algengruppen ergibt sich ein markanter Wechsel in der Gruppenzuordnung. Während für den Beginn der Messungen der Fingerprint – braune Gruppe St. 5 – für die Lösung bevorzugt wird, wechselt die Zuordnung sehr eindeutig auf die Verwendung des Fingerprints – braune Gruppe St. 1 –.

Die Stabilität des Wechsels von der einen zur anderen braunen Gruppe ist schon sehr überraschend, da die Unterschiede der Fingerprints (Abbildung 7.6-4) kleiner als die Standardabweichung des Fehlers sind.

## 7.7. Die Erkenntnisse aus den Ergebnissen der ersten Ausfahrt

- Die Ergebnisse der Ausfahrten bestätigen einen linearen Zusammenhang zwischen der Chlorophyll-*a* Fluoreszenz und der Chl.*a*-Bestimmung durch die HPLC-Analyse.
- Das FCM ist für die Nachweis von Picoplankton sehr gut geeignet.
- Die Übertragung der Fingerprints von Laboralgen auf Freilandmessungen erfordert eine Nachkorrektur der fluorometrischen Chl.*a*-Bestimmung.
- Der Normkurvenfit zur Algengruppendifferenzierung des AOA's zeigt eine hohe Abweichung zwischen den realen Messwerten und der Hypothese des Fit's.

- Es zeigt sich eine überhöhte Fluoreszenz bei der Anregung mit der blauen LED (450 nm), die der Fit nicht annähern kann und die Trennung der grünen und braunen spektralen Gruppe stört.
- Der Gehalt an Phaeophytin-a ist im Wattenbereich hoch.
- Die vorgeschlagene Anpassung (Kap. 7.6.1 und 7.6.2) des braunen spektralen Fingerprints bedarf einer Verifizierung.

### 7.8. Aussichten

Die Chl.a-Bestimmung durch die Berechnung über die Zellzahlen und die Rotfluoreszenz mit dem FCM muss überprüft werden (Kap. 11).

Es zeigt sich ein Problem bei der Verifizierung der Ergebnisse der Algengruppenerkennung (Kap. 7.4.1) durch die Referenzmessgeräte im allgemeinen. Inwieweit lassen sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Messsysteme vergleichen? Diese Fragestellung wird im Kapitel 11 untersucht.

Außerdem zeigt die Hypothese des Normkurvenfit's mit den spektralen Fingerprints der Algengruppen des AOA's nur eine schlechte Annäherung an die *in situ* Messdaten der Fluoreszenz (Kap. 7.5). Mit zwei verschiedenen Ansätzen einer möglichen Anpassung der Fingerprints der braunen spektralen Gruppe wurden in dem Kapitel 7.6 unterschiedliche Hypothesen aufgestellt. Es wird zu prüfen sein, ob diese durch weitere Untersuchungen bestätigt oder verworfen werden können (Kap. 8).

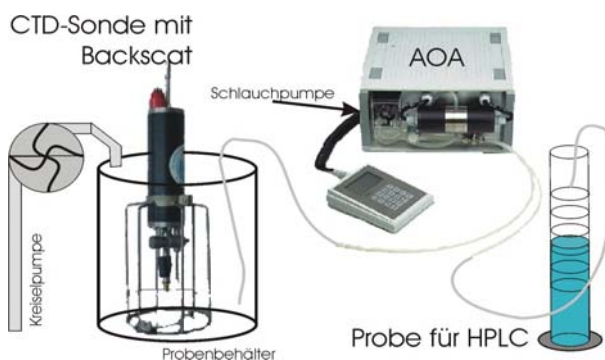
## 8. In situ Messung: Zweite Ausfahrt

### Büsum – Süderpiep – Büsum

#### 8.1. Anordnung der Messgeräte

Knapp zwei Monate nach der ersten Ausfahrt am 8.6.1999 wurde die zweite Ausfahrt durchgeführt. Ein erneuter Vergleich zwischen der HPLC-Analyse und der Bestimmung des Chl.a-Gehaltes von Algengruppen durch den AOA sollte durchgeführt werden. Im Gegensatz zu der ersten Ausfahrt war der Messablauf soweit wie möglich automatisiert. Die Messung wurde während der Fahrt durchgeführt, wie es mit einer BlueBox (Kap.2) angestrebt wird.

**Abbildung 8.1-1: Schematische Anordnung der Messgeräte**



Eine Kreislumppe saugt Seewasser aus einer Tiefe von ca. 1 Meter an. Ein Probenbehälter wird kontinuierlich mit frischem Wasser befüllt.

In diesem befindet sich eine CTD-Sonde mit BackScat-Fluorometer zur Erfassung der Wassertemperatur, der Transmission, des Salzgehaltes und der Fluoreszenz. Der Probenbehälter wurde abgedunkelt.

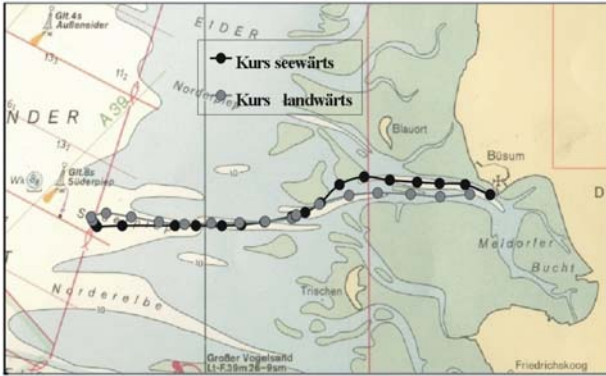
Aus diesem Probenbehälter saugt der AOA über seine Schlauchpumpe die Wasserprobe in die Messkammer. Der Silikonschlauch wurde über Deck bis zur Nasszeile verlegt. Die Strecke von dem Probenbehälter bis zum AOA betrug ca. 4 Meter.

Die HPLC-Probe wird von dem durch den AOA gepumpten Wasser genommen. Zum Erreichen der nötigen Filtrationsmenge von 400 ml Seewasser war die Pumpzeit des AOA's auf 3 Minuten eingestellt. Durch diese Anordnung konnte parallel zu jeder Messung des AOA's die gleiche Probe für die HPLC-Analyse filtriert werden.

## 8.2. Das Untersuchungsgebiet

Die Fahrt geht von Büsum bis zum Ende der Süderpiep und dann zurück. Der Beginn der Ausfahrt war um 10:00 Uhr mit ablaufendem Wasser (HW 7:44; NW 13:25).

**Abbildung 8.2-1: Probenahmen der zweiten Ausfahrt**



Die Kreise in der Abbildung markieren die geographischen Positionen der Probenahmen des AOA's. Für die Fahrt seewärts sind die Positionen als schwarze Kreise, für die Fahrt landwärts als graue Kreise dargestellt.

Die Messungen wurden also im Bereich des Wattenmeeres durchgeführt.

## 8.3. Messergebnisse: Die physikalischen Parameter

Die Aufbereitung der Proben zur Analyse (soweit nötig) und die Auswertung der Daten erfolgt in Analogie zum Kapitel 7 mit den dort neu kalibrierten Fingerprints. Die Ergebnisse werden deshalb ohne weitere Kommentare direkt wiedergegeben.

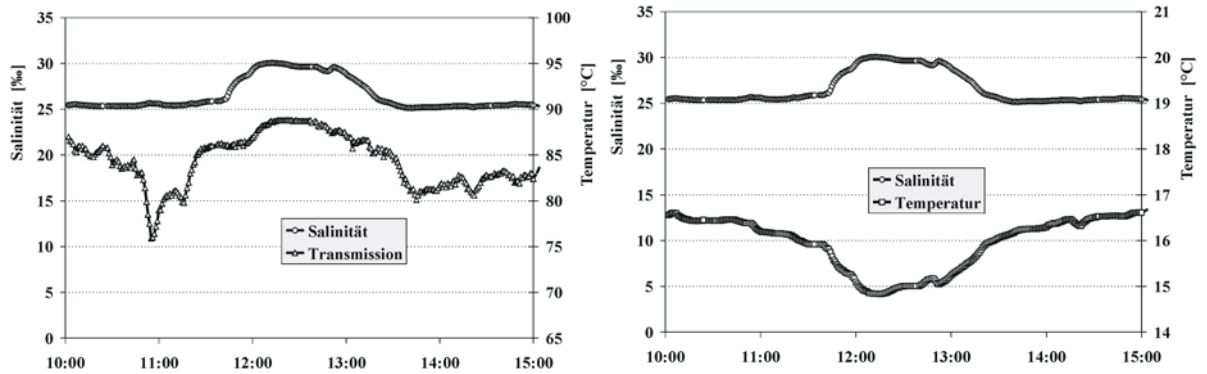
Mit der CTD-Sonde werden die physikalischen Parameter Temperatur, Salzgehalt (berechnet aus der Temperatur und der Leitfähigkeit) und Transmission der Wasserproben bestimmt. Die Messwerte werden zur besseren Übersicht in einer Zeitreihe dargestellt. Die zeitliche Zuordnung zu den in Abbildung 8.2-1 angegebenen Positionen:

Östl. Länge	Nördl. Breite	Uhrzeit	Östl. Länge	Nördl. Breite	Uhrzeit	Östl. Länge	Nördl. Breite	Uhrzeit
08° 51' 08"	54° 07' 13"	10:03	08° 31' 13"	54° 05' 58"	11:31	08° 30' 25"	54° 06' 04"	13:14
08° 49' 17"	54° 07' 37"	10:11	08° 29' 17"	54° 05' 58"	11:39	08° 32' 31"	54° 06' 05"	13:23
08° 47' 23"	54° 07' 40"	10:18	08° 27' 44"	54° 05' 58"	11:46	08° 34' 26"	54° 06' 08"	13:31
08° 45' 43"	54° 07' 43"	10:25	08° 23' 49"	54° 05' 58"	12:01	08° 36' 25"	54° 06' 16"	13:39
08° 43' 41"	54° 07' 48"	10:33	08° 21' 56"	54° 05' 56"	12:09	08° 36' 43"	54° 06' 21"	13:48
08° 41' 47"	54° 07' 56"	10:40	08° 21' 46"	54° 06' 03"	12:16	08° 36' 44"	54° 06' 24"	13:56
08° 39' 57"	54° 07' 37"	10:47	08° 21' 37"	54° 06' 10"	12:23	08° 38' 27"	54° 06' 50"	14:04
08° 38' 33"	54° 06' 53"	10:55	08° 21' 29"	54° 06' 19"	12:31	08° 40' 40"	54° 07' 11"	14:13
08° 37' 24"	54° 06' 30"	11:02	08° 22' 37"	54° 06' 28"	12:41	08° 42' 47"	54° 07' 17"	14:21
08° 36' 26"	54° 06' 20"	11:09	08° 24' 29"	54° 06' 19"	12:49	08° 45' 14"	54° 07' 14"	14:30
08° 34' 23"	54° 06' 07"	11:17	08° 26' 32"	54° 06' 07"	12:58	08° 47' 26"	54° 07' 08"	14:38
08° 32' 39"	54° 06' 00"	11:24	08° 28' 26"	54° 06' 01"	13:06	08° 49' 38"	54° 07' 14"	14:46



### Abbildung 8.3-1: Physikalische Parameter der Wasserproben

Die zeitliche Auflösung der CTD-Sonde erlaubt die Erfassung von einem Messwert pro Sekunde. Je 60 Sekunden wurden gemittelt und dargestellt. Für alle folgenden Abbildungen wird die x-Achse nur dann beschriftet, wenn es sich nicht um die Uhrzeit der Ausfahrt handelt, zu der die Probenentnahmen stattgefunden haben..



Für die Zeit zwischen 12:00 und 13:00 Uhr zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Salzkonzentration von 25 ‰ auf 30 ‰. Die Transmission zeigt hier auch maximale Werte. Einher geht damit auch ein Absinken der Wassertemperatur um ca. 1,5 °C. Für diesen Zeitraum befand sich der FK Südfall auf den am weitesten westlich gelegenen Positionen (Abbildung 8.2-1). Die Parameter weisen eindeutig auf einen veränderten Wasserkörper hin.

Der geringe Salzgehalt in Küstennähe basiert auf dem Einfluss des Flusses Elbe, die durch den Süßwassereintrag zu starken Änderungen des Salzgehaltes führen kann, wie die hier vorliegenden Messdaten auch belegen.

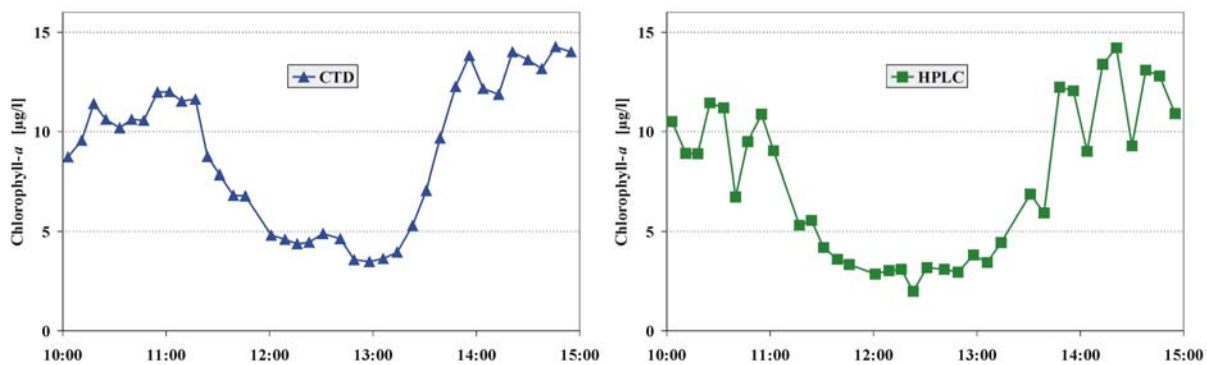
## 8.4. Messergebnisse: Die biologischen Parameter

Zur Erfassung des Chl.a-Gehaltes wurden die CTD-Sonde mit BackScat-Fluorometer, der AOA und die HPLC-Analyse eingesetzt.

### 8.4.1. Die Chl.a-Bestimmung durch das BackScat und die HPLC-Analyse

Die Chl.a-Bestimmung durch die HPLC-Analyse und das BackScat-Fluorometer der CTD-Sonde zeigt den folgenden zeitlichen Verlauf für die Chl.a-Konzentration der Wasserproben:

**Abbildung 8.4-1: Chl.a-Konzentration nach dem BackScat-Fluorometer und der HPLC-Analyse**



Die Ergebnisse dieser beiden Messgeräte zeigen einen recht ähnlichen zeitlichen Verlauf für die Chl.a-Konzentration pro Liter der Wasserproben. Es zeigt sich gegen 11:00 Uhr eine ausgeprägte Verringerung der Konzentration des Phytoplanktons, die für die Zeit zwischen 12:00 und 13:00 Uhr minimal wird. Ab ca. 13:30 Uhr steigt die Chl.a-Konzentration wieder an und erreicht eine etwas höhere Konzentration als zu Beginn der Messungen.

#### 8.4.2. Der Ergebnisse der Chl.a-Bestimmung des AOA's

Für den AOA wurden fast alle Parameter für die Messungen von der ersten Ausfahrt übernommen. Der einzige Unterschied zu den Parametern der ersten Ausfahrt liegt in der Zeit für das Einpumpen der Proben.

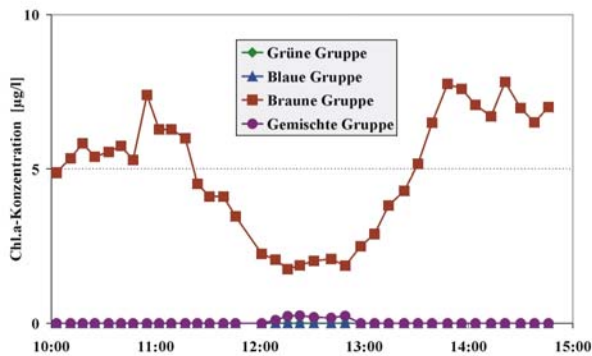
**Tabelle 8.4-1: Parametereinstellung des AOA's (zweite Ausfahrt)**

Parameter	f	f <sub>0</sub>	f <sub>M</sub>	Trans.	Probe
	[s]	[s]	[ms]	[s]	einpumpen
Dunkelphase		60			[s]
Adaptation	30	60			180
Messung	60	60	2000	10	auspumpen
Integrationszeit			200		[s]
f <sub>0</sub> / f-Teiler		1 /100			5

Um die nötige Probenmenge für die HPLC-Analyse hinter dem AOA nehmen zu können (siehe Abbildung 8.1-1), wurde die Zeit für das Einpumpen auf 3 Minuten eingestellt.

**Abbildung 8.4-2: Algengruppenerkennung des AOA's**

Ergebnisse des AOA's auf der zweiten Ausfahrt.

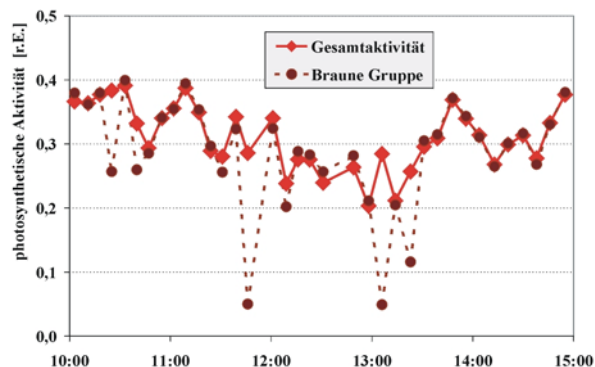


Die Phytoplanktonpopulation des Wasserkörpers wird durch die braune spektrale Algengruppe dominiert. Zwischen 12:00 und 13:00 Uhr ist der Chl.a-Gehalt pro Liter der Proben minimal.

Es wird neben der braunen spektralen Gruppe auch ein Anteil der gemischten spektralen Gruppe identifiziert.

Die Messung der photosynthetischen Aktivität für die spektralen Gruppen und der Gesamtaktivität (Mittelwert über alle spektralen Gruppen) ergibt:

**Abbildung 8.4-3: Die photosynthetische Aktivität**



Die Algen in den Proben zeigen eine Verringerung der photosynthetischen Aktivität für die Zeit von 12:00 bis 13:00. Diesem Zeitraum entsprechen die am westlichsten gelegenen Probenahmen der zweiten Ausfahrt.

Die Bestimmung der Aktivität der braunen spektralen Gruppe zeigt einige starke Ausreißer. Diese werden in dem Vergleich zu der Gesamtaktivität der Proben deutlich.

Die Ursache dieser Fehleinschätzung liegt in einer Fehlzuordnung des Fit's begründet. Für die  $f_M$ -Messung wird für diese Proben die grüne spektrale Gruppe mit identifiziert. Dadurch wird der Anteil der Fluoreszenzantwort der braunen spektralen Gruppe unterschätzt und somit auch die Aktivität.

## Kapitel 8

Die Gesamtaktivität des Phytoplanktons der Wasserproben nimmt bis kurz nach 13:00 Uhr stetig ab. Die photosynthetische Aktivität der Algen nimmt bis ca. 13:00 Uhr von 0,40 auf 0,24 kontinuierlich ab. Ab 13:00 Uhr steigt die Aktivität wieder bis auf Werte von 0,31 an.

Das Absinken der Aktivität spricht für einen Umwelteinfluss auf die Algen, der Stress bei ihnen auslöst. Unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor werden Werte zwischen 0,5 – 0,8 für die photosynthetische Aktivität der Algen beobachtet. Nährstoff- und Lichtbedingungen spielen dabei eine wesentliche Rolle für diesen Messwert [vgl. Kapitel 3].

Eine Gegenüberstellung der Aktivität und der physikalischen Parameter des Wasserkörpers (Kap. 8.3) zeigt in der Berechnung der Korrelationsfaktoren keinen signifikanten Zusammenhang. Der höchste Wert des Korrelationsfaktors  $R^2$  ergibt sich bei dem Vergleich der Aktivität mit der Temperatur von 0,63.

### 8.5. Verifizierung der Algengruppenerkennung des AOA's

Das Phytoplankton wird nach den Ergebnissen des AOA's von Algen der braunen spektralen Gruppe dominiert. Für die Zeit zwischen 12:00 und 13:00 wird eine Konzentration von bis zu 0,25  $\mu\text{g}$  Chl.a pro Liter der gemischten spektralen Gruppe nachgewiesen.

Die HPLC-Analyse bestätigt die Dominanz der braunen spektralen Gruppe durch den Nachweis der Pigmente Fuco- und Diadinoxanthin, sowie dem Chlorophyll-c.

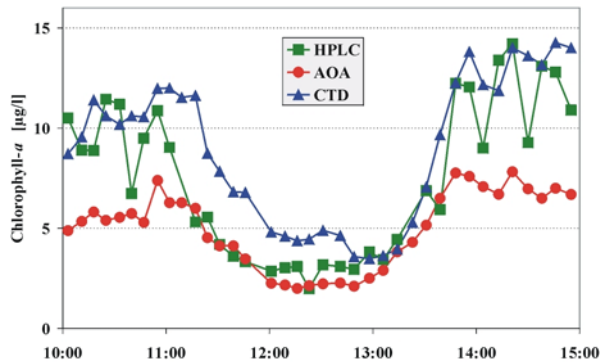
Außerdem wird der qualitative Nachweis von Algen der gemischten spektralen Gruppe erbracht. Das Markerpigment dieser Gruppe, das Alloxanthin, wird in dem Zeitraum von 12:30 – 13:30 vereinzelt nachgewiesen. Der Gehalt an Alloxanthin pro Liter befindet sich wahrscheinlich sehr nah an der Auflösungsgrenze der HPLC-Analyse für die filtrierte Probenmenge von 400 ml. Eine quantitative Aussage ist deswegen nicht möglich.

### 8.6. Vergleich der Chl.a-Bestimmung von AOA, BackScat und HPLC

Auf der ersten Ausfahrt wurden der AOA und das BackScat der CTD-Sonde (in diesem Kapitel mit CTD abgekürzt) auf die Ergebnisse der Chl.a-Bestimmung durch die HPLC-Analyse nachkalibriert (siehe Kap. 7.4). Die erneute Gegenüberstellung soll die Kalibrierung bestätigen. Im direkten Vergleich offenbarte sich eine Diskrepanz in der Höhe der Chl.a-Bestimmung durch

den AOA und die CTD:

**Abbildung 8.6-1: Vergleich der Chl.a-Bestimmung durch AOA, BackScat (CTD) und HPLC**



Die Bestimmung der Chl.a-Konzentration variiert für einzelne Probenahmen bis zu 100 % zwischen den Messgeräten.

Für eine Verifizierung der Unterschiede werden die Ergebnisse des AOA's und der CTD mit einem Faktor auf die HPLC-Analyse bezogen. Die Summe der absoluten Differenzbeträge der Chl.a-Bestimmung von HPLC zu AOA bzw. CTD für die Probenahmen werden durch ein Konvergenzverfahren minimiert:

**Gleichung 8.6-1:**

$$\text{Minimiere } \sum_{\text{alle Proben}} \frac{|\text{Chl.}a_{\text{HPLC}} - A_{\text{AOA}} \cdot \text{Chl.}a_{\text{AOA}}|}{\text{Chl.}a_{\text{AOA}}} \quad \text{durch die Variation von } A_{\text{AOA}}$$

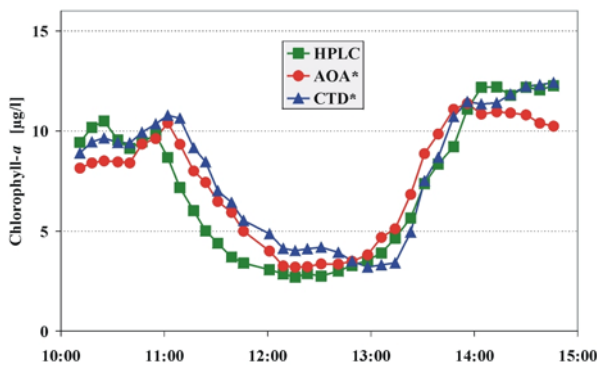
Für die Bestimmung des Faktors für die CTD Ergebnisse gilt entsprechendes. Das Lösungsverfahren (Newton) ist konvergent und liefert die folgenden Faktoren für die Angleichung der Chl.a-Ergebnisse des AOA's und der CTD an die Ergebnisse der HPLC-Analyse:

$$\begin{aligned} A_{\text{AOA}} &= 1,523 & A_{\text{CTD}} &= 0,899 \\ \text{AOA}^* &= A_{\text{AOA}} \cdot \text{Chl.}a_{\text{AOA}} & \text{CTD}^* &= A_{\text{CTD}} \cdot \text{Chl.}a_{\text{CTD}} \end{aligned}$$

In der zeitlichen Darstellung der Messungen ergibt sich im Vergleich nach der Multiplikation der AOA bzw. CTD Chl.a-Ergebnisse mit  $A_{\text{AOA}}$  bzw.  $A_{\text{CTD}}$  das folgende Bild:

**Abbildung 8.6-2: Vergleich von AOA\*, CTD\* und HPLC**

Multiplikation der Chl.a-Ergebnisse des AOA's und der CTD mit den ermittelten Faktoren  $A_{AOA}$  bzw.  $A_{CTD}$ . Zum besseren Vergleich wurde über drei Messwerte gemittelt (gleitende Mittelung)



Der Korrelationsfaktor zwischen den Ergebnissen des AOA's und der HPLC-Analyse ergibt sich zu 0,94. Für die CTD und die HPLC-Analyse beträgt dieser Faktor 0,93.

Die Chl.a-Bestimmung der Geräte ist nach Einführung der Faktoren  $A_{AOA}$  bzw.  $A_{CTD}$  (Seite 101) und der Durchführung der entsprechenden linearen Korrektur als gut einzustufen.

Über die Faktoren zur Angleichung der CTD und AOA Chl.a-Bestimmung an die HPLC-Ergebnisse und deren Ursache besteht noch keine Klarheit. Sie wird nun eingehend in dem folgenden Kapitel 8.7 untersucht.

## 8.7. Ursachenforschung bezüglich der Chl.a-Bestimmungen

Als Standardmethode zur Erfassung des Chl.a-Gehaltes der Wasserproben wird die HPLC-Analyse verwendet. Sie dient als Referenz für die Chl.a-Bestimmung durch die fluorometrischen Methoden. Auf der ersten Ausfahrt wurden das BackScat-Fluorometer und der AOA auf die HPLC-Ergebnisse angeglichen.

Auf der zweiten Ausfahrt zeigt der erneute Vergleich, dass die Messung des BackScat-Fluorometers der CTD-Sonde den Chl.a-Gehalt gegenüber der HPLC-Analyse um 11 Prozent überschätzt. Für die Messung eines biologischen Parameters, wie der Chlorophyll-Fluoreszenz, ist diese Überschätzung vernachlässigbar.

Die Bestimmung des Gesamtchlorophyll-a Gehaltes durch den AOA unterschätzt die Chl.a-Konzentration in bezug auf die HPLC-Ergebnisse um 34 Prozent. Gegenüber dem ermittelten Chl.a-Gehalt der Proben mit dem BackScat-Fluorometer zeigt sich sogar eine

Unterschätzung um 50 Prozent. Diese beiden Messgeräte basieren auf der fluorometrischen Erfassung der Chl.a-Konzentration und sollten vergleichbare Ergebnisse liefern.

Die Ursache für den Unterschied soll ermittelt werden. Dazu werden mögliche Fehlerquellen in Betracht gezogen und ein eventueller Einfluss abgeschätzt.

### **8.7.1. Einfluss der Tageslichtintensität**

Der Schlauch vom Probenbehälter zum AOA über das Heck des Schiffes war der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Bei dem Schlauch handelte es sich um einen transparenten Silikonschlauch (5 mm Ø, 1 mm Wandstärke). Leider wurde es versäumt, diesen Schlauch abzudunkeln. Die folgenden Überlegungen zeigen, dass dieses Versäumnis keinen nennenswerten Einfluss hatte.

Durch die Lichtintensitätsänderung bei der Probennahme wäre ein Einfluss auf den physiologischen Zustand der Algen und damit auf die Fluoreszenzemission möglich.

Es ist bekannt dass sich die Photosyntheseleistung der Alge an die herrschenden Lichtverhältnisse adaptiert. Es handelt sich bei Adaptationsprozessen um Zustandsänderungen des Photosyntheseapparates, der über einen langen Zeitraum mit verschiedenen Zeitkonstanten reagiert [Hintze 2000, Plieth et al. 1998 , Hintze 1995, Dau 1994a, Dau 1994b]. Quenchmechanismen verringern die Fluoreszenzemission. Deutlich wird dieser Effekt auf die Fluoreszenz durch die Kautsky Kinetik [Kautsky & Hirsch 1931]. Bei der Messung wird zusätzliches Konstantlicht auf die Algen gegeben.

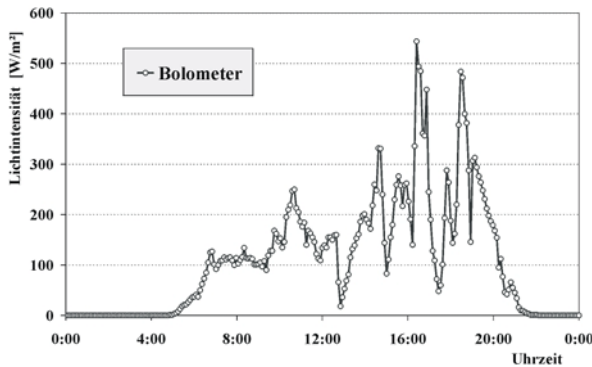
Im Fall der Messungen auf der Ausfahrt erfolgte die Beleuchtung kurz vor und nicht während der Messung.

Es ist deshalb möglich, dass die Fluoreszenz durch photochemisches und nicht-photochemisches Quenching verringert wird (Kap. 3.3.5) Die Frage lautet letztendlich, ob ein Einfluss auf die Messergebnisse des AOA's vorhanden ist.

Nach den Daten der Wetterstation des FTZ's in Büsum betrug die gemittelte Lichtintensität für die Erprobungszeit der Probennahmen zwischen 100 und 200 Watt m<sup>-2</sup>.

**Abbildung 8.7-1: Lichtintensität des Tageslichtes am 8.6.99**

Der Mittelwert wurde über 50 Messungen gebildet.



Die Messdaten der Wetterstation deuten auf einen bewölkten Tag mit stark wechselnden Lichtverhältnissen hin.

In der Zeit zwischen 10:00 und 15:00 Uhr steigt die gemittelte Intensität von 150 auf 200 Watt /  $\text{m}^2$  an. Diese Daten sind selbstverständlich nicht direkt auf die Lichtverhältnisse bei den Probenahmen übertragbar. Doch es ist anzunehmen, dass auch auf See ähnliche Schwankungen der Intensität vorlagen.

Hinzu kommt, dass der Schlauch vom Probenbehälter bis zum AOA (Abbildung 8.1-1) zumindest auf der Fahrt seewärts die überwiegende Zeit im Schatten lag. Auf den Messdaten des AOA's sind starke Schwankungen in der Messung der Fluoreszenz im Vergleich zu der Messung des BackScat-Fluorometers der CTD-Sonde nicht festzustellen (vgl. Abbildung 8.6-2).

Ebenfalls zeigt sich kein Unterschied zwischen der Hin- und Rückfahrt in bezug auf die 50 % Unterschätzung der Fluoreszenz durch den AOA gegenüber der Messung des BackScat's. Diese Tatsachen sprechen gegen einen verifizierbaren Einfluss der ungewollten, kurzzeitigen Tageslichtvorbeleuchtung der Proben. Auch wenn ein Einfluss der „Vorbeleuchtung“ auf die Chl.a-Bestimmung nicht nachgewiesen werden konnte, wird die Probe das Tageslicht bei den nächsten *in situ* Messungen nicht mehr unbeabsichtigt sehen.

**8.7.2. Absinken des Phytoplanktons**

Eine mögliche Erklärung für die um 50 % zu niedrigen Werte für die gemessenen Werte der Fluoreszenzemission mit dem AOA ist so einfach, dass sie einem zunächst nicht in den Sinn kommt.



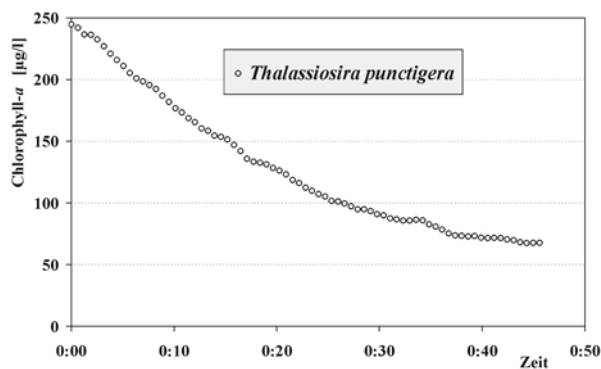
Zu Beginn des Kapitels, bei der Vorstellung der Ergebnisse der Messgeräte zur Erfassung der biologischen Parameter, habe ich erwähnt, dass alle Parametereinstellungen der ersten Ausfahrt übernommen wurden. Dies ist nicht ganz richtig.

Bei einer genaueren Überprüfung der Parametereinstellungen des AOA's für die erste und zweite Ausfahrt stellte sich heraus, dass auf der zweiten Ausfahrt die Option „durchmischen der Probe: nicht auf „ja“ sondern auf „nein“ eingestellt war.

Der Gedanke zur möglichen Klärung des Unterschiedes zwischen den Ergebnissen des AOA's und der CTD kam mit einer Beobachtung an den Laborkulturen. Es fiel auf, dass Algenspezies ohne Flagellen sich nach einiger Zeit in den Kulturgefäßen am Boden absetzen. Die Zeitdauer des Absinkens war nicht bekannt. Mit dem AOA (mit einer modifizierten Messkammer, dazu Abbildung 5.2-2) wurde das Absinkverhalten einer Diatomeenspezies untersucht:

**Abbildung 8.7-2: Absinkverhalten einer Diatomeenspezies**

Das Absinken von Zellen der Algenspezies *Thalassiosira punctigera* wurde mit dem AOA gemessen. Der Graph zeigt geringer werdende Chl.a-Konzentrationen nach dem Abschalten der Durchmischung.



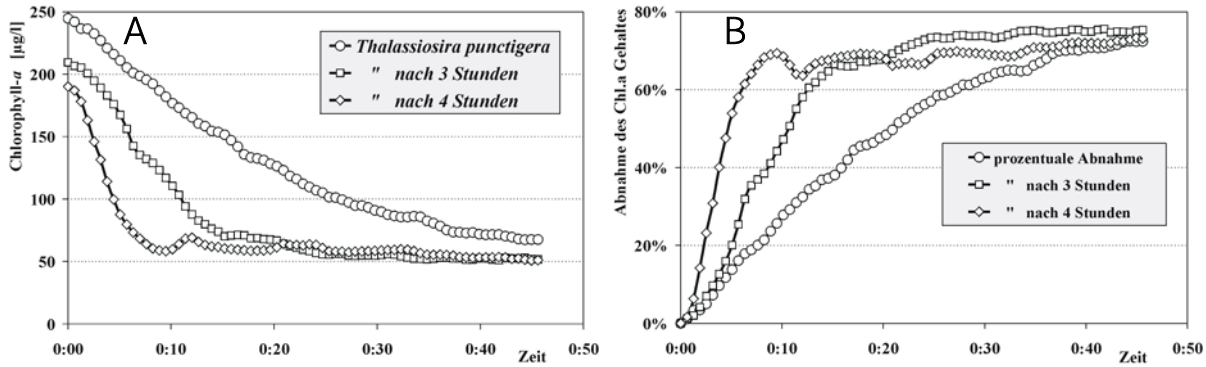
Die Algenzellen sinken aus dem Bereich der Messküvette, in dem die Lichtanregung erfolgt.

Für die Alge *Thalassiosira punctigera* wurde eine Zeit von 21 Minuten gemessen, bei dem die Hälfte der Algen aus dem Messbereich gesunken waren. Es handelt sich um eine Spezies die zwischen 50 – 100 µm im Durchmesser groß ist. Man kann vermuten, das große und damit auch schwere Algen schneller sinken als kleine. Allgemeingültig ist dies nicht, da z. B. die Flagellaten sich selbstständig bewegen können.

Der Versuch zur Messung des Absinkverhaltens die Diatomeenspezies *Thalassiosira punctigera* wurde 3 und 4 Stunden nach der ersten Messung wiederholt:

**Abbildung 8.7-3 A & B: Zeitliches Verhalten der Sinkgeschwindigkeit und das relative Unterschätzen des Chl.a-Gehaltes**

Die Darstellung A vergleicht den Verlauf des Chl.a-Gehaltes der Algenprobe und damit das Absinkverhalten der Algen. Alle drei Kurven sind auf den Zeitpunkt des Ausschaltens des Rührers als Zeit 0:00 Uhr bezogen. In B ist die relative Unterschätzung des Chl.a-Gehaltes bzgl. des ersten Messwertes dargestellt.



Mit dem Magnetrührer wurden die Algen nach dem Ablauf der ersten Messung bis zur nächsten Messung durchmischt. Drei Stunden nach dem Beginn der ersten Messung wurde die Durchmischung der Probe gestoppt und die zweite Messreihe für knapp 50 Minuten durchgeführt. Es folgte eine erneute Durchmischung für 10 Minuten mit abschließender Messung für erneut eine knappe Stunde (4 Stunden nach dem Start der ersten Messung).

Je länger also die Algen in der Küvette bis zur nächsten Versuchsdurchführung verbleiben, desto schneller sinken sie ab. Ihre Fähigkeit sich in der Schwebe zu halten wird nachhaltig gestört. Das Durchmischen der Algenprobe scheint einen schädigenden Einfluss auf die Algen zu haben.

Für einen solchen Sachverhalt spricht die Betrachtung der fluorometrischen Chl.a-Erfassung des BackScat's und des AOA's auf der zweiten Ausfahrt.

Die prompte Erfassung der Chl.a-Fluoreszenz mit dem BackScat-Fluorometer der CTD-Sonde augenblicklich nach der Probenentnahme durch die Pumpe sieht kaum eine Veränderung des Chl.a-Gehaltes gegenüber der HPLC-Analyse. Ein leicht erhöhter Chl.a-Gehalt von 11 % gegenüber der nasschemischen Methode wird detektiert. Eine Schädigung der Algenzellen kann zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führen. Andererseits kann dieser Unterschied auch biologischen Ursprungs sein, wenn eine andere Diatomeenart als bei der ersten Ausfahrt dominierend war. Dann wären die 11 Prozent der Variabilität bei der Messung eines

biologischen Parameters zuzuschreiben. Vergleicht man die fluorometrische Bestimmung des Chl.a-Gehaltes durch das BackScat und den AOA, so ergibt sich eine Unterschätzung von 50 % durch den AOA.

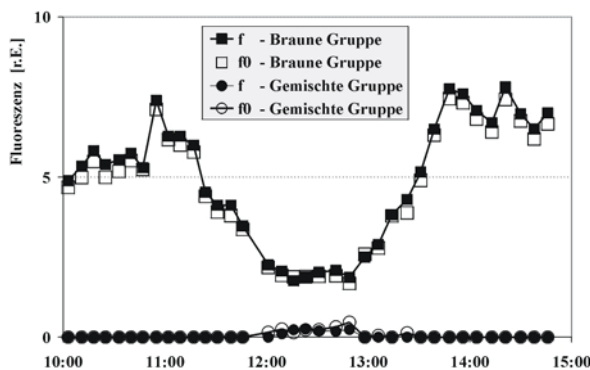
Wenn also die Algen durch die Pumpe geschädigt worden sind, dann ist bei einer Messzeit von knapp 5 Minuten für den AOA ein Absinken der Zellen aus dem Anregungsbereich der Messkammer sehr wahrscheinlich. Die gute Linearität zwischen der HPLC und der AOA Chl.a-Bestimmung über die gesamte Strecke der Probennahmen scheint durch die Absinktheorie plausibel zu sein, denn es handelt sich dabei um einen rein physikalischen Effekt.

**Dagegen spricht aber die folgende Betrachtung:**

Die Zeit von dem Ende des Einpumpens der Wasserprobe in die Messkammer des AOA bis zur ersten Messung ( $f_0$ ) betrug 2 Minuten. In dieser Zeit muss etwa die Hälfte des Phytoplanktons aus dem Anregungsbereich der Messkammer des AOA's gesunken sei, um eine zum BackScat-Fluorometer vergleichbare Fluoreszenzemission zu detektieren. Betrachtet man nun den Messablauf des AOA's zur Erfassung der variablen und der minimalen Fluoreszenz, so zeigt sich ein zeitlicher Versatz in der Erfassung dieser beiden Parameter (Tabelle 8.4-1). Zwei Minuten nach dem Einpumpen der Probe in die Messkammer wird die minimale Fluoreszenz für eine Minute gemessen. Es folgt die  $f_M$ -Messung (3 s) und nach der 30-sekündigen Adaptationszeit die einminütige  $f$ -Messung. Es liegen somit etwas mehr als 1 ½ Minuten zwischen der Messung dieser beiden Werte. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der  $f$ - zu der  $f_0$ -Messung zeigt das folgende Ergebnis der Algengruppendifferenzierung:

**Abbildung 8.7-4: Vergleich des Fit's für die  $f$ - und  $f_0$ -Messung**

Anhand der Rohdaten der  $f$ - und der  $f_0$ -Messung wird die Algengruppenzuordnung berechnet. Das Ergebnis ist mit dem ermittelten Angleichungsfaktor von 1,523 zur HPLC-Analyse korrigiert.



Zeitlich liegen diese beiden Messungen 1 ½ Minuten auseinander. Es ist aber kein markanter Unterschied in der Höhe der Fluoreszenzantworten der gemessenen diskreten Spektren für  $f$  und  $f_0$  festzustellen.

Die Zuordnung zu den Algengruppen durch den Fit ergibt im Rahmen der Messgenauigkeit identische Fluoreszenzantworten der spektralen Gruppen. Nach diesem Ergebnis lässt sich die Vermutung eines schnellen Absinkens in der Messkammer nicht halten! Die Algen müssen schon vor dem Erreichen der Messkammer des AOA „fluorometrisch verloren“ gegangen sein.

Eine Untersuchung bezüglich der mechanischen Zerstörung von Algenzellen durch eine Pumpe wurde nach dieser Ausfahrt an Nordseewasserproben durchgeführt. Es zeigt eine Verringerung von bis zu 40 Prozent in der Chl.a-Konzentration. Die Beschreibung der Versuchsdurchführung und die Vorstellung der Ergebnisse folgt in Kapitel 9.

## 8.8. Die Güte des Fit's

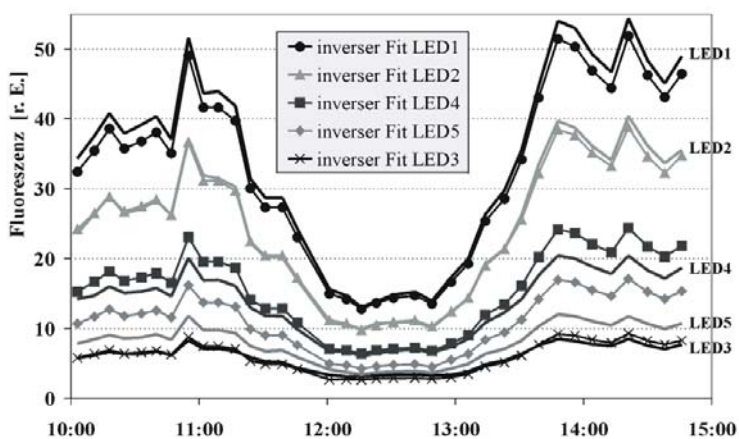
Bei der Analyse der Daten des AOA's der ersten Ausfahrt zeigte sich eine höhere Fluoreszenzemission für die blaue LED, als durch die Hypothese des Normkurvenfit's abgedeckt werden kann. Als zunächst abschließende Betrachtung der Ergebnisse der *in situ* Messung des Chl.a-Gehaltes mit dem AOA auf der zweiten Ausfahrt soll, wie schon im vorherigen Kapitel, die Güte des Fit's geprüft werden.

### 8.8.1. Die Güte des Fit's

Die Güte des Fit's nach Gleichung 7.5.3 ist mit der Güte der Ergebnisse der ersten Ausfahrt vergleichbar. Die Betrachtung der Hypothese des Fit's verdeutlicht die Abweichung von den gemessenen Fluoreszenzrohdaten.

#### Abbildung 8.8-1: Vergleich der Fluoreszenzrohdaten mit der Hypothese

Die Fluoreszenzrohdaten (durchgezogene Linie) und der Hypothese (Linie mit Punkten) für die Algengruppenzuordnung des AOA für alle Probennahmen im Vergleich.



Die Emission der LED1 für eine blaue Anregung (450 nm) wird vom Fit unterschätzt, während die Fluoreszenz für eine 610 nm (LED5) und 590 nm (LED4) Anregung überschätzt wird.

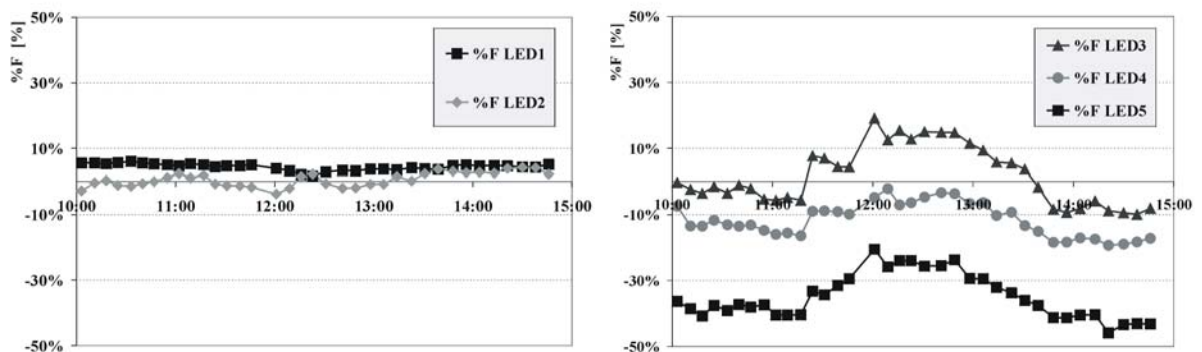
Die relative Fehleinschätzung des Fit's für die fünf LED's wird betrachtet:

**Gleichung 8.8-1: Relative Fehleinschätzung (%F) der Hypothese zu den Rohdaten**

$$\%F(\text{LED}_x) = \frac{\text{Rohdatenwert}(\text{LED}_x) - \text{Hypothese}(\text{LED}_x)}{\text{Rohdatenwert}(\text{LED}_x)}$$

**Abbildung 8.8-2: Relative Fehleinschätzung des Fit's**

Berechnung von %F für die fünf LED's nach der Gleichung 8.8-1.



Durch diese Wahl der Darstellung wird deutlich, zu welchen Zeitpunkten der Fit am stärksten abweicht. Deutlich ist die stärkste prozentuale Abweichung von den Rohdaten für die LED5 (in einer Höhe von minus 30 ± 10 Prozent über den gesamten Zeitbereich) feststellbar. Grundlegend liegt der Fit auch auf dieser Ausfahrt daneben. Ursache ist, wie schon auf der ersten Ausfahrt, eine zu hohe Fluoreszenzemission für die Anregung mit der blauen LED, die durch den Normkurvenfit nicht aufgefangen werden kann. Die Ursache ist noch immer nicht bekannt und bedarf auch weiterhin der näheren Untersuchung.

## 8.9. Zusammenfassung der Erkenntnisse

- Es konnte erneut die Bestätigung erbracht werden, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der nasschemischen und der fluorometrischen Chl.a-Erfassung gibt.
- Der Unterschied der Chl.a-Gehaltsbestimmung von 50 Prozent zwischen dem BackScat-Fluorometer und dem AOA konnte noch nicht geklärt werden.
- Ein eventueller Einfluss der physikalischen Parameter auf die fluorometrische Chl.a-

Erfassung muss untersucht werden.

- Die Auflösungsgrenzen der Geräte, die Algengruppen differenzieren können, müssen ermittelt werden, um die Eignung als Referenzmethode zu verifizieren.
- Die Überhöhung der Fluoreszenzemission bei blauer Anregung (450 nm) der Wasserproben wird auch auf dieser Ausfahrt beobachtet.

## 8.10. Rückblick auf die erste Ausfahrt

Die Überlegungen zur einer Anpassung des braunen spektralen Fingerprints des AOA's nach der Analyse der Daten der ersten Ausfahrt (Kap. 7.6) werden jetzt anhand der Messdaten der zweiten Ausfahrt geprüft. Die Fluoreszenz-Rohdatenwerte der AOA-Messung von den Wasserproben der zweiten Ausfahrt werden offline mit den modifizierten Fingerprints aus Kap. 7.6-1 bzw. 2 aus den Versuchen der Anpassung des braunen spektralen Fingerprints durchgeführt. Die Berechnung der Güte des Fit's ( $F_{rel.}$ ) erfolgt nach der Gleichung 7.5-3 und wird für alle Messwerte durchgeführt. Der Mittelwert über alle  $F_{rel.}$  wird als Bewertungsmaßstab für eine Verbesserung des Fit's verwendet.

**Tabelle 8.10-1: Mittelwert der Güte des Fit's über alle Messwerte der ersten Ausfahrt**

Der Fingerprint der grünen, blauen und gemischten spektralen Algengruppe wird beibehalten und nur der braune spektrale Fingerprint, der auf der zweiten Ausfahrt verwendet wurde, variiert.

<b>Variation des braunen Fingerprints</b>	<b><math>F_{rel.}</math></b>	
Braune Algengruppe (aus der ersten Ausfahrt)	<b>39,4</b>	± 6,6
Neue braune Gruppe A (Kap. 7.6-1)	<b>37,6</b>	± 8,9
Braune Gruppe Station – 1 – (Kap. 7.6-2)	<b>33,0</b>	± 8,6
Braune Gruppe Station – 5 – (Kap. 7.6-2)	<b>26,3</b>	± 8,1

Es zeigt sich für die braunen spektralen Fingerprints „neue braune Gruppe A“ und „braune Gruppe Station – 1 – “ keine nennenswerte Verbesserung des Fit's. Für die „braune Gruppe Station – 5 – “ zeigt sich eine verbesserte Übereinstimmung zwischen der Hypothese des Fit's mit den Fluoreszenz-Rohdaten des AOA's. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen hat sich aber gezeigt, dass die Anpassung des braunen Fingerprints nicht ausreichend ist. Es wird sich zeigen, dass die Einbeziehung eines zusätzlichen Fingerprints in den Fit (von einem noch unbekanntem Fluoreszenzstoff) die Güte des Fit's noch weiter verbessern wird (im folgenden Kapitel).

## 9. Ursachen für eine schlechte Güte des Fit's

Auf beiden Ausfahrten (Kap. 7 und Kap. 8) zeigt sich eine schlechte Übereinstimmung zwischen den Messwerten der Fluoreszenzemission (Rohdaten) und der Hypothese des Fit's. In diesem Kapitel wird dieser schlechten Näherung des Fit's auf den Grund gegangen.

### 9.1. Einfluss des Salzgehaltes

Der geplante Einsatz des AOA's auf einem Fährschiff nach Helgoland bedeutet Messungen an Wasserproben von einem Bereich der Nordsee, in dem sich die Salzkonzentration aufgrund des Zuflusses von Süßwasser aus der Elbe und aus dem Speicherkoog südlich von Büsum in einem Bereich von 20 bis 34 ‰ ändert. Auf der zweiten Ausfahrt wurde im küstennahen Bereich des Wattenmeeres ein Salzgehalt zwischen 25 – 30 ‰ gemessen.

Um einen Einfluss auf die Algengruppenerkennung ausschließen zu können, wurde die nachfolgende Untersuchung durchgeführt.

Die Grundidee der Prüfung basiert auf der ungenügenden Abtrennung des LED-Anregungslichtes von der Fluoreszenzemission (680 – 720 nm). Ein geringer Anteil des Lichtes wird trotz der optischen Filter von dem Photomultiplier detektiert. Es kann sich dabei um eine echte Transmission des Anregungslichtes durch die Filter handeln oder um eine Fluoreszenz seitens der Filter der Emissionsseite selbst (von dem RG9 ist eine Eigenfluoreszenz bekannt). Diese Detektierung bewirkt die Messung einer scheinbaren Fluoreszenz auch an reinem Wasser (Offset). Zur Kompensation lässt sich durch eine Messroutine der Offset bestimmen und wird für alle Messungen von den Rohdaten abgezogen. Für diesen Versuch wird aber nun gerade dieser Umstand ausgenutzt. Der Offset wird in der Weise eingestellt, dass der AOA für destilliertes Wasser die scheinbaren Konzentrationen von 0,84 / 1,01 / 0,93 und 1,14 µg Chl.a pro Liter für die grüne / blaue / braune und gemischte Gruppe ermittelt.

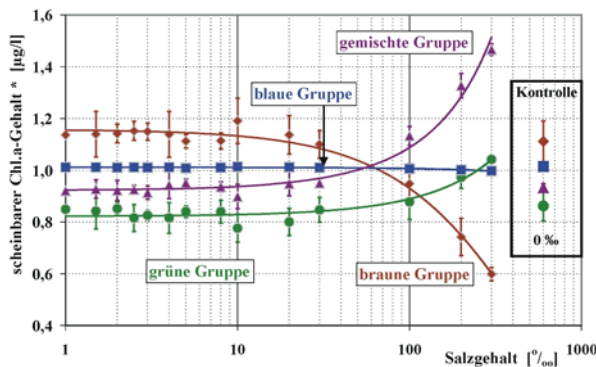
Mehrere Proben aus doppelt entionisiertem Wasser werden mit verschiedenen Mengen Salz gemischt. Sollte die Salzkonzentration der Proben einen Einfluss auf die Fluoreszenzdetektierung haben, so muss sich dies auf die Höhe des Offsets auswirken. Durch

die vorher beschriebene Manipulation des Offsets wirkt sich jede Änderung desselben direkt auf den scheinbaren Chl.a-Gehalt (\* in Abbildung 9.1-1 und -2) der vier Algengruppen aus. So ist sofort eine Abschätzung der Höhe einer möglichen Fehleinschätzung der Algengruppenzuordnung in  $\mu\text{g Chl.a}$  pro Liter möglich.

Die Messungen des AOA's werden in einem Klimaschrank (WTB Binder) unter einer konstanten Umgebungstemperatur von 18 °C an Proben mit Salzkonzentrationen von 0 bis 50‰ durchgeführt. Zusätzlich werden die Ergebnisse für Messungen an Konzentrationen von 100, 200 und 300‰ hinzugezogen, die zwar keinen Bezug zu realen Salzwasserkonzentrationen haben, aber eine Näherung der Ergebnisse über eine Exponentialfunktion stützen. Die Temperatur im Inneren des AOA's variierte während der über 4½ Stunden dauernden Messung unter 0,1 °C, womit Temperatureffekte auf die Ergebnisse des Experimentes auszuschließen sind (Abbildung 9.1-2).

**Abbildung 9.1-1: Einfluss des Salzgehaltes auf die Algengruppenerkennung**

Darstellung der Zuordnung der Algengruppen für einen manipulierten Offset in Abhängigkeit vom Salzgehalt (logarithmische x-Achse). Aus fünf Messungen jeder Salzwasserprobe wurde der Mittelwert (Punkte) und die Standardabweichung berechnet. Bei der Kontrolle (Kasten) handelt es sich um die Messung an Süßwasser (Salzgehalt 0 ‰, losgelöst von der x-Achse).



Die Veränderungen in der Gruppenzuordnung durch den Salzgehalt können durch eine exponentielle Trendlinie beschrieben werden. Die Konzentrationen von 100, 200, 300‰ haben keinen Bezug zu realen Wasserproben.

Die Ergebnisse zeigen für eine Salinität von 0 – 50 ‰ keinen nennenswerten Einfluss auf die Algengruppenzuordnung und somit keine Offsetveränderungen. Erst ab einem Salzgehalt von 100 ‰ zeigt sich eine Verschiebung in der Zuordnung des Fit's.

Die Zuordnung zu der blauen spektralen Gruppe bleibt für alle Salzkonzentrationen konstant.

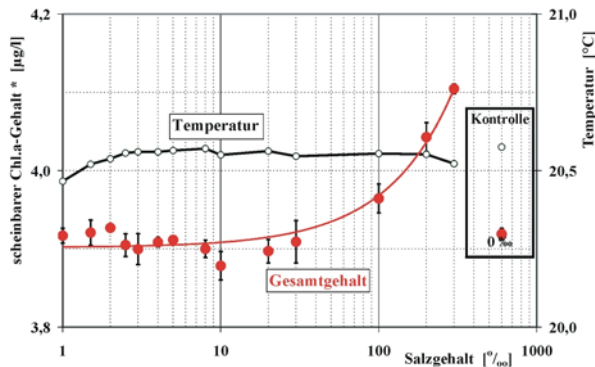
Die weiteren drei spektralen Gruppen zeigen bis zu einer Salinität von 50‰ eine maximale Veränderung in der Zuordnung, die unter 0,05  $\mu\text{g Chl.a}$  pro Liter und somit im Bereich der Auflösungsgrenze für die einzelnen Gruppen liegt.



Für den scheinbaren Gesamtchlorophyll-*a* Gehalt ergibt sich ein sehr ähnliches positives Bild:

**Abbildung 9.1-2: Einfluss des Salzgehaltes auf die Algengruppenerkennung**

Die linke y-Achse gibt die Höhe des Chl.a-Gesamtgehaltes in µg pro Liter an, die rechte Achse die Temperatur in °C. Die Kontrolle entspricht den Messwerten für einen Salzgehalt von 0 ‰.



Bis 100 ‰ Salinität bleibt die Erhöhung des Chl.a-Gesamtgehaltes unter 0,1 µg Chl.a pro Liter. Die Kontrolle zeigt das Ergebnis für die Messung an doppelt entionisiertem Wasser, dass mit den niedrigen Salzkonzentrationen übereinstimmt.

Die Änderung des Salzgehaltes zwischen 20 bis 34 ‰ auf der Fährroute Büsum - Helgoland wird keine durch den AOA bedingten Auswirkungen auf die Algengruppendifferenzierung haben.

**9.2. Einfluss der Trübung**

Der Einfluss der Trübung auf die Chl.a-Bestimmung durch die Trübung wurde von Beutler et al. [2001] untersucht. Zur Messung des Chl.a-Gehaltes und der Erkennung von spektralen Algengruppen wurde ein mit dem AOA vergleichbares Gerät eingesetzt. Zur Erzeugung der diskreten Anregungsspektren wurden 5 unterschiedliche LED's mit den Wellenlängen von 450, 525, 570, 590 und 610 nm verwendet.

Das in der Untersuchung von Beutler verwendete Gerät ist mit dem AOA nahezu identisch. Der einzige Unterschied zum AOA besteht in einer etwas kürzeren Lichtstrecke (25 Millimeter gegenüber 38 Millimeter beim AOA).

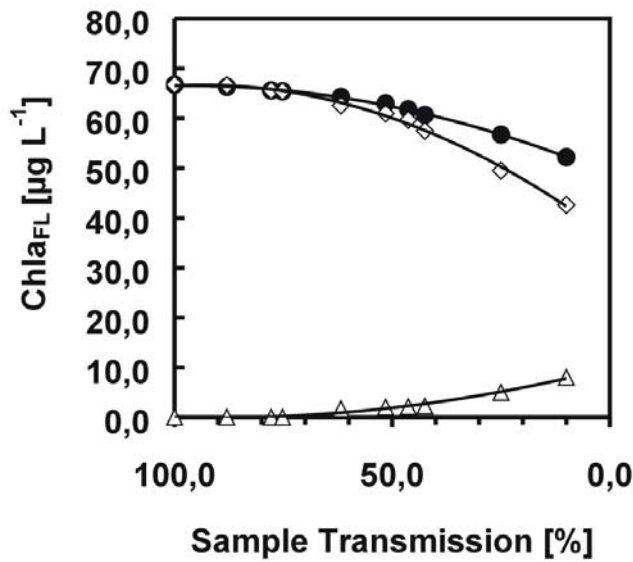
Anmerkung:

Die Messung der Transmission von den Wasserproben auf der ersten bzw. der zweiten Ausfahrt ergaben als minimale Transmission Werte von 68 % bzw. 75 % für den küstennahen Bereich.

Eine Kultur der Chlorophyceae *Chlorella vulgaris* wurde mit nicht fluoreszierenden Partikeln (Betonit) versetzt. Die Menge an zugegebenem Betonit veränderte die Trübung der Probe bei einem gleichbleibenden Chl.a-Gehalt.

**Abbildung 9.2-1: Einfluss der Trübung auf die fluorometrische Chl.a-Bestimmung**

Die Abbildung zeigt den Chl.a-Gehalt der grünen (□) und der braunen (■) spektralen Gruppe, sowie den Chl.a-Gesamtgehalt (◇) in Abhängigkeit zur Transmission der Probe. Aus Beutler et al. [2001].



Die Verminderung der Transmission durch Betonit auf 50 Prozent (für eine Lichtweglänge von 25 Millimetern) bewirkt eine Verringerung von nur 5 Prozent für die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes.

Die etwas längere Lichtstrecke beim AOA (knapp 50% mehr) sorgt für ein früheres Erreichen der Unterschätzung des Chl.a-Gehaltes von 5 Prozent durch den AOA. Da die minimalen Transmissionswerte für den küstennahen Bereich aber bei knapp 70 Prozent liegen, kann der Fehler der Chl.a-Bestimmung mit dem AOA durch nichtfluoreszierende Partikel mit gutem Gewissen als kleiner als 5 Prozent angenommen werden.

Ein Einfluss auf die Zuordnung der Algengruppen ist nach der Abbildung 9.2-1 erst für eine Transmission kleiner als 50 Prozent zu berücksichtigen.

Bis zu einem Wert von 50 Prozent für die Transmission ist dieser Fehler kleiner als 3 Prozent.

### 9.3. Einfluss der Temperatur

Die nachfolgenden Versuche sollten Aufschluss über den Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Ergebnisse der Algengruppenerkennung des AOA's geben.

### 9.3.1. Kalibrierung der Temperaturmessung des AOA's

Die Temperaturrohdaten des AOA's werden mit der Temperaturmessung mittels eines Präzisionsthermometer (Digital Platinum Resistance Thermometer 9540, Guideline) verglichen. Durch eine lineare Regression lässt sich die Übertragungsfunktion für die Kalibrierung der Rohdaten (gemessen in Digits) des Temperatursensors des AOA's auf die Temperatur in °C ( $T_{AOA}$ ) ermitteln. Die Übertragungsfunktion ergibt sich zu:

**Gleichung 9.3-1:**

$$T_{AOA} [^{\circ}\text{C}] = 0,05290 \cdot T_{AOA}^{\text{Rohdaten}} [\text{Digits}] - 1,41972$$

Da sich der Offset der Temperaturkalibrierung des AOA's nicht einstellen lässt (fehlendes Dialogfeld im Menü), wird als Näherung nur die Steigung angepasst.

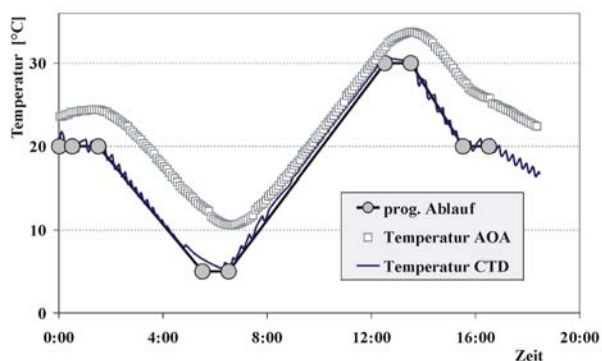
Der Temperatursensor befindet sich in dem Gehäuse der Elektronik und dient der internen Überwachung des Systems. Die Näherung über die Steigung reicht als Referenz vollkommen aus.

### 9.3.2. Programmierung des Klimaschranks

Für die angestrebten Versuche wird ein Temperaturverlauf für den Klimaschrank programmiert:

**Abbildung 9.3-1: Temperaturverlauf in dem Klimaschrank**

Programmierter Temperaturverlauf im Klimaschrank (Sollwert: graue Punkte), die Kontrollmessung mit der CTD-Sonde und die im AOA gemessene Temperatur für die erste Versuchsanordnung zur Ermittlung des Temperatureinflusses auf die Algengruppenenerkennung.



Die Abbildung zeigt den programmierten Temperaturverlauf während des Versuches, sowie die Ergebnisse der Kontrollmessung mit einer CTD-Sonde. Deutlich zeigt sich die Toleranz in der Regelung der Temperatur des Klimaschranks. Für Objekte mit genügend großer Wärmekapazität geht die Temperatur des Objektes in die Kurve der gemittelten Temperatur der CTD-Sonde über. Die vom AOA gemessene Temperatur innerhalb des

Gehäuses liegt aufgrund der Wärmeentwicklung der elektronischen Bauteile über der Temperatur im Klimaschrank und zeigt einen zeitlichen Versatz.

### 9.3.3. Manipulation des Offset's des AOA's

Nach der Eichung der Temperaturmessung des AOA's und der Programmierung des Klimaschranks wird nun der Einfluss auf die Algengruppenerkennung untersucht.

Hierzu wird der Offset der Fluoreszenzmessung des AOA's für die Temperatur von 20 °C in der Weise manipuliert, dass bei der Berechnung der Algengruppenzugehörigkeit für jede Gruppe eine Konzentration von 0,5 µg Chl.a pro Liter detektiert wird.

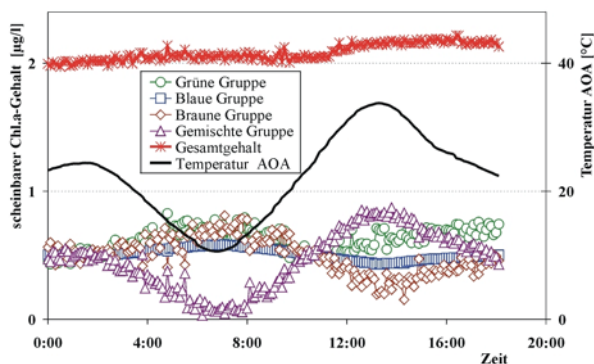
### 9.3.4. Temperaturversuch 1

Der AOA und der Probenbehälter (½ Liter doppelt entionisiertes Wasser) werden in den Klimaschrank gestellt und dem programmierten Temperaturverlauf unterworfen. Alle 5 Minuten wird vom AOA eine Probe des Wassers in die Messkammer gepumpt und vermessen.

In Abbildung 9.3-2 sind die Ergebnisse des AOA's für den Gesamtgehalt und für die vier spektralen Gruppen in µg Chl.a pro Liter dargestellt. Zum Vergleich dazu ist zusätzlich der Verlauf der Geräteinnentemperatur des AOA's wiedergegeben:

**Abbildung 9.3-2: Temperaturversuch 1**

Der AOA und Wasserprobe befinden sich beide im Klimaschrank. Dargestellt sind die Ergebnisse der Algengruppenzuordnung und des Gesamtgehaltes an Chl.a sowie die Geräteinnentemperatur (Linie) des AOA's.



Bei Temperaturen unter 20 °C setzt eine Unterschätzung der gemischten Gruppe, einhergehend mit einer Überschätzung der drei anderen Gruppen, ein. Für ansteigende Temperaturen zeigt sich ein inverser Effekt.

So gibt es einen proportionalen Zusammenhang zwischen Temperatur und dem Chl.a-Gehalt der gemischten Gruppe und einen umgekehrt proportional Zusammenhang zwischen

Temperatur und dem Chl.a-Gehalt der blauen, grünen und braunen Gruppe. Die Schwankung der Chl.a-Konzentration der einzelnen Algengruppen zwischen der höchsten und der niedrigsten Temperatur ist für die gemischte spektrale Gruppe mit 0,8 µg Chl.a pro Liter am stärksten ausgeprägt.

Auf den Chl.a-Gesamtgehalt hat die Temperaturabhängigkeit der spektralen Gruppen einen minimalen Einfluss.

Anmerkung:

Um 11:18 bei einer Geräteinnentemperatur von 28 °C setzt aber eine durchgehende Erhöhung des Chl.a-Gesamtgehaltes um 0,150 µg Chl.a pro Liter für alle späteren Zeitpunkte des Versuchablaufes ein. Diese Verschiebung im Gesamtgehalt konnte bei anschließenden Untersuchungen als ein Defekt in der Digitalelektronik identifiziert und behoben werden. Für die Messwerte vor und nach diesem Zeitpunkt ist der Temperatureinfluss auf den Chl.a-Gesamtgehalt kleiner als 0,1 µg pro Liter.

**Fazit:**

Es gibt einen Temperatureinfluss auf die Algengruppenerkennung mit dem AOA. Temperaturänderungen wirken sich auf die Zuordnung der spektralen Gruppen aus. Für eine Änderung der Umgebungstemperatur von 5 auf 30 °C beträgt die Fehlzuzuordnung aber weniger als ±0,5 µg Chl.a-Gehalt pro Liter (vom Sollwert) für die einzelnen spektralen Gruppen.

Für eine Änderung der Umgebungstemperatur von 1 °C entspricht dies einer Fehlzuzuordnung von ± 0,02 µg Chl.a pro Liter. Auf den Chl.a-Gesamtgehalt, der Summe aller spektralen Gruppen, zeigen die Umgebungstemperaturänderungen zwischen 5 – 30 °C einen zu vernachlässigenden Einfluss von weniger als 0,1 µg Chl.a pro Liter.

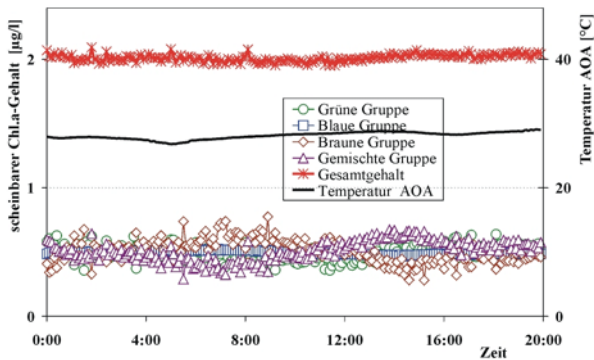
### 9.3.5. Temperaturversuch 2

In dem zweiten Versuch wurde der AOA aus dem Klimaschrank genommen und nur der Wasserprobenbehälter den Temperaturänderungen unterworfen.

Die Geräteinnentemperatur ist bei dieser Messung von der Proben temperatur unbeeinflusst, während die Lumineszenzdioden durch die Nähe zur Messkammer einem Einfluss der Proben temperatur unterliegen:

**Abbildung 9.3-3: Temperaturversuch 2**

Nur der Wasserprobenbehälter unterliegt den Temperaturänderungen im Klimaschrank.



Die Geräteinnertemperatur des AOA's bleibt während der zwanzigstündigen Messung mit  $27,5 \pm 0,5 \text{ °C}$  nahezu konstant.

Die vom AOA zugeordneten Konzentrationen der Algengruppen zeigen hier keine Abhängigkeit von der Geräteinnentemperatur. Die Schwankungen der zugeordneten Chl.a-Gehalte der spektralen Gruppen stehen im Zusammenhang mit der Temperatur der Wasserprobe. Der Unterschied zwischen der höchsten und niedrigsten Konzentration beträgt weniger als  $0,2 \text{ µg Chl.a pro Liter}$  für alle Gruppen bei einer Proben temperatur zwischen 5 bis  $30 \text{ °C}$ .

Für eine Änderung der Proben temperatur um  $1 \text{ °C}$  entspricht dies einer Chl.a-Fehlzuordnung der Gruppen um weniger als  $0,01 \text{ µg Chl.a}$ . Der Chl.a-Gesamtgehalt hingegen zeigt praktisch keine Abhängigkeit von der Änderung der Proben temperatur.

**Fazit:**

Die Temperatur der Wasserprobe hat nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zuordnung der spektralen Gruppen und kann vernachlässigt werden.

**9.3.6. Folgerungen aus den beiden Temperaturversuchen**

Der Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Messsystem AOA ist für die Bestimmung des Chl.a-Gesamtgehaltes einer Wasserprobe vernachlässigbar.

Für die Algengruppenzuordnung des AOA's kann die maximale Fehlbestimmung durch den Einfluss der Umgebungstemperatur mit  $\pm 0,02 \text{ µg Chl.a pro Liter pro } 1 \text{ °C}$  abgeschätzt werden.

## 9.4. Betrachtungen zu den *in situ* Daten der zweiten Ausfahrt

In diesem Kapitel wird auf die Güte des Fit's für die Algengruppenbestimmung durch eine Betrachtung der Hypothese zu den Rohdaten der Messung eingegangen (Kap. 8.8).

Durch die Einführung einer relativen Fehleinschätzung (%F) des Fit's (Gleichung 8.8-1) zeigt sich in Abbildung 8.8-2 B eine Veränderung von %F für die LED's 3 – 5. Es soll nun geprüft werden, ob die Veränderung von %F in einem Zusammenhang mit den physikalischen Parametern steht.

Um die Verknüpfung zwischen den physikalischen Größen und der relativen Fehleinschätzung des Fit's (%F) einschätzen zu können, werden die Korrelationskoeffizienten für die %F der LED's berechnet. Allgemein gilt für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $\rho$  :

**Gleichung 9.4-1:**

$$\rho_{X,Y} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \quad \text{mit} \quad \text{Cov}(X, Y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu_X)(y_i - \mu_Y) \quad \text{und es gilt: } -1 \leq \rho_{X,Y} \leq 1$$

**Tabelle 9.4-1: Korrelationskoeffizienten von %F und den physikalischen Parametern**

Korrelationskoeffizienten	%F LED1	%F LED2	%F LED3	%F LED4	%F LED5
Transmission	-0,57	-0,57	0,80	0,81	0,80
Temperatur	0,75	0,50	-0,89	-0,83	-0,94
Salzgehalt	-0,71	-0,50	0,85	0,80	0,90

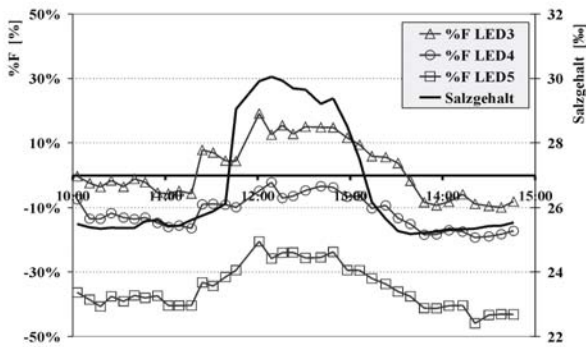
Ist der Betrag des Korrelationskoeffizienten größer 0,8, so spricht man von einem signifikanten Zusammenhang der betrachteten Messgrößen X und Y. Die Korrelation für die drei physikalischen Messgrößen zu den berechneten Werten von %F für LED1 und LED2 zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen Größen. Für die Größen %F LED3 – 5 und den physikalischen Parametern kann von einem signifikanten Zusammenhang gesprochen werden.

Durch einen direkten Vergleich der Zeitreihen von %F LED3 – 5 mit den physikalischen Parametern Temperatur, Trübung und Salzgehalt soll die Signifikanz dieses Zusammenhanges geprüft werden.

### 9.4.1. Einfluss des Salzgehaltes auf die Chl.a-Bestimmung

Die Korrelationskoeffizienten für %F der LED's 3 – 5 zu dem Salzgehalt (Tabelle 9.4-1) weisen Werte zwischen 0,8 bis 0,9 auf. Der direkte Vergleich von %F (LED3 – 5) und dem Salzgehalt der Proben der zweiten Ausfahrt zeigt das folgende Bild.

**Abbildung 9.4-1: Vergleich des Salzgehaltes mit %F für die LED's 3 – 5**



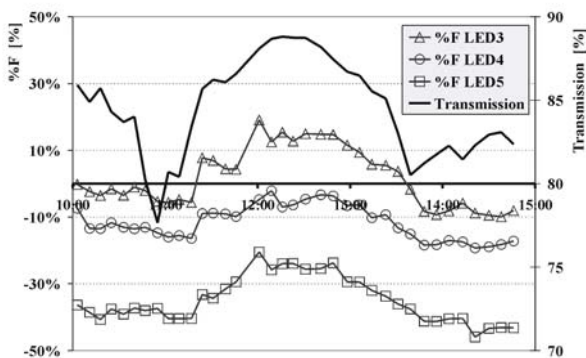
Ein Einfluss einer Salzgehaltsänderung muss sich unmittelbar auf die Messungen auswirken, weil es sich um einen nichtdynamischen Prozess handelt [Wolf 1989].

In der Darstellung der Zeitreihen zeigt sich eine signifikante Änderung von %F für alle drei LED's sowohl vor als auch nach der drastischen Änderung des Salzgehaltes in der Zeit zwischen 11:30 bis 13:30. Aus diesem Grund ist ein Einfluss des Salzgehaltes auf %F auszuschließen.

Dieses Ergebnis ist mit der Laboruntersuchung (Kapitel 9.1) zu der Abhängigkeit der Algengruppenerkennung konform und bestätigt diese somit auch für *in situ* Messungen.

### 9.4.2. Einfluss der Transmission auf die Chl.a-Bestimmung

**Abbildung 9.4-2: Vergleich der Transmission mit %F für die LED's 3 – 5**



Bei einer genaueren Betrachtung durch die Gegenüberstellung von %F des Fit's für die LED's 3 – 5 mit der Transmission zeigt sich deutlich, dass die starke Abnahme der Transmission um 11:00 Uhr keinerlei Einfluss auf %F zeigt.

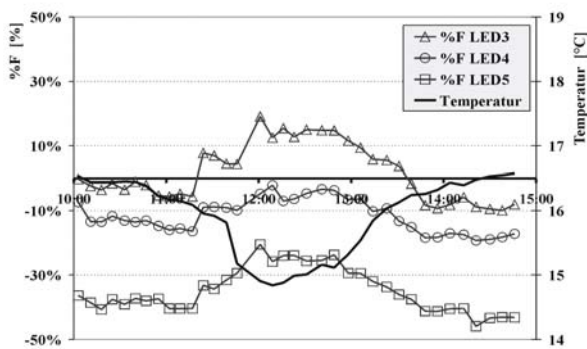


Ebenfalls ist kein Einbruch in der Chl.a-Bestimmung der Algengruppen (Abb. 8.4-2) oder des Gesamtgehaltes (Abb. 8.6-2) feststellbar. Auch bei einem Korrelationskoeffizienten von ca. 0,8 zwischen %F und der Transmission für die drei LED's (3 – 5) spricht diese Betrachtung gegen einen Einfluss auf die Bestimmung des Chl.a-Gesamtgehaltes und die Algengruppenerkennung. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Beutler ([Beutler et al. 2001], Kap. 9.2).

### 9.4.3. Einfluss der Temperatur auf die Chl.a-Bestimmung

Die Veränderung der Werte von %F für die LED's 3 – 5 zeigt zum Temperaturverlauf die höchsten Werte für den Betrag des Korrelationskoeffizienten im Vergleich zu den beiden anderen physikalischen Parametern (Tabelle 9.4-1).

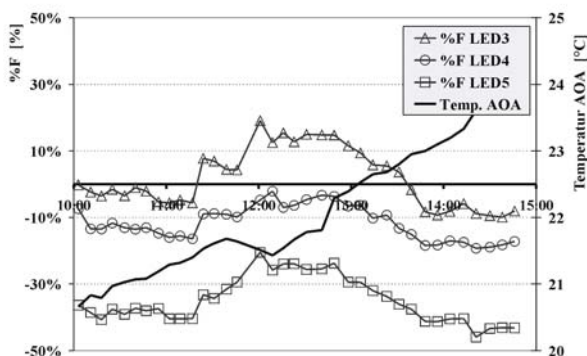
**Abbildung 9.4-3: Vergleich der Probertemperatur mit %F für die LED's 3 – 5**



Die Wassertemperatur verringert sich vom Beginn der Messung bis 11:44 um ein ½ °C. Mit der Änderung des Salzgehaltes fällt sie innerhalb von einer halben Stunde um 1 °C und erreicht um 12:15 Uhr mit 14,8 °C ihr Minimum.

Die Wassertemperatur verändert sich auf der gesamten Ausfahrt um 1,5 °C. Gleichzeitig aber zeigt sich eine Erhöhung der Geräteinnentemperatur des AOA's um etwas mehr als 3 °Celsius:

**Abbildung 9.4-4: Vergleich der Geräteinnentemperatur des AOA's mit %F für die LED's 3 – 5**



Dieser Anstieg der Temperatur in dem AOA kann über eine so lange Zeitspanne nur auf eine Erhöhung der Umgebungstemperatur zurückgeführt werden.

Dieses setzt ebenfalls eine Temperaturerhöhung der „Ansteuerungsseite der LED's“ (Abb. 5.2-1) voraus, die sich außerhalb des Gehäuses befindet. Es zeigt sich aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Geräteinnentemperatur des AOA's und %F für die LED's 3 – 5 und deshalb ist auch ein Einfluss der Wassertemperatur in der Form, wie ihn Abbildung 9.4-3 vermuten lassen könnte, auf die Messergebnisse unwahrscheinlich.

### **Fazit:**

Die Unabhängigkeit der Algengruppenerkennung von der Temperatur der Wasserprobe kann nicht mit letzter Sicherheit anhand der *in situ* Daten festgestellt werden. Anhand den vorgebrachten Gründen und der Untersuchung in Kapitel 9.3 ist eine Abhängigkeit aber unwahrscheinlich.

## 9.5. Gelbstoffe als Störeinfluss auf die Algengruppenerkennung?

In natürlichen Wasserproben liegen fluoreszierende Substanzen in gelöster Form vor, die allgemein als Huminstoffe bezeichnet werden. Laut Definition werden alle lichtabsorbierenden Substanzen einer natürlichen Probe als Huminstoff bezeichnet, die bei der Filtrierung durch eine Porengröße von 0,45 µm hindurchtreten [Sturm 1996, Kronfeld 1988]. Für den marinen Bereich hat sich auch die Bezeichnung Gelbstoffe durchgesetzt. Die Huminstoffe führen zu einer gelben bis bräunlichen Verfärbung des Wassers.

Bei Huminstoffen handelt es sich um eine Sammelbezeichnung für hochpolymere Substanzen. Diese entstehen bei der Humifizierung von organisch totem Material [Sturm 1996] und sind in nahezu allen aquatischen Systemen anzutreffen.

Es soll nun geprüft werden, ob Gelbstoffe als Störeinfluss in den Wasserproben nachgewiesen werden können.

Die diskreten Anregungsspektren von zwei Gelbstoffen werden mit dem AOA ermittelt. Die Messdaten der zweiten Ausfahrt werden anschließend erneut gefittet, wobei die Fingerprints der Gelbstoffe dem Normkurvenfit als spektrale Gruppe zur Lösungsfindung angeboten werden.

### 9.5.1. Diskrete Anregungsspektren von Gelbstoffen

Die Gelbstoffe Huminsäure und Ligninsulfonsäure, sowie der Farbstoff Rodamin B werden in doppelt entionisiertem Wasser (DeW) gelöst.

Huminsäureansatz: 29,7 mg Huminsäure Na-Salz (Merck) auf 450 ml DeW

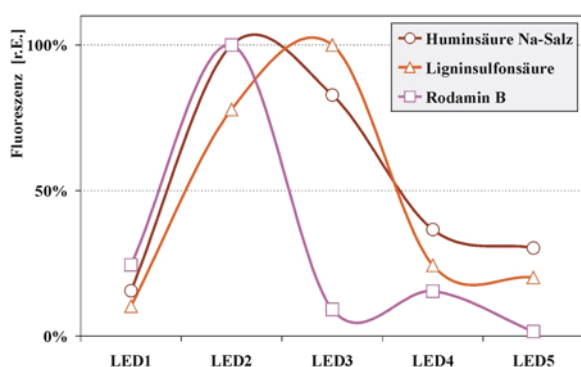
Ligninsulfonsäureansatz: 24,9 mg Ligninsulfonsäure (Karl Roth) auf 500 ml DeW

Rodamin B Ansatz: 25,0 mg Rodamin B (Merck) auf 450 ml DeW

Mit dem AOA werden die diskreten Anregungsspektren der drei Ansätze gemessen. Die Spektren werden auf das Maximum normiert:

#### Abbildung 9.5-1: Diskrete Anregungsspektren der fluoreszierenden Substanzen

Die diskreten Spektren sind maximumsnormiert normiert.



Die Rohdaten des AOA's für die einzelnen diskreten LED's (für die Anregung der Fluoreszenz) zeigen für die Ansätze mit der Huminsäure und mit dem Rodamin B eine maximale Fluoreszenzemission für die LED2 (525 nm). Für den Ligninsulfonsäureansatz liegt das Maximum bei der LED3 (575 nm).

### 9.5.2. Die Verwendung als Gelbstoff-Fingerprints

Diese drei diskreten Spektren werden zum Test als Fingerprint für einen Gelbstoff verwendet und an den Daten der zweiten Ausfahrt getestet.

Der Fingerprint der auf der Ausfahrt nicht nachgewiesenen blauen spektralen Gruppe wird nacheinander durch die diskreten Spektren der drei Ansätze ersetzt. Die Gruppenzuordnung wird durch den Fit neu berechnet.

#### Ergebnis:

Die beiden Fingerprints für die Huminsäure und das Rodamin B beeinflussen das Ergebnis des Fit's überhaupt nicht. Die Anteile beider Normkurven werden in der Hypothese zu Null.

Mit dem Fingerprint für die Ligninsulfonsäure verbessert sich die Güte des Fit's ebenfalls nicht. Der Anteil der Cryptophyceae (im Fit mit den vier spektralen Algengruppen) aber geht in einen Anteil an Ligninsulfonsäure über.

Das sich keine Cryptophyceae in der Wasserprobe befinden sondern der Gelbstoff Ligninsulfonsäure ist nicht glaubhaft. Die HPLC-Analyse identifiziert das Pigment Alloxanthin von Cryptophyceen zumindest in einigen Wasserproben. Diese Fehlzuzuordnung ist auf die schlechte Güte des Fit's zurückzuführen.

### **Fazit:**

Nach der Aufnahme der Fingerprints der drei Ansätze war eine Verbesserung des Fit's eigentlich schon nicht mehr zu erwarten. Die Form der drei diskreten Spektren zeigt eine hohe Fluoreszenz im grünen bis gelben und nicht im blauen Wellenlängenbereich (Abbildung 9.5-1).

Die Analyse der Fitergebnisse zur Algengruppenerkennung des AOA's der ersten und zweiten Ausfahrt zeigte aber deutlich eine Überhöhung der Fluoreszenz für die Anregung mit der LED1 bei einer Wellenlänge von 450 nm (vgl. Abb. 7.5-1).

Die untersuchten Gelbstoffe Ligninsulfonsäure und Huminsäure Na-Salz sind eindeutig nicht der unbekannte Fluoreszenzstoff, der den Fit verschlechtert.

Ein Farbstoff der ein Spektrum wie das Rodamin B aufweist kommt ebenfalls nicht als Störeinfluss in den Nordseewasserproben in Frage.

## **9.6. Der Einfluss des Pigments Phaeophytin-a**

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse auf beiden Ausfahrten zeigten für den küstennahen Bereich des Wattenmeeres den Nachweis des Pigmentes Pheaophytin-a auf.

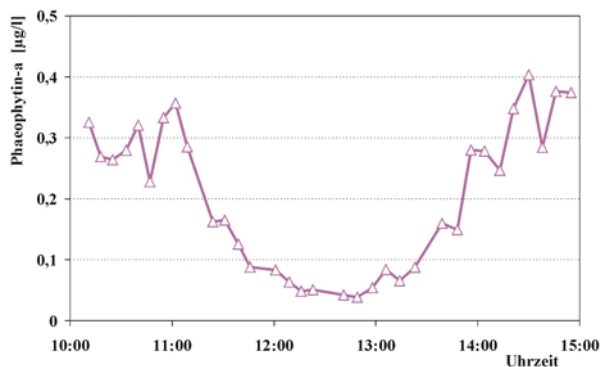
Der Nachweis dieses Pigments gilt als ein Maß für die „Schädigung“ der Algenzellen. Die Zerstörung von Zellen kann natürlichen Ursprungs sein oder ein Hinweis auf eine fehlerhafte Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse (Kap. 3.3.6).

### 9.6.1. Nachweis von Phaeophytin-a auf der zweiten Ausfahrt

Auf der zweiten Ausfahrt wurden hauptsächlich im Bereich des Wattenmeeres die Messungen durchgeführt. Die HPLC-Analyse weist für alle Probenahmen das Phaeophytin-a (Derivat des Chl.a, Kap. 3.3.6) nach:

**Abbildung 9.6-1: Gehalt an Phaeophytin-a in den Proben nach HPLC**

Ergebnis der HPLC-Analyse für die Konzentration des Phaeophytin-a in den Algenzellen der zweiten Ausfahrt.



Das Phaeophytin-a ist ein Zerfallsprodukt des Chl.a. Im küstennahen Bereich wird es in größeren Mengen nachgewiesen (bei gleichzeitig höherem Chl.a-Gehalt).

### 9.6.2. Das Emissionsspektrum des Phaeophytin-a

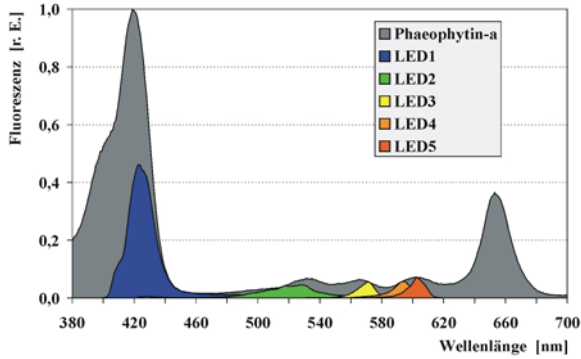
Für die Kalibrierung der HPLC-Analyse gibt es sogenannte Pigmentstandards. Es handelt sich dabei um Pigmente in Reinform (z. B. Chl.a), die in Azeton gelöst sind. Für das Phaeophytin-a gibt es einen solchen Standard nicht. Bei der Überalterung von Chl.a Standards aber bildet sich das Phaeophytin-a, es ist ein Zerfallsprodukt dieses Pigments. Von einem solchen überalterten Chl.a-Standard wird das Anregungsspektrum (Emissionswellenlänge von 720 nm) aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 9.6-2 nachfolgend wiedergegeben.

### 9.6.3. Bildung eines Phaeophytin-a Fingerprints für den AOA

Das Phaeophytin-a lag in Azeton gelöst vor. Das Risiko eines Schadens an der Messkammer des AOA's bei der Befüllung mit Azeton erscheint mir in bezug auf die Dichtungen und die Schläuche zu hoch (Die Küvettenhalterung für den AOA wurde erst mit dem später vollzogenen Umbau des Gerätes gebaut). Deshalb wird die Bildung des Fingerprints für den AOA über das volle Anregungsspektrum des Phaeophytin-a, gemessen mit dem Spektrofluorophotometer, vollzogen.

**Abbildung 9.6-2: Anregungsspektrum des Phaeophytin-a und die Emissionsspektren der LED's**

Das Anregungsspektrum des in Azeton gelösten Phaeophytin-a (intensitätskorrigiert) ist auf das Maximum normiert (Messung der Fluoreszenz bei  $720 \pm 5$  nm). Dieses Spektrum wird mit den Emissionsspektren der LED's gewichtet. Die Flächen unter den Kurven der LED's 1 – 5 entsprechen der relativen Fluoreszenzemission des Phaeophytin-a bei einer Anregung mit der LED.



Das maximumnormierte Anregungsspektrum des Phaeophytin-a wird mit den maximumnormierten LED-Emissionsspektren gewichtet.

Die resultierende Fläche unter den Kurven (LED1 – 5) wird durch Integration ermittelt. Sie entspricht der relativen Fluoreszenzemission des Phaeophytin-a für eine Anregung mit der entsprechenden LED.

Nur für die blaue LED1 (450 nm) und die grüne LED2 (525 nm) ist mit einer Fluoreszenzemission ( $F_{\text{Phaeo}}(\text{LED}_x)$ ) zu rechnen. Durch die Bildung des Integrals lässt sich die relative Höhe der Emission berechnen:

**Gleichung 9.6-1:**

$$F_{\text{Phaeo}}(\text{LED}_x) = \int_{400}^{700} \text{Spektrum}_{\text{Phaeo}}(\lambda) \cdot \text{Spektrum}(\text{LED}_x, \lambda) \, d\lambda$$

Das Integral geht durch die diskreten Messwerte in eine Summe über alle diskreten Wellenlängen über. Die Fluoreszenzemission des Phaeophytin-a ergibt sich bei einer Anregung mit der LED „x“ zu:

**Tabelle 9.6-1: Fluoreszenzemission des Phaeophytin-a bei der Anregung mit der LED „x“**

	LED1	LED2	LED3	LED4	LED5
$F_{\text{Phaeo}}(\text{LED}_x)$ [r.E.]	8,8	1,8	0,6	0,9	0,8
Relative $F_{\text{Phaeo}}(\text{LED}_x)$	100,0%	20,5%	7,0%	10,2%	9,1%

Die Werte für die relative Fluoreszenzemission des Phaeophytin-a bilden die Grundlage für einen Phaeophytin-Fingerprint, der für die Algengruppenerkennung des AOA's Verwendung finden soll.

#### 9.6.4. Einfluss des Phaeophytin-a auf die Algengruppenerkennung

Anhand der Rohdaten der zweiten Ausfahrt wird die Auswirkung der Einführung des Phaeophytin-a Fingerprints getestet.

Dazu werden die relativen Fluoreszenzemissionen des Phaeophytin-a aus Tabelle 9.6-1 kurzerhand zu einem nichtkalibrierten Fingerprint des Phaeophytin-a erklärt.

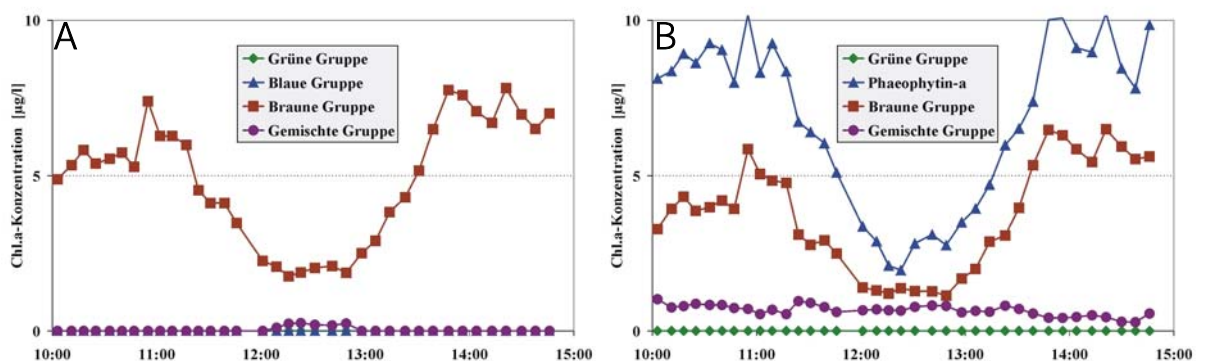
Die Daten der Ausfahrt werden erneut gefittet, wobei der neue (nicht kalibrierte) Phaeophytin-a Fingerprint den Fingerprint der blauen spektralen Gruppe ersetzt. Dies ist erlaubt, da Chl.a-Konzentrationen der blauen spektralen Algengruppe vom Fit für keine der Wasserproben der zweiten Ausfahrt nachgewiesen werden.

Eine Gegenprüfung durch das Ersetzen der grünen spektralen Gruppe durch den Phaeophytin-a Fingerprint zeigt auch für diesen Fall, dass die blaue spektrale Gruppe nicht nachgewiesen wird.

Der Vergleich mit dem Fitergebnis der Algengruppenerkennung für die vier spektralen Algengruppen und dem Fit mit dem neuen Fingerprints zeigt den Einfluss des Phaeophytin-a auf.

#### Abbildung 9.6-3 A & B: Vergleich des alten und neuen Fit's

Einbeziehung des Phaeophytin-a-Fingerprints für die Berechnung der spektralen Gruppenzuordnung. A zeigt die ermittelten Algengruppenkonzentrationen für den Fit mit allen vier spektralen Algengruppen. In B wurde der Fingerprint der blauen spektralen Algengruppe durch den nichtkalibrierten Fingerprint des Phaeophytin-a ersetzt.



In Abbildung 9.6-3 B zeigt sich, dass der Fingerprint des Phaeophytin-a in der Lösung des Fit's berücksichtigt wird. Die Abweichung zwischen der Hypothese des Fit's und den Rohdaten verringert sich. Die gemessene Fluoreszenz blauer Anregung (Rohdatenwert für LED1) wird von der Hypothese des Fit's besser angenähert. Die Güte des Fit's ( $F_{rel}$ , nach Gleichung 7.5-3) verbessert sich im Mittel über alle Messwerte von 39,4 auf 21,2, also um etwa die Hälfte.

Die Form des zeitlichen Verlaufes des Chl.a-Gehaltes der braunen spektralen Gruppe bleibt erhalten, der Chl.a-Gehalt selbst aber liegt bei der Einbeziehung des Phaeophytin-a Fingerprints um 24 % niedriger.

Die Identifizierung der Cryptophyceae des alten Fit's (Abbildung 9.6-3 A) für die Zeit zwischen 12:00 und 13:00 Uhr geht in der neuen Berechnung in einen nahezu konstanten Chl.a-Gehalt von etwas unter 1 µg Chl.a pro Liter für alle Probennahmen über.

Für den Chl.a-Gesamtgehalt (Summe über alle spektralen Algengruppen, nicht dargestellt) ergibt sich durch die Berücksichtigung des Phaeophytin-a Fingerprints eine Verringerung um 10 Prozent.

Der Verlauf der Kurve des Phaeophytin-a (Abbildung 9.6-3 B) ist dem Verlauf der braunen spektralen Gruppe ähnlich. Bei größer werdenden Chl.a-Konzentrationen steigt auch der Gehalt an Phaeophytin-a.

### 9.6.5. Die Kalibrierung des Phaeophytin-a Fingerprints

In Abbildung 9.6-1 wurde bereits das Ergebnis der HPLC-Analyse für den Phaeophytin-a Gehalt der Wasserproben der zweiten Ausfahrt vorgestellt.

Die Zuordnung des Fit's für den (nicht kalibrierten) Anteil des Fingerprints des Phaeophytins für die Wasserproben der zweiten Ausfahrt (Abbildung 9.6-3 B) wird mit den Ergebnissen der HPLC-Analyse verglichen. Gesucht wird ein Faktor ( $A_{Phaeo}$ ) zur Kalibrierung des Fingerprints des Phaeophytin-a (Phaeo), der die folgende Gleichung minimiert:

#### Gleichung 9.6-2:

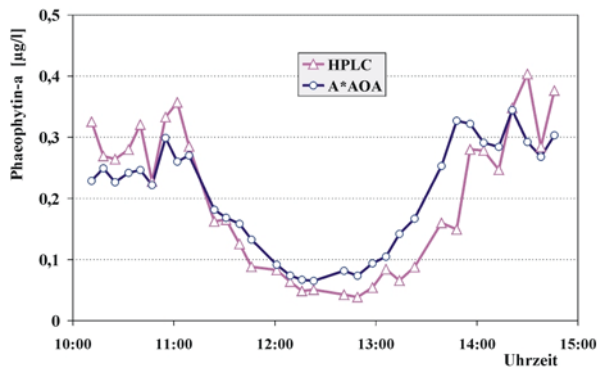
$$\text{minimiere } \sum_{\text{alle Messwerte}} (\text{Konzentration}_{Phaeo}^{HPLC} - A_{Phaeo} \cdot \text{Konzentration}_{Phaeo}^{AOA})^2$$



Dieses Minimierungsproblem wird mit Hilfe des Newton'schen Iterationsverfahrens gelöst [Bronstein & Semendjajew 1985].

**Abbildung 9.6-4: Kalibrierung des Phaeophytin-a Fingerprints**

Die Gegenüberstellung der Phaeophytin-a Konzentration in µg pro Liter nach der HPLC-Analyse (HPLC) und der nach Gleichung 9.6-2 kalibrierten Konzentration nach dem neuen Fit der Messergebnisse des AOA's (A\*AOA)



Das Minimum der Gleichung 9.6-2 ist durch den Faktor  $A_{Phaeo}$  gleich 0,03 gegeben. Der Phaeophytin-Fingerprint wird durch  $A_{Phaeo}$  geteilt und dadurch auf den Gehalt an µg Phaeophytin-a pro Liter kalibriert.

Die Gegenüberstellung zeigt recht gute Übereinstimmung im Verlauf der ermittelten Konzentrationen für das Phaeophytin-a über alle Wasserproben. Der Korrelationsfaktor  $R^2$  zwischen beiden Kurven beträgt 0,88.

**9.6.6. Einschätzung des neuen Fit-Ergebnisses für die zweite Ausfahrt**

Zunächst ist festzustellen, dass der neu eingeführte Fingerprint des Phaeophytin-a für die Hypothese des Fit's zur Berechnung der spektralen Gruppen mit einbezogen wird.

Da der Fingerprint indirekt berechnet wurde (Gleichung 9.6-1) gleicht der für den AOA erzeugte Fingerprint des Phaeophytin-a dem realen diskreten Anregungsspektrum nur näherungsweise. Trotzdem scheint der Fingerprint, mit einem solchen (oder ähnlichen) Spektrum, ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung zu sein. Die Abweichung zwischen den Rohdaten und der Hypothese verringert sich merklich.

Außerdem bestätigt das Ergebnis dieser Untersuchung den Einfluss eines nicht näher bekannten Fluoreszenzstoffes, bei dem es sich sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Phaeophytin-a handelt. Das grundlegende Ziel der Untersuchung ist somit erreicht.

Wie die Prüfung der Hypothesen zur Anpassung des Fingerprints der braunen spektralen Gruppe aus Kapitel 7.6 in Kapitel 8.10 gezeigt hat, ist eine Verbesserung der Güte des Fit's auch über den Fingerprint „braune Gruppe – Station 5 – “ möglich.

Das Fucoxanthin-zu-Chlorophyll-*a* Verhältnis für die Diatomee *Thalassiosira weissflogii* (PriPro98, [Ruser et al. 1999]) zu dem auf der ersten Ausfahrt ermittelten Verhältnis für die im Wasserkörper vorhandenen Spezies zeigt aber eine sehr gute Übereinstimmung (vgl. Tab.7.6-1). Dies spricht einerseits gegen eine Veränderung des Fucoxanthin-zu-Chlorophyll-*a* Verhältnisses und somit gegen die Anpassung des braunen spektralen Fingerprints anhand der *in situ* Daten. Zum anderen wird die Güte des Fit's durch die Einbeziehung des Phaeophytin-*a* Fingerprints gegenüber dem Fingerprint – braune Gruppe Station 5 – noch einmal verbessert (21,2 gegenüber 26,3, vgl. Kap. 9.6.4 und Kap. 8.10).

### 9.6.7. Abschließende Bemerkung zu dem Phaeophytin-*a*

Bei dem Zerfall des Pigments Chlorophyll-*a* geht dieses nicht nur in das Phaeophytin-*a* über (siehe Kap. 3.3.6).

Eine Untersuchung der weiteren Derivate des Chl.*a*'s wäre eine neue interessante Aufgabenstellung in bezug auf eine Beeinflussung der Algengruppenerkennung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden kann.

Weitere akzessorische Pigmente der Antennenkomplexe des photosynthetischen Apparates, die nicht mehr in dem Proteinkomplex des LHC's gebunden sind, sollten dann ebenfalls bezüglich eines Einflusses auf die fluorometrische Algengruppenerkennung untersucht werden.

## 10. Der Einfluss einer Pumpe auf das Phytoplankton

Auf der zweiten Ausfahrt wurde eine Kreiselpumpe zur kontinuierlichen Wasserentnahme verwendet. Zwischen der prompten Messung des Chl.a-Gehaltes mit einem BackScat-Fluorometer (direkt hinter der Kreiselpumpe, Abb. 8.1-1) und der Chl.a-Bestimmung mit dem AOA wurde ein fünfzigprozentiger Unterschied in der Höhe der ermittelten Chl.a-Fluoreszenz festgestellt [Kapitel 7.4]. Gegenüber der HPLC-Analyse als Referenz unterschätzte die Messung des Chl.a-Gesamtgehaltes mit dem AOA diesen um 34 Prozent.

Seit einigen Monaten ist nun auf der Südfall, dem Forschungskutter des FTZ, eine Pumpe zum Test im Betrieb, die eine kontinuierliche Wasserentnahme aus ca. 60 cm Wassertiefe erlaubt. Die Pumpe arbeitet nach dem Impeller-Prinzip („Raddampfer“) und ist wegen ihrer Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und der vermuteten schonenden Arbeitsweise für den Einsatz im Rahmen der BlueBox ausgewählt worden.

Um abschätzen zu können, inwieweit ein Pumpvorgang das Phytoplankton beeinträchtigt, wurden auf einer Fahrt mit dem FK Südfall Wasserproben für eine Vergleichsstudie gezogen.

Gemessen wurden vier Nordseeproben, die am 6.10.99 in der Nähe der Süderpieptonne gezogen wurden: Probe 1 mit einem Wasserschöpfer, die Proben 2 – 4 nach dem Durchlauf durch die Impellerpumpe bei verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten (Einstellung 20, 30, 40 Hertz für die Proben 2, 3, 4). In Plastikkanistern wurden die Proben dunkel gelagert und nach der Rückkehr im FTZ ca. 2 Stunden später mikroskopisch, mit dem AOA und durchflussszytometrisch analysiert.

### 10.1. Untersuchung am Mikroskop

#### **Abbildung 10.1-1: Mikroskopische Untersuchung des Phytoplanktons**

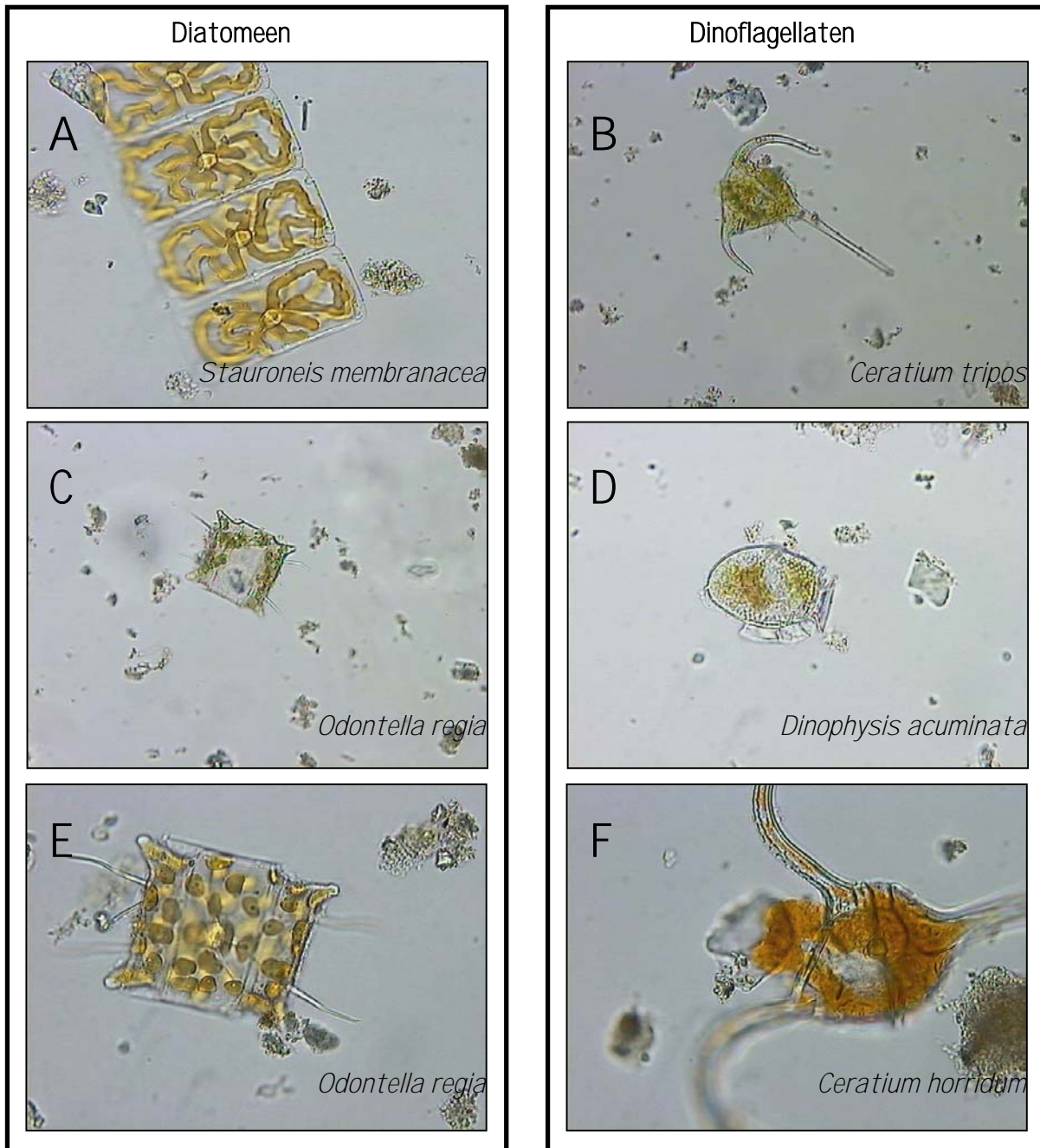
Einschätzung des Vorkommens und Zustandes des Phytoplanktons neben den Diatomeen und Dinoflagellaten (nach Rademaker, persönliche Mitteilung)

	Probennummer	Cryptophyceae	Rote Epi-Fluoreszenz (kleine Zellen)	Picoplankton vorhanden ?	Planktonzellen geschädigt ?
Wasserschöpfer	1	ja, aber wenig	ja	ja	nein
Pumpe	2	nein	weniger als Probe 1	ja	ja
	3	nein	weniger als Probe 1	ja	ja
	4	nein	weniger als Probe 1	ja	ja und nein

Die Phytoplanktonkonzentration war sehr niedrig, das Phytoplankton musste mittels einer Absetzkammer, konzentriert werden um eine ausreichende Menge an Zellen zu finden. Die folgenden Fotos zeigen exemplarisch einige Diatomeen und Dinoflagellaten der Wasserproben.

**Abbildung 10.1-2: Diatomeen und Dinoflagellaten Spezies vor und nach dem Pumpendurchlauf**

- Abb. A: Diatomee in der Probe 1 (Wasserschöpfer) gemacht,  
Abb. B: Dinoflagellat in der Probe 2 (Pumpe, 20 Hertz),  
Abb. C: Diatomee, ebenfalls Probe 2,  
Abb. D: Dinoflagellat in der Probe 3 (Pumpe, 30 Hertz),  
Abb. E und F: Plankton der Probe 4 (Pumpe, 40 Hertz)  
Vergrößerungen: Abb. A, E, F mit 60 x 10; Abb. B, C, D mit 20 x 10; (Fotos: Rademaker)



Einige Exemplare aus den Pumpen-Proben zeigten eindeutige Zerstörungsspuren (Fotos B, C, D und F).

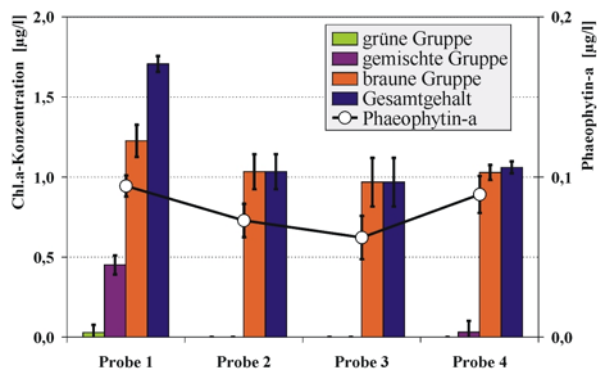
Das Plankton in Flasche 1 sah gut erhalten aus. Dies war in Flasche 2 und 3 nicht der Fall, in Flasche 4 wurden jedoch wieder mehrere gut erhaltene Zellen gefunden. In allen Proben, welche die Pumpe durchlaufen hatten, waren die Cryptophyceae verschwunden.

## 10.2. Untersuchung mit dem AOA

Der Chl.a-Gehalt der spektralen Algengruppen der vier Wasserproben wird mit dem AOA bestimmt. Das Ergebnis des vorherigen Kapitels wird berücksichtigt und die Algengruppenerkennung mit dem Fingerprint für das Phaeophytin-a anstelle der blauen spektralen Gruppe durchgeführt:

**Abbildung 10.2-1: Chl.a-Bestimmung der Algengruppen**

Es ist zu beachten, dass die Skalierung der linken Achse und der rechten Achse unterschiedlich sind.



Die Chl.a-Konzentration pro Liter ist für alle Proben sehr niedrig. Das Phytoplankton wird von der braunen spektralen Gruppe dominiert. Zu dieser zählen die Algenklassen der Diatomeen und der Dinoflagellaten.

Der Anteil der grünen spektralen Gruppe in Probe 1 ist mit 0,03 µg Chl.a pro Liter verschwindend klein. Der Standardabweichung nach zu urteilen, sowie nach den Ergebnissen in Kapitel 6.6 (Verbesserung der Auflösungsgrenze durch die fünffache Bestimmung auf 0,05 µg Chl.a pro Liter, vgl. Kap 6.6.4), liegt diese geringe Konzentration unter der Auflösungsgrenze des AOA's. Es kann sich also um eine Fehlzuordnung des Fit's handeln (muss aber nicht). Die gemischte spektrale Gruppe wird aus dem gleichen Grund nur in Probe 1 gesichert nachgewiesen.

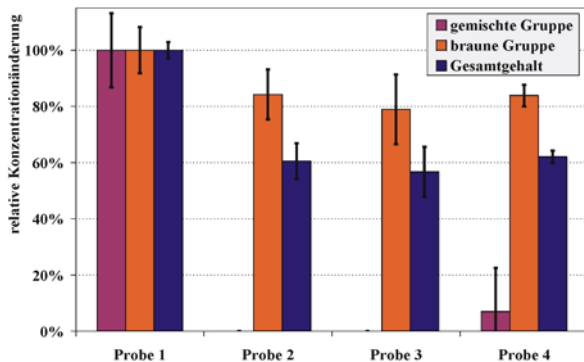
Der Phaeophytin-a Gehalt mit 0,06 – 0,09 µg pro Liter ist für alle Proben recht konstant.

Die Gegenüberstellung der Probe 1, welche mit einem Wasserschöpfer genommen wurden, zu

den Proben 2 – 4 (genommen nach dem Durchlauf durch die Pumpe) zeigt einen deutlichen Unterschied in der Höhe der Chl.a-Konzentration. Zum besseren Vergleich werden die ermittelten Chl.a-Konzentrationen der Gruppen und des Gesamtgehaltes auf die erste Probe normiert:

**Abbildung 10.2-2: Normierung auf den Chl.a-Gehalt von Probe 1**

Die spektralen Gruppen, sowie der Gesamtgehalt, sind auf Probe 1 normiert. Auf die Darstellung der relativen Änderung der grünen spektralen Gruppe wurde verzichtet.

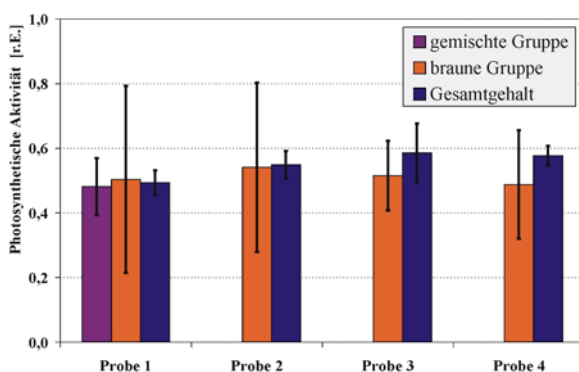


Es zeigt sich, dass durch den Einsatz der Pumpe ein nicht unerheblicher Prozentsatz der Algen nicht mehr nachweisbar ist.

Die Verminderung der Chl.a-Gesamtgehalte der Proben 2 – 4 beträgt um die 40 Prozent gegenüber der Wasserschöpferprobe. Der Chl.a-Gehalt der braunen spektralen Gruppe nimmt hingegen um „nur“ etwa 20 Prozent ab. Die gemischte spektrale Gruppe wird nur in Probe 4 mit unter 10 Prozent der ursprünglichen Konzentration der Wasserschöpferprobe (Probe 1) nachgewiesen.

Ein weiteres Ergebnis der Untersuchung ist die Messung der photosynthetischen Aktivität der Wasserproben, die in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

**Abbildung 10.2-3: Photosynthetische Aktivität des Phytoplanktons**



Die photosynthetische Aktivität konnte für die braune spektrale Gruppe und den Gesamtgehalt bestimmt werden. Die Berechnung der Aktivität erfolgt nur dann, wenn der Chl.a-Gehalt der spektralen Gruppe größer als 0,5 µg Chl.a pro Liter ist.

Die photosynthetische Aktivität des Gesamtgehaltes des Phytoplanktons beträgt zwischen 0,5 – 0,6. Es zeigt sich eine leicht steigende Tendenz von der Messung der Probe 1 bis zu der als letztes gemessenen Probe 4. Das Phytoplankton in allen vier Proben weist eine Aktivität auf, die auf einen recht guten physiologischen Zustand schließen lässt.

Diese Tatsache ist überraschend, da die mikroskopischen Untersuchungen und die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes mit dem AOA deutliche Hinweise auf eine Schädigung des Phytoplanktons durch die Pumpe für die Proben 2 – 4 aufzeigen. Deshalb wäre eine geringere Aktivität zu erwarten gewesen.

Die hohen Werte der Aktivität für alle Proben sind nur durch die zwei Stunden Dunkeladaptation der Algen auf dem Transport der Wasserproben zum Institut zu erklären. Die Dunkeladaptation erhöht den Wert für die photosynthetische Aktivität der Algen. In der üblichen Messroutine zur Bestimmung der Aktivität der Algen mit dem AOA wird wegen der Länge der nötigen Dunkeladaptationszeit von mindestens einer halben Stunde, bewusst auf diese verzichtet. So wird die photosynthetische Aktivität normalerweise mit dem AOA unter natürlichen Vorlichtbedingungen für die Alge gemessen. Diese Art der Aktivitätsmessung gilt ebenfalls als Maß für die „Fitness“ der Algen [Hintze 2000]. Die Höhe der Aktivität unter Licht liegt für gesunde Algen im Vergleich zu der Aktivitätsbestimmung von dunkeladaptierten Algen aber deutlich niedriger (unter *in situ* Bedingungen ist 0,35 – 0,45 ein normaler Wert für die Aktivität ohne Dunkeladaptation).

Der Unterschied der photosynthetischen Aktivität der braunen spektralen Gruppe zum Gesamtgehalt sowie die höhere Standardabweichung begründen sich hauptsächlich mit den Fehlzugeordnungen des Fit's für die Bestimmung der maximalen Fluoreszenz der Gruppen. Die Fluoreszenzgruppenzuordnung durch den Fit für die  $f_M$ -Rohdaten zeigt Zuordnungen zu den „nicht braunen“ spektralen Gruppen, die bei der  $f_0$  Zuordnung nicht identifiziert wurden. Die Fluoreszenzanteile dieser Gruppen gehen in die Gesamtfluoreszenz ein, sind aber für die maximale Fluoreszenz der braunen Gruppe verloren.

### 10.2.1. Erkenntnis aus der photosynthetischen Aktivitätsmessung

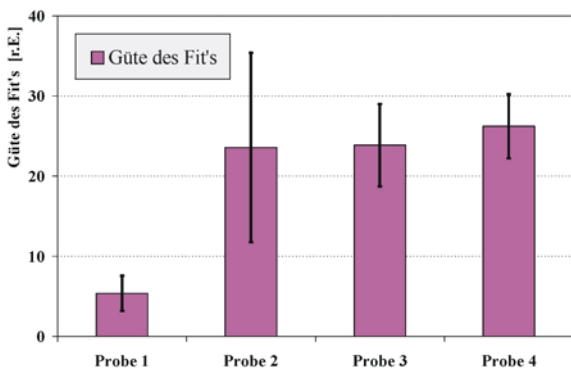
Die Bestimmung der photosynthetischen Aktivität mit dem AOA ist bei den hier vorliegenden geringen Chl.a-Konzentrationen (0,5 – 1 µg/l) für die spektralen Algengruppen knapp vor der

Auflösungsgrenze. Bei der Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung von 5 Messungen an einer Probe kann die Aktivität zum Teil zwei bis dreimal nicht bestimmt werden.

10.2.2. Güte des Fit's für die vier Proben

Die Güte des Fit's wird für alle vier Proben bestimmt. Nach Gleichung 7.5-3 (Kap. 7.5) wird die relative Güte ( $F_{rel.}$ ) berechnet und der Mittelwert mit Standardabweichung aus fünf Messwerten je Probe gebildet::

Abbildung 10.2-4: Güte des Fit's für die Pumpenproben

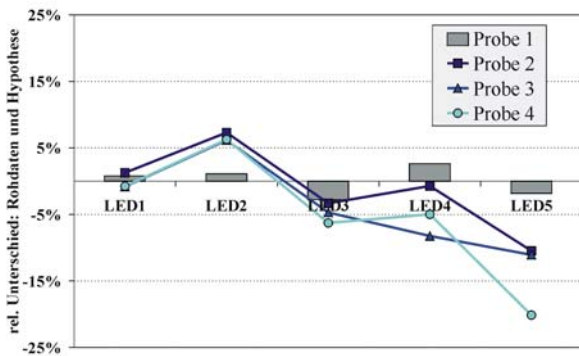


Die graphische Darstellung zeigt eine deutliche Verschlechterung der Güte (durch die höheren Werte, vgl. Gl. 7.5-3) für den Normkurvenfit für die Proben 2 – 4.

Gegenüber der Wassers schöpferprobe steigt der Wert der Güte des Fit's für die Proben 2 – 4, die durch die Impellerpumpe gezogen wurden, auf einen fünffach so hohen Wert an. Die relative Fehleinschätzung des Fit's für die einzelnen LED's ergibt sich nach Gleichung 8.8-1 zu:

Abbildung 10.2-5: %F(LED<sub>x</sub>) für die 4 Wasserproben

Zur besseren Unterscheidung ist das Ergebnis für %F(LED<sub>x</sub>) der Wassers schöpferprobe (Probe 1) für die LED's 1 – 5 als Säulen dargestellt, für die Proben 2 – 4 als Linien.



Die Hypothese des Fit's für die Probe 1 (als Säulen dargestellt) zeigt eine recht geringe prozentuale Abweichung zu den Messwerten.



Der maximale Unterschied in der Abbildung 10.2-5 beträgt unter drei Prozent für die LED's 3 & 4, zwei Prozent für die LED5 und unter ein Prozent für die LED's 1 & 2. Ganz im Gegensatz dazu der Verlauf der Kurven für die Proben 2 – 4. Deutlich zeigt sich eine ausgeprägte Diskrepanz zwischen den Messdaten und der Hypothese des Fit's für einige der LED's.

Markant ist zunächst die Unterschätzung der Messwerte für LED2 von 5 Prozent für die Proben 2 – 4 (man bedenke das der Ausgangspunkt die Rohdaten sind, deshalb eine Unterschätzung). Für die LED's 4 & 5 überschätzt der Fit die Näherung der Messwerte.

Der Prozess des Einpumpens wirkt sich also auch auf die diskreten Anregungsspektren und somit letztendlich auf die Güte des Fit's aus.

### 10.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse des AOA's

Zwei Stunden nach der Probennahme durch die Impellerpumpe verringert sich der Chl.a-Gesamtgehalt der Wasserproben um 40 Prozent für die angetroffene Phytoplanktonzusammensetzung.

Für die braune spektrale Algengruppe zeigt sich eine Verminderung der Chl.a-Konzentration um 16 – 21 Prozent. Die in der ersten Probe identifizierten Algen der grünen spektralen Gruppe liegen in einer solch geringen Konzentration vor, dass es sich um eine Fehlzuordnung des Fit's durch die Messungenauigkeiten des Systems handeln kann. Algen dieser Gruppe wurden mikroskopisch nicht explizit nachgewiesen.

Die nachgewiesenen Cryptophyceae in der Probe 1 wurden von dem AOA mit einem Chl.a-Gehalt von 0,5 µg Chl.a pro Liter detektiert. Nach dem Durchlauf durch die Pumpe werden diese nicht mehr identifiziert (Proben 2 – 4). Die Impellerpumpe hat also eine gruppenspezifische Zerstörung des Phytoplanktons zur Folge.

#### **Fazit der AOA-Messergebnisse:**

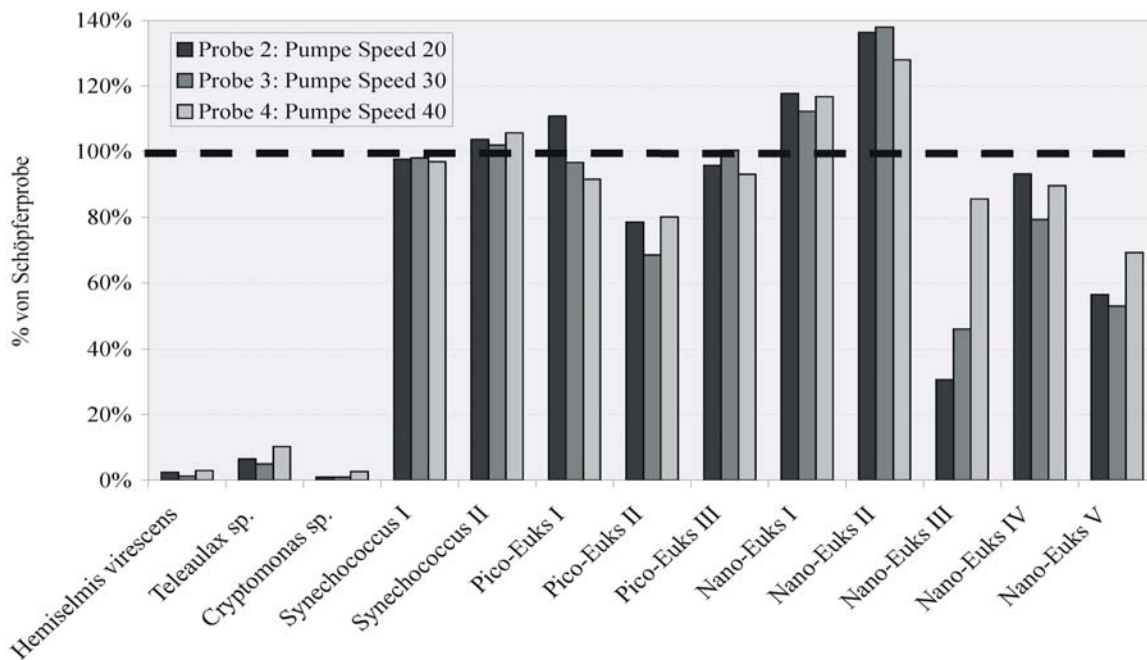
Die Impellerpumpe hat eine eindeutig schädigende Wirkung auf das Phytoplankton. Der Chl.a-Gesamtgehalt der Wasserproben verringert sich um 40 Prozent. Der Einfluss auf die Phytoplanktonzusammensetzung ist gravierend. Die gemischte spektrale Algengruppe wird hinter der Pumpe praktisch nicht mehr nachgewiesen.

### 10.3. Messungen mit dem Durchflusszytometer

Anhand der FCM-Messwerte lassen sich 13 Algengruppen in den Wasserproben unterscheiden. Die nachfolgende Abbildung stellt die Zellzahlen der zytometrisch erfassten Gruppen in den Pumpenproben in Prozent zu der Schöpferprobe (dicke gestrichelte Linie) dar.

**Abbildung 10.3-1: Relative Veränderungen der Zellzahlen der Wasserproben (FCM)**

Die Unterscheidung in Spezies I, II usw. bezieht sich auf die unterschiedliche Größe der Algen. Zur Analyse der Auswirkung der Impellerpumpe sind die Zellzahlen der Proben 2 bis 4 auf die mit dem Wasserschöpfer genommene Probe 1 normiert. (nach Reckermann, persönliche Mitteilung)



*Hemiselmis virescens*, *Teleaulax sp.* und *Cryptomonas sp.* gehören der Klasse der Cryptophyceae an. *Synechococcus* ist ein Prokaryot der Klasse der Cyanobakterien. Die Unterscheidung in Spezies I und II bezieht sich auf die unterschiedlichen Größen der Algen. Diese Algengruppen wurden alle mikroskopisch bestätigt. Bei allen weiteren Gruppen handelt es sich um Eukaryoten (Euks), die nicht näher bestimmt werden konnten. Die Unterscheidung erfolgt, wie schon bei *Synechococcus*, nach der Größe.

**Ergebnis der FCM-Messung:**

Alle drei Cryptophyceae-Arten (*Hemiselmis virescens*, *Teleaulax sp.* und *Cryptomonas sp.*) sind fast komplett in den Pumpen-Proben verschwunden.

Für die kleinen Picoplankton-Gruppen *Synechococcus* I und II und Pico-Euks I ist keine Beeinträchtigung zu erkennen, wohl aber für die Pico-Euks II (65-80%) und die größeren Nano-Euks III (30-85%), IV (80-95%) und V (53-70%).

Einen großen Unterschied in der Pumpengeschwindigkeit machte sich nur bei den Pico-Euks III bemerkbar (langsam: 31%, mittel: 46%, schnell: 86%). Besonders auffällig ist die Beobachtung, dass für die Nano-Euks I (112-118%) und insbesondere die Nano-Euks II (128-138%) höhere Zellzahlen als in der Wasserschöpferprobe ermittelt werden.

Es zeigt sich, dass etwa die Hälfte der zytometrisch erfassbaren Phytoplanktongruppen zum Teil stark durch die Pumpeneinwirkung dezimiert werden. Die gesamte Gruppe der Cryptophyceae verschwindet fast vollständig. Für die anderen eukaryotischen Gruppen zeigt sich der Trend, dass größere Zellen stärker beeinträchtigt werden als kleine (Ausnahme: Pico-Euks II).

Die kleinsten Gruppen, die aus kokkalen Nicht-Flagellaten bestehen (*Synechococcus* und wahrscheinlich Pico-Euks I), überstehen die Prozedur völlig unbeschadet, wohingegen die beschädigten Gruppen wahrscheinlich Flagellaten repräsentieren, die den hohen Scherkräften beim Pumpvorgang nicht gewachsen sind.

### **Fazit der FCM Ergebnisse:**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pumpe eine eindeutig schädigende Wirkung auf zumindest einige Phytoplanktongruppen hat. Dazu zählen zunächst die gesamte Gruppe der Cryptophyceae, einige Dinoflagellaten und Diatomeen, sowie kleinere nackte Flagellaten. Eine interessante Beobachtung ist, dass die höchste Pumpengeschwindigkeit tendenziell weniger Schaden anzurichten scheint als die niedrigeren.

## 10.4. Beurteilung des Einflusses der Pumpe auf das Phytoplankton

Alle drei Untersuchungsmethoden (Mikroskop, AOA und FCM) belegen in eindeutiger Weise den schädigenden Einfluss der Impellerpumpe auf das Phytoplankton.

Die Untersuchung mit dem Mikroskop zeigt deutliche Zerstörungsspuren an den Algen auf. Nach den Ergebnissen des AOA's wird der nachweisbare Chlorophyll-*a* Gesamtgehalt der eingepumpten Probe um 40 Prozent verringert. Für die einzelnen spektralen Algengruppen

zeigt sich ein unterschiedlich stark ausgeprägter Grad der Zerstörung. Durch das FCM wird die gruppenspezifische Zerstörung der Algenzellen auf dem Niveau der Algenarten bestätigt.

### 10.5. Rückschlüsse für die *in situ* Messungen

Für die Sensoren der BlueBox, die biologische Parameter erfassen sollen, muss eine schonende Wasserzuführung gewährleistet sein (Kap. 2.2).

Eine Zuführung der Wasserproben durch eine Impellerpumpe hat, wie die Untersuchung gezeigt hat, eine artenspezifische Zerstörung des Phytoplanktons zur Folge.

Auf den beiden durchgeführten Ausfahrten wurde für die Probennahme eine Kreiselpumpe verwendet. Zu diesem Zeitpunkt konnte für den Test einer automatisierten *in situ* Messung mit dem AOA die Wasserbereitstellung technisch nicht anders gelöst werden. Das der Einsatz einer Pumpe vor dem Sensor solche gravierenden Probleme für die Identifizierung der Algengruppen und der Bestimmung des Chl.a-Gehaltes mit sich bringen würde, wurde vorher nicht vermutet.

Die Unterschätzung des Chl.a-Gesamtgehaltes durch den AOA auf der zweiten Ausfahrt ist aufgrund dieser Untersuchungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf die Probennahme durch die Kreiselpumpe zurückzuführen.

Nach dem momentanen Stand der Entwicklung der BlueBox wurde aus Gründen eines weniger störungsanfälligen Betriebes die Positionierung der Pumpe geändert. Nun befindet sie sich jetzt vor der Entlüftung und somit vor allen Sensoren (vgl. Abb. 2.2-1 des ursprünglichen Schemas). Sollte dies die entgültige Anordnung für einen kommerziellen Vertrieb bleiben, so muss für den biologischen Sensor eine Möglichkeit der Wasserentnahme vor der Pumpe geschaffen werden. Ansonsten wird die Erfassung der biologischen Parameter des Wasserkörpers eine fragwürdige Angelegenheit.

Es muss ausdrücklich betont werden, dass auf den Einsatz einer Wasserpumpe vor dem biologischen Sensor tunlichst zu verzichten ist.

# 11. Algengruppenerkennung mit verschiedenen Systemen

## 11.1. Die Motivation

Auf den beiden Ausfahrten zeigten sich Ergebnisse des AOA's bezüglich der Algengruppenerkennung, deren Verifizierung durch die Referenzmesssysteme (die HPLC-Analyse und das FCM) zum Teil nicht möglich war:

- So wurden z. B. von dem AOA auf der ersten Ausfahrt Algen der grünen spektralen Gruppe detektiert. Diese Gruppe umfasst die Algenklassen der Chloro- und der Prasinophyceae. Mit der HPLC-Analyse konnte das Markerpigment Lutein (und/oder Prasinoxanthin) dieser beiden Algenklassen nicht nachgewiesen werden.
- Mit dem FCM konnten Algen der Klasse der Prasinophyceae nachgewiesen werden. Eine quantitative Chl.a Bestimmung war aber nicht möglich (Kap. 7.3-2). In welcher Weise ist dieses Messsystem als Referenzgerät einsetzbar? Ist eine Chl.a Bestimmung über die Zellzahlen oder die Chl.a-Fluoreszenz wirklich möglich?

In der nachfolgenden Untersuchung sollen deshalb zwei Fragen zu den betrachteten Messsystemen (Tabelle 11.2-1) im Mittelpunkt stehen:

### **(1) Wie gut funktioniert die Algengruppenerkennung mit den Messsystemen?**

In dieser Untersuchung (Kapitel 11.5) wird deshalb die Algengruppenerkennung unterschiedlicher Messsysteme anhand von Algenmischungen geprüft. Die Zusammensetzung der Algen in den Mischungen ist bekannt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Geräte ermöglicht deren Bewertung.

### **(2) Wo ist die Nachweisgrenze der Chl.a Bestimmung für die Algengruppen der Messsysteme?**

Für die *in situ* Messungen auf den Ausfahrten ist die jeweilige Nachweisgrenze des Systems von entscheidender Bedeutung. Die Chl.a-Konzentration von küstennahen Nordseewasserproben ist gegenüber limnischen Gewässerproben meistens sehr gering (Chl.a-Gehalt unter 10 µg pro Liter, im Ozean regulär Konzentrationen unter 1 µg pro Liter). Sind die

Messsysteme für *in situ* Messungen also geeignet? Die jeweilige Nachweisgrenze der Messsysteme für die Algengruppenerkennung wird in Kapitel 11.7 ermittelt.

Auf dem Workshop PriPro98 [Ruser et al. 1999] wurde ein erster Vergleich zwischen unterschiedlichen Messsystemen durchgeführt. Eine quantitative Beurteilung der Systeme war nicht möglich (Kap. 5.5.1). Die dort gemachten Erfahrungen fließen in die jetzige Untersuchung mit ein.

## 11.2. Untersuchung zur Vergleichbarkeit von Messsystemen

Die nun folgenden Untersuchungen sollen anhand verschiedener Versuche die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Messsystemen zur Algengruppenerkennung aufzeigen und eine Abschätzung der Auflösungsgrenzen der Systeme liefern.

Die Untersuchung von Algenpopulationen in Gewässern wird mit auf verschiedenen Messmethoden basierenden Geräten durchgeführt. Am FTZ stehen für die Phytoplanktonuntersuchungen die folgenden Messsysteme zur Verfügung:

**Tabelle 11.2-1: Messsysteme zur Algengruppenerkennung**

✈	HPLC-Analyse	Pigment-Analyse	(TSP)
✈	Durchflusszytometer	Zellzahlen, Rotfluoreszenz	(Facs Vantage)
✈	Spektrofluorophotometer	Anregungs-, Emissionsspektrum	(Shimadzu)
⚡	Algae Online Analyser	diskretes Anregungsspektrum	(bbe Moldaenke)
●	Spektrophotometer	Absorptionsspektrum	(Uvikon)

Ein inverses Mikroskop sowie ein Epifluoreszenz-Mikroskop stehen im Institut für Zellzählungen ebenfalls zur Verfügung. Mikroskopische Zellzählungen werden aber aufgrund der nicht möglichen Automatisierung der Messung bei den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Eine Einladung zu den folgenden Untersuchungen an Mitarbeiter der Firma Walz für einen direkten Vergleich zwischen dem PhytoPAM (Walz) und dem AOA (bbe Moldaenke) wurde leider nicht angenommen. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen diesen beiden

Messgeräten, die in direkter Konkurrenz auf dem Messgerätemarkt vertreten sind, wäre hochinteressant gewesen.

### 11.3. Die Zucht der Ausgangskulturen

Für diese Versuche wurden 3 Algenspezies kultiviert. Die Algenspezies *Pheodactylum tricornutum* aus der Algenklasse der Diatomeen, *Synechocystis spec. 6803* aus der Klasse der Cyanobakterien und *Dunaliella salina* aus der Klasse der Chlorophyceae wuchsen in künstlichem Seewassermedium (KWS 2, siehe Anhang A) für 8 Tage auf. Die Animpfung der mit 400 ml KWS 2 gefüllten Laborflaschen (Schott), erfolgte mit Algen aus hauseigenen Stammkulturen. Die Algen unterlagen einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden. Während der Beleuchtungsphase betrug die Lichtintensität im Inneren der Laborflaschen im Salzwassermedium (gemessen in der Mitte der Flasche)  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Intensität wurde mit einem  $4\pi$  Lichtsensor von Zemoko ( $\varnothing$  1cm) vor der Animpfung der Flaschen mit den Algen bestimmt. Die Temperatur wurde während der Aufzucht durch die Verwendung eines Kulturschranks (WTB 240, Binder) konstant auf 20 °C gehalten.

### 11.4. Messungen an den Ausgangskulturen

Bevor die einzelnen Versuche durchgeführt werden können, werden die Ausgangskulturen der drei Algenspezies mit den Messsystemen vermessen.

In diesem Kapitel sollen die Unterschiede zwischen den Algenklassen und der Unterschied in der Art der Erfassung der Parameter durch die Systeme deutlich gemacht werden. Die Messungen an den Ausgangskulturen bilden die Basis der späteren Auswertung der Mischungsversuche.

#### 11.4.1. Die HPLC-Analyse der Ausgangskulturen

Jeder Algenkultur wurden drei Proben zur Analyse entnommen. Ein Volumen von 30 ml der Kulturen wurde auf einen Whatman GF/F-Filter ( $\varnothing$  47 mm) abfiltriert.

Die GF/F Glasfiberfilter wurden unter der Zugabe von 5 ml Azeton und Glaskügelchen mit einer Zelmühle (Vibrogenzelmühle VI4, Bühler) für 3 Minuten gemahlen. Die Rückstände des

Glasfiberfilters und der Algenzellen wurden durch ein zehnminütiges Zentrifugieren bei 4000 Umdrehungen pro Minute (72,5 g) von den in Azeton gelösten Pigmenten getrennt.

Nach einer weiteren Filterung durch einen 0,2 µm Teflonfilter (Spritzenvorfilter; PTFE, no name product) wurde ein 0,75 ml großer Anteil der Probe mit 0,25 ml Ammoniumazetat für drei Minuten inkubiert. Das Extrakt wurde mit dem HPLC System (Kapitel 7.3.3) vermessen.

Die Messung der Pigmente des photosynthetischen Apparates durch die HPLC-Analyse ergab für die Ausgangskulturen der Mischungen die folgenden Pigmentzusammensetzungen der sechs Algenklassen:

**Tabelle 11.4-1: Pigmentzusammensetzung der Ausgangskulturen zum Algendifferenzierungsversuch**

Stellvertretend für die verwendeten Algenspezies sind in der Tabelle die Algenklassen angegeben. Die sogenannten Markerpigmente [Wilhelm et al. 1991] ermöglichen eine Identifizierung der Algenklassen und sind in Fettschrift gehalten.

	<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>Diatomeen</b>
<b>Pigment</b>	[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]
<b>Zeaxanthin</b>	0,0 ± 0,0	<b>15,3 ± 0,8</b>	0,0 ± 0,0
<b>Fucoxanthin</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	<b>106,2 ± 6,9</b>
Alloxanthin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Peridinin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Prasinoxanthin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Chlorophyll- <i>b</i>	87,6 ± 2,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Lutein</b>	<b>47,4 ± 3,5</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Neoxanthin	11,6 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Violaxanthin	16,1 ± 1,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Phaeophytin-a	1,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0
Diadinoxanthin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	15,9 ± 0,6
Chlorophyll- <i>c</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	23,1 ± 0,5
α-Carotin	20,3 ± 4,0	14,4 ± 0,5	7,3 ± 0,1
β-Carotin	3,4 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
19-Hex-Fucoxanthin	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Chlorophyll-<i>a</i></b>	<b>375,2 ± 3,2</b>	<b>110,5 ± 2,2</b>	<b>189,2 ± 6,0</b>
Relative Streuung	<b>0,8 %</b>	<b>2,0 %</b>	<b>3,2 %</b>

Die Chlorophyll-*a* Bestimmung ist mit einer maximalen Streuung von 3,2 % ausreichend gut.

Da die Probenaufbereitung sorgfältig durchgeführt wurde, spiegelt sich in den geringen Konzentrationen des Phaeophytin-a wieder. Dieses Pigment ist ein Derivat des Chlorophyll-*a* (Kap. 3.3.6 und Kap. 9.6). Bei einer fehlerhaften Probenaufbereitung zerfällt das Chl.a zu Phaeophytin-a.

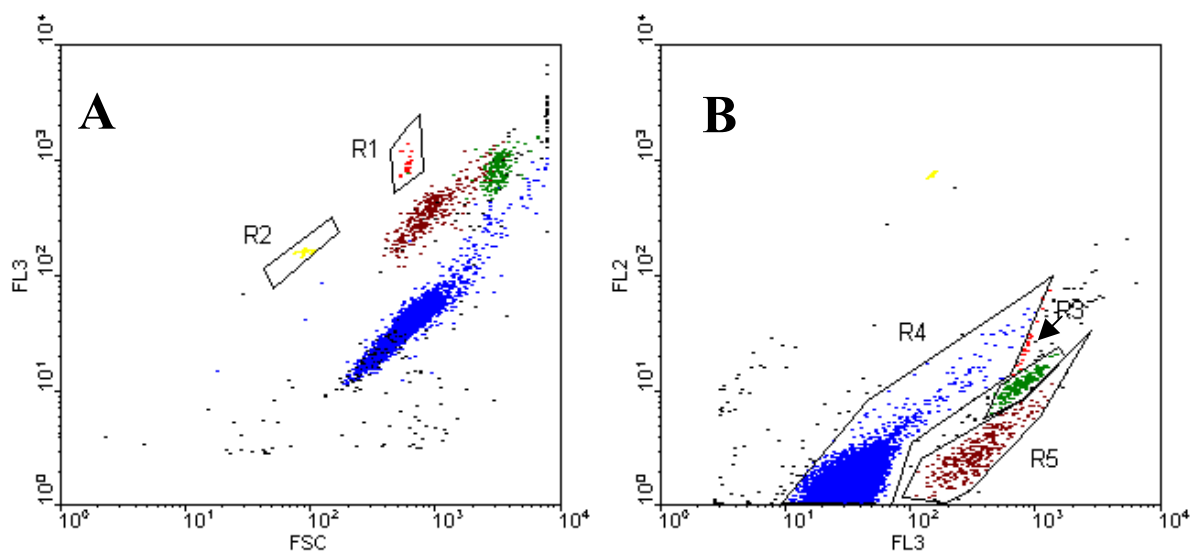


### 11.4.2. Die Durchflusszytometer Messung an den Ausgangskulturen

Je drei Proben der Ausgangskulturen wurden mit dem Durchflusszytometer vermessen. Die Analyse der Messergebnisse ergab die Festlegung der Regionen für die Identifizierung der Algenklassen.

#### Abbildung 11.4-1 A & B: Festlegung der Regionen zur Identifizierung der Algenklassen

Die Festlegung der Regionen erfolgt durch die Ergebnisse für die Ausgangskulturen. Die Graphen A und B zeigen die Darstellungen der Messergebnisse am Beispiel einer Mischung der Ausgangskulturen in der Gegenüberstellung Rotfluoreszenz (FL3) zur Größe (FSC) bzw. der Orangefluoreszenz (FL2) zu FL3. Die Regionen R1 und R2 in Abb. A erfassen die Kontrollbeads. In Abb. B sind die Regionen für die 3 Algenklassen festgelegt. Durch R3 wird die Klasse der Chlorophyceae identifiziert. R4 entspricht den Cyanobakterien, R5 den Diatomeen.



In der Abbildung 11.4-1 A, der Darstellung der Rotfluoreszenz zu dem Streulicht (~ Größe der Zellen), sind die Regionen für die Kontrollbeads festgelegt. Diese Beads sind Partikel unterschiedlicher Größe und Fluoreszenz, die zur Kontrolle der Geräteeinstellung dienen. Sie werden den Proben vor der Messung hinzugefügt. In der Darstellung A sind die Regionen zur Identifizierung der Kontrollpartikel eindeutig von den Algenzellen zu trennen.

Für die Identifizierung der Algenspezies hingegen zeigt sich die Darstellung von FL2 gegen FL3 (Abbildung 11.4-1 B) aufgrund einer besseren Unterscheidbarkeit als geeigneter für eine Festlegung der Regionen.

Die Algenklassen der Chlorophyceae (grün), Cyanobakterien (blau) und der Diatomeen (braun) werden durch die Regionen R3, R4 bzw. R5 in Abbildung 11.4-1 B repräsentiert.

Die Zellzahlen der Ausgangskulturen pro Liter wurden durch die Messungen an den drei Proben der Ausgangskulturen ermittelt. Unter Verwendung der Ergebnisse der HPLC-Analyse zur Bestimmung der Chlorophyll-*a* Konzentration der Ausgangskulturen (Kap. 11.4.1) kann der mittlere Chl.a-Gehalt pro Algenzelle einer Spezies bestimmt werden.

**Tabelle 11.4-2: FCM-Ergebnisse für die Ausgangskulturen**

Algenspezies	Region	Zellzahl	Chlorophyll- <i>a</i> / Zelle	Fluoreszenz / Zelle
		10 <sup>8</sup> [Zellen/l]	[fg Chl.a/Zelle]	[r.E.]
Chlorophyceae	R3	2,4 ± 0,2	1592 ± 122	772 ± 56
Cyanobakterien	R4	18,7 ± 0,9	59 ± 3	42 ± 2
Diatomeen	R5	4,6 ± 0,1	411 ± 4	397 ± 3

Bemerkung:

Der Vergleich zu den Ergebnissen des PriPro98 Workshops [Ruser et al. 1999] zeigt eine gute Übereinstimmung des ermittelten mittleren Chl.a-Gehaltes pro Zelle für die Chlorophyceae *Dunaliella salina* (1.5 pg (PriPro) zu 1.6± 0.1 pg Chl.a / Zelle). Der mittlere Chl.a-Gehalt pro Zelle für das Cyanobakterium *Synechocystis spec. 6803* wurde auf dem PriPro98 zu 20 fg Chl.a pro Zelle bestimmt. Die Kultur war damals in Süßwasser angezogen worden. Ein Ableger der Kultur wurde in Salzwasser (Salzgehalt 30 ‰) angesetzt. Die Alge überlebte den Salzgehalt und zeigt unter den genannten Aufzuchtbedingungen einen mit knapp 60 fg deutlich höheren Chl.a-Gehalt pro Zelle.

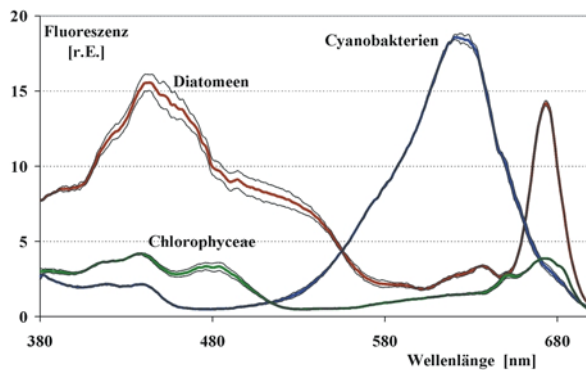
### 11.4.3. Die Fluoreszenzspektren der Ausgangskulturen

Die Anregungs- und Emissionsspektren der Algenkulturen wurden *in vivo* mit dem Spektrofluorophotometer von Shimadzu ermittelt. Die Proben der Ausgangskulturen wurden in 1 x 1 cm Küvetten in dem Strahlengang des Gerätes postiert. Von der Probe einer Kultur wurde zuerst das Anregungs- und anschließend sofort das Emissionsspektrum aufgenommen.

Das Anregungsspektrum wurde für eine Anregung in dem Wellenlängenbereich von 380 – 700 nm und einer Emissionswellenlänge von 720 ± 5 nm aufgenommen. Die Auflösung betrug 1 nm mit einer Geschwindigkeit von 174 nm pro Minute (Shimadzu: scanspeed slow). Die Spaltbreite der Anregung und der Emission betrug 3 bzw. 10 nm.

**Abbildung 11.4-2: Die Anregungsspektren der Ausgangskulturen**

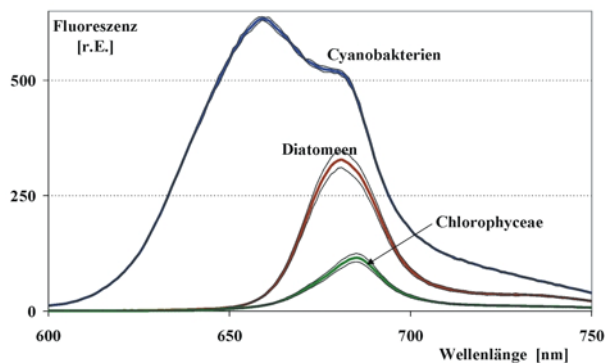
Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Messungen bei einer Emissionswellenlänge  $720 \pm 5$  nm.



Unter Verwendung der ermittelten Chl.a-Konzentrationen aus der HPLC-Analyse wurden die Spektren auf  $100 \mu\text{g}$  Chl.a pro Liter normiert.

Für die Erfassung der Emissionsspektren ist eine Änderung der Messprozedur nötig. Für eine feste Anregungswellenlänge von 580 nm wird nun der Wellenlängenbereich von 600 – 750 nm aufgenommen.

**Abbildung 11.4-3: Die Emissionsspektren der Ausgangskulturen**



Die Emissionsspektren sind auf eine Chlorophyll-*a* Konzentration von  $100 \mu\text{g}$  Chl.a pro Liter normiert.

#### 11.4.4. Die Algae Online Analyser Messung an den Ausgangskulturen

Für die Messung des AOA's wurde die folgende Parametereinstellung gewählt:

**Tabelle 11.4-3: Parameter der AOA-Messung**

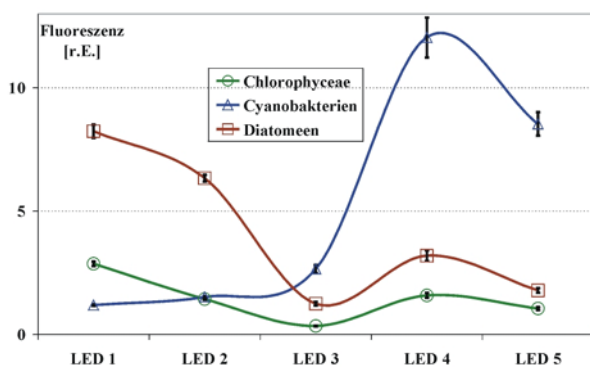
Parameter	f	f <sub>0</sub>	f <sub>M</sub>	Trans.	Probe
	[s]	[s]	[ms]	[s]	einpumpen
Dunkelphase		60			[s]
Adaptation	30	60			30
Messung	60	60	2000	10	auspumpen
Integrationszeit			250		[s]
f <sub>0</sub> / f-Teiler		1 / 100			5

Die Parametereinstellung wurde im Vergleich zu der ersten Ausfahrt (siehe Tabelle 7.3-7) nur unwesentlich verändert.

Zur Bestimmung der Fingerprints (diskretes Anregungsspektrum) der Ausgangskulturen wurden die Proben vermessen. Der Ablauf der Messroutine ist automatisiert. Das Probenvolumen wird nach der Bestimmung des diskreten Anregungsspektrums mit einer neuen Probe befüllt und dreimal wiederholt. Die Fingerprints für die Ausgangskulturen wurden durch die Chlorophyll-*a* Konzentrationen aus der HPLC-Analyse auf 1 µg Chl.a pro Liter bezogen. Die fünf diskreten Anregungswellenlängen sind durch die jeweilige Nummer der entsprechenden Lumineszenzdiode (LED) wiedergegeben.

**Abbildung 11.4-4: Die diskreten Anregungsspektren des AOA's für die Ausgangskulturen**

Die diskreten Anregungsspektren der Ausgangskulturen sind auf 1 µg Chl.a/l normiert. Die LED's 1 – 5 haben die Emissionsmaxima bei den Wellenlängen von 450, 525, 575, 590 und 610 nm.

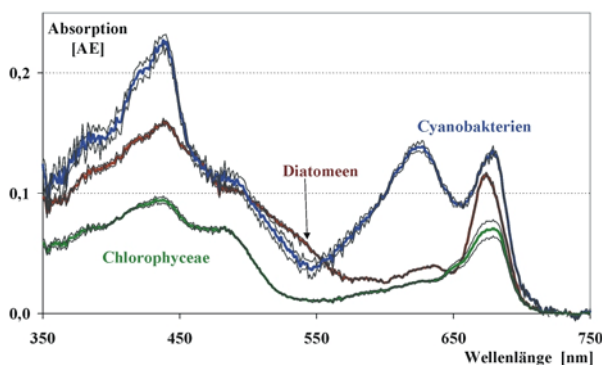


Diese drei Kurven werden als Basisvektoren der Algengruppen (Fingerprints) in den AOA übernommen. Sie bilden die Grundlage für die Berechnung der Chl.a-Konzentrationen der Algenspezies in den nachfolgenden Versuchen.

#### 11.4.5. Die *in vivo* Absorptionsspektren der Ausgangskulturen

Die Aufnahme der Absorptionsspektren wurde mit einem Zweistrahl-Absorptionsspektrometer (Uvikon) durchgeführt. Zur Vermeidung von Messfehlern durch die Streuung des Lichtes an Algenzellen ist das Spektrometer mit einer Ulbrich-Kugel ausgestattet.

**Abbildung 11.4-5: Absorptionsspektren der Ausgangskulturen**



Die *in vivo* Absorptionsspektren der Ausgangskulturen für den Wellenlängenbereich von 350 – 750 nm sind aus 3 Messungen gemittelt und auf einen Chlorophyll-a Gehalt von 100 µg Chl.a/l normiert.

Für die nachfolgenden Versuche sind die vorbereitenden Messungen nun abgeschlossen. Für alle Messsysteme sind die Messungen an den Ausgangskulturen der einzelnen Spezies beendet.

## 11.5. Test der Algengruppenerkennung der Messsysteme

Gegenstand der Untersuchung wird die Algengruppenerkennung nach verschiedenen Methoden sein, wie sie das jeweilige Messgerät erfordert. Die Untersuchung wird alle in Tabelle 11.2-1 aufgezählten Messsysteme umfassen.

Aus den Ausgangskulturen werden Algenmischungen erzeugt. Mit allen Geräten werden die Mischungen vermessen. Da die Mischungsverhältnisse bekannt sind, lässt sich die Genauigkeit der Ergebnisse der Messsysteme ermitteln. Zunächst wird nun im Folgenden die Herstellung der Mischungen und die Ergebnisse der Messgeräte im einzelnen beschrieben. Im Kapitel 11.6 werden die Einzelergebnisse dann den aus den bekannten Mischungsverhältnissen berechneten Chl.a-Konzentrationen der Algenspezies in den Mischungen gegenübergestellt.

### 11.5.1. Die Algenmischungen aus den Ausgangskulturen

Für die Mischungen werden die Kulturen der Diatomeen, Cyanobakterien und der Chlorophyceae verwendet. Bis auf die Diatomee (*Phaeodactylum tricornutum*, anstatt *Thalassiosira weissflogii*) wurden auf dem PriPro98 [Ruser et al. 1999] die gleichen Algenspezies verwendet.

**Tabelle 11.5-1: Mischungen der Algenspezies**

Angegeben sind die Verhältnisse der Volumenanteile der Ausgangskulturen für die einzelnen Mischungen.

Mischung	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
<b>A</b>	1		4
<b>B</b>	1	4	1
<b>C</b>	3		1
<b>D</b>	1	1	1

Nach der Herstellung der Mischungen wurden die Algen für eine halbe Stunde unter Schwachlichtbedingungen ( $<20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) belassen. Diese Zeit dient der Gewöhnung an die neuen Umgebungsbedingungen und soll Auswirkungen auf die Messergebnisse durch einen physiologischen Schock der Algen vermeiden.

Als Bezug für die Einschätzung der Ergebnisse der Messsysteme werden die theoretischen (theo) Chlorophyll-*a* Konzentrationen (K) der Algenklassen der Mischungen berechnet. Die Chl.a-Konzentrationen der Ausgangskulturen sind durch die HPLC-Analyse (Tabelle 11.4-1) bekannt. Mit den Mischungsverhältnissen aus Tabelle 11.5-1 erfolgt die Berechnung der theoretischen Chl.a-Konzentration.

**Gleichung 11.5-1: Berechnung der theo. Chl.a-Konzentration einer Algenspezies in der Mischung**

$$\text{Chl. a}_{\text{Spezies}} = \frac{T_{\text{Spezies}}}{T_{\text{Gesamt}}} K_{\text{Spezies}} \quad \text{mit} \quad T_{\text{Gesamt}} = \sum_{j=1}^N T_j$$

$T_{\text{Spezies}}$	Menge an Volumenanteilen, die von einer Spezies zur Mischung gegeben werden
$T_{\text{Gesamt}}$	Gesamtmenge an Teilen
$K_{\text{Spezies}}$	Chl.a-Konzentration der Ausgangskulturen nach der HPLC-Analyse (Tab. 11.4-1)

Für den absoluten Fehler der Chlorophyll-*a* Gehalte in den Mischungen gilt:

**Gleichung 11.5-2: Absoluter Fehler der theo. Chl.a-Konzentrationen einer Spezies**

$$d\text{Chl. a}_{\text{Spezies}} = \left| \frac{\partial \text{Chl. a}_{\text{Spezies}}}{\partial K_{\text{Spezies}}} \right| dK_{\text{Spezies}} + \sum_{i=1}^3 \left| \frac{\partial \text{Chl. a}_{\text{Spezies}}}{\partial T_i} \right| dT_i$$

$$= \frac{T_{\text{Spezies}}}{T_{\text{Gesamt}}} dK_{\text{Spezies}} + \frac{K_{\text{Spezies}}}{T_{\text{Gesamt}}} dT_{\text{Spezies}} + \frac{K_{\text{Spezies}} T_{\text{Spezies}}}{T_{\text{Gesamt}}^2} \sum_{i=1}^N dT_i$$

$dK_{\text{Spezies}}$  : Abs. Fehler der Chl.a Bestimmung der Ausgangskulturen  
 $dT_i$  : Abs. Volumenfehler der Teile der Ausgangskulturen in der Mischung

**Gleichung 11.5-3: Relativer Fehler der theo. Chl.a-Konzentrationen einer Spezies**

$$\frac{d\text{Chl. a}_{\text{Spezies}}}{\text{Chl. a}_{\text{Spezies}}} = \frac{dK_{\text{Spezies}}}{K_{\text{Spezies}}} + \frac{dT_{\text{Spezies}}}{T_{\text{Spezies}}} + \frac{1}{T_{\text{Gesamt}}} \sum_{i=1}^N T_i \frac{dT_i}{T_i}$$

N: Anzahl der Spezies, die in der Mischung sind ( $T_i \neq 0$ )  
 $dT_i/T_i$  Relativer Volumenfehler der Teile der Ausgangskulturen der Mischungen

Durch Gleichung 11.5-1 werden die theoretischen Chl.a Anteile der Algenspezies und durch Gleichung 11.5-2 die zu erwartenden absoluten Fehler der Mischungen berechnet.

Der Fehler der Herstellung der Mischungen wird mit 0,05 Volumenteilen (absolut) auf die Teile einer Algenspezies festgelegt, was einer relativen Abweichung von 5 % auf ein Teil entspricht.

Die theoretischen Konzentrationen ergeben sich zu:

**Tabelle 11.5-2: Theoretische Chl.a-Konzentrationen der Mischungen**

Chl.a-Gehalt	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
Mischung A	75,0 ± 4,4	0,0 ± 0,0	151,3 ± 6,7	226,4 ± 11,1
Mischung B	62,5 ± 3,7	73,7 ± 2,4	31,5 ± 2,6	167,7 ± 8,6
Mischung C	281,4 ± 7,1	0,0 ± 0,0	47,3 ± 3,9	328,7 ± 11,0
Mischung D	125,1 ± 7,3	36,8 ± 2,6	63,1 ± 5,1	225,0 ± 15,0

### 11.5.2. Algengruppenerkennung mit der HPLC-Analyse

Die Auswertung der Ergebnisse der Pigmentzusammensetzung der Mischungen erfolgt nach einer Methode, die 1991 von Wilhelm beschrieben wurde [Wilhelm et al. 1991]. Durch die Identifizierung von sogenannten Markerpigmenten, die den Xanthophyllen zugehörig sind, lassen sich Algenklassen identifizieren (Kap. 3.2). Die Messungen an den Ausgangskulturen mit der Bestimmung der Pigmente der Spezies bildet die Grundlage dieser Methode. Die Klasse der Diatomeen z. B. lässt sich durch das Pigment Fucoxanthin eindeutig identifizieren, da es bei den beiden weiteren Spezies nicht vorkommt. Für die Chlorophyceae wird das Pigment Lutein und für die Cyanobakterien das Zeaxanthin verwendet.

Die Berechnung der Chlorophyll-*a* Anteile einer Algenklasse in einer beliebigen Wasserprobe wird über die gemessene Menge der Markerpigmente (MP) durchgeführt. Die Grundlage bildet das bekannte Verhältnis des Xanthophylls zum Chlorophyll-*a* aus den Ausgangskulturen. Über die Pigmentbestimmung der Ausgangskulturen (Tabelle 11.4-1) können diese Verhältnisse ( $V_{MP}$ ) bestimmt werden.

**Gleichung 11.5-4: Xanthophyll-zu-Chl.a-Verhältnis**

$$V_{MP} = \frac{MP}{Chl.a}$$

Der Gehalt des Markerpigmentes wird in ng pro Liter angegeben, der Chlorophyll-*a* Gehalt

hingegen in µg pro Liter (Faktor von 10<sup>-3</sup>).

Die Bestimmung des Gehaltes beider Pigmente ist mit einem Fehler behaftet. Für den Fehler der Bestimmung dV von V folgt deshalb:

**Gleichung 11.5-5: Absoluter Fehler von V<sub>MP</sub>**

$$dV_{MP} = \left| \frac{\partial V}{\partial MP} \right| dMP + \left| \frac{\partial V}{\partial \text{Chl. a}} \right| d\text{Chl. a}$$

$$= \left| \frac{1}{\text{Chl. a}} \right| dMP + \left| \frac{MP}{\text{Chl. a}^2} \right| d\text{Chl. a}$$

Die Fehlerabweichung dV für die Berechnung von V ergibt sich aus den Standardabweichungen der Bestimmung der Pigmente. Durch die Messungen an den Ausgangskulturen (Tabelle 11.4-1) ergeben sich die Xanthophyll-zu-Chl.a-Verhältnisse (V) und die absoluten Fehler der Bestimmung (dV). Sie werden den Ergebnissen von Wilhelm et al. [1991] gegenüber gestellt:

**Tabelle 11.5-3: Xanthophyll / Chlorophyll-a Verhältnisse der Markerpigmente der Algenklassen**

Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen von Wilhelm aus dem Jahre 1991

Algenklasse	Markerpigment	Algenart	Xan / Chl.a	Algenart	Xan / Chl.a
		in dieser Untersuchung	*10 <sup>-3</sup>	Wilhelm et al. [1991]	*10 <sup>-3</sup>
<b>Cyanophyceae</b>	Zeaxanthin	<i>Synechocystis spec. 6803</i>	138 ± 10	<i>Anacystis nidulans</i>	117 ± 13
<b>Diatomeen</b>	Fucoxanthin	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	562 ± 54	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	850 ± 71
<b>Chlorophyceae</b>	Lutein	<i>Dunaliella salina</i>	126 ± 11	<i>Chlorella fusca</i>	149 ± 19

In der Gegenüberstellung der Xanthophyll-zu-Chlorophyll-a Verhältnisse dieser Untersuchung mit denen, die von Wilhelm et al. [1991] gefunden wurden, zeigen sich für die Klasse der Cyanobakterien und der Chlorophyceae vergleichbare Ergebnisse. Für die Diatomeen ist ein deutlicher Unterschied in dem Xanthophyll zu Chlorophyll-a Verhältnis feststellbar.

Selbstverständlich gilt es zu bedenken, dass es sich bei der Gegenüberstellung zwar um Algen der gleichen Klasse, nicht aber derselben Spezies handelt. Variationen der Pigmentkomposition sind in jeder Algenklasse schon durch die einzelnen Spezies gegeben, wie in den Anregungsspektren mariner Arten (Kapitel 5.4-1 bis 7) gezeigt wurde.



**Tabelle 11.5-4: Messergebnisse für die Markerpigmente der HPLC-Analyse**

	<b>Mischung A</b>	<b>Mischung B</b>	<b>Mischung C</b>	<b>Mischung D</b>
Pigment	[µg / l]	[µg / l]	[µg / l]	[µg / l]
<b>Chl.a</b>	<b>247,9</b> ± 2,0	<b>179,7</b> ± 10,6	<b>382,1</b> ± 21,1	<b>126,1</b> ± 0,7
<b>Fucoxanthin</b>	<b>100,7</b> ± 1,0	<b>23,9</b> ± 1,2	<b>29,9</b> ± 1,0	<b>19,2</b> ± 0,2
Lutein	<b>12,6</b> ± 0,3	<b>18,4</b> ± 0,9	<b>44,6</b> ± 3,0	<b>12,3</b> ± 0,3
<b>Chl.b</b>	<b>24,1</b> ± 2,2	<b>19,5</b> ± 2,1	<b>81,7</b> ± 3,8	<b>19,6</b> ± 2,9

Die Berechnung der Anteile der Algenklassen zu dem Chlorophyll-*a* Gesamtgehaltes der vier Mischungen wird durch die nachfolgende Formel berechnet:

**Gleichung 11.5-6: Algengruppenerkennung über Markerpigmente nach Wilhelm et al. [1991]**

$$\text{Chl. a}_{\text{Algengruppe}} = \left( \frac{1}{V_{\text{MP}}} \right)_{\text{Ausgangskulturen}} * \text{MP}_{\text{Algengruppe}}$$

Die vier Mischungen enthalten die drei Algenklassen der Diatomeen, Chlorophyceae und der Cyanobakterien. Die Markerpigmente für diese Klassen sind die Xanthophylle Fucoxanthin, Zeaxanthin und Lutein.

In Tabelle 11.5-4 wird das Pigment Zeaxanthin nicht aufgeführt. Die am Institut verwendete Methode von Mantoura & Llewellyn [1983] lässt keine eindeutige Trennung zwischen Lutein und Zeaxanthin zu. Für alle vier Mischungen wurde nur das Lutein identifiziert und der Gehalt bestimmt, auch wenn es sich um eine Mischung der beiden Pigmente handelte.

Zur Trennung wurde das Pigment Chlorophyll-*b* herangezogen. Dieses Pigment ist im Antennenapparat der Chlorophyceae zu finden, nicht aber in dem der Cyanobakterien und der Diatomeen. Über das Chl.b-zu-Chl.a-Verhältnis der Ausgangskulturen ist der Anteil der Chlorophyceae zum Gesamtchlorophyll-*a* Gehalt direkt bestimmbar.

Der Anteil des Zeaxanthins einer Mischung hingegen muss indirekt bestimmt werden. Dazu wird der Prozess der Identifizierung eines Pigmentes und der Gehaltsbestimmung genauer betrachtet.

Der Gehalt eines Pigmentes wird über eine Detektierung der Fluoreszenz ermittelt. Da das zu bestimmende Pigment über eine definierte Zeitspanne an dem Detektor registriert wird, erfolgt eine Integration über die Zeit. Die für das Pigment bestimmte Fläche mal einem Faktor

RF (response factor) ergibt den Chl.a-Gehalt in µg pro Liter. Die für Lutein ermittelte Fläche setzt sich für die Mischung B und D aus Anteilen von Lutein und Zeaxanthin zusammen:

**Gleichung 11.5-7:**

$$\text{Fläche}_{\text{Lutein+ Zeaxanthin}} = \text{Fläche}_{\text{Lutein}} + \text{Fläche}_{\text{Zeaxanthin}}$$

Um den Anteil des Luteins an der Gesamtfläche zu bestimmen, wird die Menge über das Verhältnis Lutein zu Chl.b der Ausgangskulturen (Tabelle 11.4-1) bestimmt. Der Beitrag der Chlorophyceae (Chloro) zu der Menge an detektiertem Lutein ergibt sich wie folgt:

**Gleichung 11.5-8:**

$$\text{Lutein}_{\text{Mischung}} = \left( \frac{\text{Lutein}_{\text{Chloro}}}{\text{Chl.b}_{\text{Chloro}}} \right)_{\text{Ausgangskulturen}} * \text{Chl.b}_{\text{Mischung}}$$

Es gilt außerdem:

**Gleichung 11.5-9:**

$$\text{Lutein}_{\text{Mischung}} = \text{RF}_{\text{Lutein}} * \text{Fläche}_{\text{Lutein}}$$

Mit diesen drei Gleichungen folgt für den Anteil des Zeaxanthins (Zea) in den Mischungen:

**Gleichung 11.5-10:**

$$\text{Zea}_{\text{Mischung}} = \text{RF}_{\text{Zea}} \left( \text{Fläche}_{\text{Lutein+ Zea}} - \frac{1}{\text{RF}_{\text{Lutein}}} \left( \frac{\text{Lutein}_{\text{Chloro}}}{\text{Chl.b}_{\text{Chloro}}} \right)_{\text{Ausgangskultur}} * \text{Chl.b}_{\text{Mischung}} \right)$$

Die indirekte Ermittlung des Zeaxanthins über die Gleichung 11.5-10 vergrößert den Fehler der Bestimmung der Chl.a Anteile der Cyanobakterien. Zusätzlich zum Fehler der Lutein-Bestimmung kommt noch der Fehler der Chl.b Bestimmung hinzu.

Nach der Berechnung der Menge an Zeaxanthin lassen sich die Anteile der Algenklassen in den Mischungen bestimmen.

**Tabelle 11.5-5: Differenzierung der Algenklassen nach der Methode von Wilhelm et al. [1991]**

Die Unterscheidung erfolgt über die Markerpigmente aus Tabelle 11.4-1

HPLC	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
nach Wilhelm	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]
<b>Mischung A</b>	<b>103,3</b> $\pm 9,5$	<b>0,0</b> $\pm 0,0$	<b>179,4</b> $\pm 1,8$
<b>Mischung B</b>	<b>83,7</b> $\pm 9,0$	<b>70,4</b> $\pm 3,1$	<b>42,5</b> $\pm 2,1$
<b>Mischung C</b>	<b>349,9</b> $\pm 16,3$	<b>0,0</b> $\pm 0,0$	<b>53,2</b> $\pm 1,8$
<b>Mischung D</b>	<b>84,0</b> $\pm 12,4$	<b>15,4</b> $\pm 17,0$	<b>34,1</b> $\pm 0,4$

Neben der Verwendung der Markerpigmente wurde ein weiterer Weg der Differenzierung der Algenklassen besprochen. Die Methode nach Wilhelm geht von der Konstanz der Pigmentverhältnisse aus. Da die Gruppenerkennung nur auf der Verwendung eines Pigmentes basiert, ist diese stark von der Messgenauigkeit abhängig. Daher bietet sich die Verwendung aller messbaren Pigmente zur Lösungsfindung an. Eine Lösung wird über einen Normkurvenfit erreicht. Als Normkurven dienen alle ermittelten Pigmente der HPLC-Analyse, die damit einen sogenannten Pigment-Fingerprint einer Algenart bilden (Tabelle 11.4-1).

Das Gleichungssystem ist in Kapitel 6.1 beschrieben. Dort wird die Lösung mittels spektraler Fingerprints bei Fluoreszenzmessungen beschrieben, die sich aber auch auf diese Problemstellung übertragen lässt. Die Lösung des Gleichungssystems durch den Normkurvenfit mit Pigmentfingerprint (alle Pigmente als Normkurven) ergibt für die Mischungen:

**Tabelle 11.5-6: Differenzierung der Algenklassen durch den Normkurvenfit**

HPLC	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
Normkurvenfit	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]
Mischung A	<b>81,1</b> $\pm 3,2$	<b>0,0</b> $\pm 0,0$	<b>159,5</b> $\pm 1,2$
Mischung B	<b>64,0</b> $\pm 0,9$	<b>86,3</b> $\pm 2,2$	<b>37,2</b> $\pm 0,6$
Mischung C	<b>319,3</b> $\pm 18,5$	<b>0,0</b> $\pm 0,0$	<b>45,0</b> $\pm 1,5$
Mischung D	<b>114,8</b> $\pm 59,1$	<b>15,8</b> $\pm 5,1$	<b>49,0</b> $\pm 22,2$

### 11.5.3. Algengruppenerkennung mit dem Durchflusszytometer

Die Mischungen A – D wurden nun ebenfalls mit dem FCM analysiert. Es ergeben sich unter Verwendung der ermittelten Regionen (Kap. 11.4.2) zur Differenzierung des Phytoplanktons die Zellzahlen der Algenspezies pro Liter.

Mit dem bekannten mittleren Chl.a-Gehalt pro Zelle (Tabelle 11.4-2) aus den FCM-Messungen an den Ausgangskulturen für die Algenspezies lässt sich die Chl.a-Konzentration der Algenspezies in den Mischungen bestimmen:

**Gleichung 11.5-11:**

$$\text{Chl.a}_{\text{Algenspezies}} = \left( \frac{\text{Chl.a}_{\text{Algenspezies}}}{\text{Zellzahl}_{\text{Algenspezies}}} \right)_{\text{Ausgangskulturen}} * \text{Zellzahl}_{\text{Algenspezies}}$$

**Tabelle 11.5-7: FCM Bestimmung der Chl.a-Konzentrationen anhand der Zellzahlen**

FCM	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
Zellzahlen	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
Mischung A	77,9 ± 17,6	0,0 ± 0,0	188,1 ± 16,9
Mischung B	78,5 ± 4,2	100,8 ± 2,7	22,4 ± 0,6
Mischung C	345,7 ± 9,7	0,0 ± 0,0	62,4 ± 3,8
Mischung D	160,4 ± 10,8	48,5 ± 0,5	63,8 ± 2,5

Ist der Chl.a-Gehalt pro Zelle nicht bekannt, so wie es bei Freilandproben im allgemeinen der Fall ist (Kap. 7.3.1), kann der Zusammenhang zwischen der Rotfluoreszenz (> 675 nm) und dem Chlorophyll-*a* Gehalt zur Bestimmung der Algenklassenkonzentration in der Probe heran gezogen werden. Durch die Integration der Rotfluoreszenz aller Algenzellen in einer Region (nach Gleichung 7.3-1) lässt sich dann die Konzentration unabhängig von der Zellzahl bestimmen.

Die Auswerteprogramme für das FCM liefern aber momentan nur den Mittelwert der Rotfluoreszenz einer Region und so muss die Zellzahl mit eingerechnet werden:

**Gleichung 11.5-12:**

$$\text{Chl.a}_{\text{Algenspezies}} = \left( \frac{\text{Chl.a}_{\text{Algenspezies}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{Algenspezies}}} \right)_{\text{Ausgangskulturen}} * \text{Fluoreszenz}_{\text{Algenspezies}}$$

mit  $\text{Fluoreszenz}_{\text{Algenspezies}} = \text{Zellzahl}_{\text{Algenspezies}} * \text{mittl. Rotfluoreszenz}_{\text{Region}}$

Für die Mischungen werden nun die Chl.a-Gehalte der Algenklassen über die Rotfluoreszenz bestimmt.

**Tabelle 11.5-8: FCM Bestimmung der Chl.a-Konzentrationen anhand der Rotfluoreszenz**

FCM	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
Rotfluoreszenz	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]
<b>Mischung A</b>	<b>76,9</b> $\pm$ 17,3	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>163,5</b> $\pm$ 10,9
<b>Mischung B</b>	<b>79,1</b> $\pm$ 3,8	<b>86,5</b> $\pm$ 1,9	<b>18,8</b> $\pm$ 0,5
<b>Mischung C</b>	<b>337,4</b> $\pm$ 10,0	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>53,8</b> $\pm$ 2,1
<b>Mischung D</b>	<b>169,5</b> $\pm$ 14,4	<b>46,8</b> $\pm$ 1,4	<b>59,1</b> $\pm$ 3,9

#### 11.5.4. Algengruppenerkennung durch Fluoreszenzspektren

Die Anregungsspektren der Mischungen werden durch den Normkurvenfit (Gleichung 5.7-7) unter Verwendung der Spektren der Ausgangskulturen analysiert und die Chlorophyll-*a* Konzentrationen der Algenspezies berechnet. Die Matrix **A** der Spektren der Ausgangskulturen ergibt sich zu einer 3 x 320 Matrix. Die Berechnung ergibt die folgenden Konzentrationen:

**Tabelle 11.5-9: Algengruppenbestimmung durch die Messung der Anregungsspektren**

Spektrum	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
Anregung	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]
<b>Mischung A</b>	<b>53,5</b> $\pm$ 3,7	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>175,8</b> $\pm$ 5,0
<b>Mischung B</b>	<b>60,7</b> $\pm$ 8,8	<b>62,5</b> $\pm$ 0,8	<b>28,9</b> $\pm$ 5,5
<b>Mischung C</b>	<b>280,6</b> $\pm$ 25,9	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>74,2</b> $\pm$ 5,9
<b>Mischung D</b>	<b>108,6</b> $\pm$ 3,0	<b>31,8</b> $\pm$ 0,3	<b>71,9</b> $\pm$ 2,8

Die Emissionsspektren werden wie die Anregungsspektren behandelt, die Matrix **A** enthält nun aber 3 x 150 Elemente.

**Tabelle 11.5-10: Algengruppenbestimmung durch die Messung der Emissionsspektren**

Spektrum	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen
Emission	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]	[ $\mu\text{g Chl.a} / \text{l}$ ]
<b>Mischung A</b>	<b>51,4</b> $\pm$ 8,4	<b>0,0</b> $\pm$ 0,0	<b>143,5</b> $\pm$ 3,7
<b>Mischung B</b>	<b>79,4</b> $\pm$ 26,8	<b>73,9</b> $\pm$ 2,3	<b>21,0</b> $\pm$ 4,0
<b>Mischung C</b>	<b>276,4</b> $\pm$ 26,8	<b>0,1</b> $\pm$ 0,1	<b>41,7</b> $\pm$ 4,7
<b>Mischung D</b>	<b>110,2</b> $\pm$ 9,5	<b>37,8</b> $\pm$ 0,8	<b>48,4</b> $\pm$ 4,5

#### 11.5.5. Algengruppenerkennung mit dem AOA

Die Ergebnisse des AOA's für eine Mischung sind durch fünf Rohdatenwerte gegeben. Die Anregung erfolgt durch fünf diskrete Wellenlängen, die Messung bestimmt somit die

Fluoreszenz für die fünf Farben. Damit reduziert sich die Matrix der Fingerprints auf 3 x 5 Matrixelemente.

**Tabelle 11.5-11: Algengruppenbestimmung durch die Messung der diskreten Anregungsspektren**

<b>AOA</b>	<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>Diatomeen</b>
Diskr. Anregung	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Mischung A</b>	<b>55,0</b> ± 1,8	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>151,1</b> ± 6,5
<b>Mischung B</b>	<b>63,6</b> ± 9,1	<b>83,2</b> ± 4,3	<b>30,6</b> ± 5,0
<b>Mischung C</b>	<b>339,5</b> ± 10,0	<b>0,2</b> ± 0,3	<b>45,3</b> ± 5,3
<b>Mischung D</b>	<b>161,0</b> ± 4,9	<b>41,7</b> ± 2,3	<b>52,8</b> ± 5,0

### 11.5.6. Algengruppenerkennung durch Absorptionsspektren

Die Berechnung der Anteile der Spezies aus den Absorptionsspektren erfolgt in Analogie zu den Berechnungen der Algengruppenzugehörigkeit durch Anregungsspektren aus (Kap. 11.5.4). Benutzt wurde der volle Wellenlängenbereich von 350 – 750 nm des Absorptionsspektrums. Die Matrix **A** der Normkurven hat 3 x 400 Elemente.

**Tabelle 11.5-12: Algengruppenbestimmung durch die Messung der Absorptionsspektren**

<b>Spektrum</b>	<b>Chlorophyceae</b>	<b>Cyanobakterien</b>	<b>Diatomeen</b>
Absorption	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
Mischung A	<b>85,9</b> ± 3,2	<b>1,3</b> ± 0,6	<b>166,4</b> ± 24,8
Mischung B	<b>95,6</b> ± 9,4	<b>83,2</b> ± 7,8	<b>42,1</b> ± 3,7
Mischung C	<b>314,4</b> ± 2,9	<b>1,9</b> ± 1,3	<b>71,9</b> ± 6,2
Mischung D	<b>119,1</b> ± 12,3	<b>46,4</b> ± 2,1	<b>74,6</b> ± 12,3

Die Bestimmung der Algengruppen in den vier Mischungen durch die verschiedenen Messsysteme ist jetzt abgeschlossen. Es folgt nun die Bewertung der Messergebnisse.

## 11.6. Bewertung der Ergebnisse zur Algengruppenerkennung

Alle Ergebnisse werden einander gegenüber gestellt. Für eine Beurteilung der Qualität der Algengruppenerkennung mit den verschiedenen Messsystemen werden nun Noten vergeben.

Die Bewertung erfolgt anhand der Abweichungen der Ergebnisse der Messsysteme zu den berechneten theoretischen Konzentrationen (theo. Konzentration) der Algenspezies. Der

relative Fehler des Gesamtgehaltes der theoretischen Konzentrationen beträgt für alle vier Mischungen weniger als 6 %.

Davon ausgehend werden die Noten folgendermaßen definiert: Für die Note **I** muss die Abweichung für den Gesamtgehalt des Messsystems kleiner als 10 % sein und die Erfassung der Algenspezies um weniger als 20 % von den theoretischen Bezugswerten abweichen. Für die Note **II** gelten maximal 20 % Abweichung für den Gesamtgehalt und 30 % für die Spezies. Mit Note **III** werden alle Ergebnisse bewertet, die schlechter als Note **II** sind.

**Tabelle 11.6-1: Definition des Bewertungsmaßstabes für die Algengruppenerkennung**

<b>Rel. Abweichung vom:</b>	theo. Chl.a-Gesamtgehalt	&	theo. Chl.a-Gehalt der Algengruppen
<b>Note I</b>	< 10 %		< 20 %
<b>Note II</b>	> 10 % bis < 20 %		> 20 % bis < 30 %
<b>Note III</b>	> 20 %		> 30 %

**Tabelle 11.6-2: Ergebnisse aller Messsysteme zur Algengruppenerkennung**

Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Algengruppenerkennung der Messsysteme für die jeweilige Mischung mit der Benotung nach Tabelle 11.6-1.

Mischung A	Note	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
theo. Konzentrationen		75,0 ± 4,4	0,0 ± 0,0	151,3 ± 6,7	226,4 ± 11,1
HPLC (Normkurvenfit)	I	81,1 ± 3,2	0,0 ± 0,0	159,5 ± 1,2	240,6 ± 4,3
FCM (Fluoreszenz)		76,9 ± 17,3	0,0 ± 0,0	163,5 ± 10,9	240,4 ± 28,2
Anregungsspektrum	II	53,5 ± 3,7	0,0 ± 0,0	175,8 ± 5,0	229,3 ± 8,6
Absorptionsspektrum		85,9 ± 3,2	1,3 ± 0,6	166,4 ± 24,8	253,6 ± 28,6
AOA (diskr. Spektrum)		55,0 ± 1,8	0,0 ± 0,0	151,1 ± 6,5	206,0 ± 8,3
HPLC (Wilhelm)	III	103,3 ± 9,5	0,0 ± 0,0	179,4 ± 1,8	282,7 ± 11,3
FCM (Zellzahl)		77,9 ± 17,6	0,0 ± 0,0	188,1 ± 16,9	266,0 ± 34,5
Emissionsspektrum		51,4 ± 8,4	0,0 ± 0,0	143,5 ± 3,7	194,9 ± 12,2

Mischung B	Note	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
theo. Konzentrationen		62,5 ± 3,7	73,7 ± 2,4	31,5 ± 2,6	167,7 ± 8,6
Anregungsspektrum	I	60,7 ± 8,8	62,5 ± 0,8	28,9 ± 5,5	152,1 ± 15,1
AOA (diskr. Spektrum)		63,6 ± 9,1	83,2 ± 4,3	30,6 ± 5,0	177,4 ± 18,4
HPLC (Normkurvenfit)	II	64,0 ± 0,9	86,3 ± 2,2	37,2 ± 0,6	187,5 ± 3,7
FCM (Fluoreszenz)	III	79,1 ± 3,8	86,5 ± 1,9	18,8 ± 0,5	184,4 ± 6,2
Emissionsspektrum		79,4 ± 26,8	73,9 ± 2,3	21,0 ± 4,0	174,3 ± 33,0
HPLC (Wilhelm)		83,7 ± 9,0	70,4 ± 3,1	42,5 ± 2,1	196,6 ± 14,2
FCM (Zellzahl)		78,5 ± 4,2	100,8 ± 2,7	22,4 ± 0,6	201,7 ± 7,5
Absorptionsspektrum		95,6 ± 9,4	83,2 ± 7,8	42,1 ± 3,7	220,9 ± 20,9

Mischung C	Note	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
theo. Konzentrationen		<b>281,4</b> ± 7,1	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>47,3</b> ± 3,9	<b>328,7</b> ± 11,0
HPLC (Normkurvenfit)	<b>I</b>	<b>319,3</b> ± 18,5	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>45,0</b> ± 1,5	<b>364,3</b> ± 20,0
Emissionsspektrum		<b>276,4</b> ± 26,8	<b>0,1</b> ± 0,1	<b>41,7</b> ± 4,7	<b>318,1</b> ± 31,6
AOA (diskr. Spektrum)	<b>II</b>	<b>339,5</b> ± 10,0	<b>0,2</b> ± 0,3	<b>45,3</b> ± 5,3	<b>387,1</b> ± 14,8
FCM (Fluoreszenz)		<b>337,4</b> ± 10,0	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>53,8</b> ± 2,1	<b>391,2</b> ± 12,1
Anregungsspektrum	<b>III</b>	<b>280,6</b> ± 25,9	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>74,2</b> ± 5,9	<b>354,8</b> ± 31,8
FCM (Zellzahl)		<b>345,7</b> ± 9,7	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>62,4</b> ± 3,8	<b>408,1</b> ± 13,5
HPLC (Wilhelm)		<b>349,9</b> ± 16,3	<b>0,0</b> ± 0,0	<b>53,2</b> ± 1,8	<b>403,1</b> ± 18,1
Absorptionsspektrum		<b>314,4</b> ± 2,9	<b>1,9</b> ± 1,3	<b>71,9</b> ± 6,2	<b>388,2</b> ± 10,4

Mischung D	Note	Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
theo. Konzentrationen		<b>125,1</b> ± 7,3	<b>36,8</b> ± 2,6	<b>63,1</b> ± 5,1	<b>225,0</b> ± 15,0
Anregungsspektrum	<b>I</b>	<b>108,6</b> ± 3,0	<b>31,8</b> ± 0,3	<b>71,9</b> ± 2,8	<b>212,3</b> ± 6,0
Emissionsspektrum	<b>II</b>	<b>110,2</b> ± 9,5	<b>37,8</b> ± 0,8	<b>48,4</b> ± 4,5	<b>196,4</b> ± 14,8
AOA (diskr. Spektrum)		<b>161,0</b> ± 4,9	<b>41,7</b> ± 2,3	<b>52,8</b> ± 5,0	<b>257,8</b> ± 13,3
Absorptionsspektrum		<b>119,1</b> ± 12,3	<b>46,4</b> ± 2,1	<b>74,6</b> ± 12,3	<b>240,1</b> ± 26,7
FCM (Zellzahl)	<b>III</b>	<b>160,4</b> ± 10,8	<b>48,5</b> ± 0,5	<b>63,8</b> ± 2,5	<b>272,7</b> ± 13,8
FCM (Fluoreszenz)		<b>169,5</b> ± 14,4	<b>46,8</b> ± 1,4	<b>59,1</b> ± 3,9	<b>275,4</b> ± 19,7
HPLC (Wilhelm)		<b>84,0</b> ± 12,4	<b>15,4</b> ± 17,0	<b>34,1</b> ± 0,4	<b>133,5</b> ± 29,8
HPLC (Normkurvenfit)		<b>114,8</b> ± 59,1	<b>15,8</b> ± 5,1	<b>49,0</b> ± 22,2	<b>179,7</b> ± 86,3

Die Beurteilung der Messsysteme in der Übersicht:

**Tabelle 11.6-3: Beurteilung der Ergebnisse der Messsysteme anhand der Mischungen**

Algengruppenerkennung mit der Methode:	Mischung A	Mischung B	Mischung C	Mischung D	Summe der Beurteilungen
	Note	Note	Note	Note	
<b>Anregungsspektrum</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>III</b>	<b>I</b>	<b>7</b>
<b>AOA (dis. Spektrum)</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>II</b>	<b>7</b>
<b>HPLC (Normkurvenfit)</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>8</b>
<b>FCM (Fluoreszenz)</b>	<b>I</b>	<b>III</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>9</b>
<b>Emissionsspektrum</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>9</b>
<b>Absorptionsspektrum</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>II</b>	<b>10</b>
<b>HPLC (Wilhelm)</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>12</b>
<b>FCM (Zellzahl)</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>III</b>	<b>12</b>

Die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Spezies durch die HPLC-Analyse nach der Methode von Wilhelm [Wilhelm et al. 1991] erhält für alle Mischungen nur die Note **III** . Es gilt zu bedenken, dass die Trennung der Pigmente Lutein und Zeaxanthin indirekt über das Pigment Chlorophyll-*b* vorgenommen wurde, was eine zusätzliche Fehlerquelle für die Erkennung darstellt.



Doch im Vergleich zu der Berechnung über den Normkurven-Fit (HPLC(Fit) in der Tabelle 11.6-2) ist diese Art der Bestimmung als stark fehlerbehaftet anzusehen. Dieses gilt ebenso für die Chl.a Bestimmung über die vom FCM bestimmten Zellzahlen, der Verwendung der Absorptionsspektren und den Emissionsspektren.

### 11.6.1. Beurteilung der Messsysteme anhand der Untersuchung

Die besten Ergebnisse für die Chl.a Bestimmungen des Gesamtgehaltes und der Gehalte der Algengruppen werden durch die HPLC-Analyse mit anschließendem Normkurven-Fit, dem FCM bei einer Berechnung über die Fluoreszenz, der Analyse der Anregungsspektren, der Emissionsspektren und den diskreten Anregungsspektren des AOA's erzielt. Für die Algengruppenerkennung sind diese Geräte am besten geeignet. Für die Beurteilung der AOA Ergebnisse der *in situ* Messungen der Ausfahrten, muss aber zusätzlich die Auflösungsgrenze der Systeme ermittelt werden. Es gilt festzustellen, ob die Messsysteme auch für Messungen an geringeren Chl.a-Konzentrationen geeignet sind.

## 11.7. Untersuchungen zu den Auflösungsgrenzen der Messsysteme

Zum Test der Sensitivität der Messsysteme werden sechs unterschiedliche Verdünnungen der Mischung D erzeugt. Als Verdünnungsmedium dient künstliches Salzwasser (KSW 2), in dem die Algen kultiviert wurden. Die Verdünnungsstufen ergeben sich aus jeweils einem Teil Ausgangskultur zu  $2^{n-1}$  Teilen Salzwasser für die n.te Verdünnung. Ein Teil Algenkultur mit einem Teil Medium verdünnt wird als 1 : 2 Verdünnung bezeichnet. Um Folgefehler von einer Verdünnung zur nächsten zu vermeiden, wurden alle Verdünnungen von der Ausgangskultur direkt angefertigt. Die Ergebnisse der Messungen aller Systeme an der ersten Verdünnung zeigten eine Erhöhung der Konzentration der Chlorophyceae in der Mischung. Die Mischung wurde bis zu den Messungen der Verdünnungsreihe für mehrere Stunden unter Schwachlichtbedingungen verwahrt. Es zeigte sich trotz der geringen Lichtintensität ein Konzentrationsanstieg von 25 % für die Chlorophyceae und 10 % für die Cyanobakterien.

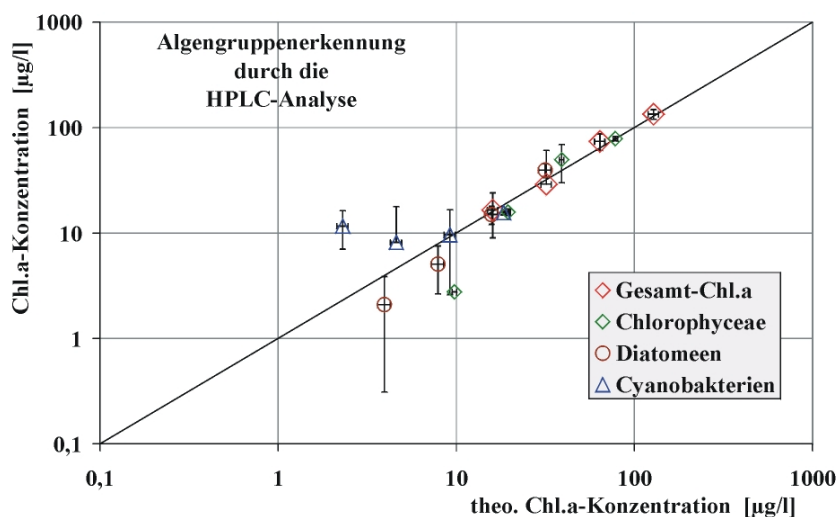
Damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet bleibt, wird auf die Ergebnisse der Verdünnung „0“ (Mischung D) verzichtet. Es werden im weiteren die Ergebnisse der Messsysteme der Verdünnungen 1 bis 6 einander gegenüber gestellt. Die zur Auswertung der

Daten der Messsysteme nötigen Berechnungen sind zu denen im vorherigen Kapitel 11.5 identisch und diesem zu entnehmen.

**Anmerkung zu den nachfolgenden Abbildungen:**

In einer logarithmischen Darstellung können Werte, die kleiner gleich Null sind, nicht dargestellt werden. Ist also ein positiver Fehlerbalken sichtbar, der negative aber nicht, so kann der Messwert nach der Standardabweichung Werte annehmen, die kleiner als 0,1 µg Chl.a pro Liter sind. Dieses betrifft in den folgenden Abbildungen nur die Standardabweichungen für die Werte der Messsysteme (y-Achse), da die Fehler für die theoretische Chl.a-Konzentration für einen solchen Fall zu klein ist. Aufgrund der Wichtigkeit dieser Ergebnisse sind diese sowohl als übersichtliche Abbildungen (Abbildung 11.7-1 – 5) als auch als Tabellen (Tabelle 11.7-1 A – F) wiedergegeben.

**Abbildung 11.7-1: Verdünnungsreihe: HPLC-Analyse (Normkurvenfit)**



**Abbildung 11.7-2: Verdünnungsreihe: Anregungsspektrum**

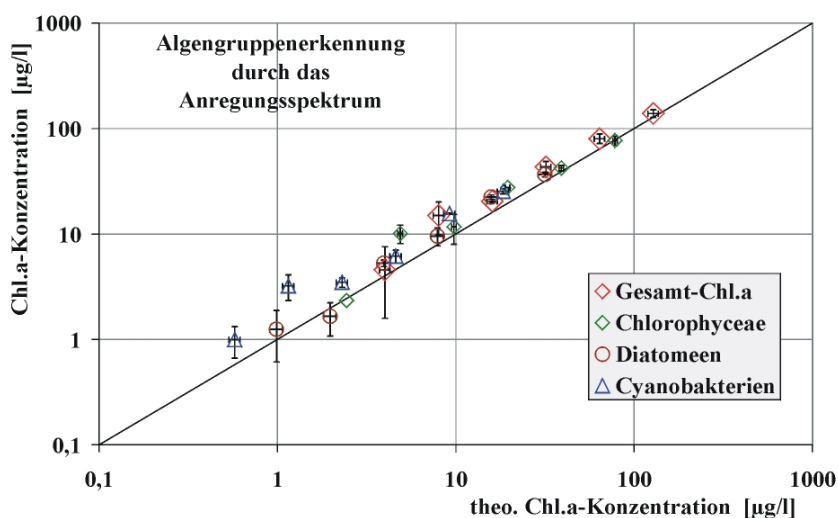


Abbildung 11.7-3: Verdünnungsreihe: Emissionsspektrum

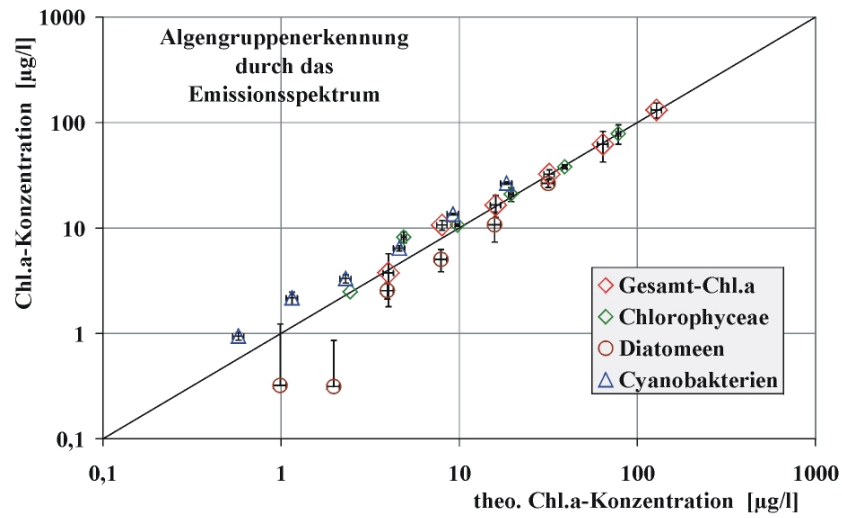


Abbildung 11.7-4: Verdünnungsreihe: Absorptionsspektrum

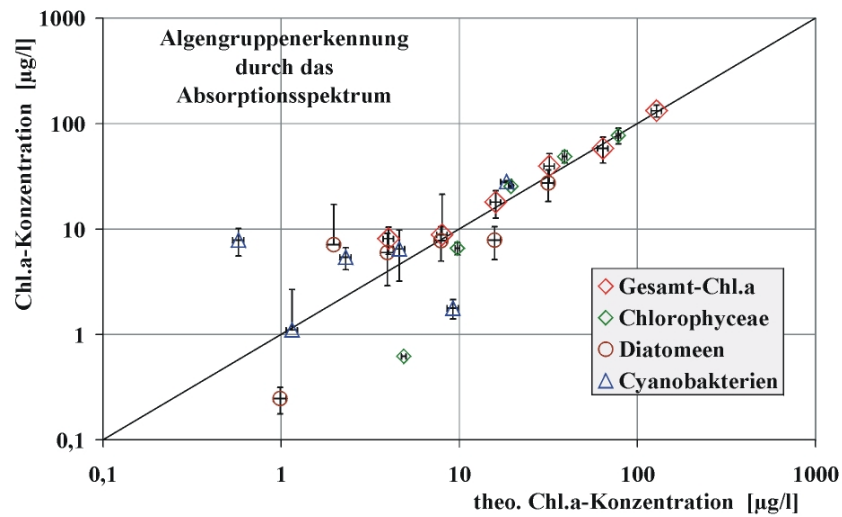
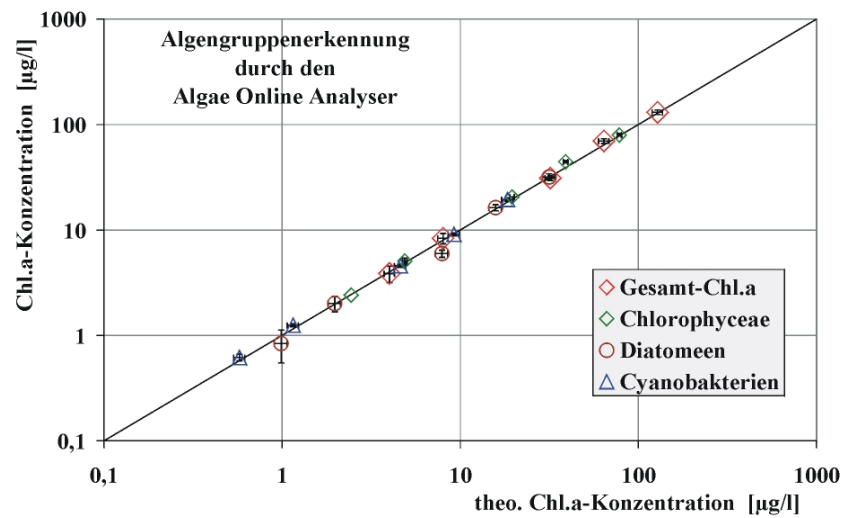


Abbildung 11.7-5: Verdünnungsreihe: Algae Online Analyser



**Tabelle 11.7-1 A - F: Verdünnungsreihenversuch zur Ermittlung der Sensitivität der Messsysteme**

Das Erreichen der Auflösungsgrenze des Systems ist durch die kursiv gehaltenen Ergebnisse markiert (siehe die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse für die einzelnen Messsysteme).

**A: Theoretisch berechnete Konzentrationen aus der Verdünnung der Ausgangskultur**

Theoretische Konzentration		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>78,2</b> ± 4,6	<b>18,4</b> ± 1,3	<b>31,5</b> ± 2,6	<b>128,1</b> ± 8,5
<b>Verdünnung 2</b>	<b>1 : 4</b>	<b>39,1</b> ± 2,3	<b>9,2</b> ± 0,7	<b>15,8</b> ± 1,3	<b>64,1</b> ± 4,2
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>19,5</b> ± 1,1	<b>4,6</b> ± 0,3	<b>7,9</b> ± 0,6	<b>32,0</b> ± 2,1
<b>Verdünnung 4</b>	<b>1 : 16</b>	<b>9,8</b> ± 0,6	<b>2,3</b> ± 0,2	<b>3,9</b> ± 0,3	<b>16,0</b> ± 1,1
<b>Verdünnung 5</b>	<b>1 : 32</b>	<b>4,9</b> ± 0,3	<b>1,2</b> ± 0,1	<b>2,0</b> ± 0,2	<b>8,0</b> ± 0,5
<b>Verdünnung 6</b>	<b>1 : 64</b>	<b>2,4</b> ± 0,1	<b>0,6</b> ± 0,0	<b>1,0</b> ± 0,1	<b>4,0</b> ± 0,3

**B: Ergebnisse der HPLC-Analyse durch einen Normkurven**

HPLC (Normkurvenfit)		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Σ Gruppen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>78,8</b> ± 7,3	<b>15,6</b> ± 0,7	<b>39,4</b> ± 5,9	<b>133,8</b> ± 13,9	<b>133,5</b> ± 0,8
<i>Verdünnung 2</i>	<i>1 : 4</i>	<i>49,5</i> ± 3,5	<i>9,6</i> ± 7,0	<i>15,0</i> ± 2,9	<i>74,0</i> ± 13,4	<i>74,0</i> ± 0,7
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>15,8</b> ± 19,6	<b>8,2</b> ± 9,6	<b>5,1</b> ± 2,4	<b>29,1</b> ± 31,6	<b>36,5</b> ± 2,0
<i>Verdünnung 4</i>	<i>1 : 16</i>	<i>2,8</i> ± 1,1	<i>11,6</i> ± 4,6	<i>2,1</i> ± 1,8	<i>16,5</i> ± 7,5	<i>16,8</i> ± 5,3
<i>Verdünnung 5</i>	<i>1 : 32</i>					<i>16,1</i> -
<i>Verdünnung 6</i>	<i>1 : 64</i>					<i>6,5</i> ± 1,5

**C: Normkurven-Fit der Anregungsspektren**

Anregungs-spektrum		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>77,2</b> ± 8,0	<b>25,4</b> ± 1,4	<b>36,6</b> ± 2,0	<b>139,3</b> ± 11,4
<b>Verdünnung 2</b>	<b>1 : 4</b>	<b>42,2</b> ± 7,1	<b>15,6</b> ± 0,2	<b>22,4</b> ± 1,0	<b>80,2</b> ± 8,3
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>27,6</b> ± 2,5	<b>6,2</b> ± 0,9	<b>9,6</b> ± 1,9	<b>43,3</b> ± 5,3
<b>Verdünnung 4</b>	<b>1 : 16</b>	<b>11,7</b> ± 0,1	<b>3,5</b> ± 0,4	<b>5,3</b> ± 0,4	<b>20,5</b> ± 0,8
<i>Verdünnung 5</i>	<i>1 : 32</i>	<i>10,1</i> ± 3,7	<i>3,2</i> ± 0,9	<i>1,7</i> ± 0,6	<i>15,0</i> ± 5,1
<i>Verdünnung 6</i>	<i>1 : 64</i>	<i>2,3</i> ± 2,0	<i>1,0</i> ± 0,3	<i>1,2</i> ± 0,6	<i>4,6</i> ± 3,0

**D: Normkurven-Fit der Emissionsspektren**

Emissions-spektrum		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>78,7</b> ± 18,5	<b>26,7</b> ± 0,7	<b>26,5</b> ± 2,2	<b>131,9</b> ± 21,4
<b>Verdünnung 2</b>	<b>1 : 4</b>	<b>38,2</b> ± 16,5	<b>13,5</b> ± 0,2	<b>10,7</b> ± 3,4	<b>62,4</b> ± 20,1
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>20,9</b> ± 1,6	<b>6,4</b> ± 0,4	<b>5,0</b> ± 1,2	<b>32,4</b> ± 3,1
<b>Verdünnung 4</b>	<b>1 : 16</b>	<b>10,7</b> ± 3,2	<b>3,3</b> ± 0,3	<b>2,6</b> ± 0,4	<b>16,5</b> ± 4,0
<i>Verdünnung 5</i>	<i>1 : 32</i>	<i>8,2</i> ± 0,3	<i>2,2</i> ± 0,3	<i>0,3</i> ± 0,5	<i>10,7</i> ± 1,1
<i>Verdünnung 6</i>	<i>1 : 64</i>	<i>2,5</i> ± 1,0	<i>0,9</i> ± 0,1	<i>0,3</i> ± 0,9	<i>3,7</i> ± 2,0

**E: Normkurven-Fit der Absorptionsspektren**

Absorptions-spektrum		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>77,2</b> ± 7,8	<b>28,1</b> ± 0,6	<b>27,3</b> ± 9,0	<b>132,6</b> ± 17,4
<b>Verdünnung 2</b>	<b>1 : 4</b>	<b>48,7</b> ± 13,0	<b>1,8</b> ± 0,4	<b>7,8</b> ± 2,7	<b>58,3</b> ± 16,1
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>25,3</b> ± 6,3	<b>6,5</b> ± 3,3	<b>7,7</b> ± 2,8	<b>39,5</b> ± 12,4
<i>Verdünnung 4</i>	<i>1 : 16</i>	<i>6,6</i> ± 0,9	<i>5,4</i> ± 1,3	<i>6,0</i> ± 3,1	<i>17,9</i> ± 5,3
<i>Verdünnung 5</i>	<i>1 : 32</i>	<i>0,6</i> ± 0,9	<i>1,1</i> ± 1,6	<i>7,1</i> ± 10,1	<i>8,8</i> ± 12,5
<i>Verdünnung 6</i>	<i>1 : 64</i>	<i>0,0</i> ± 0,0	<i>7,8</i> ± 2,3	<i>0,2</i> ± 0,1	<i>8,1</i> ± 2,3

**F: Normkurven-Fit der diskreten Anregungsspektren**

AOA diskretes Spektrum		Chlorophyceae	Cyanobakterien	Diatomeen	Gesamtgehalt
		[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]	[µg Chl.a / l]
<b>Verdünnung 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>79,8</b> ± 3,5	<b>19,5</b> ± 0,7	<b>31,9</b> ± 2,1	<b>131,2</b> ± 6,4
<b>Verdünnung 2</b>	<b>1 : 4</b>	<b>44,4</b> ± 2,3	<b>9,1</b> ± 0,3	<b>16,3</b> ± 1,0	<b>69,8</b> ± 3,6
<b>Verdünnung 3</b>	<b>1 : 8</b>	<b>20,5</b> ± 1,0	<b>4,6</b> ± 0,2	<b>6,0</b> ± 0,5	<b>31,1</b> ± 1,6
<b>Verdünnung 4</b>	<b>1 : 16</b>				
<b>Verdünnung 5</b>	<b>1 : 32</b>	<b>5,1</b> ± 0,6	<b>1,3</b> ± 0,0	<b>2,0</b> ± 0,3	<b>8,3</b> ± 0,9
<b>Verdünnung 6</b>	<b>1 : 64</b>	<b>2,4</b> ± 0,4	<b>0,6</b> ± 0,0	<b>0,8</b> ± 0,3	<b>3,9</b> ± 0,7

### 11.7.1. Beurteilung der Algengruppenerkennung durch die HPLC-Analyse

Der Vergleich der Ergebnisse der HPLC-Analyse mit den theoretisch berechneten Konzentrationen lässt eine Aussage über die Auflösungsgrenze des Systems zu.

Die Untersuchung zur Algengruppenerkennung in Kapitel 11.5.2 zeigt für die Ermittlung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppen sehr starke Abweichungen zu den theoretisch berechneten Konzentrationen bei der Verwendung der Methode nach Wilhelm [Wilhelm et al. 1991] auf. Dieses Ergebnis zeigt sich auch in der Bestimmung der Chl.a-Konzentrationen der Algengruppen für die Verdünnungsreihen. Die Ergebnisse sind so schlecht, dass auf ihre Darstellung ganz verzichtet wird.

Bei der Verwendung aller identifizierten Pigmente zur Bestimmung der Algenklassen durch einen Normkurvenfit ergeben sich die Konzentrationen der Spezies in den Verdünnungen nach Tabelle 11.7-1 B. Der Vergleich der HPLC-Ergebnisse mit den theoretisch berechneten Konzentrationen der Algenklassen zeigt im Rahmen der Messgenauigkeit eine gute Übereinstimmung für die Bestimmung des Chlorophyll-*a* Gehaltes der Spezies und des Gesamtgehaltes für die erste Verdünnung.

Bei der zweiten Verdünnungsstufe zeigt sich eine Überschätzung der Chlorophyceae, womit ein erhöhter Chl.a-Gesamtgehalt einher geht. Die absoluten Fehler der Einzelgehalte der Spezies steigen stark an. Die relative Abweichung von 18% für den berechneten Gesamtgehalt ( $\Sigma$  Gruppen) aus der Summe der Chl.a-Gehalte zeigt eine größer werdende Unsicherheit des Fit's. Als Maß für die Unsicherheit kann der Vergleich der Summe der Konzentrationen der Spezies zu den Abweichungen des real gemessenen Chl.a-Gehaltes herangezogen werden. Bis zur vierten Verdünnung sind die Werte für die Chl.a-Konzentration vergleichbar. Die Standardabweichungen aber zeigen deutlich, dass von einer Verdünnungsstufe zur Nächsten die Algenerkennung immer fehlerhafter wird. Als Beispiel dafür weist die direkte Bestimmung des Chl.a-Gehaltes für die Verdünnung 3 einen relativen Fehler von 5,5 % auf. Die Ermittlung des Chl.a-Gesamtgehalt über die Summe der Chl.a-Gehalte der Algenspezies hingegen zeigt für diese Verdünnung einen relativen Fehler von über 100 % auf.

Bei der Betrachtung der identifizierten Pigmente wird die Quelle des Fehlers in der nachfolgenden Tabelle deutlich.

**Tabelle 11.7-2: Nachweisbarkeit der Pigmente für die Verdünnungsreihe**

Von den insgesamt 16 Pigmenten, welche durch die HPLC-Analyse separiert werden können, wurden die 9 in der Tabelle aufgeführten Pigmente nachgewiesen.

<b>Pigment</b>		<b>Verdünnung 1</b>	<b>Verdünnung 2</b>	<b>Verdünnung 3</b>	<b>Verdünnung 4</b>
Fucoxanthin	µg/l	<b>23,7</b> ± 3,6	<b>8,7</b> ± 2,0	<b>4,1</b> ± 0,3	<b>0,8</b> ± 1,2
Chlorophyll- <i>b</i>	µg/l	<b>21,3</b> ± 1,6	<b>11,6</b> ± 1,1	<b>6,6</b> ± 0,5	nicht nachweisbar
Lutein	µg/l	<b>13,6</b> ± 0,2	<b>7,1</b> ± 0,1	<b>3,2</b> ± 0,3	<b>0,9</b> ± 1,3
Neoxanthin	µg/l	<b>2,8</b> ± 0,3	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Violaxanthin	µg/l	<b>4,3</b> ± 0,1	<b>2,3</b> ± 0,3	<b>1,2</b> ± 0,0	nicht nachweisbar
Diadinoxanthin	µg/l	<b>2,5</b> ± 0,2	<b>1,4</b> ± 0,2	<b>0,4</b> ± 0,5	nicht nachweisbar
β-Karotin	µg/l	<b>9,9</b> ± 0,8	<b>4,6</b> ± 0,1	<b>2,2</b> ± 0,2	nicht nachweisbar
α-Karotin	µg/l	<b>0,8</b> ± 0,0	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Chlorophyll- <i>a</i>	µg/l	<b>133,5</b> ± 0,8	<b>74,0</b> ± 0,7	<b>36,5</b> ± 2,0	<b>16,8</b> ± 5,3

Die Pigmente Neoxanthin und β-Carotin werden ab der Verdünnung 2 nicht mehr nachgewiesen. Für die Bestimmung des Diadinoxanthins in der Verdünnung 3 übersteigt die Standardabweichung des Pigmentes die ermittelte Menge des Xanthophylls. Die indirekte Bestimmung des Zeaxanthins über den Chlorophyll-*b* Gehalt ergibt negative Werte und ist damit nicht mehr indirekt bestimmbar. Für alle weiteren Stufen der Verdünnung wird nur noch das Pigment Chlorophyll-*a* ermittelt.

**11.7.2. Die Auflösungsgrenze der HPLC-Analyse**

Für die Algenerkennung über die Pigmentanalyse ergibt sich anhand der Tabelle 11.7-1 B und Tabelle 11.7-2 der Chl.a-Gehalt der Verdünnung 1 als untere Chl.a-Grenze für eine sichere Auflösung der drei betrachteten Pigmente.

Bei einer Filtrationsmenge von 10 ml der Verdünnung und einer Doppelbestimmung werden die Spezies für die erste Verdünnung mit einem relativen Fehler von 10 % bestimmt. Für die weiteren Verdünnungen erhöht sich die Standardabweichung und damit der relative Fehler der Zuordnung.

Wird für die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppen in einer unbekanntem Wasserprobe eine Genauigkeit von 10 % relativem Fehler gefordert, so ergibt sich eine mindestens zu filtrierende Probenmenge in Abhängigkeit zu dem vorhandenen Chl.a-Gehalt:

- Um die Klasse der Chlorophyceae in einer Wasserprobe mit 1 µg Chl.a pro Liter mit einem relativen Fehler von maximal 10% zu bestimmen, müssen insgesamt 800 ml Wasserprobe filtriert werden.

- Für 1 µg Chl.a pro Liter von Cyanobakterien muss die Menge mindestens 150 ml betragen.
- Für den Nachweis von 1 µg Chl.a von Diatomeen mit einem Fehler von 10% wird eine Filtrationsmenge von 400 ml benötigt.

Es gilt zu bedenken, dass diese Abschätzung nicht impliziert, dass bei einer Halbierung der Konzentration sich der relative Fehler auf 20 % verdoppelt. Die Ergebnisse in Tabelle 11.7-2 zeigen, dass bei einer Halbierung der Konzentration die ersten Pigmente nicht mehr nachweisbar sind.

### **Fazit für die HPLC-Analyse**

Die Pigmente Zeaxanthin, Lutein und Fucoxanthin können unter 1 µg Chl.a pro Liter für die abgeschätzten Probenmengen von 150, 400 und 800 ml filtrierter Probenmenge unter Umständen nicht mehr nachgewiesen werden.

### **11.7.3. Anmerkung zur weiteren Beurteilung der Systeme**

Für eine Beurteilung der Auflösungsgrenze der Algengruppenerkennung eines Messsystems werden deshalb zwei unterschiedliche relative Fehler betrachtet. Die erste Fehlerbetrachtung erfolgt bezüglich der relativen Abweichung des ermittelten Chl.a-Gesamtgehaltes des Messsystems zu dem theoretisch berechneten Chl.a-Gehalt:

#### **Gleichung 11.7-1:**

$$\text{Rel. Abweichung}_{\text{Chl.a}} = \frac{|\text{Chl.a}_{\text{theo.}} - \text{Chl.a}_{\text{Messgerät}}|}{\text{Chl.a}_{\text{theo.}}}$$

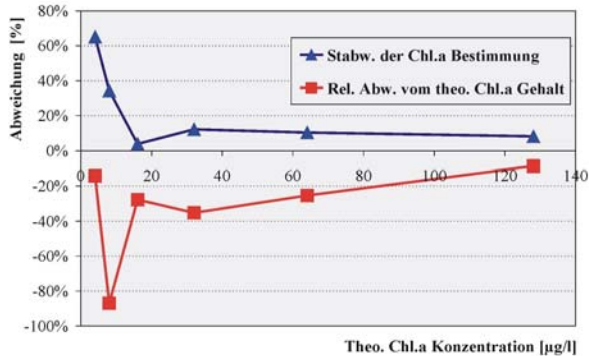
Die zweite Betrachtung erfolgt bezüglich des relativen Fehlers der Chl.a-Bestimmung des Messgerätes selbst, also der ermittelten relativen Standardabweichung des Messwertes bei einer Mehrfachbestimmung (im Fall dieser Untersuchung eine Doppelbestimmung). Zusätzlich werden auch die Ergebnisse der Gruppenerkennung des Systems aus Tabelle 11.7-1 für die Abschätzung der Auflösungsgrenze in Betracht gezogen.

### **11.7.4. Die Auflösungsgrenze bei der Verwendung des Anregungsspektrums**

Für die Beurteilung der Eignung der Anregungsspektren bei geringen Chl.a-Gehalten (Tabelle 11.7-1 C) wird die relative Abweichung nach Gleichung 11.7-1 und die Standardabweichung der

Fitergebnisse in Abhängigkeit von den theoretischen Chl.a-Konzentrationen der Verdünnungsproben graphisch dargestellt:

**Abbildung 11.7-6: Auflösungs Grenzen der Anregungsspektren**



Der relative Fehler der Chl.a Bestimmung bleibt bis zu einer Konzentration von 16 µg Chl.a / l (Verdünnung 4) konstant bei etwa 10 %. Für höhere Verdünnungen steigt dieser Fehler dann stark an.

Die relative Abweichung des ermittelten Chl.a-Gehaltes von dem theoretischen Chl.a-Gehalt steigt von den hohen zu den niedrigeren Konzentrationen leicht an. Für den Chl.a-Gesamtgehalt von 8 µg pro Liter vergrößert sich die relative Abweichung vom theoretischen Wert auf 90 %. Für 4 µg Chl.a pro Liter geht dieser Fehler wieder zurück auf unter 20 %, doch der relative Fehler der Chl.a Bestimmung ist von 34 % (für 8 µg/l) auf über 60 % angestiegen. Die Betrachtung der Identifizierung der Algengruppen in Tabelle 11.7-1 C spiegelt die Tendenz aus Abbildung 11.7-6 auch für die einzelnen Spezies wieder. Die Cyanobakterien werden über alle Verdünnungen um 38 % überschätzt.

### Fazit für die Anregungsspektren

Für Chlorophyll-a Konzentrationen unter 16 µg pro Liter wird die Erkennung der Algengruppen stark fehlerbehaftet.

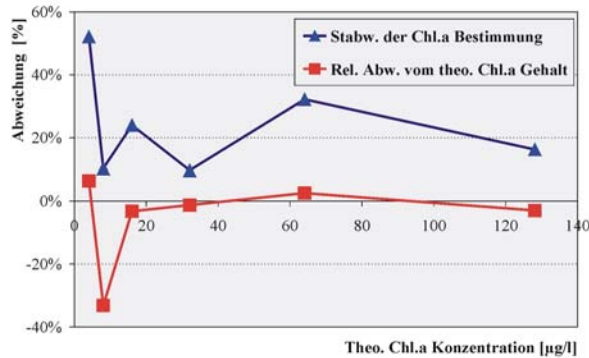
#### 11.7.5. Die Auflösungs Grenze bei der Verwendung des Emissionsspektrums

Die Betrachtung der Algengruppenerkennung anhand von Anregungsspektren wird nun auf die Emissionsspektren übertragen. Der relative Fehler der Bestimmung des Chl.a-Gesamtgehaltes erweist sich mit Werten zwischen 10 bis 30 % höher als für die Algengruppenerkennung mittels der Anregungsspektren (siehe nachfolgende Abbildung). Die relative Abweichung zu dem theoretischen Chl.a-Gesamtgehalt hingegen ist mit ca. 5 % gut. Für die höchste Verdünnung zeigt sich erneut ein starker Anstieg des relativen Fehlers des



Chl.a-Gehaltes. Tabelle 11.7-1 D zeigt, das die Diatomeen in den Verdünnungen 5 und 6 „fast“ nicht mehr identifiziert werden.

**Abbildung 11.7-7: Auflösungs-grenzen für Emissionsspektren**



Der Gehalt an Chl.a beträgt für beide Verdünnungen 0,3 µg Chl.a pro Liter bei einer Standardabweichung von 0,5 bzw. 0,9 µg Chl.a pro Liter absolut. Die Cyanobakterien werden mit 44 % über alle Verdünnungen hindurch überschätzt.

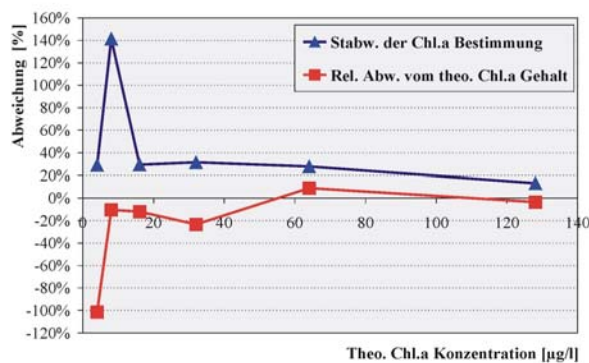
### Fazit für die Emissionsspektren

Der relative Fehler der Chl.a Bestimmung beträgt 10 bis 30 %. Da die Diatomeen für die Verdünnungen 5 und 6 nicht zugeordnet werden können (Tabelle 11.7-1 D), ergibt sich die Auflösungs-grenze, für die eine Gruppenerkennung noch möglich ist, zu 16 µg Chl.a pro Liter.

### 11.7.6. Die Auflösungs-grenze bei der Verwendung des Absorptionsspektrums

Für die Verwendung des Absorptionsspektrums ergibt sich ein zu den Fluoreszenzspektren sehr ähnliches Bild der Fehlerentwicklung:

**Abbildung 11.7-8: Auflösungs-grenzen für Absorptionsspektren**



Die relative Abweichung der Chl.a Bestimmung zu den theoretischen Konzentrationen beträgt zwischen 10 und 20 %. Der relative Fehler der Chl.a Bestimmung liegt zwischen 15 und 35 %.

Die Messung des Gesamtgehaltes an Chl.a ist mit den Ergebnissen der Analyse der Fluoreszenzspektren vergleichbar. Für die Konzentration von 4 µg Chl.a pro Liter (Verdünnung 6) steigt die Abweichung zu dem theoretischen Gehalt stark an. In der Tabelle 11.7-1 E sind die Ergebnisse für den Chl.a Gehalt der drei Algenspezies einzeln aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Algengruppenerkennung für die Verdünnung 1 durch die Verwendung der Absorptionsspektren möglich ist. Für die Verdünnung 2 hingegen ist die Zuordnung durch den Normkurvenfit mit den Spektren der Ausgangskulturen stark gestört. Der Chl.a-Gehalt der Cyanobakterien und der Diatomeen wird in Verdünnung 2 extrem stark unterschätzt. Die Unterschätzung zeigt für die höheren Verdünnungsstufen (Verdünnung 4 – 6) mit geringer werdendem Chl.a-Gesamtgehalt keine einheitliche Tendenz.

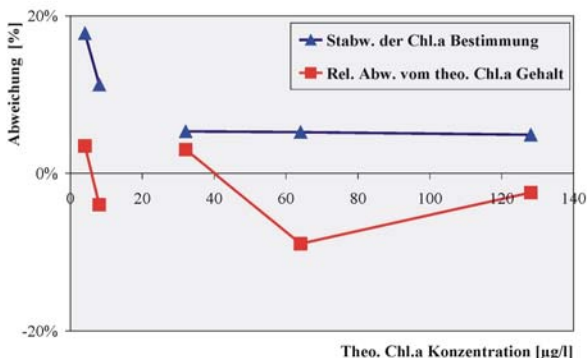
### Fazit für das Absorptionsspektrum

Die Auflösungsgrenze der Algengruppenerkennung unter Verwendung der Absorptionsspektren ist bei einem Chl.a-Gesamtgehalt von 40 bzw. 130 µg pro Liter erreicht. Wird das Ergebnis für die Verdünnung 2 als Ausreißer angesehen liegt die Grenze der Auflösung bei 40 µg Chl.a-Gesamtgehalt pro Liter, ansonsten bei 130 µg Chl.a pro Liter.

#### 11.7.7. Auflösungsgrenze des AOA's

Die Ergebnisse der Messung mit dem AOA zur Differenzierung der Algenklassen sind in Tabelle 6.6 – 1 F für die Spezies und den Chl.a-Gesamtgehalt aufgezeigt. Die Verdünnung 4 ging für die Messung leider verloren, da der Probenbehälter umkippte.

**Abbildung 11.7-9: Auflösungsgrenzen für den AOA**



Der relative absolute Fehler der Chl.a Bestimmung beträgt für die ersten 3 Verdünnungen 5 %. Für die beiden stärksten Verdünnungen erhöht sich der relative Fehler auf 11 bzw. 18 %.

Die Abweichung des gemessenen zu dem theoretischen Chl.a-Gesamtgehalt beträgt mit einer Ausnahme (Verdünnung 2: 9%) weniger als 5 %. Die Erkennung der einzelnen Algenspezies zeigt ebenfalls sehr gute Ergebnisse bis zu den höchsten Verdünnungen (vgl. Tabelle 11.7-1 F).

### Fazit für den Algae Online Analyser

Speziell für die geringen Konzentrationen von 4 und 8 µg Chl.a pro Liter zeigt sich im Vergleich zu den anderen getesteten Messsystemen eine wesentlich höhere Auflösung, deren untere Grenze mit diesem Versuch (wohl) nicht erreicht wird.

## 11.8. Zusammenfassung der Resultate beider Versuche

Die Beurteilung der Ergebnisse zur Untersuchung der Algengruppenerkennung (Kap. 11.6) kommt zu folgendem Schluss:

Die HPLC-Analyse mit anschließendem Normkurven-Fit bei der Verwendung von Pigmentfingerprints, die Analyse über die Verwendung von Fluoreszenzanregungsspektren und der AOA weisen bei der Untersuchung zur Algengruppenerkennung die besten Ergebnisse auf.

Über alle Messungen gesehen sind die relativen Abweichungen von den theoretischen Chl.a-Konzentrationen für diese drei Systeme kleiner als maximal 20 % für den Chl.a-Gesamtgehalt und 30 % für den Chl.a-Gehalt der Algengruppen (Tabelle 11.6-3).

Alle weiteren Systeme schneiden in der Betrachtung der relativen Abweichungen schlechter ab. Der Verdünnungsreihenversuch belegt, dass die Auflösungsgrenzen der Systeme für die Untersuchung zur Algengruppenerkennung nicht unterschritten wurden. Für die Gruppen-erkennung nach der Methode von Wilhelm et al. [1991] und die Differenzierung der Algenklassen durch die vom FCM ermittelten Zellzahlen betragen die relativen Abweichungen von den theoretischen Konzentrationen sogar bei allen Mischungen mehr als 20 % für den Chl.a-Gesamtgehalt und 30 % für den Chl.a-Gehalt der Algengruppen.

## 11.9. Die Eignung der besten Messsysteme als Referenz für den AOA

Im Vergleich der Systeme erweisen sich die Fluoreszenzanregungsspektren und die HPLC-Analyse als die besten Referenzen für die Verifizierung der Messergebnisse des AOA's.

Für die Anregungsspektren zeigt sich durch den Verdünnungsreihenversuch eine Auflösungsgrenze von 16 µg Chl.a-Gesamtgehalt pro Liter, unterhalb derer die Ergebnisse stark fehlerbehaftet sind (Kap. 11.7.4). Für Nordseewasserproben ist diese Auflösung zu gering, um bei den geringen Chl.a-Gehalten (von unter 10 µg Chl.a pro Liter) Algengruppen detektieren zu können. Eine Verbesserung der Auflösungsgrenze ist durch eine Erhöhung der Konzentration der Probe gegeben. Mittels einer Zentrifuge kann diese Erhöhung vorgenommen werden. Für den *in situ* Einsatz ist das Aufkonzentrieren mit den am FTZ verfügbaren Mitteln auf den Ausfahrten aber nicht realisierbar und somit für online-Messungen nicht einsetzbar.

Die HPLC-Analyse liefert für geringe Konzentrationen (< 10 µg/l) gute Ergebnisse für den Chl.a-Gehalt. Für die Markerpigmente zur Identifikation der Algengruppen ist in Kapitel 11.7.2 eine Abschätzung für die Auflösung von 1 µg Chl.a pro Liter der Algengruppe und dem dafür minimal benötigten Filtrationsvolumen wiedergegeben.

Das Durchflusszytometer ist als Referenz nur bedingt einsetzbar. Das Plankton kann in der Zellgröße über 7 Dekaden des forward scatter Signales (~ zur Größe der Algenzellen) variieren. Das FCM verfügt über einen 4 Dekaden Auflösungsbereich, der je nach Einstellung des Probenstrahles den erfassbaren Größenbereich festlegt. Die Messung an natürlichen Wasserproben erfordert deshalb eine zweifache Messung der Probe mit sich überlappenden Größenbereichen. Die Zeit der Messung an einer Probe wird dadurch verdoppelt. In dem Vergleich zu den anderen Messsystemen ist die Algengruppenerkennung mit dem FCM aber fehlerbehafteter (Tabelle 11.6-3). Die Messung an einzelnen Zellen hat aber den großen Vorteil, dass auch äußerst geringe Mengen von Phytoplankton einer Algenklasse von den restlichen Algenzellen differenziert werden können. Speziell bei der Klärung unterschiedlicher Ergebnisse vom AOA und der HPLC-Analyse kann die Algengruppenerkennung durch das FCM zur Klärung heran gezogen werden.

Alle weiteren untersuchten Messsysteme und Methoden werden aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zur Algengruppenerkennung und deren Auflösungsgrenzen auch weiterhin nicht als Referenz verwendet.

### 11.10. Eignung für eine Verifizierung von *in situ* Ergebnissen

Auf der ersten Ausfahrt wurden das FCM und die HPLC-Analyse als Referenzgeräte für den AOA eingesetzt. Diese beiden Untersuchungen zeigen, dass eine Verifizierung der AOA

Messergebnisse mittels dieser beiden Messsysteme prinzipiell möglich ist und auch die beste Wahl im Vergleich zu den untersuchten Systemen darstellt.

Es zeigt sich aber durch den Verdünnungsreihenversuch, dass die HPLC-Analyse für die Bestätigung von Algenklassen mit einer geringen Chl.a-Konzentration ( $< 2 \mu\text{g/l}$ ) an ihre Leistungsgrenze stößt. Die stärkste Einschränkung erfährt diese Analysetechnik durch den zum Teil sehr hohen Sedimentgehalt in den Wasserproben. Soll die HPLC-Analyse auf weiteren Ausfahrten zur Algengruppenerkennung genutzt werden, so wird eine Erhöhung der Filtrationsmenge unumgänglich sein. Erschwerend für die Auswertung ist außerdem die Tatsache, dass die verwendete Methode zur Identifizierung der Pigmente [Mantoura & Llewellyn 1983] keine Trennung von Lutein und Zeaxanthin ermöglicht. Methoden, die eine solche Auftrennung ermöglichen, sind bekannt [Bendixen 1998, Barlow et al. 1997].

Die Beurteilung der Algengruppenerkennung mit dem FCM durch Zellzählung und der Erfassung der Rotfluoreszenz (Tabelle 11.6-3) zeigt ein deutlich besseres Ergebnis für die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes über die Rotfluoreszenz der Algen. Rückblickend auf die Ergebnisse des FCM's der *in situ* Proben der ersten Ausfahrt und der Diskrepanz in der Höhe des Chl.a-Gehaltes der Diatomeen bei dem Versuch der Bestimmung durch die Zellzählung (Tabelle 7.3-3) und durch die Rotfluoreszenz (Kap. 7.3-5) erscheinen nach dieser Untersuchung die Werte für die Rotfluoreszenz glaubwürdiger. Dann aber zeigt sich eine starke Unterschätzung dieser Algenklasse gegenüber den HPLC-Ergebnissen (Kap. 7.3-6) der Proben, was zu dem Schluss führt, dass die Anzahl der mit dem FCM gezählten Partikel als zu gering einzustufen ist um eine gesicherte Bestimmung zuzulassen.

So gilt es für die Zukunft zu beachten, dass die Messung mit dem FCM solange durchgeführt wird, bis eine ausreichende Anzahl an Phytoplanktonzellen erfasst wird, unabhängig von der Gesamtmenge an (zu großen Teil nur scheinbar fluoreszierenden) Partikeln.



## 12. Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe

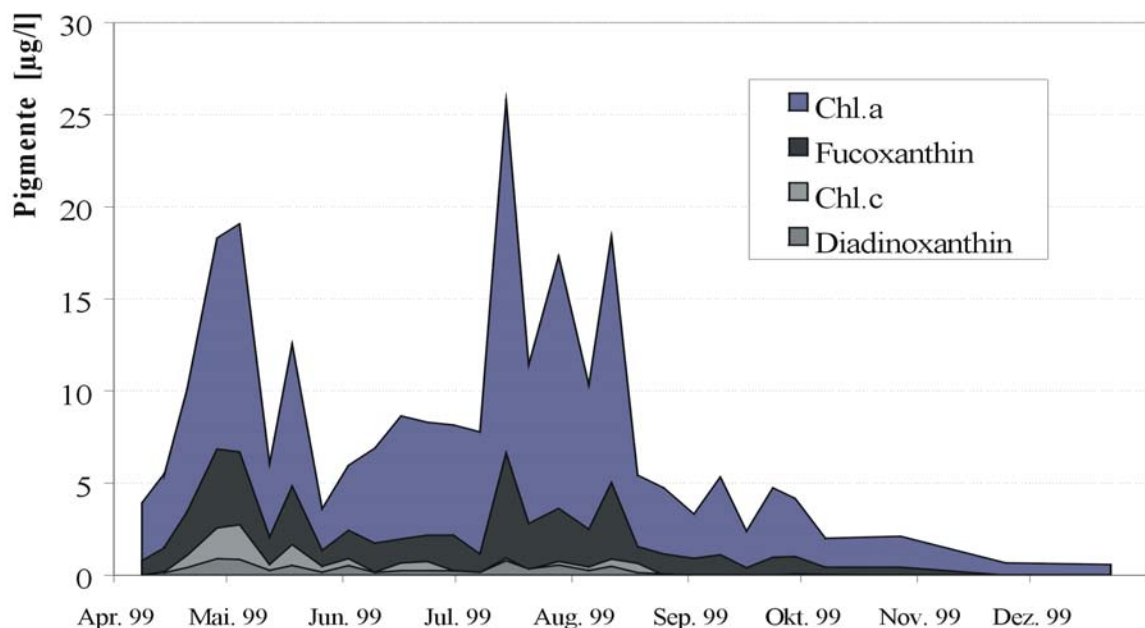
Unter Einbeziehung der Zusammensetzung des Phytoplanktons in der Deutschen Bucht wird eine Anpassung der Algengruppenerkennung über eine Hardwareänderung des AOA's vorgenommen.

### 12.1. Das Phytoplankton der Nordsee

Das Phytoplankton der Nordsee wird nach den Ergebnissen der beiden Ausfahrten (Kap. 7 & 8) im wesentlichen von Algen der braunen spektralen Gruppe dominiert. Als wichtigste Algenklassen sind die Diatomeen, die Dinoflagellaten und die Haptophyceae zu nennen. Wenn sich im Frühjahr die Wassertemperatur erhöht und sich die Lichtverhältnisse verbessern, setzt zwischen März und Juni die erste Algenblüte ein. Normalerweise handelt es sich bei der ersten Blüte um eine starke Vermehrung von Algen der Klasse der Diatomeen. Diese Algen vermehren sich so lange bis das gelöste Mineral Silikat knapp wird. Es wird für den Aufbau der Silikatschale der Algen benötigt. Ist das Silikat verbraucht, wird das Wachstum dieser Algen gehemmt und die Blüte findet ihr Ende.

**Abbildung 12.1-1: Jahresgang 1999 einiger Antennen-Pigmente an der Station Büsum Mole**

HPLC-Bestimmung der Pigment Konzentration an der Station Büsum Mole für das Jahr 1999. Das Phytoplankton wird durchgehend von der Algenklasse der Diatomeen dominiert (hauseigene Daten).



Nach der ersten Frühjahrsblüte der Diatomeen ist aufgrund der starken Eutrophierung der Nordsee nicht von einem Mangel an Nährstoffen auszugehen, und Algenklassen die kein Silikat benötigen, können in der Phytoplanktonpopulation dominant werden. Zu diesen Algen sind die Dinoflagellaten zu zählen.

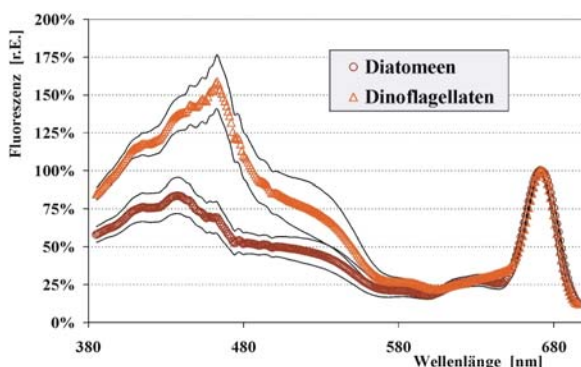
In dem Jahr 1999 zeigten die kontinuierlichen Messungen an der Station „Büsum Mole“ diese Entwicklung nicht auf. In Abbildung 12.1-1 sind die wichtigsten nachgewiesenen Pigmente dargestellt. Neben diesen vier Pigmenten wurden in geringen Mengen auch das  $\beta$ -Carotin und das Phaeophytin-a gefunden. Das zur Identifikation der Klasse der Dinoflagellaten wichtige Xanthophyll Peridinin wurde aber in keinem einzigen Fall nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Flagellaten üblicherweise nach den Diatomeen bei günstigen Umweltbedingungen stark vermehren. Eine Algenblüte der Flagellaten ist aber nicht zwingend.

## 12.2. Spektrale Unterschiede zwischen Diatomeen und Dinoflagellaten

In Kapitel 5 wurden die Anregungsspektren der Algenklassen vorgestellt. Ein direkter Vergleich der Spektren von Algen der Klasse der Dinoflagellaten und der Diatomeen (Abbildung 5.4.-3 & 7) wird durch eine Normierung der beiden Spektren auf den Peak des Chlorophyll-*a* (673 nm) vorgenommen.

### Abbildung 12.2-1: Vergleich der Anregungsspektren der Diatomeen und Dinoflagellaten

Die Spektren sind auf das Maximum der Anregung des Chl.a bei der Wellenlänge von 673 nm normiert. (gemessen mit dem RF5001PC (Shimadzu), Emissionwellenlänge  $720 \pm 10$  nm)



Im direkten Vergleich der Spektren zeigt sich der Unterschied in der Pigmentkomposition des Antennenapparates des PS II der beiden Algenklassen.

Die Dinoflagellaten zeigen im Vergleich zu den Diatomeen eine höhere Chl.a-Fluoreszenz für eine Anregung in dem Wellenlängenbereich von 380 – 580 nm. Ein weiterer markanter



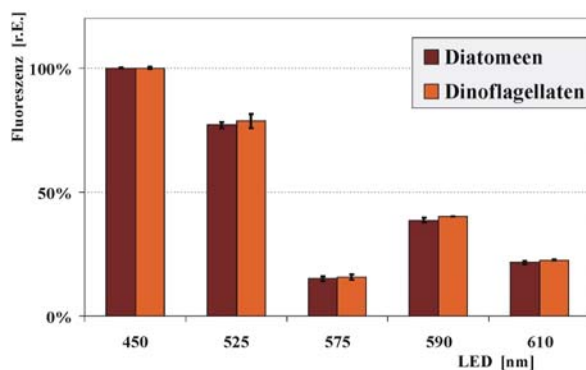
Unterschied ist die Lage des Maximums. Das lokale Maximum der Chl.a-Fluoreszenz für die Diatomeen liegt bei 437 nm, das für die Dinoflagellaten bei 465 nm. Verantwortlich dafür sind die Xanthophylle Fucoxanthin und Peridinin. Der Grundgedanke ist, die Unterschiede der Maxima durch eine entsprechende Anregung zu messen und für eine Trennung dieser beiden Algenklassen zu nutzen.

### 12.3. AOA-Fingerprints der Diatomeen und Dinoflagellaten

Nach den Untersuchungen von Beutler [1998] wurden für die Algengruppendifferenzierung durch diskrete Anregungsspektren die Wellenlängen von 450, 525, 575, 590 und 610 nm für limnische Algen gewählt. Die Bestimmung der spektralen Fingerprints der Algenspezies *Phaeodactylum tricornutum* (Diatomee) und *Amphidinium carterae* (Dinoflagellat) zeigen, dass mit dieser Wahl der diskreten Anregungswellenlängen eine Unterscheidung der beiden Algenklassen der braunen spektralen Gruppe nicht möglich ist (siehe nachfolgend Abbildung 12.3-1). Um dies zu verdeutlichen, werden die Fingerprints der beiden Algenklassen auf die Fluoreszenz der 450er LED normiert und verglichen:

**Abbildung 12.3-1: Fingerprints der Diatomeen und Dinoflagellaten des kommerziellen AOA's**

Die Fingerprints der beiden Algenspezies aus den Algenklassen der Diatomeen und der Dinoflagellaten sind auf die Fluoreszenz der LED mit einer Wellenlänge von 450 nm normiert.



Die Fingerprints der Algen *Phaeodactylum tricornutum* (Diatomee) und *Amphidinium carterae* (Dinoflagellat) sind praktisch nicht zu unterscheiden.

Der AOA bietet somit in seiner kommerziellen Ausführung nicht die Möglichkeit zwischen den Diatomeen und Dinoflagellaten zu unterscheiden. Diese beiden Algenklassen wurden in der braunen spektralen Gruppe zusammen gefasst [Beutler 1998].

Um den in Abbildung 12.2-1 aufgezeigten Unterschied der Spektren dieser beiden Klassen

auszunutzen, muss die nach Beutler vollzogene Wahl der LED's modifiziert werden. Eine Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe erscheint möglich. Dazu müssen LED's mit einer geeigneten Anregungswellenlänge eingebaut werden.

### 12.4. Die Chl.a-Fluoreszenz für diskrete Anregungswellenlängen

Zwei Wellenlängenbereiche sind für eine Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe von besonderer Bedeutung. In den Bereichen von 400 – 450 und 450 – 500 nm wird der Pigmentunterschied der betrachteten Klassen in Abbildung 12.2-1 am deutlichsten. Ein spezifisches Xanthophyll (Markerpigment) für die Klasse der Diatomeen ist das Fucoxanthin (Peak bei 450 nm, mit einer Schulter bei 470 nm) in Verbindung mit dem Xanthophyll Diadinoxanthin. Für die Dinoflagellaten hingegen ist es in eindeutiger Weise das Peridinin mit einem Maximum bei der Wellenlänge von 480 nm. Es werden für die Unterscheidung LED's benötigt, die ihre Emissionsmaxima in diesen beiden Wellenlängenbereichen haben.

Im Anhang E ist eine Übersicht über kommerziell erhältliche Lumineszenzdioden wiedergegeben. Für den „blauen“ Bereich gibt es nur zwei verschiedene LED's, die UB34180 (Oshino) und die NSPB (Nichia) mit Peakwellenlängen von 430 und 470 nm (Herstellerangaben, Anhang D). Die Aufnahme der Emissionsspektren der LED's (Anhang E, Abbildung E1) zeigt aber für die UB34180 ein Emissionsmaximum von 450 nm. Die Halbwertsbreite dieser LED ist sehr groß und sie erscheint deshalb als geeignet, den Bereich von 400 – 450 nm ausreichend anzuregen.

Bevor ein Umbau des AOA's in Erwägung gezogen wird, soll abgeschätzt werden, ob mit einer neuen LED-Auswahl eine Unterscheidung der Diatomeen und der Dinoflagellaten möglich ist. Dazu werden die theoretisch zu erwartenden Fluoreszenzausbeuten für die beiden Algenklassen bei der Anregung mit den jeweiligen LED's berechnet. Die Grundlage dazu bilden die beiden Vollspektren aus Abbildung 12.2-1. Mit  $F_{\text{Algenspezies}}(\lambda)$  gleich der Chl.a-Fluoreszenzemission der Algenklasse für eine Anregung mit der Wellenlänge ( $\lambda$ ) und  $I_{\text{LED}}(\lambda, x)$  gleich der Intensität der LED „x“ bei der Wellenlänge ( $\lambda$ ) kann die Fluoreszenzemission der Algenspezies für die LED „x“ berechnet werden:

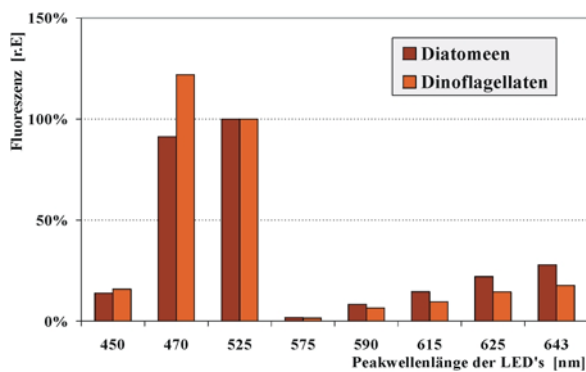
**Gleichung 12-1:**

$$F(\text{LED}_x) = \int_{400}^{700} F_{\text{Algenklasse}}(\lambda) \cdot I_{\text{LED}_x}(\lambda) d\lambda = \sum_{\lambda=400}^{700} F_{\text{Algenklasse}}(\lambda) \cdot I_{\text{LED}_x}(\lambda)$$

Für die gemittelten normierten Spektren der Klasse der Diatomeen und der Dinoflagellaten aus Abbildung 12.2-1 wird die Fluoreszenzemission für die möglichen LED's als Anregungslicht aus Anhang E ermittelt und einander gegenüber gestellt:

**Abbildung 12.4-1: Nach der Gleichung 12-1 berechnete Fluoreszenz der Diatomeen und Dinoflagellaten**

Zum besseren Vergleich sind die einzelnen Fluoreszenzemissionen auf die Emission der 525er LED normiert. Die Herstellerbezeichnung der LED ist der nachfolgenden Tabelle 12.5-1 zu entnehmen.



Der relative Unterschied der Fluoreszenzemission der beiden Algenklassen wird bei einer Normierung auf die Emission bei einer Anregung mit einer grünen LED (525 nm) in bezug auf die Diatomeen für kürzere Wellenlängen positiv. Für größere Wellenlängen (>525 nm) wird der relative Unterschied negativ. Die Höhe der einzelnen Säulen in der Darstellung ist proportional zu der Chlorophyll-Fluoreszenz der Algenklasse bei einer diskreten Anregung mit der entsprechenden LED und deren emittierter Lichtintensität. Die höchsten Intensitäten für die Fluoreszenzemissionen sind für die LED's mit den Wellenlängen von 470 und 525 nm zu erwarten. Die 575er LED ist am lichtschwächsten. Entsprechend klein ist die Intensität der Emission. Für die Auswahl der LED's ist dieses zu berücksichtigen.

## 12.5. Der relative Unterschied der Chl.a-Fluoreszenz

Wichtiger als die Intensität der Fluoreszenzemission ist der relative Unterschied (Rel. U) der Fluoreszenzantwort der beiden Klassen für die einzelnen LED's. Dieser Unterschied wird berechnet nach:

**Gleichung 12-2:**

$$\text{Rel.U}(F(\text{LED}_y), \text{LED}_x) = \left[ \frac{F_{\text{Diatomeen}}(\text{LED}_x) - F_{\text{Dinoflagellaten}}(\text{LED}_x)}{\text{Maximum}(F_{\text{Diatomeen}}(\text{LED}_x), F_{\text{Dinoflagellaten}}(\text{LED}_x))} \right]_{\text{normiert auf } F(\text{LED}_y)}$$

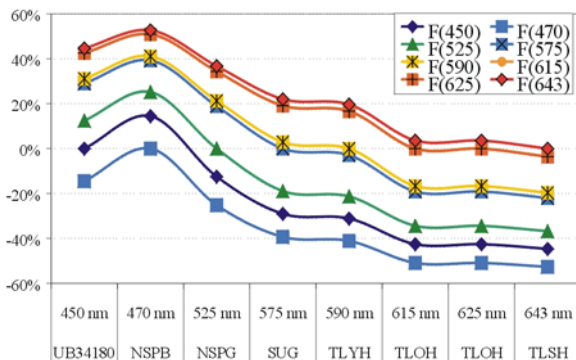
Der relative Unterschied ist abhängig von der Normierung auf die Fluoreszenzemission der LED „Y“ (F(LED<sub>y</sub>)):

**Tabelle 12.5-1: Relativer Unterschied der Fluoreszenzemission der Diatomeen und der Dinoflagellaten**

Die Normierung erfolgt jeweils auf die in der ersten Spalte angegebene Fluoreszenzemission für die LED mit der entsprechenden Peakwellenlänge.

Bezeichnung	UB34180	NSPB	NSPG	SUG	TLYH	TLOH	TLSH	TLRH
Peak [nm]	450	470	525	575	590	615	625	643
Normiert auf:								
F(450)	0%	14%	-12%	-29%	-31%	-43%	-43%	-45%
F(470)	-14%	0%	-25%	-39%	-41%	-51%	-51%	-53%
F(525)	12%	25%	0%	-19%	-21%	-34%	-34%	-37%
F(575)	29%	39%	19%	0%	-3%	-19%	-19%	-22%
F(590)	31%	41%	21%	3%	0%	-17%	-17%	-20%
F(615)	43%	51%	34%	19%	17%	0%	0%	-4%
F(625)	43%	51%	34%	19%	17%	0%	0%	-4%
F(643)	45%	53%	37%	22%	20%	4%	4%	0%

**Abbildung 12.5-1: Graphische Darstellung der Tabelle 12.5-1**



Die Höhe des relativen Unterschiedes für eine LED „x“ bei einer Normierung auf die Fluoreszenzemission bei der Anregung mit der LED „y“ zeigt die Trennbarkeit zwischen den beiden Algenklassen an.

Je höher dieser Wert für eine Anregung mit der LED „X“ in bezug auf die  $F(LED_x)$  ist, desto prädestinierter ist dieses LED-Paar für die Verwendung zur Differenzierung der beiden Klassen.

Für eine Erkennung der beiden Algenklassen reicht im Prinzip die Messung der Fluoreszenz bei zwei diskreten Wellenlängen aus. Für eine Algengruppendifferenzierung im Sinne von Beutler [Beutler 1998] sollen neben der Erkennung der Diatomeen und der Dinoflagellaten nach Möglichkeit auch die gemischte, die grüne und die blaue spektrale Gruppe erkannt werden.

### 12.6. Festlegung der neuen diskreten Anregungswellenlängen

Der AOA ist für die Verwendung von fünf diskreten Anregungswellenlängen ausgelegt. Diese werden jetzt unter Berücksichtigung der Betrachtungen der vorherigen Unterkapitel festgelegt.

Ausgehend von der Verwendung der 450er LED (Normierung auf  $F(450)$ ) zeigt die 470er LED als einzige einen positiven relativen Unterschied zwischen den beiden Algenklassen an (Tabelle 12.5-1). Diese beiden LED's werden verwendet.

Die LED's mit einer Wellenlänge von 615, 625 und 643 nm weisen die größten negativen relativen Unterschiede zur 450er LED auf. Ein Vergleich der relativen Unterschiede für die Normierungen  $F(615)$ ,  $F(625)$  und  $F(643)$  zeigt zusätzlich, dass diese drei LED's die gleiche Information liefern. Um die Differenzierung zwischen beiden braunen Gruppen und der grünen spektralen Gruppe zu verbessern, wird die 625 LED gewählt. Mit dieser LED wird gezielt das Chlorophyll-*c* der beiden braunen Gruppen angeregt. Algen der grünen spektralen Gruppe besitzen dieses Pigment nicht.

Für die  $F(525)$  Normierung wird das Verhältnis für kürzere Wellenlängen negativ, für längere Wellenlängen positiv. Diese LED wird verwendet.

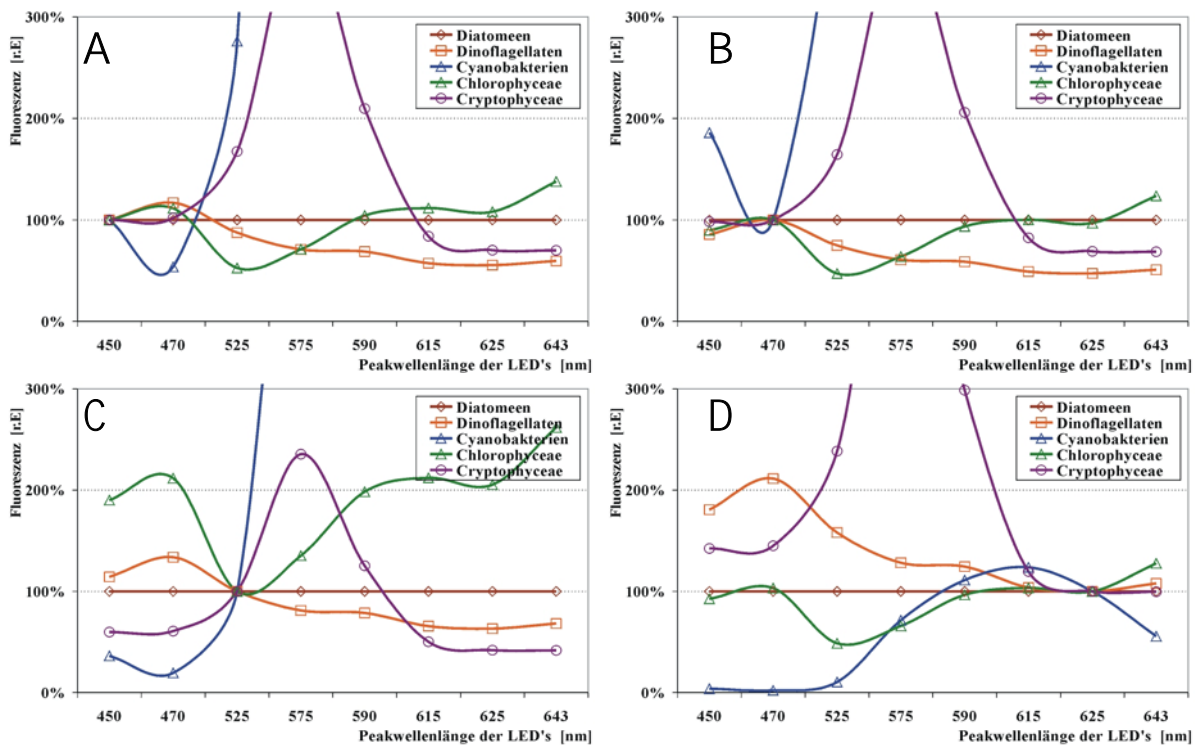
Für die Subunterteilung der braunen spektralen Algengruppe wurden nun 4 der 5 möglichen Lumineszenzdioden festgelegt.

Die fünfte mögliche LED wird nach dem Kriterium bestimmt, dass die Differenzierung auch in Bezug auf die von Beutler eingeführten Algengruppen möglich sein soll. Die Berechnung des relativen Unterschiedes der Chl.a-Fluoreszenz für die verschiedenen diskreten

Anregungswellenlängen der LED's wird auf die Algenklassen der Crypto-, Cyano- und Chlorophyceae ausgedehnt. Die Betrachtung erfolgt in Analogie zu den Kapiteln 12.4 und 12.5.

**Abbildung 12.6-1: A – D: Relativer Unterschied der Chl. Fluoreszenz für verschiedene Algenklassen**

Die Chl.a-Fluoreszenz wurde zunächst auf die Klasse der Diatomeen und nachfolgend auf die LED's mit einer Wellenlänge von 450 nm (A), 470 nm (B), 525 nm (C) und 625 nm (D) normiert. Der maximale relative Fluoreszenzwert in der Darstellung wurde auf 300 % begrenzt, um die geringeren prozentualen Unterschiede besser sichtbar zu machen.



Zur Diskussion für die fünfte LED des AOA's zur Anregung der Chl.a-Fluoreszenz stehen die LED's mit den Peakwellenlängen von 575, 590, 615 und 645 nm zur Verfügung.

- Die 615er LED liefert im Vergleich mit der 625er LED (die schon zum Einbau festgelegt wurde) keine wesentlichen neuen Informationen für die Gruppendifferenzierung.
- Zur Erkennung der Klasse der Cryptophyceae ist der Einsatz der 575er oder 590er LED nötig. Die 575er LED besitzt aber nur eine sehr geringe Lichtintensität (siehe Anhang E).
- Die 643er LED emittiert in einem Wellenlängenbereich, der sich sehr nah an dem Detektionswellenlängenbereich der Chl.a-Fluoreszenz von 680 – 720 nm befindet. Mit optischen Filtern lässt sich die Trennung eines solchen langwelligen Anregungslichtes von

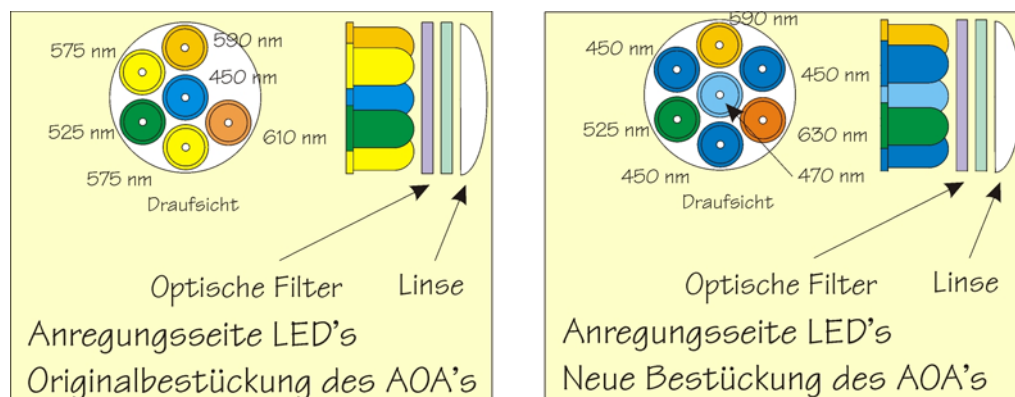
der Fluoreszenz nicht vollständig erreichen. Für geringe Intensitäten der Fluoreszenz kann dies zu einem Problem werden.

Als fünfte LED wird somit die 590er LED gewählt und festgelegt.

## 12.7. Änderung der AOA-LED's und deren Ansteuerung

Die Änderung der LED-Bestückung der Anregungsseite des AOA's (vgl. Kap. 5.2) wird nun durchgeführt.

**Abbildung 12.7-1: Änderung der LED's für die Fluoreszenzanregung des AOA's**



Die 450er LED (Toshiba) des AOA's wird durch eine NSPB (470 nm) ersetzt.

Die UB34180 (450 nm, Oshino) ist sehr lichtschwach. So liegt es nahe, die zwei LED's des AOA's mit einer Wellenlänge von 525 nm gegen die UB34180 mit 450 nm zu tauschen. Der Tausch der 450er LED des AOA's in der Originalbestückung gegen die UB34180 wurde notwendig, da Toshiba die Produktion dieser LED eingestellt hat. Zudem zeigt das Spektrum der „alten“ 450er einen stark asymmetrischen Abfall der Intensität mit einer Halbwertsbreite von 30 nm. Der Intensitätsabfall erfolgt nahezu linear zu kürzeren Wellenlängen, für die längeren Wellenlängen hingegen gemäß einer abfallenden e-Funktion.

Die 525er und die 590er LED bleiben unverändert. Die 610er LED hingegen wurde gegen die 625er LED ausgetauscht.

Durch eine geeignete Modifikation der LED-Ansteuerung konnte die Anzahl der anregenden UB34180 auf drei gesteigert werden (mit einem Strom von 60 mA im eingeschalteten

Betrieb). Die Beschaltung der als Stromquelle betriebenen Transistoren, die den Diodenstrom liefern, wurde für alle weiteren LED's ebenfalls überarbeitet. Als Resultat der Änderungen beträgt der Diodenstrom definierte 36 mA bei leitendem Transistor. In der Originalbeschaltung hing der Diodenstrom von der verwendeten LED ab, was sich nach einer nötigen Reparatur als sehr nachteilig erwies. Unterschiedliche Spannungsabfälle über den PN-Übergängen der LED's von verschiedenen Herstellern (z.B 1,2 Volt für die 630 nm LED, 4,1 Volt für die 470 nm LED) im leitenden Betrieb wirken sich nun nicht mehr auf den Diodenstrom aus.

Die neue Version des AOA  
mit der geänderten LED-Bestückung erhält den  
Namen „DOA“

## 12.8. Trennung der Diatomeen und Dinoflagellaten mit dem DOA

Nach den abgeschlossenen Umbauarbeiten am AOA (jetzt als DOA bezeichnet) wird die Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe *in vivo* getestet. Von zwei Batchkulturen der Algen *Thalassiosira rotula* (Diatomee) und *Prorocentrum micans* (Dinoflagellat) wird der Chl.a-Gehalt pro Liter der Ausgangskulturen bestimmt. Anschließend werden die diskreten spektralen Fingerprints der beiden Spezies ermittelt.

### 12.8.1. Die Ausgangskulturen

Die Algen liegen in einer Batchkultur vor und unterliegen einem Licht-Dunkel-Zyklus von 16 zu 8 Stunden. Während der Beleuchtungsphase beträgt die Lichtintensität im Inneren der Laborflaschen in dem Salzwassermedium, gemessen in der Mitte der Flasche,  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $4\pi$  Lichtsensor von Zemoko ( $\varnothing$  1 cm)). Die Temperatur wird konstant auf 18 °C gehalten (Kulturschrank WTB 240, Binder).



### 12.8.2. Bestimmung der Chl.a-Konzentration der Ausgangskulturen

Für die Normierung der Fingerprints der Diatomeen und der Dinoflagellaten auf 1 µg Chl.a pro Liter muss die Chl.a-Konzentration der Ausgangskulturen bestimmt werden.

Von den beiden Ausgangskulturen werden 15 ml bei einem Unterdruck von 100 mbar auf einen GF/F Filter (Whatmann, Ø 47 mm) filtriert. Nach dem Plazieren des Filters in einem Probenröhrchen, der Zugabe von Glaskugeln und 10 ml Azeton werden der Filter und die Algen in einer Zelmühle (Vibrogenzelmühle VI4, Bühler) fünf Minuten lang zerkleinert. Durch eine Zentrifuge (15 Minuten, 4000 UpM, 72,5 g) werden die Rückstände des Glasfiberfilters und der Algenzellen von den in Azeton gelösten Pigmenten getrennt. 3,5 ml des Azetons werden in eine Quarzglasküvette (Suprasil) abpipettiert.

Die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes erfolgt durch die Messung der Absorption bei vier diskreten Wellenlängen (750, 663, 647, 630 nm) nach der Methode von Jeffrey & Humphrey [1975]. Die Dreifachbestimmung an den Ausgangskulturen ergab:

**Tabelle 12.8-1: Chl.a-Konzentrationen der Ausgangskulturen**

Filtrierte Menge:	10,0	ml		
Küvettentiefe:	1,0	cm		
Azeton-Volumen:	10,0	ml		
<b>Algenspezies:</b>	<b><i>Prorocentrum micans</i></b>		<b><i>Thalassiosira rotula</i></b>	
<b>Probe 1</b>	114,9	µg/l	234,4	µg/l
<b>Probe 2</b>	117,7	µg/l	238,5	µg/l
<b>Probe 3</b>	117,7	µg/l	236,7	µg/l
<b>Mittelwert &amp; Stabw.</b>	<b>116,75 ± 1.0</b>	µg/l	<b>236,5 ± 2.6</b>	µg/l

Die Messung der Chl.a-Konzentrationen ist die Basis für die spätere Normierung der Fingerprints des DOA auf 1 µg Chl.a pro Liter.

### 12.8.3. Bestimmung der spektralen Fingerprints mit dem DOA

Für die Messung wird den Ausgangskulturen eine Probe entnommen und mit dem neuen DOA der Fingerprint bestimmt. Der durch die Methode nach Jeffrey & Humphrey [1975] ermittelte Chl.a-Gehalt wird zur Normierung der Fingerprints verwendet.

Aus jeweils zwei Bestimmungen je Ausgangskultur ergeben sich die folgenden Rohdaten der Fluoreszenz für den DOA:

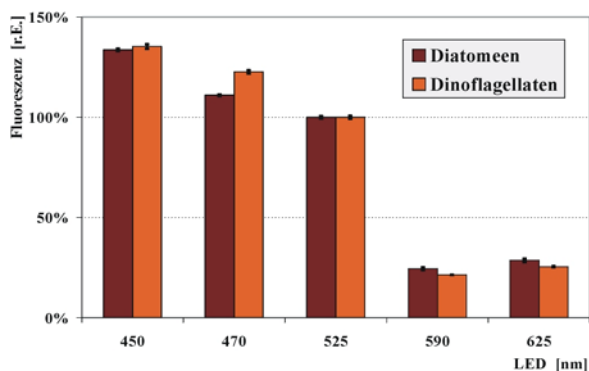
**Tabelle 12.8-2: Auf 1 µg/l Chl.a normierte Fingerprints für die Diatomeen und die Dinoflagellaten**

LED	Intensität der LED [ $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ]	Diatomeen	Dinoflagellaten
450 nm	$0,60 \pm 0,07$	$0,657 \pm 0,003$	$0,529 \pm 0,004$
470 nm	$4,92 \pm 0,06$	$4,474 \pm 0,016$	$3,925 \pm 0,027$
525 nm	$2,04 \pm 0,07$	$1,674 \pm 0,011$	$1,329 \pm 0,010$
590 nm	$1,95 \pm 0,07$	$0,391 \pm 0,011$	$0,272 \pm 0,000$
625 nm	$1,12 \pm 0,07$	$0,263 \pm 0,007$	$0,186 \pm 0,002$

#### 12.8.4. Die Fingerprints der Diatomeen und der Dinoflagellaten

Für einen direkten Vergleich mit den Untersuchungen der Vollspektren zur Unterscheidung der Diatomeen und der Dinoflagellaten werden die Fingerprints des DOA's aus Abbildung 12.1-1 auf die Rohdaten der 525er LED normiert und intensitätskorrigiert (Abbildung 12.8-1).

**Abbildung 12.8-1: Normierung auf die 525er LED und die Intensitäten der LED's (Tabelle 12.8-2)**



Diese Darstellung der Fingerprints des DOA's soll mit den aus den Vollspektren errechneten Fluoreszenzemissionen für die einzelnen LED's aus Abbildung 12.4-1 verglichen werden.

Die Tendenz der Fluoreszenzverhältnisse von Diatomeen und Dinoflagellaten für die einzelnen LED's stimmt in den beiden Abbildungen (Abbildung 12.4-1 und Abbildung 12.8-1) überein. Die hohe Fluoreszenzausbeute für die 450er LED sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die sehr geringe gemessene Intensität mit dem Lichtsensor (Zemoko) zurückzuführen. Dieser ist für den PAR-Bereich (photosynthetic active radiation) des Lichtes ausgelegt und soll für die Messung in dem Wellenlängenbereich von 400 – 700 nm anwendbar sein. Für kurze Wellenlängen wird die reale Intensität aber stark unterschätzt.

#### Anmerkung:

Die Messung der Lichtintensität mit einer Photodiode wäre für den kurzwelligen Wellenlängenbereich besser gewesen. Da aber im folgenden nur die relativen Unterschiede betrachtet werden, ist die Unterschätzung der Intensität der 450 nm LED durch den Lichtsensor für die weitere Diskussion nicht von Bedeutung.

Die relativen Unterschiede zwischen den beiden Algenklassen ergeben sich nach Gleichung 12-2 für die Vollspektren (Tabelle 12.5-1) und den DOA zu:

**Tabelle 12.8-3: Vergleich der relativen Unterschiede (LED-gewichtete Vollspektren und DOA)**

LED [nm]	450	470	525	590	625
	<b>Normiert auf LED (525 nm)</b>				
<b>Vollspektren</b>	12 %	25 %	0 %	-21 %	-34 %
<b>DOA</b>	1 %	10 %	0 %	-14 %	-12 %

Für die gewichteten Vollspektren (Kap. 12.5) und den DOA zeigen sich recht gravierende Abweichungen für den relativen Unterschied zwischen den Diatomeen und den Dinoflagellaten. Die Unterscheidungsmöglichkeit dieser beiden Klassen ist mit dem DOA schlechter als die Vorbetrachtung der Vollspektren vermuten lassen würde. Die Verringerung des prozentualen Unterschiedes macht sich bei allen verwendeten LED's bemerkbar. Die Unterscheidbarkeit der beiden Algenklassen ist mit dem DOA nicht so deutlich ausgeprägt, die Trennung der beiden Algenklassen deshalb erschwert.

## 12.9. Langzeitmessung an einer Diatomeen – Dinoflagellatenmischung

Nach der Bestimmung der spektralen Fingerprints für die Algenklassen der Diatomeen und der Dinoflagellaten wird eine Mischung der beiden Algen erzeugt und die Algengruppenzuordnung des DOA's überprüft.

### 12.9.1. Erzeugung einer Algenmischung

Von den beiden Ausgangskulturen wird eine Mischung erstellt, die aus 3 Teilen der Diatomeenkultur und 4 Teilen der Dinoflagellatenkultur besteht. Der DOA ermittelt für die beiden Ausgangskulturen den Chl.a-Gehalt und die Anteile der Algenklassen in der Mischung.

**Tabelle 12.9-1: Chl.a-Gehalt der Ausgangskulturen und der Mischung**

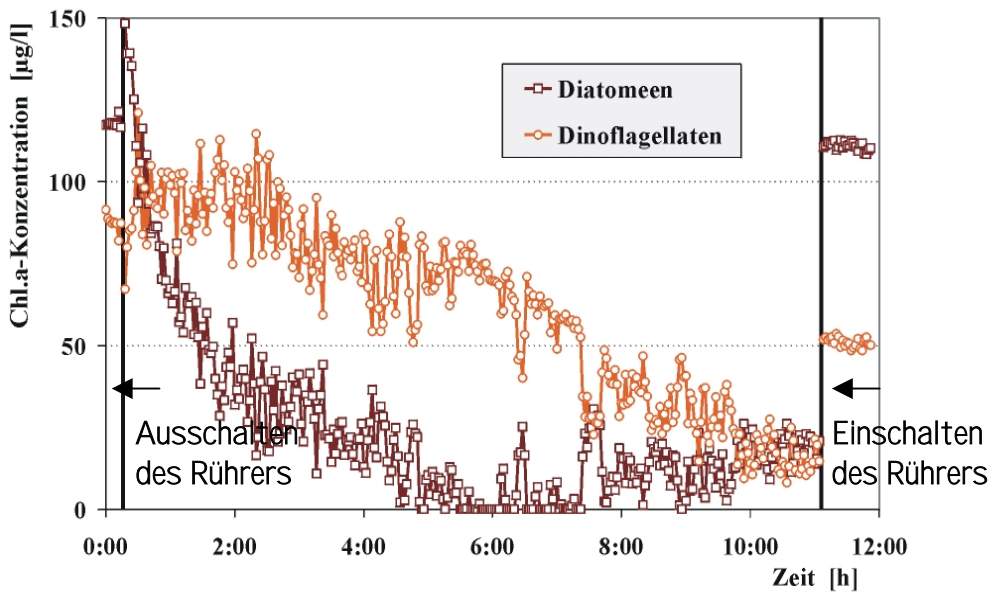
	Chl.a-Gehalt der Ausgangskulturen	Anteile in der Mischung	Berechneter Chl.a-Gehalt der Mischung	Gemessener Chl.a-Gehalt der Mischung	Prozentuale Abweichung
	[µg/l]	Teile	[µg/l]	[µg/l]	[%]
<b>Diatomeen</b>	287,3	3	<b>123,1</b>	<b>117,6</b>	4,7 %
<b>Dinoflagellaten</b>	146,0	4	<b>83,4</b>	<b>88,4</b>	5,7 %

Der Unterschied zwischen der aus den zusammengemischten Teilen der Ausgangskulturen erwarteten Chl.a-Konzentration für die beiden Algen und dem vom DOA zugeordneten Gehalt ist kleiner als 6 %. Die Trennung beider Algenklassen ist also durch die neue Auswahl der Anregungsleuchtdioden mit dem DOA möglich.

### 12.9.2. Langzeitmessung an der Diatomeen – Dinoflagellaten Mischung

Die Algenmischung verbleibt in der Küvette und wird über einen Zeitraum von 12 Stunden beobachtet. Alle 2 Minuten führt der DOA eine Messung durch. Um die Lichtbedingungen für die Algen möglichst wenig zu ändern, wird die Probe in der Messküvette mit einer Lichtintensität von  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Lichtsensor von Zemoko,  $\varnothing 1 \text{ cm}$ ) konstant beleuchtet. Als Lichtquelle dienen sieben LED's mit einer Peakwellenlänge von 470 nm (NSPB, Nichia). Die Lichtintensität für die Algen bleibt während der Messung damit vergleichbar zur Anzucht (die Lichtqualität (blau anstatt weiß) ändert sich).

**Abbildung 12.9-1: Langzeitmessung an der Diatomeen – Dinoflagellaten Mischung**



Das Rühren dient dazu, ein Absinken der Algen zu verhindern. Nach der ersten Markierung ist der Rührer zum Durchmischen der Probe abgeschaltet. Es zeigt sich ein sofortiger Anstieg in dem Chl.a-Gehalt, der den Diatomeen zugeordnet ist. Parallel dazu wird ein geringerer Gehalt für die Dinoflagellaten detektiert. Für alle nachfolgenden Messungen fällt die gemessene

Konzentration für die Diatomeen exponentiell über sieben Stunden ab, während der Gehalt der Dinoflagellaten näherungsweise linear fällt. Nach sieben Stunden steigt der Gehalt der Diatomeen wieder leicht, aber nicht signifikant, an. Zur Kontrolle wird am Ende der Messung der Rührer wieder eingeschaltet (rechte Markierung in der Grafik). Der Chl.a-Gehalt der Diatomeen erreicht nahezu den Wert zu Beginn der Messung (links der ersten Markierung). Der Chl.a-Gehalt der Dinoflagellaten hingegen ist durch das Absterben der Zellen auf 60 % der ursprünglichen Konzentration gesunken.

### 12.9.3. Diskussion der Ergebnisse der Langzeitmessung

Die Langzeitmessung zeigt für die ungerührte Probe eine deutliche Entwicklung der Algenzusammensetzung in der Messkammer. Der zur Chl.a-Fluoreszenz durch die LED's angeregte Bereich befindet sich auf einer Höhe von knapp 3 Zentimetern über dem Küvettenboden. Nach dem Abschalten des Rührers sinken die Diatomeen aus dem Bereich der Anregung (vgl. Kap. 8.7.2). Die Dinoflagellaten hingegen sind durch ihre Begeißelung in der Lage, sich selbstständig zu bewegen. Diese Fähigkeit lässt sie länger in dem Anregungsbereich verweilen.

Das Durchmischen der Probe ist deshalb absolut notwendig. In Kapitel 8.7.2 wurde schon das Absinken der Diatomeen untersucht und findet hier seine Bestätigung. Im Vergleich der Algenspezies *Thalassiosira punctigera* (Kap. 8.7.2) und *Thalassiosira rotula* zeigt sich ein langsameres Absinken für die etwa 10 mal kleinere Alge *Thalassiosira rotula*.

Die Absinkgeschwindigkeit der Algen ist nicht nur von der Algenklasse, sondern zusätzlich auch von der Spezies abhängig, wobei neben der Begeißelung auch das spezifische Gewicht und die Größe der Zellen eine Rolle spielt.

## 12.10. Fazit des Umbaus vom AOA zum DOA

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen eindrucksvoll, dass durch eine Änderung der Auswahl der zur Anregung verwendeten diskreten Wellenlängen eine Subunterteilung der braunen spektralen Algenklasse möglich ist. Es wurde der Nachweis erbracht, dass sich die Algenklassen der Diatomeen und der Dinoflagellaten mit dem DOA unterscheiden lassen.

Dabei bleibt nach der Analyse der Vollspektren (Abbildung 12.6-1 A bis D) die Unterscheidbarkeit des Phytoplanktons der nach Beutler [1998] eingeführten, weiteren spektralen Algengruppen (grüne, blaue und gemischte spektrale Gruppe) auch weiterhin erhalten.

Die Möglichkeit der Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe hat für den marinen Bereich eine enorme Bedeutung. Die im marinen Bereich in einer nachweisbaren Chl.a-Konzentration vorhandenen Phytoplanktonklassen beschränken sich für die Unterscheidung anhand diskreter Anregungsspektren im wesentlichen auf die braune und gemischte spektrale Algengruppe.

Die durch die Modifikation des AOA's nun mögliche Diatomeen-Dinoflagellaten Trennung innerhalb der braunen spektralen Gruppe verbessert zum einen die Chl.a-Gesamthaltsbestimmung, zum anderen ermöglicht sie überhaupt erst die selektive Erkennung der Algenklasse der Dinoflagellaten.

Die immense Bedeutung der Dinoflagellatenerkennung beruht auf dem Auftreten von toxischen Arten dieser Algenklasse im Bereich der Nordsee [De Jong et al. 1999]. Eine frühzeitige Erkennung einer Dinoflagellatenblüte durch eine automatisierte Überwachung der biologischen Wasserparameter, wie es mit der BlueBox angestrebt wird, könnte zu einer frühzeitigen Warnung führen. Kostenintensivere spezifizierte Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Dinoflagellatenart (toxisch oder nicht) könnten dann zielgerichteter eingesetzt werden.

## 13. Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit den in der Einleitung dargelegten Problemen stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit Untersuchungen für die Erkennung von Algengruppen und deren photosynthetischer Aktivität im marinen Bereich. Das Ziel ist die Einbringung eines möglichst einfach einsetzbaren Sensorsystems zur Messung der biologischen Parameter des marinen Wasserkörpers u.a. in das Projekt BlueBox [Kapitel 2]. Ein mögliches Fernziel ist ein Beitrag zur genaueren Biomassebestimmung in Hinblick auf globale Bilanzierungen (Kohlenstoff-assimilation, usw.).

Der AOA der Firma Moldaenke [Beutler 1998] war das erste Online-Gerät, das über die technische Möglichkeit der Unterscheidung von Algengruppen mit Hilfe von Chlorophyll-Fluoreszenz-Anregungsspektren verfügte [Kapitel 5]. Bis zum Beginn dieser Arbeit wurde diese Art von Messgerät ausschließlich als Küvettengerät für zeitlich sehr begrenzte Messungen an Wasserproben von limnischen Gewässern eingesetzt.

Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung der Eignung der fluorometrischen Algengruppenerkennung für marine Algenspezies [Kapitel 3 & 5] und ihre Vergleichbarkeit mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden [Kapitel 7, 8, 11]. Die ersten Testläufe wurden auf dem Workshop PriPro98 [Ruser et al. 1999] vorgenommen. Als Ergebnis dieser Untersuchungen ergab sich eine qualitative Vergleichbarkeit der fluorometrischen Algenerkennung und der nasschemischen Methode der HPLC-Analyse [Kapitel 5.6]. Es zeigte sich aber auch, dass die für limnische Algen voreingestellten spektralen Fingerprints des AOA's sich nicht auf die Salzwasserspezies [Kapitel 3], die auf dem PriPro98 verwendet wurden, übertragen ließen.

Die Frage der Zuverlässigkeit von Fingerprints erhielt durch die Messung der Anregungsspektren der Chl.a-Fluoreszenz von 23 marinen Algenarten eine positive Antwort. Für den PAR-Bereich des Lichtes konnte die Möglichkeit der Einteilung der marinen Algen in spektrale Klassen [Kapitel 5] bestätigt werden. Diese Möglichkeit der Trennung deckt sich mit den Untersuchungen von Beutler [1998] an limnischen Algenarten. Das über alle untersuchten marinen Algenarten einer Klasse gemittelte Spektrum zeigte in den meisten Fällen eine sehr erfreulich geringe Standardabweichung [Kapitel 5.5]. Dieser Befund erlaubt die Verwendung einer einzigen Algenart aus einer Algenklasse, um den spektralen Fingerprint der nach Beutler [1998] eingeführten Algengruppen zu ermitteln.

Als ein besonderes Problem der marinen Algen erwies sich ein geringer spektraler Unterschied zwischen den Fingerprints der grünen und der braunen spektralen Algengruppe [Kapitel 6.2], der kleiner ist als der an limnischem Phytoplankton in den Untersuchungen von Beutler [1998]. Die Ähnlichkeit dieser beiden spektralen Gruppen erforderte die Untersuchung des Einflusses eines messsystembedingten Rauschens der Messwerterfassung auf die Unterscheidbarkeit der Algengruppen [Kapitel 6].

Durch die Erzeugung von künstlich verrauschten Messdaten konnte der Einfluss von Messfehlern auf die Algengruppenzuordnung des AOA's näher untersucht werden. Laboruntersuchungen ergaben eine Abschätzung für das absolute [Kapitel 6.4.2] und das relative Rauschen [Kapitel 6.4.1] der Messwerterfassung des AOA's. Die absolute, systembedingte Auflösungsgrenze des AOA's für eine Einfachbestimmung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppen in einer Wasserprobe ergab sich zu 0,12 µg Chl.a pro Liter. [Kapitel 6.4.4].

Die *in situ* Messung diente der Sichtung des zu erwartenden Phytoplanktons und dessen Chl.a-Konzentration auf der Strecke Büsum – Helgoland [Kapitel 7]. Die Algengruppen-erkennung des AOA's identifizierte die braune spektrale Algengruppe als das den Wasserkörper dominierende Phytoplankton. Mit dem FCM und der HPLC-Analyse konnte diese Zuordnung des AOA's bestätigt werden [Kapitel 7.3]. Es zeigte sich aber die Notwendigkeit einer linearen Anpassung der Chl.a-Kalibrierung des braunen spektralen Fingerprints auf die Chl.a-Ergebnisse der HPLC-Analyse [Kapitel 7.4].

Die ermittelte geringe Chl.a-Konzentration des AOA's für die grüne spektrale Gruppe konnte nicht verifiziert werden. Es stellte sich die grundsätzliche Frage der Vergleichbarkeit der Messsysteme in bezug auf die ermittelten Chl.a-Konzentrationen und die Algengruppen-erkennung [Kapitel 7 & 8] und führte zu den Untersuchungen der Messsystem-Auflösungsgrenzen [Kapitel 11].

Die Messungen auf der zweiten Ausfahrt dienten dazu, die gewonnenen Erkenntnisse und die vorgenommenen Anpassungen der Chl.a-Bestimmung durch den AOA und das BackScat der CTD-Sonde zu überprüfen [Kapitel 8]. Der Feststellung der Dominanz der braunen spektralen Algengruppe durch den AOA erfolgte auch auf dieser Ausfahrt.

Auf beiden Ausfahrten zeigte sich größtenteils eine schlechte Übereinstimmung zwischen den realen Fluoreszenzmesswerten und der Hypothese des Normkurvenfits zur Algengruppen-differenzierung des AOA's [Kapitel 7 & 8]. Eine erhöhte Fluoreszenz bei der Anregung mit der blauen LED (450 nm), abgeschwächt auch bei der grünen LED (525 nm), hat einen störenden



Einfluss auf die Algengruppenzuordnung [Kapitel 7.5 & Kapitel 8.8]. Dass sie von dem Fit nur ungenügend angenähert werden kann, ist ein Hinweis auf das Auftreten einer neuen Komponente [Kapitel 9].

Mögliche Quellen eines solchen Einflusses auf die Algengruppenerkennung wurden untersucht. Die aus dem limnischen Bereich bekannten Gelbstoffe Huminsäure und Ligninsulfonsäure konnten als unbekannter Fluoreszenzstoff ausgeschlossen werden [Kapitel 9.5]. Als mögliche Quelle wurde der Einfluss von Phaeophytin-a, einem Derivat des Chlorophyll-*a*, auf die Algengruppenerkennung des AOA's untersucht [Kapitel 9.6] und als Fingerprint mit in die Algengruppenerkennung einbezogen. Es zeigte sich durch diesen neuen Fingerprint eine wesentliche Verbesserung der Güte des Fit's für die Algengruppenzuordnung bezüglich der *in situ* Daten der beiden Ausfahrten.

Die Zuordnung des nicht normierten Anteils des Phaeophytin-a Fingerprints durch die spektrale Gruppenerkennung des AOA's für die Wasserproben der zweiten Ausfahrt liess durch den Vergleich mit den HPLC-Ergebnissen für den Phaeophytin-a Gehalt ( $\mu\text{g/l}$ ) eine Kalibrierung des Fingerprints zu [Kapitel 9.6.5].

Die Diskrepanz in der Höhe der ermittelten Chl.a-Konzentration der HPLC-Analyse, des BackScat und des AOA's für die Wasserproben der zweiten Ausfahrt [Kapitel 8.7] führte zu einer grundlegenden Untersuchung des Einflusses der zur Automatisierung der Wasserentnahme eingesetzten Pumpe auf das Phytoplankton. In einer Vergleichsbestimmung konnte anhand der Untersuchung mit einem inversen Mikroskop, einem FCM und der Algengruppenerkennung mit dem AOA die artenspezifische Zerstörung von Algenzellen durch den Einsatz einer Pumpe dokumentiert werden [Kapitel 10]. Die Zerstörung der Algenzellen bringt eine Verschlechterung der Güte des Fit's des AOA's mit sich [Kapitel 10.2].

Für die Erfassung der biologischen Parameter eines Wasserkörpers im Dauerbetrieb, wie im BlueBox Projekt angestrebt, ist die Wasserentnahme über die Pumpe für den entsprechenden biologischen Sensor zu überdenken [Kapitel 10.4 & 5].

Um die Frage der prinzipiellen Vergleichbarkeit der Algengruppenerkennung verschiedener Messsysteme zu klären, wurde ein an den PriPro98 [Ruser et al. 1999] angelehnter Versuch durchgeführt. Für die Bestimmung des Chl.a-Gehaltes der Algengruppenerkennung konnte festgestellt werden, dass die besten Resultate bei der Verwendung der Fluoreszenzanregungsspektren, der HPLC-Analyse und des AOA's erzielt wurden [Kapitel 11]. Aber selbst für die Geräte mit der besten Erkennung unter Laborbedingungen ergab sich eine

bis zu 20 % Prozent große Abweichung vom theoretisch zu erwartenden Chl.a-Gesamtgehalt. Für die Chl.a-Bestimmung der einzelnen Algengruppen belief sich dieser Fehler auf bis zu 30 % [Kapitel 11.6].

Diese Untersuchung wurde durch eine Verdünnungsreihe vervollständigt, um durch die Ermittlung der Nachweisgrenzen der einzelnen Messsysteme die am besten geeigneten Referenzsysteme für die Verifizierung der Algengruppenerkennung des AOA's zu ermitteln [Kapitel 11.7]. Es wurde eine Abschätzung für die minimale Menge an zu filtrierendem Probenwasser für die HPLC-Analyse für drei Algenklassen ermittelt, um diese für eine Konzentration von 1 µg Chl.a pro Liter noch nachweisen zu können [Kapitel 11.7.2].

Für den untersuchten Bereich der Nordsee zeigte sich im Gegensatz zu limnischen Gewässern mit Algen aller vier spektralen Klassen eine ausgeprägte Dominanz der braunen spektralen Gruppe. Während die gemischte spektrale Gruppe noch eine gewisse Rolle spielt, sind die Anteile an Algen der grünen und der blauen spektralen Gruppe an dem Gesamtchlorophyll-*a* Gehalt als verschwindend gering anzusehen [Kapitel 7 & 8]. Die Möglichkeit der Algendifferenzierung des AOA's kommt somit nicht zum Tragen, aber die spektrale Anpassung sorgt für eine verbesserte Chl.a-Gehaltserfassung im marinen Bereich [Kapitel 4.5 & 9.6].

Aufgrund der in dieser Arbeit festgestellten Dominanz der braunen spektralen Gruppe wurde die Möglichkeit einer Subunterteilung dieser Gruppe untersucht [Kapitel 12]. Anhand der Vollspektren wurde der spektrale Unterschied von zwei Algenklassen, die der braunen spektralen Gruppe angehören, erörtert [Kapitel 12.4]. Durch die theoretische Betrachtung der Unterschiede konnten die geeignetsten Lumineszenzdioden für die Klassen der Diatomeen und der Dinoflagellaten ermittelt werden [Kapitel 12.6]. Die Änderung der diskreten Anregungswellenlängen des AOA's für eine Trennung der beiden „braunen“ Algenklassen ging mit einer Verbesserung der LED-Ansteuerung einher [Kapitel 12.7].

In einem Laborversuch konnte schließlich die Trennung zwischen den Algenklassen der Diatomeen und den Dinoflagellaten anhand diskreter Anregungsspektren in überzeugender Weise bestätigt [Kapitel 12.9] und ein abschließendes Fazit des Umbaus des AOA's zum DOA mit seinen marinen Einsatzmöglichkeiten gezogen werden [Kapitel 12.10].

## 14. Ausblick

Für den zukünftigen Einsatz des Algae Online Analysers im marinen Bereich konnte durch die Untersuchungen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Erfassung des Chlorophyll-*a* Gehaltes von Wasserproben des marinen Bereiches sich deutlich von der an limnischen Gewässern unterscheidet. Die fluorometrische Erfassung des Chl.*a* Gehaltes von Phytoplankton im marinen Wasserkörper ist mit der üblichen Standardmethode der HPLC-Analyse unter der Berücksichtigung speziell für den marinen Bereich notwendiger Anpassungen vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit hat sich aber auch gezeigt, dass es eine große Anzahl von Einflüssen auf die spektrale Erkennung von Algengruppen gibt. Die Tatsache, dass ein Fluoreszenzstoff im Wasser nachgewiesen wurde, der bei einer blaugrünen Anregung die Erfassung der Chl.*a* Fluoreszenz für einzelne diskrete Anregungsfarben stört und sich deshalb auf die Algengruppenerkennung auswirkt, lässt sich durch die Verwendung eines entsprechenden Fluoreszenzstoff-Fingerprints kompensieren.

Der AOA (und meines Wissens nach auch kein anderes Messsystem zur Algengruppenerkennung) liefert selbst keine Bewertung des Normkurvenfit's. Der Anwender muss sich selbstständig (durch eine Offline Berechnung) von der ausreichenden Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen und der Hypothese des Fit's vergewissern. Die Implementierung einer Aussage zu der Güte des Fit's für die Algengruppenerkennung ist für den Benutzer von äußerster Wichtigkeit, gerade in bezug auf *in situ* Untersuchungen mit nicht definierten Umgebungsbedingungen und unbekanntem Fremdeinflüssen. Eine wissenschaftliche Betreuung ist deshalb zur Analyse der Messdaten und deren Interpretation unumgänglich.

Eine Verbesserung der Zuordnung der Algengruppen ist durch eine Einbeziehung der Streuung für jede einzelne Komponente der Fingerprints zu erwarten. Wünschenswert wäre auch der Aufbau einer Fingerprint-Datenbank für die einzelnen spektralen Algengruppen in verschiedenen Stadien der Nährstoff-Limitierung (Si, P, N) und für unterschiedliche Vorlichtbedingungen. Mit einem automatisierten Fitalgorithmus könnten dann die besten Kombinationen an Fingerprints ermittelt werden, die möglicherweise in der Verbindung mit der Erfassung der photosynthetischen Aktivität der einzelnen Algengruppen Aussagen über die zukünftige Entwicklung der Phytoplanktonpopulation zulässt.

Der Langzeiteinsatz einer automatisierten Algengruppenerkennung über mehrere Jahre auf festen Schiffsrouten ließe neue Erkenntnisse der jahreszeitlichen Entwicklung der Phytoplanktonzusammensetzung zu. Die Subunterteilung der braunen spektralen Gruppe könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Der Wechsel von der (ersten) Diatomeen-Algenblüte zu einer Blüte von Flagellaten würde sich mit der automatisierten fluorometrischen Algengruppenerkennung zeitlich und räumlich mit einer hohen Auflösung verfolgen lassen.

Für gezielte Überwachungen kritischer Seegebiete könnte sich durch die Verbindung von satellitengestützten „Remote Sensing“-Systemen und der direkten fluorometrischen Bestimmung der Algengruppen des Wasserkörpers zukünftig eine großräumige Überwachung realisieren lassen. Ein Austausch der Daten wäre dabei für beide Methoden für die Interkalibrierung der Messsysteme von großem Vorteil und ermöglicht in vielleicht nicht allzu ferner Zukunft erste Modelle zur Phytoplanktonentwicklung der Nordsee.

## 15. Literaturverzeichnis

- Allen J.F. (1992):** How does protein-phosphorylation regulate photosynthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* 54, Page 999 – 1021.
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B. (1993):** Photoinhibition of Photosystem II, Inactivation, protein damage and turnover. *Biochem. Biophys. Acta* 1143, Page 113 – 134.
- Baba K., Itho S., Hastings G., Hoshina S. (1996):** Photoinhibition of Photosystem I electron transfer activity in isolated photosystem I preparations with different chlorophyll contents. *Photosynth. Res.* 47, Page 121 – 130.
- Baker N.R., Bowyer J.R. (1994):** Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Barlow R.G., Cummings D.G., Gibb S.W. (1997):** Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using the reverse phase C-8 HPLC. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 161, Page 303 – 307.
- Bendixen R. (1998):** Meßtechnische Untersuchungen zur stickstoffabhängigen Lichtstreibresistenz des photosynthetischen Apparates. Shaker Verlag, Aachen 1998, Diss. Univ. Kiel, 165 Seiten.
- Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Lüring C., Meyerhöfer M., Hansen U.P., Dau H. (2001):** A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research*, (submitted).
- Beutler M. (1998):** Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Algengruppen mit Hilfe computergestützter Auswertung spektralaufgelöster Fluoreszenzanregungsspektren. Dipl. Univ. Kiel, 100 Seiten.
- Bronstein I.N., Semendjajew K.A. (1985):** Taschenbuch der Mathematik, Frankfurt/Main, 840 Seiten.
- Buchwald K. (1990):** Nordsee: Ein Lebensraum ohne Zukunft?. Verlag Die Werkstatt, Göttingen, 552 Seiten.

- Burkholder J.M. (2000):** Eine „Gifthalge“ mit vielen Tarnkappen. *Spektrum der Wissenschaft*, Seite 66 – 73.
- Buschmann C., Grumbach K. (1985):** *Physiologie der Photosynthese*. Springer, Berlin, 245 Seiten.
- Dau H. (1998):** Chlorophyll fluorescence measurements for assessment of primary production in aquatic ecosystems - the basics. *Rostock. Meeresbiol. Beitr.* 6: Seite 23 – 40.
- Dau H. (1994a):** Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. Invited review. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 60, Page 1 – 23.
- Dau H. (1994b):** Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 26, Page 3 – 28.
- Dau H., Canaani O. (1990):** The involvement of LHC 2 phosphorylation in the adaption of higher plants to changing light intensities and some results on the regulation of LHC 2 phosphorylation in vivo. In: *Current Research in Photosynthesis*, Baltscheffsky M. (ed.), Vol. IV, Page 325-328.
- Dau H., Hansen U.P. (1988):** The involvement of spillover changes in State1-State2 transitions in intact leaves at low light intensities. *Biochim. Biophys. Acta* 934, Page 156 – 159.
- De Jong F., Bakker J., Berkel v.C, Dahl K., Dankers N.M.J.A., Gätje C., Marencic H., Potel P. (1999):** 1999 Wadden Sea Quality Status Report. Wadden Sea Ecosystem No. 9, Common Wadden Sea Secretariat, Trilateral Monitoring and Assessment Group, Quality Status Report Group, Wilhelmshaven, Germany, 259 Pages.
- Drebes G. (1974):** *Marines Phytoplankton*. Thieme, Stuttgart.
- Falkowski PG, Kolber Z, (1995):** Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, Page 341 – 355.

- Geider R.J., MacIntyre H.L., Kana T.M. (1997):** Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of balanced growth rate and the chlorophyll *a* : carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 148, Page 187 – 200.
- Genty B., Briantais J.M, Baker N.R. (1989):** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA* 990, Page 87 – 92.
- Giullard R.R.L Ryther J.H. (1962):** Studies of marine planctonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8, Page 229 – 239.
- Goericke R., Montoya, J.P. (1998):** Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field – variations of pigment ratios under nutrient- and light-limited growth. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 169, Page 97 – 112.
- Goodwin, T.W. (1976):** Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press London, 2. edition.
- Grzymiski J., Johnson G., Sakshaug E. (1997):** The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red, and green macroalgae. *J. Phycol.* 33. Page 408 – 414.
- Hansen U.P., Dau H., Brüning B., Fritsch T., Moldaenke C (1991):** Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase chlorophyll fluorescence as induced by actinic PS-II light, PS-I light and changes in CO<sub>2</sub>-concentration. *Photosynth Res* 28, Page 119 – 130.
- Harrison P.J., Waters R.E., F.J.R., Taylor F.J.R. (1980):** A broad spectrum artificial medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16, Page 28 – 35.
- Hilton J., Rigg E., Jarworski G. (1989):** Algal identification using in vivo fluorescence spectra. *Journal of Plankton Research*, Vol. 11, No. 1, Page 65 – 74 .
- Hintze R. (2000):** Grundlagen der Anwendbarkeit der Chlorophyll-Fluoreszenz-Analyse mit linearen und nichtlinearen Ansätzen. *Berichte Forschungs- und Technologiezentrum Westküste d. Univ. Kiel*, Nr. 22, Diss. Univ. Kiel, 202 Seiten.

Hintze R., Popp P., Reckermann M., Ruser A., Köhler J., Ockenfeld K., Vanselow K.H. (1999): Experiments for continuous chlorophyll fluorescence measurements in a mesocosm. In: Ergebnisse des 2. Workshops „Primärproduktionsbestimmung in aquatischen Systemen“ (Hartig P., Vanselow K.H., Hrsg.). Berichte Forschungs- und Technologiezentrum Westküste d. Univ. Kiel, Nr. 19, Seite 11 – 25.

Hintze R. (1995): Meßtechnische Erfassung der Herbizidwirkung auf die Chlorophyll-Fluoreszenz und systemtheoretische Analyse der Prozesse im Photosystem II. Dipl. Univ. Kiel, 101 Seiten.

Hoek C.v.d. (1993): Algen. 3.Auflage, Thieme, Stuttgart, 481 Seiten.

Hollinderbäumer R., Ebbert V., Godde D. (1997): Inhibition of CO<sub>2</sub>-fixation and its effect on the activity of Photosystem II, on D1-protein synthesis and phosphorylation. Photosynth. Res. 52, Page 105 – 116.

Horton P.; Ruban A.V.; Walters R.G. (1996): Regulation of light harvesting in green plants. Annual-Review-of-Plant-Physiology-and-Plant-Molecular-Biology. 47: Page 655-684; 131 ref.

Jeffrey S.W (1997): Application of pigment methods to oceanography. In: Phytoplankton pigments in oceanography: Guideline to modern methods. Monographs on Oceanographic Methodology. SCOR/UNESCO, Page 127 – 166.

Jeffrey S.W (1997): Application of pigment methods to oceanography. In: Phytoplankton pigments in oceanography. In: Phytoplankton pigments in oceanography (Jeffrey et. al., ed.) UNESCO Publishing, Paris, Page 127 – 166.

Jeffrey S.W., Mantoura, R.F.C., Wright S.W. (1997): Phytoplankton pigments in oceanography. UNESCO Publishing. Paris, 661 Pages.

Jeffrey S.W., Vesk, M. (1997). Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: Phytoplankton pigments in oceanography (Jeffrey et. al., ed.) UNESCO Publishing, Paris, Page 37 – 84.



- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. (1975):** New spectrometric equations for the determining chlorophylls a, b, c1, c2 in algae, phytoplankton and higher plants. *Biochem. Physiol. Planz. B.P.P.*, 167, Page 191 – 194.
- Johnson G., Sakshaug E. (1996):** Light Harvesting in bloom-forming marine phytoplankton: species-specificity and photoacclimation. *Sci. Mar.*, 60 (Supl. 1), Page 47 – 56.
- Johnson G., Samset O., Granskog L., Sakshaug E. (1994):** In vivo absorption characteristics in 10 classes of bloom-forming phytoplankton: taxonomic characteristic responses to photoadaptation by means of discriminant and HPLC analysis. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 105, Page 149 – 157.
- Kautsky and Hirsch (1931):** Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964.
- Kolbowski J., Schreiber U. (1995):** Computer-controlled phytoplankton analyser based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer. Mathis P. (ed.), *Photosynthesis: From light to biosphere. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Intern. Conference on Photosynthesis*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands Vol. V: Page 825 – 828.
- Kooten O.van, Snel J.F.H. (1990):** The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, Page 147 – 150.
- Krause, G.H., Winter, K. (1996):** Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: A chlorophyll fluorescence study. *Botanica Acta* 109, Page 441 – 506.
- Krause, G.H., Virgo, A., Winter, K. (1995):** High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta* 197, Page 583 – 591.
- Krause G.H., Weis E. (1991):** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, Page 313 – 349.
- Kronfeld U. (1988):** Die optischen Eigenschaften der ozeanischen Schwebstoffe und ihre Bedeutung für die Fernerkundung von Phytoplankton. GKSS 88/E/40, Diss. Uni. Hamburg, Fachbereich Geowissenschaften, 153 Seiten.

- Largo D. B., Funtami K., Adachi M., Nishijima T. (1997):** Direct enumeration of bacteria from macroalgae by epifluorescence microscopy as applied to the fleshy red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria spp.* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 33, Page 554 – 557.
- Lawlor D.W. (1990):** Photosynthese: Stoffwechsel – Kontrolle – Physiologie. Thieme, Stuttgart, New York, 377 Pages.
- Lorenzen C.F. (1967):** Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12, Page 343 – 346.
- Lutz V.A., Satheyendranath S., Head E.J.H. (1996):** Absorption coefficient of phytoplankton: regional variations in the North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 135, Page 197 – 213.
- Mackey M.D., Mackey D.J., Higgins H.W., Wright S.W. (1996):** CHEMTAX – a program for estimate class abundance from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 144, Page 265 – 283.
- Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A. (1983):** The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analyt. Chim. Acta*, Vol. 155, Page 297 – 314.
- Meyer-Harms B., Bodungen B.v. (1997):** Taxon-specific ingestion rates of natural phytoplankton by calanoid copepods in an estuarine environment (Pomeranian Bight, Baltic Sea) determined by cell counts and HPLC analyses of marker pigments. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 153, Page 181 – 190 .
- Meyerhöfer M. (1994):** Plankton pigments and their derivatives as biomarkers for the description and assessment of phytoplankton succession and sedimentation in the North Atlantic. *Berichte aus dem Institut für Meereskunde, Kiel*, Vol. 251, Diss. Univ. Kiel.
- Mohr H. , Schopfer P. (1992):** Pflanzenphysiologie, Springer Verlag ,4. Auflage, 659 Seiten.

- Moldaenke C., Vanselow K.H., Hansen, U.P. (1995):** The 1-Hz fluorometer: A new approach to fast and sensitive long-term studies of active chlorophyll and environmental influences. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 49, Seite 785-796.
- Nilawati J., Greenberg B.M., Smith R.E.H. (1997):** Influence of ultraviolet radiation on growth and photosynthesis of two cold ocean diatoms. *J. Phycol.* 33, Page 215 – 224.
- Park Y-I., Chow W.S., Anderson J.M. (1995):** The quantum yield of photoinactivation of photosystem II in pea leaves is greater at low than high photon exposure. *Plant Cell Physiol.* 36, Page 1163 – 1167.
- Plieth C., Sattelmacher B., Hansen U.P. (1998):** Light induced  $Ca^{2+}$ -transients in green plants II: The effect on the  $K^+$  channel as studied by a kinetic analysis in *Chara corallina*. *Planta* 207, Page 52 – 59.
- Porra R.J., Pfündel E.E., Engel, N. (1997):** Metabolism and function of photosynthetic pigments. In: *Phytoplankton pigments in oceanography* (Jeffrey et. al., eds.) UNESCO Publishing, Paris, Page 85 – 126.
- Press W.H. (1989):** Numerical Recipes in Pascal. Univ. Press, Cambridge.
- Price, N.M., Thompson P.A., Harrison P.J. (1987):** Selenium: An essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 23, Page 1 – 9.
- Raab A. (1992):** CAN-Das Controller Area Network. *Elektor* 6/92, Seite 20-22.
- Rademaker M., Reckermann M., Tillmann U., Tillmann-Mayer A., Colijn F., Zevenboom W., Houpt P. (1998):** *Fibrocapsa japonica* and *Heterosigma akashiwo*. New observations. *Harmful Algae News*, an IOC Newsletter on toxic algae and algae blooms, 17, Page 8 – 10.
- Reckermann M. (2000):** Flow sorting in aquatic ecology. In *Aquatic flow cytometry: Achievements and Prospects*, Reckermann M. and Colijn F. (eds.), *SCI. MAR.* 64 (2): Page 235 – 246.

- Ruser A., Vanselow K.H. (1999): Automatische Algengruppenerkennung mit fluorometrischen Meßmethoden. Mitteilung der deutschen Gesellschaft für Meeresforschung, Nr. 3/99, Seite 14 – 15.
- Ruser A., Popp P., Kolbowski J., Reckermann M., Feuerpfeil P., Egge B., Reineke C., Vanselow K.H. (1999): Comparison of different measurement systems based on the analysis of chlorophyll-fluorescence for algae-group detection and determination of the chlorophyll-a concentration. In: Ergebnisse des 2. Workshops „Primärproduktionsbestimmung in aquatischen Systemen“ (Hartig P., Vanselow K.H., Verf.). Berichte Forschungs- und Technologiezentrum Westküste d. Univ. Kiel, Nr. 19, Seite 27 – 38.
- Ruser A. (1992): Entwurf und Erprobung eines schnellen digitalen Korrelators für systemtheoretische Untersuchungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei geringen Frequenzunterschieden zwischen Messlicht und aktinischem Licht. Dipl. Univ. Kiel, 117 Seiten.
- Sagert S., Forster R.M., Feuerpfeil P., Schubert H. (1997): Daily course of photosynthesis and photoinhibition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta) from different shore levels. Eur. J. Phycol. 32, Page 363 – 371.
- Schlüter L., Møhlenberg F., Havskum H., Larsen, S. (2000): The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment / chlorophyll *a* ratios. Marine Ecology Progress Series, Vol. 192, Page 49 – 63.
- Schreiber, U. (1994): New emitter-Detector-Cuvette assembly for measuring modulated chlorophyll fluorescence of high diluted suspensions in conjunction with the standard PAM fluorometer. Z. Naturforsch. 49C, Page 646 - 656.
- Schreiber U., Schliwa U. and Bilger W. (1986): Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10, Page 51 – 62.
- Schubert H. (1992): A simple method for the identification of higher taxa of picoplankton in water samples. J. of Plankton Research, Vol. 14, No. 9, Page 1343 – 1347.

- Simon N., LeBot N., Marie D., Partensky F., Vaultot D. (1995):** Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, Page 2506 – 2513.
- Simon N., Barlow R.G., Marie D., Partensky F., Vaultot D. (1994):** Characterisation of oceanic photosynthetic picoeukaryotes by flow cytometry. *J. Phycol.* 30, Page 922 – 935.
- Stein J.R. (1973):** Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. 448 Pages, Cambridge, University Press.
- Sturm B. (1996):** Ein System zur automatischen und ferngesteuerten Probennahme von organischen Verunreinigungen in Küstengewässern: Untersuchungen zur Festphasenextraktion ausgewählter chlorierter und polycyclisch-aromatischer Kohlenwasserstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Huminstoffen. Externe Berichte, GKSS 96/E/23, Diss. Uni. Hannover, Fachbereich Chemie, 190 Seiten.
- Sundberg B., Campbell D., Palmqvist K. (1997):** Predicting CO<sub>2</sub> gain and photosynthetic light acclimation from fluorescence yield and quenching in cyano-lichens. *Planta* 201 Page 138 – 145.
- UNESCO (1966):** Determination of photosynthetic pigments. In: *Seawater.-Rep. SCOR/UNESCO Working Group 17. Monographs on oceanographic methodology.* UNESCO, Paris, Page 1 – 69.
- Utermöhl, H. (1958):** Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. Internat. Verein Limnol.* 9, Seite 1 – 38.
- Van Thor J.J., Mullineaux C.W., Matthijs H.C.P, Hellingwerf K.J. (1998):** Light harvesting and state transitions in Cyanobacteria. *Bot. Acta* 111: Page 430 – 443.
- Vanselow, K.H. (2000):** Algen als Biodetektoren. *Life science Technologien, Ein gemeinsames Supplement von LaborPraxis, PROCESS und UmweltMagazin.* Vogel Life Science Medien, Würzburg, Seite 32 – 33.
- Vanselow K.H., Hintze R., Hartig P., Colijn F. (1997):** Comparison of different fluorometers (PAM-, 1Hz-, BackScat- and Turner-) measuring either the chlorophyll concentration or

the photosynthetic activity. Deutsche Hydrographische Zeitschrift 49 (2/3), Seite 375 – 384.

**Wilhelm C., Volkmar P., Lohmann C., Becker A., Meyer M. (1995):** The HPLC-aided pigment analysis of phytoplankton cells as a powerful tool in water quality control. J. Water SRT-Aqua, Vol. 44, No. 3, Page 132 – 141.

**Wilhelm C., Rudolph I., Renner W. (1991):** A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor the structure and dynamics of the phytoplankton assemblages - A study from Lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany). Arch. Hydrobiol., Vol. 123, No. 1, Page 21 – 35.

**Willkomm R. (1987):** Rausch- und Impedanzmessungen zur Untersuchung von Kontrollmechanismen des Membrantransportes von *Characeen*. Dipl. Univ. Kiel.

**Wolf H. (1989):** Lineare Systeme und Netzwerke. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

**Wright S.W., Mantoura R.F.C. (1997):** Guidelines for collection and pigment analysis of field samples. In: Phytoplankton pigments in oceanography (Jeffrey et. al., ed.) UNESCO Publishing, Paris, Page 429 – 446.

**Wright S.W., Thomas D.P., Marchant H.J., Higgins H.W., Mackey M.D., Mackey D.J. (1996):** Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with the interpretations of pigment HPLC data using the 'CHEMTAX' matrix factorisation program, Marine Ecology Progress Series, Vol. 144, Page 285 – 298.

**Yentsch C.S., Phinney D.A. (1985):** Spectral fluorescence: A taxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations. J. Plankt. Res., Page 617 – 632.

**Yentsch C.S., Menzel D.W. (1963):** A method for the determination of phytoplankton chlorophyll by fluorescence. Deep Sea Res. 10, Page 1221 – 1231.

**Zapata M., Rodriguez F., Garrido J.L. (2000):** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 195, Page 29 – 45.

Anhang

A - E





# Anhang A: Salzwassermedien und Nährstoffe

Zur Aufzucht von Algen wurden die folgenden Medien künstliches Seewasser verwendet.

## KSW 1:

2 Liter doppelt entionisiertes Wasser  
60 g NaCl  
20 g MgSO<sub>4</sub>  
0.1g NaCO<sub>3</sub>

## KSW 2:

2 Litern doppelt entionisiertem Wasser werden die 2 Ansätze nach dem vollständigen Auflösen hinzugefügt:

Ansatz I:		Ansatz II:	
41.516 g	NaCl	18.790 g	MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O
6.954 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.6320 g	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O
1.174 g	KCl	0.0428 g	SrCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O
0.340 g	NaHCO <sub>3</sub>		
0.169 g	KBr		
0.045 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		
0.0054 g	NaF		

**Anmerkung:** Diese Informationen sind auch auf der Internetseite bei der North East Pacific Culture Collection unter der Adresse <http://www.ocgy.ubc.ca/projects/nepcc/media.htm> erhältlich.

## Nährstoffe:

Dem künstlichen Salzwasser werden die folgenden Nährstoffe zugesetzt:

### Auf 1000 ml KSW 1 oder 2:

- 1) 1 ml Na NO<sub>3</sub> (Natriumnitrat) 7,5 g auf 100 ml Aqua bidest. auffüllen
- 2) 1 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat) 0,5 g auf 100 ml Aqua bidest. auffüllen
- 3) 2 ml NA<sub>2</sub>SIF<sub>6</sub> (Natriumfluorsilikat) 1,0 g auf 80 ml Aqua bidest. auffüllen mit HCl  
(1,2N) auf pH 3,1 bringen, mit Bidest auf 100 ml auffüllen
- 4) 1 ml Metall-Mix  
i. 150mg ZnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Zinksulfat)  
100 mg CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (Kupfer-II-sulfat)  
120 mg Co SO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Kobalt-II-sulfat)  
2000 mg Mn SO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Mangan-II-sulfat) in 100 ml Bidest  
ii. 5000 mg FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (Eisen-III-chlorid) in 100 ml Bidest  
iii. 65 mg NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Natriummolybdat) in 100 ml Bidest  
iv. 5000 mg Na2EDTA x 2H<sub>2</sub>O (Titriplex III) in 1000ml Bidest  
Mische für die Metall-Mix Stammlösung:  
50 ml Lösung iv,  
5 ml Lösung i,  
5 ml Lösung ii,  
5 ml Lösung iii , fülle mit Aqua bidest. auf 400 ml auf, stelle mit NaOH (1,2N) den pH auf 7,5 ein und fülle auf 500 ml auf
- 5) 1ml Vitamin-Mix  
i. Vitamin B<sub>12</sub> 10 ml auf 10 ml Aqua bidest.  
ii. Biotin 1 ml auf 10 ml Aqua bidest.  
Vitamin-Mix-Stammlösung:  
0,1 ml Lösung i,  
1,0 ml Lösung ii,  
20 mg Thiaminiumdichlorid, mit Aqua bidest.zu 100 ml auffüllen und abschließend den pH auf 7,25 – 7,5 einstellen.

**Literatur:** Price et al. [1987],  
Stein [1973],

Harrison et al. [1980],  
Giullard & Ryther [1962].



## Anhang B: Marine Algenarten

Algenklasse	Spezies	SAG-Bestellnummer
<b>Bacillariophyceae</b>	<i>Attheya longicornis</i>	hausteigener Stamm
	<i>Cyclotella cryptica</i>	1070-1
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1090-6
	<i>Skeletonema costatum</i>	hausteigener Stamm
	<i>Thalassiosira weißflogii</i>	hausteigener Stamm
	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	B122.79
	<i>Thalassiosira excentrica</i>	hausteigener Stamm
	<i>Thalassiosira c.f. minima</i>	hausteigener Stamm
<b>Dinophyceae</b>	<i>Amphidinium carterae</i>	37.80
	<i>Amphidinium höferli</i>	B35.80
	<i>Glenodinium foliaceum</i>	38.80
	<i>Prorocentrum cassubicum</i>	B40.80
	<i>Prorocentrum micans</i>	hausteigener Stamm
	<i>Prorocentrum redfeldii</i>	hausteigener Stamm
<b>Cryptophyceae</b>	<i>Chroomonas sp.</i>	B980-1
	<i>Cryptomonas baltica</i>	B18.80
	<i>Pyrenomonas helgolandii</i>	B28.87
	<i>Teleaulax acuta</i>	hausteigener Stamm
<b>Haptophyceae</b>	<i>Chrychromulina polylepis</i>	B32.90
	<i>Emiliana bilobata</i>	B33.90
	<i>Isochrysis spec.</i>	B927-3
	<i>Pavlova lutheri</i>	hausteigener Stamm
	<i>Pheocystis spec.</i>	hausteigener Stamm
	<i>Prymnesium parvum</i>	B127.79
	<i>Prymnesium patalliferum</i>	hausteigener Stamm
<b>Cyanophyceae</b>	<i>Anabaena spp.</i>	12.82
	<i>Chroococcus turgidus</i>	B36.85
	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	B31.92
	<i>Synechococcus spec.</i>	hausteigener Stamm
<b>Prasinophyceae</b>	<i>Micromonas pusilla</i>	B39.85
	<i>Pyramimonas amyliifera</i>	B22.86
	<i>Tetraselmis chui</i>	6-8
	<i>Tetraselmis striata</i>	41.85
<b>Chlorophyceae</b>	<i>Chlamydomonas reginae</i>	17.89
	<i>Chlamydomonas parkeae</i>	24.89
	<i>Dunaliella primolecta</i>	B183.80
	<i>Dunaliella salina</i>	B42.88
	<i>Mantoniella squamata</i>	B65.90
	<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	B66.90
<b>Rhodophyceae</b>	<i>Porphydinium aerugineum</i>	B110.79
	<i>Rhodella maculata</i>	45.85
<b>Euglenophyceae</b>	<i>Eutreptia viridis</i>	B1226-1c
<b>Eustigmatophyceae</b>	<i>Nannochloropsis oculata</i>	38.85
	<i>Nannochloropsis salina</i>	40.85
<b>Chrysophyceae</b>	<i>Pseudopedinella elastica</i>	B43.88
	<i>Ockromonas spec.</i>	hausteigener Stamm
<b>Raphidophyceae</b>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	hausteigener Stamm

Die aufgelisteten Algenspezies der Algensammlung der Göttinger Universität (SAG) können in den meisten Fällen auch in dem KSW 2 (Anhang A) aufgezogen werden.



## Anhang C: Kommerziell erhältliche Lumineszenzdioden

Wellenlänge	Intensität	Farbe	Abstrahlwinkel	Bezeichnung	Hersteller
[nm]	[mCd]				
660	2400	rot	12°	MV8114	QT
	2750	rot	30°	L-53SCR-E	Kingbright
	2000	rot	20°	ESR34180-H	Oshino
644	<b>7700</b>	<b>rot</b>	<b>8°</b>	<b>GL5ZR43</b>	<b>Sharp</b>
	6000	rot	8°	TLRH180P	Toshiba
645	5000	rot	8°	SUR14180-H	Oshino
650	2500	rot	8°	TLDR5800	Temic über Eurodis
630	7000	rot	8°	TLSH180P	Toshiba
620	3500	orange	12°	MV8716	QT
	3000	orange	22°	SL9050CS	Sloan Company
612	7000	orange	8°	TLOH180P	Toshiba
615	6500	orange	8°	HLMTCH00	HP
605	3500	amber	8°	TLHF5800	Temic über Eurodis
590	7000	gelb	8°	TLYH180P	Toshiba
	6500	gelb	8°	HLMTCLOO	HP
	5000	gelb	8°	SUY14180-H	Oshino
	3500	gelb	12°	MV8316	QT
	3500	gelb	8°	TLHE5800	Temic über Eurodis
595	3000	gelb	22°	SL905YCU	Sloan Company
	2500	gelb	30°	L-53SYC	Kingbright
	1200	gelb	20°	ESY34180	Oshino
570	2200	grün	8°	SUG14180	Oshino
525	6000	grün	15°	NSPG500S	Nichia
	5000	grün	20°	L-2543MGC	Kingbright
	5000	grün	15°	E1L51-3G	Toyada über Mitsui
520	4000	grün	16°	SPG41510	Oshino
470	2000	blau	15°	NSPB500S	Nichia
	1800	blau	16°	SUB41510	Oshino
	1500	blau	15°	E1L51-3G	Toyada über Mitsui
430	350	blau	20°	UB34180	Oshino
450-750	3000	weiß	20°	NSPW500S	Nichia

### Distribuentips:

kleinere Mengen als 100 Stück des Hersteller Oshino über Börsig

Toshiba über Spoerle Elektronik

Temic-Angaben im Temic-Datenbuch auf Seite 162

Keinen Distributor von Sloan in Erfahrung gebracht, geschweige denn Kontakt zu Sloan

Sharp über Eurodis

HP über RS Components



## Anhang D: Intensitätsnormierte Lumineszenzdiodenspektren

Die Lichtintensitäten der kommerziell erhältlichen LED's (Anhang C) wurden für verschiedene Ströme mit einem 4B Lichtsensor (Zemoko, Ø 1cm) für einen Abstand 0 cm vom Sensors bestimmt.

**Tabelle E1: Lichtintensitäten der LED's für verschiedene Ströme**

Die Wellenlängen der LED's (Herstellerbezeichnung) sind dem Anhang C zu entnehmen

	UB 34180	NSPW	NSPB	NSPG	SUG	TLYH	SUY	TLOH	MV 8716	TLSH	TLRH	MV8114	L53 SCR	GL5ZR
Strom [mA]	[ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]													
5	3,2	40,6	34,1	37,8	1,6	8,7	6,8	11,6	11,2	20,9	19,2	17,2	44,6	22,1
10	4,9	71,5	62,3	62,4	4,5	22,5	18,8	30,7	23,7	48,8	46,7	38,2	94,0	49,5
15	5,7	97,3	85,6	82,1	7,7	36,2	31,7	50,6	35,7	77,0	75,2	59,7	143,2	76,5
20	6,2	120,0	106,0	99,1	10,8	49,5	44,6	69,8	46,9	105,7	103,6	81,0	191,1	102,7
30	6,5	158,4	140,4	127,1	17,0	74,3	68,0	106,6	67,2	162,1	160,1	122,1	283,1	150,2
40	6,5	190,0	169,5	149,3	22,6	96,1	90,0	138,9	84,7	215,2	215,4	158,8	368,8	195
50	6,7	211,0	193,3	167,6	27,0	114,3	112,2	166,7	99,4	266,6	268,7	190,4	436,2	235,3

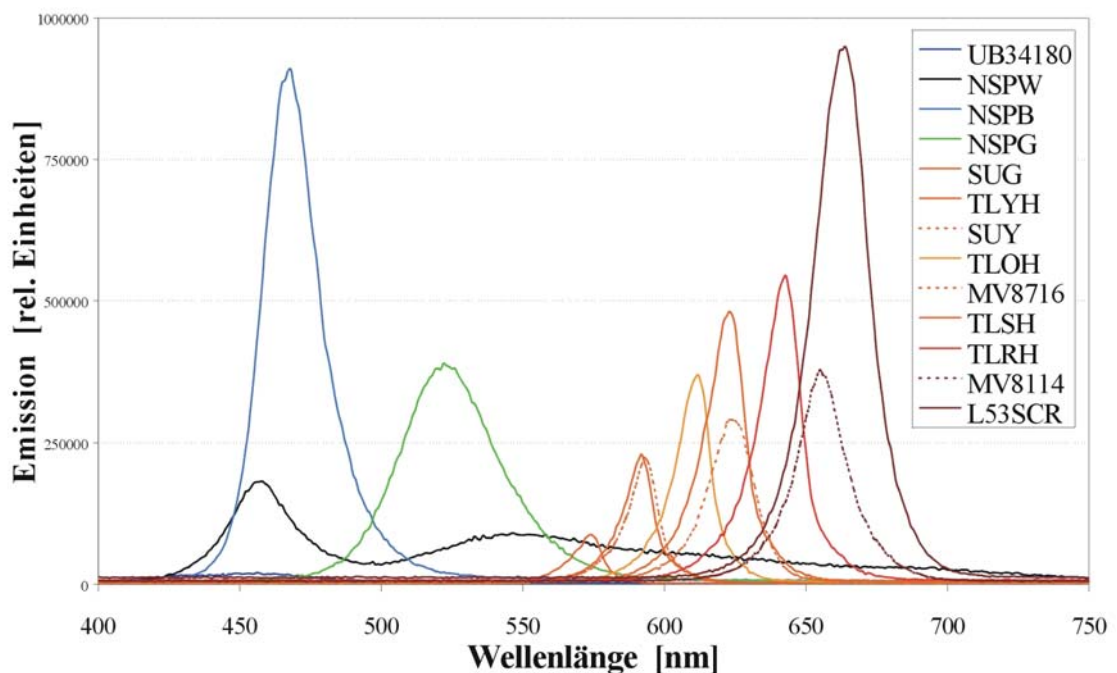
Die Spektren der LED's wurden mit einem RF5001PC Spektrofluorophotometer (Shimadzu) ausgemessen. Die Xenonlampe des Gerätes wurde abgeschaltet und das Emissionsspektrum der LED in 1 nm Schritten aufgenommen. Es erfolgte eine Normierung der Spektren der LED „x“ auf die Lichtintensität für einen Diodenstrom „i“ nach:

$$\text{Intensität Led}(x,i) = \int_{\text{alle Wellenlängen}} \text{FluoreszenzLED}(x,i,\lambda) d\lambda = \sum_{\lambda=400}^{700} \text{FluoreszenzLED}(x,i,\lambda)$$

Für einen Strom von 20 mA ergaben sich die LED-Spektren wie folgt:

**Abbildung E1: Intensitätsnormierte LED-Spektren**

Die Reihenfolge der LED's in der Legende folgt dem Maximum der einzelnen Spektren von „blau“ nach „rot“.







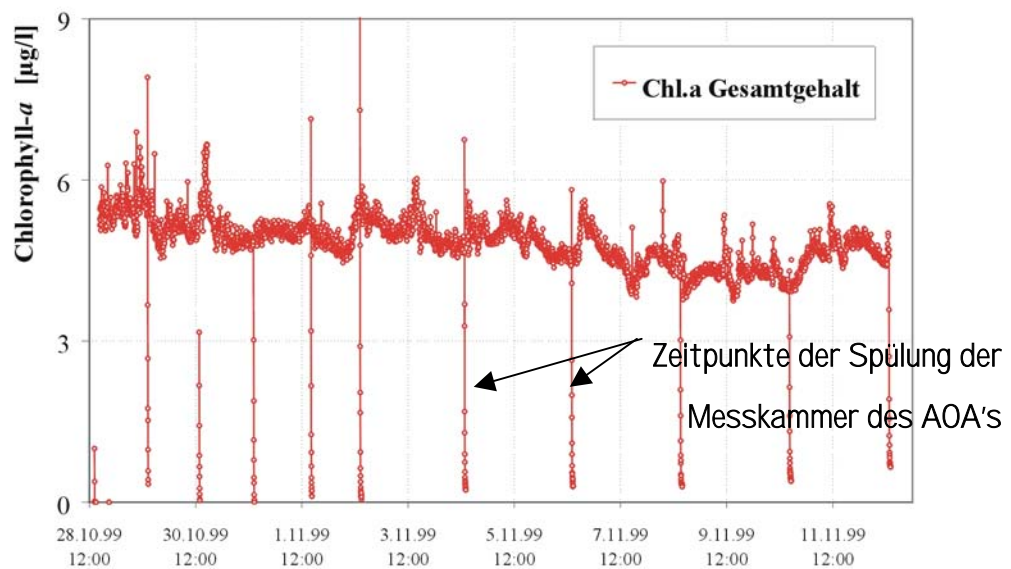
## Anhang E: Bewuchsentwicklung in der Messkammer des AOA's

In einer Langzeitstudie mit dem AOA im Hafenbecken 3 des Büssumer Hafens wurde über zwei Wochen die Bewuchs- und Sedimentationsentwicklung in der Messkammer des AOA's untersucht.

Mit dieser Untersuchung soll die Zeit ermittelt werden in der ein nicht mehr zu vernachlässigender Fehler durch den Bewuchs in der Messkammer hervorgerufen wird. Je länger diese Zeitspanne ist umso weniger Wartung fällt für den laufenden Betrieb an.

Abbildung E 1: Untersuchung zur Bewuchsentwicklung in der AOA-Messkammer

Langzeitmessung im Büssumer Hafen zur Untersuchung des Bewuchses der Messkammer des AOA's mit Algen. Die starken Abfälle des Gesamtchlorophyll-*a* Gehaltes sind auf die Spülungen der Kammer mit künstlichem Seewasser zurückzuführen, die zum Nachweis des Bewuchses nötig waren.



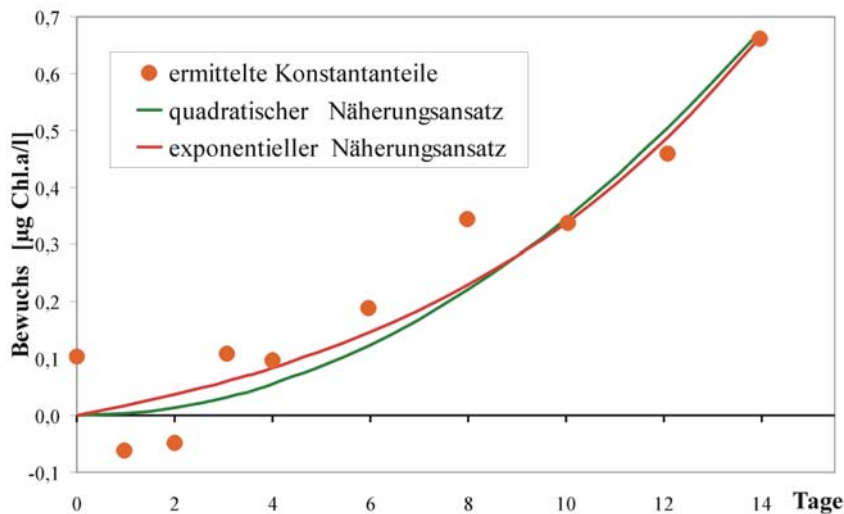
Durch das Wasservolumen in den Schläuchen und der Messkammer kommt es bei jeder Spülung zu einer Vermischung mit dem künstlichen Seewasser, die Konzentration fällt somit nicht sofort auf den Wert Null ab. Als Bewuchs der Messkammer des AOA's wird die Chl.a Konzentration angesehen, die auch nach „unendlich“ vielen Spülungen noch detektiert wird. Die zeitliche Entwicklung des Chl.a Gehaltes der verbleibenden Algen in der Kammer für jede Spülung (i) kann durch einen Fit gemäß einer Exponentialfunktion ermittelt werden:

$$\text{Chl.a Gehalt}_i(t) = a_1 e^{-t/\tau_i} + a_0$$

Die konstanten Anteile ( $a_0$ ) des Näherungsansatzes des Chl.a Gesamtgehaltes, die auch nach „unendlich“ häufiger Spülung immer noch in der Kammer verbleiben, sind der unerwünschte konstante Anteil des Chl.a Gehaltes durch den Bewuchs.

Der Bewuchs ( $a_0$ ) für jeden Spülvorgang (i) wird nun in der zeitlichen Entwicklung betrachtet:

**Abbildung E 2: Ergebnisse des Konstantanteils (a0) für die Spülungen (nur Spülung, keine Reinigung!)**  
 Zeitliche Bewuchsentwicklung in der Messkammer des AOA's (Punkte). Zwei Näherungsansätze zur mathematischen Beschreibung der ermittelten Konstantanteile (a0) sind in der Graphik aufgezeigt.



Die in Abbildung E 2 dargestellten Näherungsansätze für die zeitliche Entwicklung des Bewuchses in der Messkammer des AOA's genügen den Funktionen:

$$f_q(t) = a_q t^2 \quad \text{oder} \quad f_e(t) = a_e e^{t/\tau_e} \quad \text{quadratischer oder exponentieller Ansatz}$$

Für beide Funktionen ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,915.

Wenn die Annahme stimmt, das die Bewuchsentwicklung einer dieser beiden Funktionen folgt (quadratisch wegen der Oberfläche auf der die Algen wachsen können, exponentiell wegen der Zellteilung), so ergibt sich folgende Bewuchsabschätzung:

**Tabelle E 1: Abschätzung der zeitlichen Bewuchsentwicklung der Messkammer des AOA's**

Tage	$f_q$	$f_e$
12	10%	10%
14	14%	13%
17	20%	21%
21	30%	39%
24	40%	59%
28	54%	104%

Nach diesen beiden Abschätzungen ist ein Fehler von 10 % für den Chl.a Gesamt Gehalt durch den Bewuchs nach 12 Tagen erreicht, 20% nach ca. 17 Tagen. Nach 3 bzw. 4 Wochen würde der Fehler für eine quadratische Entwicklung dann schon 30 bzw. 54 %, für die exponentielle Entwicklung aber schon 39 bzw. 104 % betragen. Dies aber alles nur unter der Voraussetzung, dass die weitere Entwicklung des Bewuchses auch wirklich diesen Funktionen folgt. Da ein Fehler von 10 % schon nach 12 Tagen erreicht ist, sollte bei einem kontinuierlichen

Betrieb des AOA's die Messkammer mindestens in einem zweiwöchentlichen Rhythmus gesäubert werden und eine Verlängerung des Zeitraumes zwischen den Wartungszyklen nur nach entsprechender Prüfung vorgenommen werden. Zu bedenken ist dabei, dass viele unterschiedliche Randbedingungen bei der Bewuchsentwicklung eine Rolle spielen können (Algenspezies, Temperatur, Phytoplanktonkonzentration, Toxine usw.).

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei als Hilfsmittel nur die genannten Quellen benutzt habe.

Desweiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder ganz, noch zum Teil bei einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Kiel, Mai 2001