

Forschungsverbundvorhaben:

**"Maßnahmen zur Beseitigung nutzungseinschränkender Qualitätseigenschaften stehender Gewässer in den neuen Bundesländern"**

Abschlußbericht

Teilprojekt 4 - Förderkennzeichen 02WT93 13/5

*Prof. Dr. Ch. Wilhelm<sup>1</sup> mit Dipl. biol. C. Lohmann<sup>2</sup> und Dipl. biol. A. Becker<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Institut für Botanik - Pflanzenphysiologie - , Universität Leipzig, 04103 Leipzig*

<sup>2</sup> *Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz, 55099 Mainz*

**Entwicklung einer HPLC-gestützten Methode der  
Phytoplanktonanalyse zur Bestimmung der Wassergüte**

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
<b>1. Zusammenfassung der im Vorhaben erarbeiteten Ergebnisse</b>	<b>3</b>
<b>2. Fragestellung und im Vorhaben beschrittener Lösungsweg</b>	<b>4</b>
2.1. Das Extraktionsproblem	7
2.2. Empfindlichkeitsproblem	8
2.3. Chromatographieproblem	8
2.4. Matrixproblem	9
2.5. Auswerteproblem	
<b>3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse</b>	<b>10</b>
3.1. Die Anwendung der HPLC- Methode auf Gewässer unterschiedlicher Trophie	10
3.1.1. Hypertrophes Gewässer	10
3.1.2. Eutrophes Gewässer	11
3.1.3. Oligotrophes Gewässer	11
3.2. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von HPLC- und Zählmethode	11
3.2.1. Eutrophe bis mesotrophe Gewässer	12
3.2.2. Oligotrophe Gewässer	14
3.3. Überprüfung des Auswertemodus	14
3.3.1. Überprüfung der Übereinstimmung $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$	15

3.3.1.1.	Oligotrophes Gewässer	15
3.3.1.2.	Eutrophe/mesotrophe Gewässer	15
3.3.1.3.	Hypertrophe Gewässer	15
3.3.2.	Ursachen für die gefundenen Abweichungen im Verhältnis $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$	15
3.3.2.1.	Verfahren zur Ermittlung von in-situ Xanthophyll/Chlorophyll a-Verhältnissen	16
3.3.2.1.1.	Das Mainzer Modell	16
3.3.2.1.2.	Das iterative Modell	16
3.3.2.1.3.	Das SPSS Modell (multivariate Regression)	17
3.3.3.	Nachweis anderer Algengruppen	20
3.4.	Die Pigmentanalyse als ein neues Instrumentarium zur Charakterisierung der Phytoplanktonaktivität?	20
<b>4.</b>	<b>Fazit</b>	<b>21</b>
<b>5.</b>	<b>Zeit- und Kostenplanung</b>	<b>22</b>
<b>6.</b>	<b>Veröffentlichungen und Vorträge</b>	<b>23</b>
<b>7.</b>	<b>Zitierte Literatur</b>	<b>24</b>
	<b>Anhang: (Tabellen und Abbildungen)</b>	<b>27</b>

Verwendete Abkürzungen:

Allo	Alloxanthin
BLT	Bleilochtalsperre
Chl a:	Chlorophyll a
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
Fuc	Fucoxanthin
Lut	Lutein
Per	Peridinin
TS:	Talsperre
VS:	Vorsperre
Xan	Xanthophyll
Zea	Zeaxanthin

## **1. Zusammenfassung der im Vorhaben erarbeiteten Ergebnisse**

Im Rahmen des Forschungsvorhaben wurde auf der Grundlage einer HPLC-gestützten Pigmentanalyse eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der Phytoplanktonzusammensetzung entwickelt und an Gewässern unterschiedlicher Trophie getestet. Die Methode erlaubt neben der exakten Messung des Gehalts an Chlorophyll a und dessen Abbauprodukten eine hoch reproduzierbare Bestimmung des prozentualen Beitrags der fünf wichtigsten Algengruppen zum Gesamtchlorophyll: Cyanobakterien, Grünalgen, Cryptophyceen, Dinophyceen und der Diatomeen inklusive der Chrysophyceen. Die beiden letztgenannten Gruppen können aufgrund des identischen Pigmentmusters nicht weiter differenziert werden. Dagegen konnten lichtmikroskopisch nicht identifizierbare Nanoplankter den genannten fünf Algengruppen sicher zugeordnet werden. Zusätzlich quantifizierbar sind auch die lichtmikroskopisch schwer erkennbaren Eustigmatophyceen und Xanthophyceen. In dem Projekt konnte erstmalig gezeigt werden, daß diese Algengruppen im Phytoplankton von oligotrophen Seen überhaupt von quantitativer Bedeutung sind. Es wurden mehrere Auswertungsverfahren entwickelt und erprobt, wie auf der Grundlage der Pigmentbestimmungen die prozentuale Algenverteilung ermittelt werden kann. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine einfache Modellrechnung in vielen Fällen richtige Ergebnisse liefert, in anderen Fällen aber eine statistische Analyse die Aussagengenauigkeit deutlich verbessert. Neben dem pigmentanalytischen Verfahren wurde mit den meisten Proben die klassische Zählmethode nach Uthermöhl parallel durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß in der Regel beide Methoden identische jahreszeitliche Verläufe der Phytoplanktonentwicklung liefern, der prozentuale Beitrag der jeweiligen Algenklasse aber sehr unterschiedlich sein kann. Die Ursache dafür liegt in der Bezugsgröße: das Zählverfahren bezieht den Beitrag der Algenklassen auf das Biovolumen, während die pigmentanalytische Methode Chlorophyll als Bezugsgröße benutzt. Es werden Argumente genannt, weshalb Chlorophyll in diesem Zusammenhang als Biomasseindikator zu bevorzugen ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß alle wesentlichen angestrebten Ziele des Vorhabens erreicht wurden und das Verfahren nun der Routinepraxis zur Verfügung steht.

## **2. Fragestellung und im Vorhaben beschrittener Lösungsweg**

In eutrophierter Gewässern entstehen erhebliche Nutzungseinschränkung durch die Entwicklung unerwünschter Algen, so daß entweder die vorhandene Biomasse als auch die Populationsstruktur des Phytoplanktons die Wasserqualität erheblich beeinflusst (Lund, 1972; Elser et al. 1990). So sind z.B. Cyanobakterien generell in stehenden Gewässern unerwünscht. Aufgrund ihrer Fähigkeit Toxine bilden zu können, stellen sie

für die verschiedensten Nutzungsarten einen Risikofaktor dar. Kritisch sind Cyanobakterien auch deshalb, weil sie aufgrund ihrer geringen Zellgröße die Filter verstopfen können und somit zu Kalamitäten in der Trinkwasseraufbereitung führen (Bernhardt und Willems, 1978). Zudem besteht bei hohen Cyanobakterienanteilen im Freiwasser das Risiko der Belastung des Rohwassers mit algenbürgigen Toxinen, so daß entweder ein zusätzlicher Überwachungsaufwand betrieben oder die Rohwasserentnahme gestoppt werden muß. Bislang kennt man noch kein Modell wie aus wasserchemischen Daten die Phytoplanktonpopulation vorhergesagt werden kann (Scharf et al. 1984). Daher ist die Phytoplanktonanalyse nach wie vor als ein empfindlicher **biologischer** Indikator der Wasserqualität in stehenden Gewässern unverzichtbar (Lund, 1972, Gorharm et al. 1974). Insbesondere ist die Erfolgskontrolle von Gewässersanierungsmaßnahmen entscheidend von der Kenntnis der Phytoplanktonstruktur abhängig (Cook, 1993). Während die Biomasse relativ einfach über die Bestimmung des Chlorophyll a-Gehaltes ermittelt werden kann, - entweder naßchemisch nach der DIN-Methode oder mittels Fluoreszenzsonden (Anonymus, 1989) - erforderte bisher die Erfassung der Populationsstruktur einen erheblichen zeitlichen und personellen Aufwand (Utermöhl, 1958; Lund et al. 1958). Dieser resultiert hauptsächlich aus der Größenvermessung und Zählung der Zellen, während die Identifizierung bei geübtem Personal relativ schnell erfolgt. Daher kann das Artenspektrum mikroskopisch schnell erfaßt werden, die quantitative Analyse verursacht aber einen Zeit- und Kostenaufwand, der in der Regel so hoch ist, daß solche Analysen nur noch im Rahmen von Forschungsvorhaben durchgeführt werden und in der Routinepraxis bei aller Notwendigkeit oft unterbleiben muß. Im Rahmen des abgeschlossenen Forschungsvorhabens sollte für dieses Problem eine praxisnahe Lösung gefunden werden.

Grundlage der vorgeschlagenen Problemlösung ist die Tatsache, daß die verschiedenen Algentaxa eine spezifische Xanthophyllpigmentierung besitzen, die quasi als „Finger-print“ genutzt werden kann (Everitt et al., 1990; Williams and Claustre, 1991; Barlow et al. 1993). Tabelle 1 listet die verschiedenen Algengruppen und ihre jeweiligen Xanthophylle auf. Diese Pigmente sind *in-vivo* an Proteine gebunden und bilden sogenannte Chlorophyll-Protein-Komplexe (zur Übersicht siehe Goodwin and Britton, 1988; Rowan, 1989). Hier sind die die Pigmente in einer bestimmten Stöchiometrie an das Protein fixiert (Wilhelm 1990). Dieses stöchiometrisch definierte Bindungsverhalten sollte theoretisch die Möglichkeit geben, aus den Xanthophyllmengen den prozentualen Beitrag zum Gesamtchlorophyll zu ermitteln. Dazu mußten folgende Probleme gelöst werden:

### **2.1. Das Extraktionsproblem:**

Viele Algenzellen besitzen oft widerstandsfähige Zellwände, die der Extraktion der Pigmente erheblichen Widerstand entgegensetzen. Das im Rahmen der DIN-Methode

benutzte Verfahren für die Extraktion der Chlorophylle und Phaeopigmente mittels heißem Methanol, das bis zum heutigen Tag umstritten ist, konnte nicht verwendet werden, da die Xanthophylle unter diesen Bedingungen degradiert werden. Die Extraktionsbedingungen sollten folgenden Kriterien genügen:

- a. alle Carotinoide und Chlorophylle sollten quantitativ extrahiert werden.
- b. es sollten keine Abbauprodukte erzeugt werden.
- c. die Extraktion sollte in möglichst kleinem Volumen erfolgen. Eine nachträgliche Anreicherung sollte möglichst vermieden werden, da dabei nicht nur die Gefahr besteht, daß die empfindlichen Pigmente degradiert werden, sondern auch der Kostenaufwand in der Routine steigt.
- d. das Extraktionsmedium sollte möglichst so gewählt werden, daß der Extrakt direkt für die HPLC-Analyse verwendet werden kann, das Extraktionsmittel also mit dem chromatographischen Laufmittel kompatibel ist (Zapata and Garrido, 1991).

Zu a.

Bei der Extraktion lipophiler Pigmente hängt das Extraktionsvermögen des Lösungsmittels von der Polarität des Solvens ab. Diese wird nicht nur das Lösungsmittel selbst, sondern auch vom Wassergehalt der Filter bestimmt. Bei einem kleinen Lösungsmittelvolumen wirkt der Wassergehalt der Filter schon störend, da schon geringe Änderungen des Wassergehalts im Extraktionsmittel die Lipophilie sehr stark vermindern. Lipophile Lösungsmittel besitzen nur ein geringes Puffervermögen für Protonen. Freie Protonen demetallisieren nicht nur die Chlorophylle, sondern derivatisieren auch die Xanthophylle und müssen daher gebunden werden. Planktonzellen besitzen aber zuweilen säurereiche Vakuolen, deren Inhalt bei Extraktion frei wird und dann die Pigmente chemisch angreift. Aus diesem Grund war es unbedingt erforderlich, das Extraktionsmittel stark zu puffern. In salzreichen wässrigen Mischungen apolarer Lösungsmittel wie Aceton, Methanol oder Ethanol ist nur dann eine hohe Reproduzierbarkeit zu erwarten, wenn der Wassergehalt mit hoher Genauigkeit eingestellt werden kann. Unsere Untersuchungen zeigten, daß der Wassergehalt der Filter sehr stark variiert, je nachdem wie hoch und wie lange das Vakuum während der Filtration anstand. Zudem entstehen bei der Extraktion feuchter Filter Ungenauigkeiten bei der Volumenbestimmung des Extraktes, die erforderlich ist, wenn man die absolute Menge an Pigment pro Filter und damit pro Liter Wasserprobe angeben will. Unter Punkt 5 wird noch einmal eingehend dargestellt, weshalb die Bestimmung absoluter Pigmentgehalte für die Validität der Methode von unverzichtbarer Bedeutung ist.

Systematische Optimierung der Extraktionsmethode führte dann zu folgendem Ergebnis.

- \* Alle Filter sind vor der Extraktion über Gefriertrocknung zu entwässern. Dadurch ergeben sich genau definierte Verhältnisse hinsichtlich Wassergehalt und Extraktionsvolumen.
- \* Das optimale Extraktionsmittel hat die Zusammensetzung: 90/10 v/v Methanol/H<sub>2</sub>O; 0.2 M Ammoniumacetat und 10% Ethylacetat. Ohne den Zusatz von Ethylacetat werden die lipophilen Pigmente wie Chl a und  $\beta$ -Carotin nicht mehr vollständig gelöst und man erhält "falsche" Xanthophyll/Chlorophyll a-Werte, wie aus folgender Aufstellung hervorgeht:

Extraktionsmittel	Lutein/Chlorophyll a <sup>1</sup>	Fucoxanthin/Chlorophyll a <sup>2</sup>
mit Ethylacetat	0,62 ± 0.02	1.3±0.07
ohne Ethylacetat	0,46 ± 0.05	1.1±0.05

- \* Die gefriergetrockneten Zellen werden in einem Volumen von minimal 2ml in einem Glasperlenhomogenisator extrahiert. Der Pigmentextrakt wird über eine Fitte von den Glasperlen befreit und durch eine Spritze mit einem Feinporenfilter gedrückt. Der klare Überstand kann direkt injiziert werden. Die Probenaufbereitungszeit beträgt nach etwas Übung nur noch 5 Minuten.
- \* Der Extrakt ist sehr gut mit dem chromatographischen Starteluenten kompatibel; so können z.B. bis zu 350 $\mu$ l auf die Säule gegeben werden, ohne daß dadurch die chromatographische Trennleistung nachteilig beeinflußt wird.
- \* Es konnte gezeigt werden, daß dieses Verfahren innerhalb der meßbaren Grenzen keine Pigmentabbauprodukte erzeugt. Bei Algenkulturen, die sich innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden Phaeophytinmengen bestimmt, die den theoretisch kalkulierten Werten entsprachen. Diese theoretische Kalkulation beruht darauf, daß in Photosystem II pro Reaktionszentrum zwei Phaeophytinmoleküle vorhanden sind. Die Anzahl der PSII Reaktionszentren läßt sich aus Blitzlichtexperimenten ermitteln (Wilhelm et al. 1984). So ist z.B. in Grünalgen unter Schwachlichtbedingungen das Verhältnis Gesamtchlorophyll a zur Reaktionszentrum von Photosystem II etwa 500:1. Da pro Reaktionszentrum zwei Phaeophytinmoleküle vorhanden sind, beläuft sich das Verhältnis Chlorophyll a/Phäophytin auf 250:1. Tatsächlich konnte ein Phaeophytingehalte von 0.4% nicht unterschritten werden und entspricht daher der zu erwartenden Mindestmenge. Damit wurde aber auch gezeigt, daß im Zuge der Pigmentextraktion kein weiteres Phaeophytin entsteht. **Soweit uns bekannt, ist dieses von uns hier entwickelte Verfahren das einzige, das in natürlichen Algenzellproben keine meßbaren Abbauprodukte erzeugt.**

<sup>1</sup> ausgeführt mit Reinkulturen von *Selenastrum spec.* in drei von einander unabhängigen Versuchen

<sup>2</sup> ausgeführt mit Reinkulturen von *Phaeodactylum tricornutum* in drei von einander unabhängigen Versuchen

- \* Als einziger Nachteil erwies sich die beschränkte Haltbarkeit der Pigmentextrakte. Auch bei Kühlung kommt es nach einigen Stunden in den Extrakten aufgrund des Methanolgehaltes zu Umlagerungsreaktionen am Isopentanonring des Chlorophyllmoleküls. Dadurch laufen die Chlorophylle nicht mehr als einheitliche Banden und es kommt zu Problemen nicht nur bei der Quantifizierung, sondern auch bei der Reinheit der Fraktionen, da sich Chlorophyll-Allomere z.B. mit Echinenon, einem in Cyanobakterien häufigen Pigment, unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen überlagern. Die Extrakte sollten daher sofort nach der Präparation bearbeitet werden. Aufgrund der sehr kurzen Aufarbeitungszeit der Extrakte wirkt sich die eingeschränkte Probenhaltbarkeit jedoch in der Praxis kaum nachteilig aus.

## 2.2. Empfindlichkeitsproblem

Die Methode sollte nach Möglichkeit in allen Gewässertypen anwendbar sein. Sowohl in oligotrophen Gewässern als auch in Proben, die aus aphotischen Schichten eutropher Gewässer entnommen werden, können die Chlorophyllkonzentrationen im Bereich von unter  $1 \mu\text{g Chlorophyll a L}^{-1}$  liegen. Um in solchen Proben noch zuverlässig die Phytoplanktonzusammensetzung bestimmen zu können, müssen die auf dem Filter vorhandenen Pigmentmengen für eine Pigmentanalyse ausreichen. Im Prinzip kann das leicht über eine Erhöhung der Wassermenge bewerkstelligt werden. In der Praxis ergeben sich allerdings Einschränkungen. Probenvolumina von über 2 L verlangen lange Filtrationszeiten, die über das Anlegen eines stärkeren Vakuums nicht ausgeglichen werden können, da in diesem Fall empfindliche Zellen platzen und so den Filter passieren können. Enthält die Probe zudem andere, nicht-chlorophyllhaltige Partikel, so verstopfen die Filter und die erforderliche Planktonmenge wird nicht erreicht. Um die erforderlichen Volumina möglichst gering zu halten, mußte daher die Nachweisempfindlichkeit der Methode möglichst hoch gewählt werden. Eine erste wichtige Voraussetzung war in der Extraktion in einem kleinen Volumen und in der Kompatibilität zwischen Extraktionsmittel und Eluent geschaffen. Ungünstig wirkte sich aus, daß für die Detektion ein Diodenarraydetektor erforderlich ist (siehe weiter unten), dessen Nachweisempfindlichkeit deutlich geringer ist als von konventionellen Spektralphotometern. In der Praxis ist die Nachweisempfindlichkeit nicht nur von der Hardware, sondern auch von der Güte der chromatographischen Trennung abhängig. Die Ausarbeitung eines besonders leistungsfähigen Trennsystems (siehe unter 2.3.) führte dann zu einer Nachweisempfindlichkeit zwischen 2 und 5 ng pro Pigment. Für die Praxis hieß das, daß bei einem Chlorophyllgehalt von  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  ein Liter Probevolumen ausreichend ist. Für die Routinepraxis ist diese Empfindlichkeit völlig ausreichend.

## 2.3. Chromatographieproblem

Das Herzstück der Methode stellt die chromatographische Trennung dar. Alle zu quantifizierenden Pigmente müssen dabei in einem Lauf zu spektral reinen Banden aufgelöst werden. Hochauflösende Gradienten für Phytoplanktonpigmente waren zuvor von verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert worden (Kohata et al. 1991, Wright et al., 1991, Wilhelm et al. 1992, Kraay et al. 1992, Garrido and Zapata, 1993). Von allen bislang publizierten Gradienten lagen jedoch keine Daten vor hinsichtlich der spektralen Reinheit der Peaks, der Säulenübertragbarkeit und der Reproduzierbarkeit der Trennung „problematischer“ Pigmente. Qualitätskriterien für die Güte eines Trennsystems sind neben der Peakreinheit, die Reproduzierbarkeit, die Trenndauer und die Druckbelastung der Hardware. Der von uns benutzte ternäre Gradient hat eine Laufzeit von ca. 30 Minuten und liegt damit deutlich besser als der 1995 veröffentlichte Gradient von Schmid und Stich. Das in Fig. 1 wiedergegebene Chromatogramm ist ein Originalausdruck, wie man ihn direkt aus dem Gerät erhalten kann. Die Peakreinheit wurde von uns routinemäßig über Spektrenvergleiche geprüft. Die jeweiligen Pigmentstandards sind zur Zeit nicht kommerziell erhältlich und mußten daher aus Algenreinkulturen mittels präparativer HPLC selbst isoliert werden. In Fig. 2 ist die Peakreinheit des besonders kritischen Pigmentpaares Lutein/Zeaxantin und von Peridinin demonstriert. Die Spektren der beiden Pigmente wurden jeweils zu Beginn und zu Ende der Integration als auch im Peakmaximum registriert. Auch in Abb 2 werden unbearbeitete Originaldaten gezeigt.

Auch der Druck konnte gegenüber früheren Trennsystemen deutlich verbessert werden und liegt bei max 1450 psi, das von allen HPLC Anlagen als Dauerbelastung problemlos toleriert wird. Auch der Lösungsmittelverbrauch konnte aufgrund der geringen Flußrate von  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$  gegenüber bisherigen Gradienten um 20% gesenkt werden. Positiv wirkte sich die Temperierung der Säule auf die Reproduzierbarkeit aus. Die Retentionszeiten wurden auf diese Weise mit einer Genauigkeit von ca. 0.2 min reproduzierbar. *Da die Temperierung leicht über einen Kühlthermostaten und einen Säulenmantel zu erreichen ist, empfehlen wir für die Pigmentanalytik generell die Säulentemperierung.* Alle für die Auswertung erforderlichen Peaks werden spektral rein getrennt. Diese Voraussetzung wurde mittels Diodenarraydetektors überprüft und ist eine wesentliche Bedingung für die Qualität der erhaltenen Ergebnisse (siehe Tabelle 2). Vor allem bei den Quantifizierung von Chlorophyllabbauprodukten (siehe unten) ist es wichtig, daß ein Detektor zur Verfügung steht, der auch im langwelligen Rotbereich des Spektrums (bis 700nm) gute Empfindlichkeit hat.

#### **2.4. Matrixproblem**

Im Rahmen des Vorhabens wurden über 1000 Freilandproben aus Gewässern verschiedenster Trophie analysiert. In Fig. 3 ist ein Originalchromatogramm aus der Saldenbachtalsperre gezeigt. In keiner Probe konnten Matrixprobleme beobachtet werden, die nicht die sichere Identifizierung und Quantifizierung der erforderlichen

Pigmente erlaubt hätten (siehe dazu auch Tabelle 2). Die spektralen Eigenschaften der aus Freilandmaterial isolierten Pigmente waren mit denen aus Laborkulturen in allen Fällen identisch. Auch in der Gelbstoff-reichen Bleilochtalesperre traten diesbezüglich keinerlei Probleme auf. Auch Planktonproben aus extrem versauerten Resttagebauseen wurden außerhalb dieses Programmes untersucht. Hier zeigte sich, daß ein Abpuffern der Filter vor der Gefriertrocknung verbunden mit einer pH Korrektur auf Werte größer 6 eine einwandfreie Extraktion der Pigmente und eine anschließende chromatographische Analyse zuläßt.

## 2.5. Auswerteproblem

In Tabelle 3 ist exemplarisch die Auswertung durchgeführt, die zeigt, wie man von den aus der Integration der Flächen der Chromatogramme zu dem prozentualen Anteil der verschiedenen Algenklassen zum Gesamtchlorophyll gelangt. Man errechnet aus den Peakflächen zunächst die absoluten molaren Mengen der Markerxanthophylle und von Chlorophyll a (Xan/Chl a). Aus Laborkulturen ist der molare Verhältniswert Markerpigment zu Chlorophyll a (100%-Wert) bekannt. Der prozentuale Beitrag der verschiedenen Algengruppen zum Gesamtchlorophyll ergibt sich dann aus dem Verhältnis des 100%-Wertes zu dem Quotienten Xan/Chla in der unbekanntenen Probe.

Man erhält auf diese zwei von einander unabhängige Bestimmungen von Chlorophyll a. Man kann einmal das Chlorophyll a direkt über die Fläche im Chromatogramm ermitteln (Chl a<sub>gem</sub>). Da sowohl die absoluten Mengen der Markerxanthophylle als auch der prozentuale Beitrag der einzelnen Algengruppen zum Gesamtchlorophyll bekannt ist, kann man die der jeweiligen Algengruppe zugehörige Chlorophyllmenge ermitteln und aufaddieren. Man erhält auf diese Weise ein theoretisches Chl a (Chl a<sub>theo</sub>). Stimmen beide Chlorophyllwerte überein, so zeigt dies, daß die getroffenen Annahmen gültig sind. Bei Nichtübereinstimmung liegen entweder analytische Fehler vor (interne Fehlerkontrolle), oder es tragen weitere Algengruppen zum Gesamtchlorophyll bei, die mit den genannten Markerxanthophyllen nicht erfaßt wurden (siehe unten) oder aber die Annahmen treffen aus verschiedenen Gründen nicht zu. Es war daher zu prüfen, ob

- \* diese Methode in der Routinepraxis valide ist
- \* sich alternative Auswerteverfahren entwickeln lassen
- \* lassen sich aus den Pigmentdaten auch Informationen über den physiologischen Zustand der Zellen gewinnen?

### 3. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Mit der neuen Methode wurden folgende Gewässer untersucht:

- Talsperre Neunzehnhain in den Jahren 1994 und 1995
- Talsperre Saidenbach in den Jahren 1994 und 1995
- Talsperre Dröda mit den Vorsperren Bobenneukirchen und Ramoldsreuth
- Schmäler Luzin mit Carwitzer Becken
- Tollensesee
- Bleilochtalsperre mit dem Schwerpunkt der Enclosure-Versuche

Parallel zur HPLC-Methode wurden die Proben parallel nach dem Zählverfahren untersucht. Im Falle der beiden Talsperren Neunzehnhain und Saidenbach wurde diese Arbeiten von Drs. Horn von der Sächsischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt und die Daten uns dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Im Falle der Bleilochtalsperre erhielten wir die Zählraten dankenswerter Weise überlassen von der Thüringischen Landesanstalt für Umwelt (Dr. Herschel). Bei den anderen Gewässern wurden die Planktonzählungen im Rahmen studentischer Werkverträge an der Universität Mainz durchgeführt. In der Regel wurden die Proben in 14-tägigem oder monatlichem Abstand genommen, wobei je nach Gewässertyp die Anzahl der Tiefenstufen verschieden war. Eine vollständige Darstellung aller Daten liegt im 3. Zwischenbericht vor. Hier beschränken wir uns auf eine Auswahl, die Antwort gibt auf die Fragen, die für nachfolgende Routineanwender besonders relevant sind.

1. Ist die Methode in Gewässern verschiedener Trophie in gleicher Weise anwendbar?
2. Liefert sie die gleichen Ergebnisse wie die Utermöhl Zähltechnik?
3. Wie zuverlässig ist die Auswertung und was ist das optimale Auswerteverfahren?
4. Welche zusätzlichen für die gewässer-internen Prozesse wichtigen Informationen kann man zusätzlich aus den Pigmentanalysen gewinnen?

#### 3.1. Die Anwendung der HPLC- Methode auf Gewässer unterschiedlicher Trophie

##### 3.1.1. Hypertrophes Gewässer

In Figure 4 ist die vollständige Phytoplanktonsuccession der Jahre 1994 und 1995 der hypertrophen Vorsperre Ramoldsreuth aufgetragen. Diese Vorsperre ist Teil des Talsperrensystems Dröda und ist gekennzeichnet durch eine Diatomeendominanz mit Chlorophyllgehalten bis zu  $70\mu\text{g L}^{-1}$  im Frühjahr, die dann im Sommer bei Chlorophyllwerten um  $20\mu\text{g L}^{-1}$  durch eine Cryptophyceenpopulation ersetzt wird. Im Herbst 1994 kam es dann zu einer dramatischen Cyanophyceenblüte mit bis zu  $150\mu\text{g Chl a L}^{-1}$ . Diese Blaualgenentwicklung blieb im darauffolgenden Jahr aus. Hier stellte

sich im Herbst eine gemischte Population aus Grünalgen, Diatomeen und Cryptophyceen und Cyanobakterien ein.

### 3.1.2. Eutrophes Gewässer

Als eutrophes Gewässer wurde das Carwitzer Becken (Lucinsee) ausgewählt. Beispielhaft sind in Fig. 5 die Prozentanteile der verschiedenen Algengruppen aus den Schöpfproben der Wasseroberfläche im Jahr 1994 gezeigt. Der durchschnittliche Chlorophyllgehalt beläuft sich auf 3-5  $\mu\text{g Chl a L}^{-1}$ , ein für ein eutrophes Gewässer niedriger Wert, der durch die überdurchschnittliche Winddurchmischung bedingt ist. Im Jahr 1994 war das Phytoplankton nahezu immer durch Cyanobakterien dominiert, lediglich im März erreichten die Diatomeen mit 40% und die Grünalgen mit 20% einen hohen Anteil am Gesamtchlorophyll.

### 3.1.3. Oligotrophes Gewässer

Als besonders interessanter Anwendungsfall für die HPLC-Methodik erwies sich die Talsperre Neunzehnhain. Hier handelt es sich um ein extrem P-limitiertes Gewässer mit hohen Sichttiefen nicht nur während der Sommermonate. Im Jahr 1994 beobachtet man im Frühjahr bei einem Chlorophyllgehalt von 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  einen hohen Anteil von Cyanobakterien (50%) begleitet von Diatomeen, Grünalgen und Dinoflagellaten (Fig. 6). Im Sommer und Herbst geht der Cyanobakterienanteil zurück und es etablieren sich Grünalgen und Diatomeen mit geringen Beiträgen von Cryptophyceen und Dinophyceen. Aufgrund der hohen Sichttiefe des Gewässers können Algen noch in großen Tiefen physiologisch aktiv sein, so daß die Tiefenverteilung nicht nur hydrodynamische sondern auch biologische Ursachen hat (Dichteregulation, Beweglichkeit etc). So beobachteten wir am 26.5.94 eine Chlorophyllmaximum bei 15 m Tiefe, das stärker durch Grünalgen und Diatomeen bestimmt war als an den oberflächennahen Schichten (Fig. 7). Während die Diatomeen an der Oberfläche nur 10% zum Chlorophyll beitragen, beläuft sich ihr Anteil in 25 Tiefe auf 30%. Am 23.6. hingegen ist die Zusammensetzung des Phytoplanktons tiefenunabhängig. Diese Tiefenverteilung konnte trotz des teilweise unter 0.5  $\mu\text{g Chl a L}^{-1}$  liegenden Chlorophyllgehaltes sicher gemessen werden. Überraschend hoch war der Anteil an Cyanobakterien (siehe dazu unten mehr).

## 3.2. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von HPLC- und Zählmethode

Ein Schwerpunkt der Arbeiten lag im Methodenvergleich zwischen Zähl- und HPLC-Methode. Daher sollten möglichst alle Proben parallel zur HPLC-Methode auch mittels Utermöhl Technik ausgewertet werden. Dies war aus mehreren Gründen nicht möglich. Aufgrund des hohen Probenumfangs konnten nicht alle Verbundprojektpartner die Proben wirklich quantitativ auswerten. Quantitative Auswertung bedeutet, daß die

Zellen nicht nur gezählt, sondern auch in der Größe vermessen werden müssen. Bei Arten mit einer hohen Variabilität der Zellgröße wie etwa bei Diatomeen ist eine genaue Biomassenbestimmung nur möglich, wenn mindestens nach Größenklassen getrennt gezählt wird. Eine einfache Häufigkeitsbestimmung ist völlig unzureichend, da die Zellgrößen der verschiedenen Algenarten über 3 Zehnerpotenzen streuen. Auf das Volumen umgerechnet ergeben sich enorme Unterschiede pro Zelle, wie das folgende Beispiel zeigt. Eine Cyanobakterienzelle hat z.B. einen mittleren Zellradius von z.B. 2 Mikrometer (wobei es allerdings auch sehr viel größere, aber auch noch kleinere Zellen gibt), eine Dinoflagellat aber einen mittleren Zellradius von z.B. 150µm besitzt. Das Cyanobakterium hat eine Biomasse von ca. 0.5 µm<sup>3</sup>/Zelle während der Dinoflagellat eine Biomasse von ca. 200.000 µm<sup>3</sup>/Zelle besitzt. Diese enormen Unterschiede beeinflussen nicht nur die Genauigkeit der Biovolumenbestimmung, sondern führen auch zu statistischen Problemen. Findet man unter 400.000 Zellen von Cyanobakterien einen Dinoflagellaten, so tragen beide Algengruppe je 50% zum Biovolumen bei. Findet man diese einzige Dinoflagellatenzelle nicht, so hat man scheinbar eine reine Cyanobakterienpopulation vor sich. Demzufolge erhält man nur dann zuverlässige Zählergebnisse, wenn man eine hohe Anzahl von Zellen zählt bis man auch bei den gering repräsentierten Zellentypen eine statistische Sicherheit erreicht hat. Der Zähler/in muß für jede Probe entscheiden, wann eine ausreichende Zahl von Zellen erfaßt worden ist. Dies verlangt eine gewisse Erfahrung und enthält dennoch einen subjektiven Faktor. Hinzu kommt, daß die Proben im fixierten Zustand analysiert werden mußten. Viele Zellen sind dann aber nicht mehr genau indentifizierbar, insbesondere für denjenigen, der das Gewässer nicht regelmäßig untersucht und daher nicht weiß, welche Arten er zu erwarten hat. Ein großer Teil der Proben mußte von Studenten ausgewertet werden, die mit den Gewässern noch keine längeren Erfahrungen hatten. Zwar standen die Studenten im Austausch mit den jeweiligen Kollegen vor Ort, aber es ist bei allem Engagement nicht auszuschließen, daß Fehlbstimmungen relativ häufig waren, insbesondere dann, wenn der Erhaltungszustand der Proben zu wünschen übrig ließ. Auf diesem Hintergrund darf der nachfolgend durchgeführte Vergleich zwischen Zähl- und Pigmentmethode nicht so aufgefaßt werden, daß die Zählraten immer die „richtigen“ sind und Differenzen zwischen den Methoden quasi automatisch bedeuten, daß die Pigmentmethode „falsche“ Ergebnisse geliefert hat.

### 3.2.1. Eutrophe bis mesotrophe Gewässer

In den Figuren 8, 9 und 10 sind vom „Schmalen Lucinsee“ vergleichend die Phytoplanktonpopulationänderungen im Jahre 1994 mit beiden Methoden aufgetragen. Im oberen Teil der Abbildung ist der prozentuale Beitrag der verschiedenen Algen am Biovolumen und im unteren Teil am Chlorophyll a aufgetragen. Zunächst einmal fällt bei

den Proben der Wasseroberfläche auf, daß Gesamtbiovolumen und Gesamtchlorophyll nicht parallel verlaufen. Im Biovolumen findet man ein kleines Sommermaximum am 19.7., das sich im Chlorophyll nicht auffinden läßt, während das Chlorophyllmaximum am 20.10. keine Entsprechung im Biovolumen hat. Generell wird der Biovolumenanteil der Dinoflagellaten beim Biovolumen sehr hoch bestimmt, während diese Algengruppe beim Chlorophyll kaum in Erscheinung tritt. Die Grünalgen werden mit beiden Methoden mit ähnlichen Prozentanteilen bestimmt, werden aber bei der mikroskopischen Methode am Ende des Jahres nicht mehr erkannt, während sie noch mit ca. 10% sich im Chlorophyll wiederfinden lassen. Nimmt man die Haptophyta, Chrysophyta und Diatomeen zusammen, so zeigen sie im Jahresverlauf eine ähnliche Dynamik, ihr Anteil am Biovolumen ist jedoch wesentlich höher als am Chlorophyll. Die an den Proben der Wasseroberfläche gemachten Beobachtungen finden sich in den anderen Tiefenschichten entsprechend wieder. Das Problem der Dinoflagellaten wird besonders bei der 10m Probe auffällig. Am 19.7. wird im Biovolumen ein hoher Anteil von Dinoflagellaten beobachtet, der im Beitrag zum Chlorophyll gar keinen Niederschlag findet. Entweder ist dies auf zufällig in der Probe vorhandene große Einzelexemplare zurückzuführen, oder es handelt sich um nicht-pigmentierte, heterotrophe Dinoflagellaten oder einfach um leere Panzer.

Sehr ähnliche Ergebnisse wurden im Carwitzer Becken erzielt (Fig. 11, 12 und 13). Auch hier bestehen Diskrepanzen zwischen dem Verlauf der Biovolumina und des Chlorophylls. Auch hier gehen diese Unterschiede auf Dinoflagellaten oder große Diatomeen zurück. Hinzu kommt allerdings, daß hier der Anteil der Cyanobakterien mit der Pigmentmethode generell höher bestimmt wird als mit der Zählverfahren.

Anders stellen sich die Ergebnisse in der Talsperre Saidenbach dar. Hier stimmt der Verlauf von Biovolumen und Chlorophyll sehr gut überein (Figuren 14-19). In der 1m Stufe ist das Phytoplankton im Frühjahr durch Diatomeen dominiert. Ihr Beitrag zur Biomasse beträgt bis Ende Mai zwischen 80 und 95% unabhängig von der verwendeten Methode. Im Juni geht der Diatomeenanteil zurück und es Grünalgen und schwer identifizierbare Kleinstzellen auf, die nach der Pigmentanalyse den Cyanobakterien zuzurechnen sind. Am 1.8.94 beobachtet man in der mikroskopischen Untersuchung einen Anstieg des Pikoplanktons und einen hohen Anteil von Cryptophyceen und von Chrysophyceen, letztere werden bei der Pigmentanalyse zusammen mit den Diatomeen erfaßt. In der Pigmentmethode findet man dagegen einen hohen Anteil von Cyanobakterien, während die Cryptophyceen und Diatomeen nur von untergeordneter Bedeutung sind. Ende August dominieren im Biovolumen sehr kleine Cyanobakterien und alle anderen Algengruppen treten in den Hintergrund, während in der HPLC Methode neben Cyanobakterien auch Grünalgen und kleine Cryptophyceen und Diatomeen mit relativ hohen Prozentanteilen gefunden werden.

Man kann daher feststellen, daß die beiden Methoden um so stärker von einander abweichen, je höher der Anteil an sehr kleinen, schwer identifizierbaren Zellen ist. Dies beobachtet man in allen nachfolgend untersuchten Tiefenstufen. Besonders deutlich wird dies beim Auftreten von Pikoplankton. Meist handelt es sich dabei um Cyanobakterien, während diese jedoch nur wenig zum Biovolumen beisteuern (oder die Biovolumenbestimmung sehr schwierig ist), ist ihr Beitrag zum Chlorophyll sehr hoch. Offenbar kommen die beobachteten Unterschiede hauptsächlich durch die unterschiedliche Bezugsgröße zustande. Die im Verlauf einer Vegetationsperiode ermittelten Populationsverschiebungen werden aber von beiden Methoden in ähnlicher Weise beschrieben.

### 3.2.2. Oligotrophe Gewässer

An der oligotrophen Talsperre Neunzehnhain wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie an den beiden zuvor genannten Gewässern (Fig. 20-22): Der Verlauf von Biovolumen und Chlorophyll ist nicht (oder nicht immer) phasengleich, die mikroskopische Technik ermittelt einen höheren Anteil an Dinoflagellaten und Chrysophyceen/Diatomeen und einen kleineren Anteil an Cyanobakterien als die Pigmentmethode. Das Auftreten nicht identifizierbarer Algen (i.d. Regel Pikoplankter) ist in der Regel eng korreliert mit hohen Anteilen von Cyanobakterien am Gesamtchlorophyll. Der Verlauf der Änderungen in der Phytoplanktonpopulationsstruktur wird von beiden Methoden sehr ähnlich charakterisiert. Die Beobachtung, daß bei Dinoflagellaten und großen Diatomeen der prozentuale Beitrag zur Biomasse auf der Grundlage des Biovolumens immer höher bestimmt wird als bei der Bezugsgröße Chlorophyll ist dadurch zu erklären, daß bei diesen Zellen der Quotient Chlorophyll/Zellvolumen sehr viel kleiner ist als bei Grünalgen oder gar pikoplanktischen Cyanobakterien. In diesen kleinen Zellen ist das Chlorophyll sehr viel dichter gepackt, so daß die beobachteten Unterschiede durch die Bezugsgröße erklärbar sind. Im Gesamtkontext des Vorhabens hat dieses Ergebnis zwei Konsequenzen:

1. Die mikroskopische Methode stellt für die HPLC-Methode keine eigentliche Referenz dar. Man kann daher die HPLC-Methode nicht über die Mikroskopie „kalibrieren“.
2. Es stellt sich die grundsätzliche Frage, ob „Biovolumen“ oder „Chlorophyll“ der geeignetere Biomasseparameter ist.

### 3.3. Überprüfung des Auswertemodus

Die Daten zeigen, daß man mit beiden Methoden **qualitativ** ähnliche, aber **quantitativ** z.T. sehr unterschiedliche Resultate erhält. Die Trophie der Gewässer spielt dabei offenbar keine entscheidende Rolle. Da die Gültigkeit der HPLC-Methode und des zugrunde liegenden Auswertemodus nicht über den direkten Vergleich mit der

Zählmethode überprüft werden kann, und keine andere alternative Methode bekannt ist, wie man den prozentualen Anteil der Phytoplanktongruppen zum Gesamtchlorophyll ermitteln kann, mußte nach anderen Überprüfungskriterien gesucht werden. Ein Prüfparameter wurde im Quotienten aus gemessenem und dem theoretisch errechneten Chlorophyllgehalt ( $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$ ) gefunden. Dieser Parameter ist leicht zu ermitteln (siehe unter 2.5) und stellt eine außerordentlich effektive Prüfgröße dar.

### 3.3.1. Überprüfung der Übereinstimmung zwischen $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$ .

#### 3.3.1.1. Oligotrophes Gewässer

In Fig. 23 ist die prozentuale Verteilung der Algenklassen in der TS Neunzehnhain an vier verschiedenen Terminen im Jahre 1995 wiedergegeben. Auf der Ordinate ist der Quotient ( $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$ ), der auf der Grundlage von Labordaten ermittelt wurde, aufgetragen. In diesem Datensatz erhält man eine nahezu ideale Übereinstimmung zwischen Theorie und Realität. Die Übereinstimmung liegt bis auf einen Fall zwischen 85 und 100%. Wertet man alle Proben aus beiden Untersuchungsjahren aus, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit einer durchschnittlichen Abweichung von 20% nach oben und nach unten. Lediglich an einem Meßtag sind bei den beiden oberflächennäheren Proben die Abweichungen größer und betragen dort 40%.

#### 3.3.1.2. Eutrophe/mesotrophe Gewässer

In Fig. 24 ist der Quotienten  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$  aller Proben aus den Jahren 1994 und 1995 vom Schmalen Luzin-See aufgetragen. In diesem Gewässer beobachtet man im Frühjahr und Herbst gute bis sehr gute Übereinstimmung zwischen erwartetem und gemessenem Chlorophyll, allerdings treten in den Sommermonaten erhebliche Abweichungen auf, die bis über den Faktor 5 hinausreichen.

#### 3.3.1.3. Hypertrophes Gewässer

In der TS Dröda (Fig. 24 unterer Teil) wurde die hypertrophe Vorsperre hinsichtlich des Quotienten  $\text{Chl } a_{\text{ber}}/\text{Chl } a_{\text{gem}}$  untersucht. In allen drei Gewässern beobachtet man generell eine gute Übereinstimmung zwischen theoretischem und gemessenem Chlorophyll; die Abweichungen sind selten größer als 20%. Dies ist um so bemerkenswerter da gerade in diesen drei Gewässern die Dynamik besonders hoch ist.

### 3.3.2. Ursachen für die gefundenen Abweichungen im Verhältnis $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$

Obwohl wir also generell eine relativ gute Übereinstimmung zwischen  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$  feststellen konnten, haben wir in der Datenmatrix, dort wo die Differenzen besonders groß waren, nach Ursachen gesucht. Theoretisch können diese Abweichungen durch drei Hauptursachen entstehen:

- a. die zugrunde gelegten Verhältniswerte sind falsch. In diesem Fall ist zu fragen, wie man "richtigere" Werte ermitteln kann.
- b. die zugrunde gelegten Verhältniswerte sind physiologisch variabel. Dann ist zu untersuchen, ob man aus den Abweichungen etwas über den physiologischen Zustand der Zellen lernen kann.
- c. in der Phytoplanktonprobe tragen weitere Algengruppen zu Chl a bei, die über die Markerpigmente Peridinin, Fucoxanthin, Lutein, Alloxanthin und Zeaxanthin nicht erfaßt werden.

### 3.3.2.1. Verfahren zur Ermittlung von in-situ Xanthophyll/Chlorophyll-Verhältniswerten.

#### 3.3.2.1.1. Das "Mainzer" Modell.

Wir haben drei verschiedene Modelle der Auswertung entwickelt. Das erste Modell, wir nennen es hier "Mainzer Modell", arbeitet mit festen Verhältniswerten von Markerxanthophyll zu Chlorophyll a, die anhand von Laborkulturen ermittelt wurden. Alle unter 3.1 und 3.2. vorgestellten Ergebnisse wurden auf der Grundlage des "Mainzer Modells" ermittelt also mit festen, anhand von Laborkulturen ermittelten Xan/Chl a-Verhältniswerten.

#### 3.3.2.1.2. Das "Iterative" Modell.

Das zweite Modell, wir nennen es hier iterativ, nimmt die Markerxanthophyllverhältniswerte des Mainzer Modells zur Grundlage und paßt die Verhältniswerte für die einzelnen Algenklassen so an, daß sich ein Verhältnis von  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$  von 1 ergibt. Es sollte geprüft werden, ob es entgegen der Annahme, daß alle Algengruppen in gleicher Weise für die Abweichung des gemessenen vom erwarteten Chlorophyll verantwortlich sind, nicht doch Hinweise auf Über- bzw. Unterbewertungen einzelner Algenklassen gibt. Hierbei müssen implizit - genau wie beim Mainzer Modell - feste Verhältnisse der Markerpigmente zum Chl a angenommen werden. In Fig. 25 wurde das Verhältnis  $\text{Chl } a_{\text{theo}}$  (Modellchlorophyll) gegen die prozentualen Algenklassenanteile (AK%) am Beispiel eines Datensatzes aus der Bleilochtalsperre im Juni 1996 aufgetragen. Eine positive Steigung der durch die Punktwolke für eine Algenklasse gelegten Regressionsgeraden deutet darauf hin, daß ihr Anteil relativ zu den restlichen Klassen überbewertet wurde, Umgekehrtes gilt für eine negative Steigung. Das  $r^2$  kann zusätzlich Aufschluß über die quantitative Bedeutung der Abweichung geben: je näher es an 1 ist, um so stärker ist der Effekt; bei 0 ist der Effekt nicht vorhanden. Für den hier verwendeten Datensatz ergibt sich nach diesem System die folgende Interpretation: es wurden Korrelationen gefunden, die stärkste für die Chlorophyceen mit  $r^2=0,47$ . Die Steigungen der Geraden deuten darauf hin, daß die Chlorophyceen im Vergleich zu den anderen Algenklassen durch das Mainzer Modell unterbewertet wurden. Das iterative Modell korrigiert diese Unterbewertung wie folgt:

### 1. Schritt:

Minimieren der Korrelationen von Algenklassenanteilen mit dem Verhältnis  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$ . Die Steigung der Regressionsgeraden und das  $r^2$  geben Hinweise, welche Faktoren in welche Richtung verändert werden müssen. In kleinen "vortastenden" Schritten wird zunächst ein Faktor (Chl a/Markerpigment) verändert (z.B der mit dem größten  $r^2$ ) und der Effekt auf die Modellgüte (Kriterien  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}} = 1$ ) anhand der Grafik beurteilt. Bei Umkehr der Geradensteigung war die Veränderung zu stark, hat sie sich der Waagerechten angenähert, war es ein Schritt in die richtige Richtung, aber möglicherweise noch nicht weit genug. Da sich das Ändern eines Faktors immer auch auf die prozentualen Anteile der anderen Algenklassen auswirkt, kann nicht einfach ein Faktor nach dem anderen angepaßt werden, sondern es muß durch "trial and error" eine zufriedenstellende Lösung gefunden werden. Ab einem gewissen Punkt wird der zeitliche Aufwand für eine weitere (mehr oder weniger unwesentliche) Verbesserung relativ groß und es erscheint sinnvoll, die Modelloptimierung abzubrechen. Das in der Grafik (Fig.25) dargestellte Ergebnis dieses iterativen Verfahrens wurde in wenigen Minuten gewonnen.

### 2. Schritt:

Anpassung des Modell-Niveaus an das Niveau des gemessenen Chl a.

Das durchschnittliche Verhältnis Modell Chl a / gemessenes Chl a wird für die im ersten Schritt erhaltenen Faktoren ermittelt. Alle Faktoren (Chl a/Markerpigment) werden durch das ermittelte Verhältnis dividiert, so daß die neu erhaltenen Faktoren im Modell eingesetzt ein neues durchschnittliches Verhältnis von 1:1 ergeben. Es kann mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 5.0 binnen weniger Minuten ermittelt werden.

### 3.3. 2.1.3. Das "SPSS" Modell (multivariate Regression).

In den verschiedenen Algenklassen kommen neben den Markerxanthophyllen, die für die einzelnen taxonomischen Gruppen jeweils spezifisch sind, auch andere Pigmente vor, die in der Regel immer mit dem Markerpigment vergesellschaftet sind. Stellt man daher eine statistische Korrelationsmatrix auf, in die man zunächst alle getrennten und quantifizierbaren Pigmente einträgt, so ist nicht zu erwarten, daß die einzelnen Pigmente frei variieren, sondern es entsteht ein Korrelationsmuster verbundener Variablen. Wählt man aus der Gesamtdatenmatrix die Markerpigmente aus und korreliert diese in einer multiplen Regressionsanalyse mit dem Chlorophyll a, so werden die Markerxanthophylle zu Prädiktorvariablen, mit denen sich der Chlorophyll a-Gehalt mit einer gewissen statistischen Wahrscheinlichkeit voraussagen läßt. Die multiple Regressionsanalyse kann unter Zuhilfenahme von Koeffizienten oder ohne Koeffizienten durchgeführt werden. Wir haben beide Durchführungsweisen für unterschiedliche Fälle getestet. Im Fall der Verwendung von Koeffizienten setzt man folgende mathematische Beziehung ein:

$$[\text{Chl a}] = \text{konst} + A_k \cdot [\text{Allo}] + F_k \cdot [\text{Fuco}] + L_k \cdot [\text{Lut}] + P_k \cdot [\text{Per}] + Z_k \cdot [\text{Zea}]$$

wobei:

$[\text{Chl a}]$  = die zu erwartende Menge an Chl a in  $\text{pmol L}^{-1}$

konst = Korrelationskonstante

$A_k$  = Koeffizient für Alloxanthin (entsprechend für alle anderen Pigmente)

$[\text{Fuco}]$  = in der Probe gemessene Fucoxanthinkonzentration (entsprechende für alle anderen Markerxanthophylle)

Diese Korrelationsmatrix kann man dann entweder für alle Proben aufstellen, oder man ermittelt sie für jedes Gewässer getrennt. Aus den Korrelationsgeraden lassen sich dann Markerxanthophyll/Chlorophyll a Verhältnisse ermitteln, die nicht mehr auf Messungen an Laboralgen zurückgehen, sondern die denen im Freiland wirklich existierenden Verhältnissen entsprechen. Aufgrund der ausreichend großen Probenzahl können solche Korrelationen dann gewässerspezifisch und sogar Gewässertiefen-spezifisch aufgestellt werden. Tabelle 4 gibt die molaren Xanthophyll/Chlorophyll a-Verhältnisse der Freilandproben aus den Gewässern Neunzehnhain, Schmaler Luzin und TS Dröda an. Da nicht in allen Tiefen und allen Gewässern alle Pigmente vorhanden waren, kann das Signifikanzniveau von 5% auch nicht bei allen analysierten Datensätzen erreicht werden. Es wurden nur solche Verhältniswerte, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% behaftet sind, in die Tabelle eingetragen. In der Zeile "alle Daten" sind aus der Datenmatrix aller Proben der Gewässer neue Verhältniswerte ermittelt und denen aus Laborkulturen gegenübergestellt worden. Man erkennt, daß die Laborverhältniswerte für Peridinin, Fucoxanthin und Alloxanthin sehr gut mit denen aus dem Freiland übereinstimmen, daß aber die Werte für die Grünalgen und die Cyanobakterien an der unteren Grenze liegen und zu niedrig angenommen sind.

Wir schlagen daher für die weitere Praxis vor, diese neuen Verhältniswerte für die Auswertung zu verwenden. Dies führt dazu, daß generell die Übereinstimmung zwischen  $\text{Chl a}_{\text{gem}}$  und  $\text{Chl a}_{\text{theo}}$  um 20-30% höher wird. Bei der Berechnung der prozentualen Verteilung der Algenklassen auf Gesamtchlorophyll a werden die Grünalgen und Cyanobakterien etwas weniger stark gewichtet.

**Tabelle 4**

Verhältnismerte der gruppenspezifischen Caroteninoide zu Chl a in verschiedenen Gewässern ermittelt aus Freilanddaten mittels multipler Korrelationsanalyse. Das Signifikanzniveau der angegebenen Zahlen ist in allen Fällen höher als  $P=0,05$ .

Probenart	n	Fucoxanthin	Peridinin	Lutein	Zeaxanthin	Alloxanthin
Neunzehnhain	66	0,75	0,82	0,29	0,5	0,61
Schm. Luzin	183	0,89	-	0,36	0,35	0,14
Dröda	66	1,00		0,39	0,31	0,49
alle Daten	315	0,96	0,99	0,41	0,31	0,47
Labor		0,85	0,95	0,15	0,12	0,39

Für die meisten Ergebnisse hat dieser veränderte Auswertemodus aber nur eine relativ geringe Konsequenz.

Die multi-variate Regressionsanalyse ohne Koeffizienten wurde am Datensatz der Bleilochtalsperre für das Jahr 1996 getestet. In der Tabelle 5 wurden die Verhältnismerte nach allen drei Modellen vergleichend auf der Datengrundlage der Pigmentmessungen für die Bleilochtalsperre im Jahr 1996 dargestellt.

**Tabelle 5**

Verhältnismerte der gruppenspezifischen Caroteninoide zu Chl a in der Bleilochtalsperre ermittelt aus Freilanddaten mittels drei verschiedener Modellannahmen (Erklärung siehe Text)

Pigment [mol Chl/mol Markerpigment]	Mainzer Modell	Iterativ	SPPS
Fucoxanthin	0,78	0,71	0,80
Alloxanthin	1,68	1,60	1,68
Lutein	4,45	2,48	1,77
Zeaxanthin	5,63	6,15	6,42
Peridinin	kam in der Talsperre nicht vor		

Man erkennt, daß die verschiedenen Auswertemodi nur auf das Markerpigment der Grünalgen und der Cyanobakterien erkennbare Auswirkung haben. In Abbildung 26 haben wir das prozentuale Verhältnis der einzelnen Xan/Chl a-Verhältnisse nach den verschiedenen Modellen am Beispiel der Bleilochtalsperre aufgetragen. Diese Darstel-

lung zeigt letztlich nichts anderes als die Variabilität der Berechnungsgrundlagen der verschiedenen Modelle, wenn man die prozentualen Algenklassenanteile ermittelt. Die Modellannahmen haben offenbar für die Endaussage nur eine relativ geringe Bedeutung, die sich deutlich unterhalb des Zählfehlers bei der Utermöhl-Methode bewegt.

### 3.3.3. Nachweis anderer Algengruppen

In der TS Neunzehnhain wurden an einigen Terminen sehr hohe Konzentrationen an Violaxanthin gefunden. Dieses Pigment kommt sowohl in Grünalgen als auch in Chrysophyceen in relativ geringen Mengen vor, bildet aber bei Eustigmatophyceen das Hauptxanthophyll. In Abwesenheit dieser Gruppe erhält man in einer Korrelationsmatrix aller Pigmente eine enge Koppelung von Violaxanthin mit Lutein und mit Fucoxanthin. Unabhängige Varianz von Violaxanthin und den beiden anderen Pigmenten spricht für die Anwesenheit von Eustigmatophyceen. In der TS Neunzehnhain konnten Eustigmatophyta sowohl im Jahr 1994 als auch 1995 im Plankton z.T. mit erheblichen Beiträgen zum Gesamtchlorophyll identifiziert werden (Fig. 26). Leider kann das Auftreten dieser Algen in der Population kaum mittels mikroskopischer Analyse überprüft werden. Eustigmatophyta sind lichtmikroskopisch nur sehr schwer von Xanthophyceen und von Grünalgen zu unterscheiden, insbesondere dann, wenn sie zum Nanoplankton gehören. So lassen sich z.B. die beiden coccalen Algen *Nanochloris spec.* (Chlorophyta) und *Nannochloropsis spec.* (Eustigmatophyta) nur elektronenmikroskopisch differenzieren. Die kritische Sichtung einiger Arten aus Algensammlungen hat ergeben, daß aufgrund der enormen mikroskopischen Identifizierungsprobleme eine Reihe von Xanthophyceen falsch identifiziert sind und den Eustigmatophyceen zugeordnet werden müssen. Die Tatsache, daß der Zusammenhang zwischen Wasserqualität und dem Vorhandensein von Eustigmatophyceen gänzlich unbekannt ist, liegt darin begründet, daß bislang keine Methode greifbar ist, diese Algen in natürlichen Planktonproben sicher identifizieren zu können. Die HPLC-Methode wird in Zukunft möglicherweise hier Aufklärung bringen können.

## 3.4. Die Pigmentanalyse als ein neues Instrumentarium zur Charakterisierung der Phytoplanktonaktivität?

Es konnte gezeigt werden, daß der Anteil der in den Zellen vorhandenen Chlorophyllabbauprodukten Phaeophytin, Chlorophyllid und Phaeoid in der Regel lag die Summe dieser Substanzen unter 6-8% des Gesamtchlorophylls. Allerdings wurde in Proben, die aus aphotischen Schichten entnommen wurden auch deutlich höhere Konzentrationen registriert. Auch zeigt sich im Verlauf eines Jahresganges der prozentuale Anteil an Chlorophyllabbauprodukten nicht konstant. Die Daten deuten darauf hin, daß absterbende Algen und stark unter grazing-Druck stehende Populationen einen erhöhten Anteil dieser Substanzen erhalten (Head et al. 1994). Erst

systematische Studien werden ausreichend sichere Daten liefern, ob die Menge an Chlorophyllabbauprodukten mit einer physiologischen Aktivität zu korrelieren ist oder als ein Maß für den Fraßdruck interpretiert werden kann. Diese ersten Hinweise zeigen aber, daß die Methode hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit noch nicht vollständig ausgeschöpft ist. Wilhelm and Manns (1991) konnten zeigen, daß bei Algen, die sich in der poststationären Entwicklungsphase befinden, der Chlorophyllabbau früher einsetzt als die Degradation der Xanthophylle. Erhöhte Xan/Chl a-Verhältniswerte können daher einen Hinweis liefern, ob die Zellen sich noch in der aktiven Wachstumsphase befinden. Besonders wertvoll wäre es, wenn sich erhöhte Xan/Chl a-Verhältniswerte zusammen mit erhöhten Konzentrationen an Chlorophyllabbauprodukten zu einem Prognoseinstrument ausbauen ließe, das erlaubt vorherzusagen, ob eine Population weiter an Biomasse zunehmen wird, oder ob das Maximum überschritten ist. Ein solches Prognoseinstrument könnte gerade dann von Bedeutung sein, wenn in der Trinkwasserbewirtschaftung kritische Phytoplanktondichten erreicht sind und das Risiko von kurzfristigen Bewirtschaftungsengpässen besteht, wenn sich eine Planktonblüte weiter entwickelt.

#### 4. Fazit

In dem Vorhaben konnte durch die Ermittlung des Quotienten  $\text{Chl } a_{\text{gem}}/\text{Chl } a_{\text{theo}}$  ein Parameter gefunden werden, der eine kritische Überprüfung der Berechnungsgrundlagen zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Algenklassen zum Gesamtchlorophyll erlaubt. Es konnten über eine statistische Methode neue Xanthophyll-Verhältniswerte ermittelt werden. Die Verwendung dieser neuen Berechnungswerte führt insgesamt zu einer noch höheren Übereinstimmung zwischen gemessenem und postuliertem Chlorophyll. Bei der Berechnung des prozentualen Anteils der Algenklassen am Gesamtchlorophyll werden etwas geringe Anteile für die Chlorophyceen und Cyanobakterien ermittelt. Die neuen Berechnungsgrundlagen sind für die Routinepraxis ausreichend genau und zuverlässig. Der mittlere maximale Fehler kann mit etwa 20% angenommen werden. Die statistische Auswertung erlaubte erstmalig die Identifizierung und quantitative Abschätzung der Eustigmatophyceen zum Gesamtchlorophyll. Die quantitative Analyse der Chlorophyllabbauprodukte liefert möglicherweise Hinweise auf die Intensität des Zooplanktongrazings und/oder Instabilitäten in der Phytoplanktonstruktur. Im Vergleich zur mikroskopischen Analyse werden sehr ähnliche qualitative Ergebnisse erzielt, die beobachteten quantitativen Unterschiede zwischen beiden Methoden gehen auf die Bezugsgröße zurück. Trotz der bestehenden Einwände (White et al., 1988) ist Chlorophyll in der Routinepraxis der wichtigste Trophieindikator ist, so daß es für die Bestimmung der Phytoplanktonzusammensetzung eine sinnvollere Bezugsgröße darstellt als das Biovolumen, über das in der Regel in der Routineüberwachung keine Information

vorliegt. Nach Abschluß der Arbeiten kann die Methode für die Routinepraxis empfohlen werden.

## **5. Zeit- und Kostenplanung**

Das Projekt ist abgeschlossen und die bewilligten Finanzmittel wurden zeit- und verwendungsgerecht vollständig verausgabt. Hinsichtlich des rechnerischen Abschlusses wird auf ein Begleitschreiben verwiesen.

Leipzig, den 20.6.1997

Prof. Dr. Christian Wilhelm

## 6. Vorträge und Veröffentlichungen

WILHELM, C., VOLKMAR, P., LOHMANN, C., BECKER, A. and M. MEYER

*The HPLC-aided pigment analysis of phytoplankton cells as a powerful in water quality control. J. Water SRT - Aqua 44, 132-141, 1995*

C. WILHELM, C. LOHMANN und P. VOLKMAR:

*Erfahrungen mit der HPLC-gestützten Pigmentanalyse zur quantitativen Bestimmung der Phytoplanktonzusammensetzung - Probleme und Perspektiven, BMBF-Status-Seminar, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH (Hrgb), S.62-67, Dresden, 1996*

C. LOHMANN, C. WILHELM

*Vergleichende Phytoplankton-Untersuchungen unterschiedlicher Trophiestufen anhand der Lichtmikroskopie und der HPLC-gestützten Pigmentanalyse - Möglichkeiten und Grenzen der chromatographischen Methode zur Phytoplankton-Erfassung. in Fachgruppe Wasserchemie, Jahrestagung 1997, pp. 132-135 ISBN 3-924763-63-1*

WILHELM, C., LOHMANN, C.,

*Recent Progress in the analysis of the phytoplankton community structure and the determination of its photosynthetic activity. In: the Microbial Quality of Water (Ed. D.W. Sutcliffe) pp. 81-91, Freshwater Biological Associations special Publications, Ambleside, U.K. 1997*

C. LOHMANN, C. WILHELM

*HPLC-Fingerprinting as a quantitative Method to estimate Phytoplankton assemblages in waters of different trophic state. Abstract on 6th Intern. Phycol. Congress, Leiden, 1997*

## 7. Zitierte Literatur

Anonymus. Chlorophyll. In: Chesceri, L.S.; Greenberg, A.E., Trussell, R.R. (Eds.) Standard Methods for the Examination of water and wastewater. American Health Association, American Water Works Association, American Water Pollution Control Federation, chapter 10-30, pp. 10-39. (1989)

Barlow, R.G., Gough, M.A., Mantoura, R.F.C. and Fileman, T.W. Pigment signatures of the phytoplankton in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom. Deep-Sea Research 40 (2), (1993).

Bernhardt, H. and Wilhelms, A. Der Einfluß algenbürtiger organischer Verbindungen auf den Flockungsprozeß bei der Trinkwasseraufbereitung. In K. Aurand et al. (Eds.), Organische Verbindungen in der Umwelt. Berlin, pp. 112-146 (1978).

Elser, J.J., Marzolf, E.R. and Goldman, C.R. Phosphorus and Nitrogen Limitation of Phytoplankton in the Freshwaters of North America: A review and Critique of Experimental Enrichments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47, 1468-1477 ( 1990).

Epler, K.S., Sander, L.C., Ziegler, R.G., Wise, S.A. and Craft, N.E. Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. Journal of Chromatography 595, 89-101, (1992).

Everitt, D.A., Wright; S.W., Volkman, J.K., Thomas, D.P. and Lindstrom, E.J. Phytoplankton community compositions in the western equatorial Pacific determined from Chl and carotenoid pigment distributions. Deep-Sea Research 37 (6), 975-997 (1990).

Garrido, J.L. and Zapata, M. High performance liquid chromatographic separation of polar and non-polar chlorophyll pigments from algae using a wide pore polymeric octadecyl-silica column. Journal of High Resolution Chromatography 16, 229-233, (1993).

Goodwin, T.W., Britton G. In Goodwin, J.W. (Ed.), Plant Pigments, Academic Press, London. pp. 61-132 (1988).

Gorham, E., Lund, W.G. Sanger, J.E and Dean, W.E. Some relationships between Algal Standing crop, water chemistry and sediment chemistry in the English Lakes Limnology and Oceanography. 19, 601-617 ( 1974).

Head, E.J.H., Hargrave, B.T. and Subba Rao, D.V. Accumulation of a phaeophorbide a-like pigment in sediment traps during late stages of a spring bloom: A product of dying algae? Limnology and Oceanography 39 (1), 176-181 (1994).

Kohata, K., Watanabe, M. and Yamanaka, K. Highly sensitive determination of photosynthetic pigments in marine in situ samples by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography 558, 131-140 (1991).

Kraay, G.W., Zapata, M. and Veldhuis, M.J.W. Separation of chlorophylls  $c_1$ ,  $c_2$  and  $c_3$  of marine phytoplankton by reversed-phase- $C_{18}$ -high-performance liquid chromatography. Journal of Phycology 28, 708-712 (1992).

Lund, J.W. Eutrophication. Proceedings of the Royal Society of London 180, 371-382 (1972 ).

Lund, J.W.G., Kipling, G. and Le Cren, E.D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia 11, 143-170 (1958).

Rowan K.S. Photosynthetic pigments of algae. University Press, Cambridge (1989).

Scharf, B., Hamm, A. and Steinberg, C. Seerestaurierung. Limnologie für die Praxis. - Grundlagen des Gewässerschutzes 280.5, Ecomed Verlag, Landsberg/Lech (1984).

Utermöhl, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. Mitteilungen der internationalen Vereinigung für Limnologie 9, 1 - 39 (1958).

Weisse T. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. Advances in Microbiology and Ecology 13, 327-370 (1993).

White, E., Payne, G. and Pickmere, S. A limitation to the usefulness of chlorophyll as a biomass indicator in eutrophication studies. Verhandlungen Internationaler Vereinigungen für Theoretische und Angewandte Limnologie 23, 598-601 (1988).

Wilhelm, C. The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. Plant Physiology and Biochemistry 28 (2) 293-306 (1990).

Wilhelm, C. and Manns, L. Changes in pigmentation of different phytoplankton species during growth und steady state culture conditions. Journal of Applied Phycology 3, 305-310 (1991).

Wilhelm, C., Rudolph, I. and Renner, W. A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage - A study from Lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany). Archiv für Hydrobiologie 123, 21 - 35 (1992).

Wilhelm, C., Volkmar, P., Lohmann, C., Becker, A. and Meyer, M. The HPLC-aided pigment analysis of phytoplankton cells as a powerful tool in water quality control. Journal of Water Research - Aqua 44, 132-144 (1995).

Williams, R. and Claustre, H. Photosynthetic pigments as biomarkers of phytoplankton populations and processes involved in the transformation of particulate organic matter at the Biotrans site (47°N, 20°W). Deep-Sea Research 38 (3), 347-355 (1991).

Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland, T., Repeta, D. and Welschmeyer, N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series 77, 183-196 (1991).

Zapata, M. and Garrido, J.L. Influence of injection conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. Chromatographia 31, 589-594 (1991).

**Tabelle 1 Die wichtigsten Carotinoide verschiedener Algenklassen**

<u>Algenklasse:</u> <u>Carotenoid</u>	<u>Chlorophyta</u>	<u>Bacillariophyceae</u>	<u>Dinophyceae</u>	<u>Cryptophyta</u>	<u>Cyanophyta</u>
<i>a</i> -Carotene	+	-	-	+	-
$\beta$ -Carotene	+	+	+	-	+
Echinenone	-	-	-	-	+
Lutein	+	-	-	-	-
Zeaxanthin	+	-	-	-	+
Neoxanthin	+	-	-	-	-
Violaxanthin	+	-	-	-	-
Fucoxanthin	-	+	(+)	-	-
Diatoxanthin	-	+	-	-	-
Diadinoxanthin	-	+	+	-	-
Peridinin	-	-	+	-	-
Alloxanthin	-	-	-	+	-
Myxoxanthophyll	-	-	-	-	+

(+) = nur in Spuren vorhanden

**Tabelle 2** Retentionszeiten ( $R_t$ ) und spektrale Eigenschaften der über HPLC-getrennten Pigmente

Pigment	<u>ermittelt aus Standards</u>				<u>ermittelt aus Freilandproben</u>				<u>Referenzdaten aus Literatur</u> <u>[Wright et al. 1991]</u>			
	$R_t$ [min]	Absorptionsmaxima [nm]			$R_t$ [min]	Absorptionsmaxima [nm]			Absorptionsmaxima [nm]			Solvens
Chl ide b	<b>4.250</b>	464.3	600.6	648.4/654.3					453	598	645	Aceton
Chl ide a	<b>4.900</b>	435.3	620.1	664.1								
Chl ide a´	<b>5.350</b>	435.3	585.9	625.0/664.0								
Chl ide a	<b>5.650</b>	430.5	620.1	664.1					449	581	629	Aceton
Chl c <sub>2</sub>	<b>6.567</b>	445.0	581.0	629.9	<b>6.538</b>	445.0	581.0	629.9				
Chl ide a´´	<b>8.033</b>	430.5	620.1	664.1								
Peridinin	<b>9.750</b>	474.0			<b>9.738</b>	474.0			472			Eluent
Oscillaxanthin	<b>10.267</b>	469.2	498.3	532.3								
Fucoxanthin	<b>11.250</b>	449.8			<b>11.238</b>	449.8			446			Eluent
Neoxanthin	<b>11.800</b>	416.0	440.1	469.2					416	441	470	Eluent
α-THC	<b>12.267</b>		449.8	474.0								
Violaxanthin	<b>13.767</b>	416.0	440.1	474.0	<b>13.805</b>	416.0	440.1	474.0	416	440	470	Eluent
Myxoxanthin	<b>14.717</b>		478.9	508.0								
Diadinoxanthin	<b>15.167</b>		449.8	478.9	<b>15.222</b>	425.7	449.8	478.9	422	446	476	Eluent
Alloxanthin	<b>16.350</b>		454.7	483.7	<b>16.422</b>		454.7	483.7		454	484	Eluent/Aceton
Lutein	<b>17.667</b>		449.8	478.9	<b>17.738</b>		449.8	478.9		446	476	Eluent/Aceton
Zeaxanthin	<b>18.083</b>		454.7	478.9	<b>18.155</b>		454.7	478.9		454	478	Eluent
Chl b	<b>19.833</b>	459.5	595.7	644.5	<b>19.822</b>	459.5	595.7	644.5	453	598	645	Aceton
Chl a *	<b>20.850</b>	430.5	615.2	664.1	<b>20.838</b>	430.5	615.2	664.1	425	616	664	eluent
Chl a	<b>21.600</b>	430.5	581.0	615.2/664.1	<b>21.605</b>	430.5	581.0	615.2/664.1	431	618	665	eluent
Chl a *					<b>22.288</b>	430.5	620.1	664.1				
β-Carotin					<b>26.305</b>	454.7	478.9			461		Aceton

$R_t$ : Retentionszeit gemessen am Peakmaximum

**Tabelle 3 Berechnung der relativen Algenklassenverteilung**

<b>Pigment</b>	<b>Fläche</b>	<b>[pmol]</b>	<b><u>Xanthophyll</u> 1000 Chl a</b>	<b><u>pmol Xan</u> nmol Chl a</b>	<b><u>Anteil am Chl a</u> [%]</b>	<b>Algengruppe</b>
Zeaxanthin	108262	85	6.95	117	15.65	Cyanophyceae
Lutein	254763	206	16.91	149	48.18	Chlorophyceae
Fucoxanthin	232034	307	25.14	850	9.85	Diatomeen <sup>1</sup>
Peridinin	91113	149	12.22	951	4.28	Dinoflagellaten
Alloxanthin	531616	419	34.34	393	29.13	Cryptoflagellaten
Chlorophyll a	3183781	12198 gemessen			100.0	
		13064 berechnet <sup>2</sup>			107.2	
					7.2 % Fehler	

pmol = ng/Molekulargewicht - ng Pigment wurde berechnet aus Kalibrationsgeraden für jedes Pigment

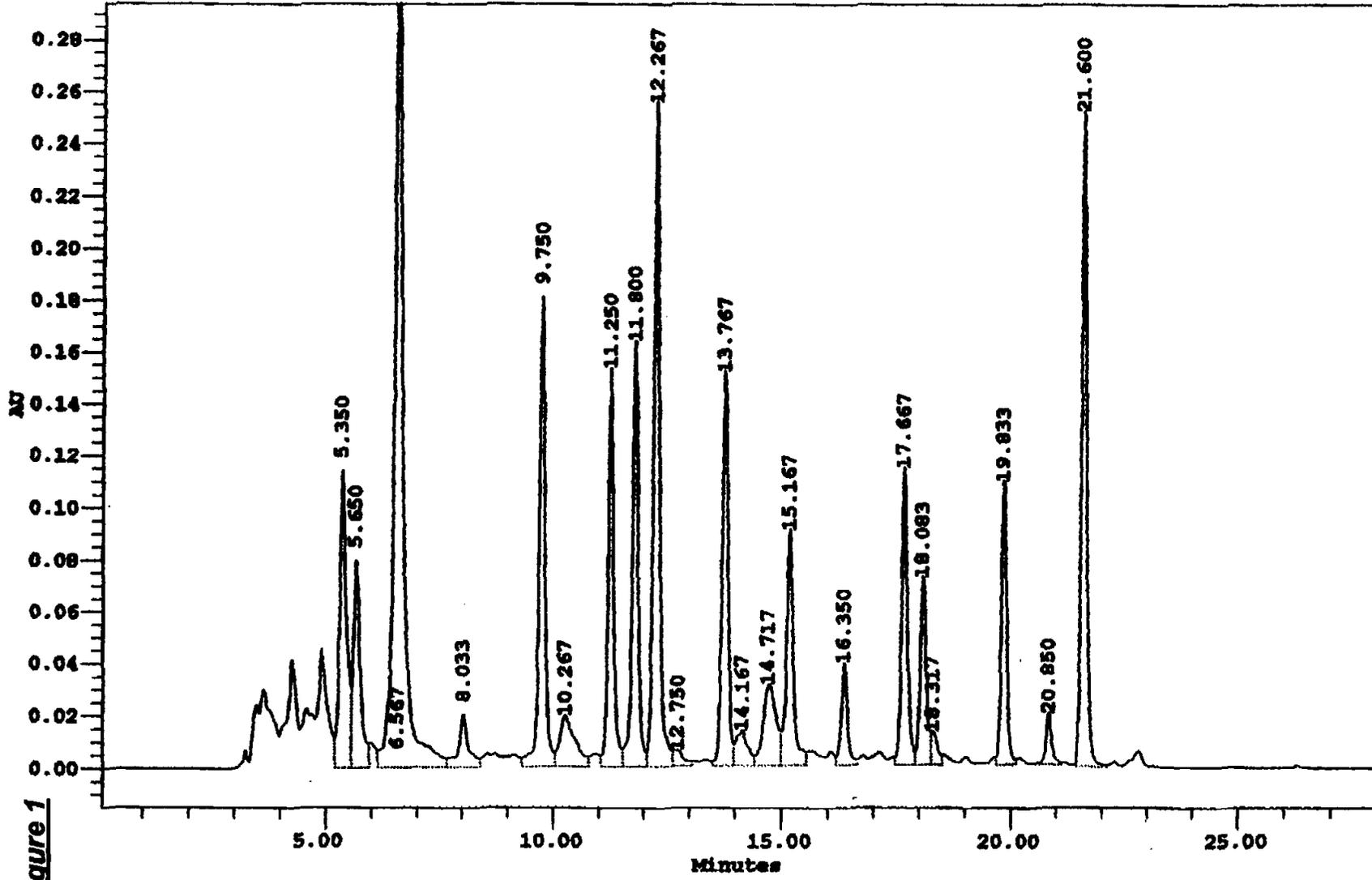
pmol Xan/nmol Chl a = molares Verhältnis des Markerxanthophylls zu Chlorophyll a ermittelt aus Laborkulturen von jeder der genannten Algengruppen nach Renner et al., 1992

<sup>1</sup> Diatomeen einschließlich von Chrysophyceen

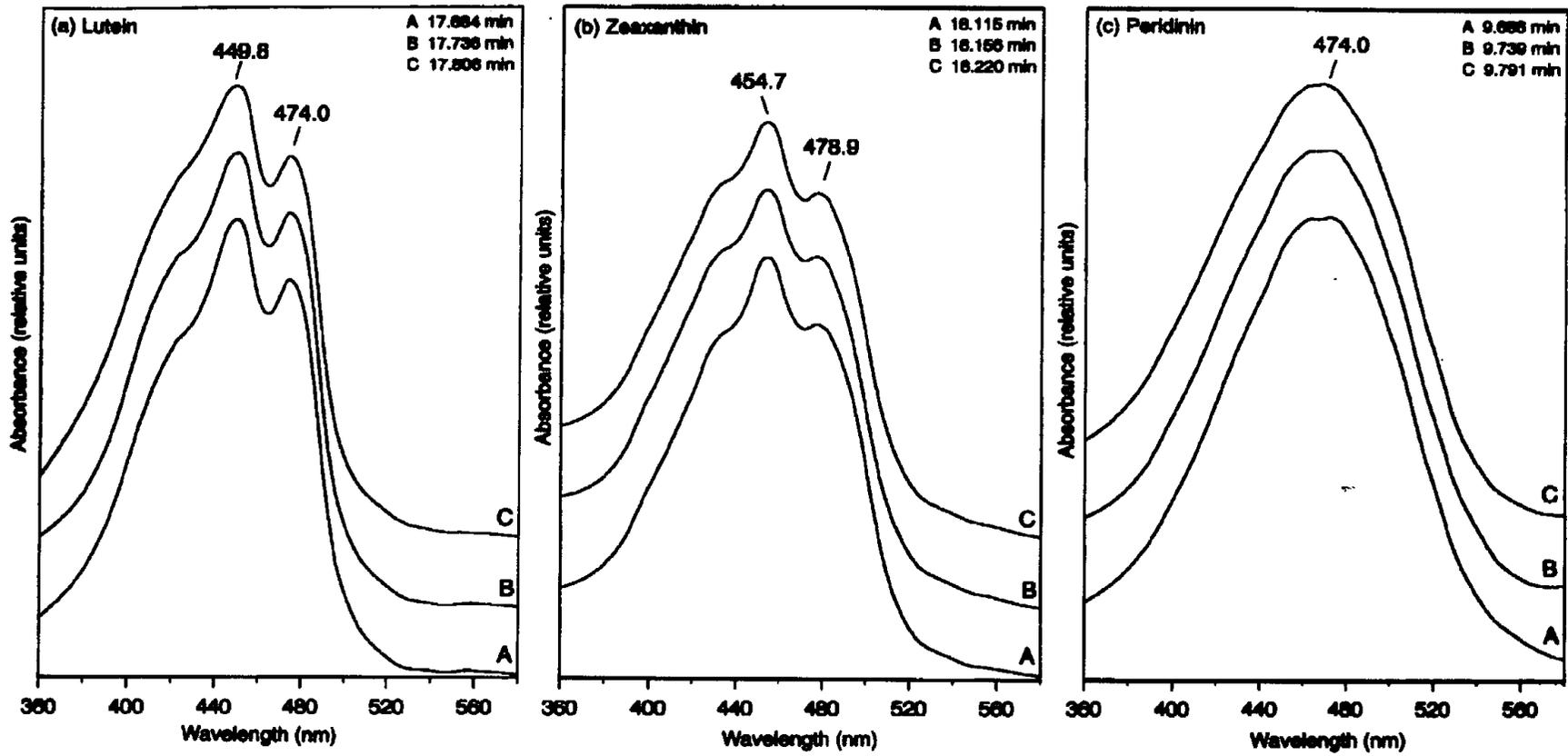
<sup>2</sup> theoretisch errechnete Chlorophyllmenge auf der Grundlage der Xan/Chl a-Verhältnisse und der bestimmten Xanthophyllflächen (siehe Text)

HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

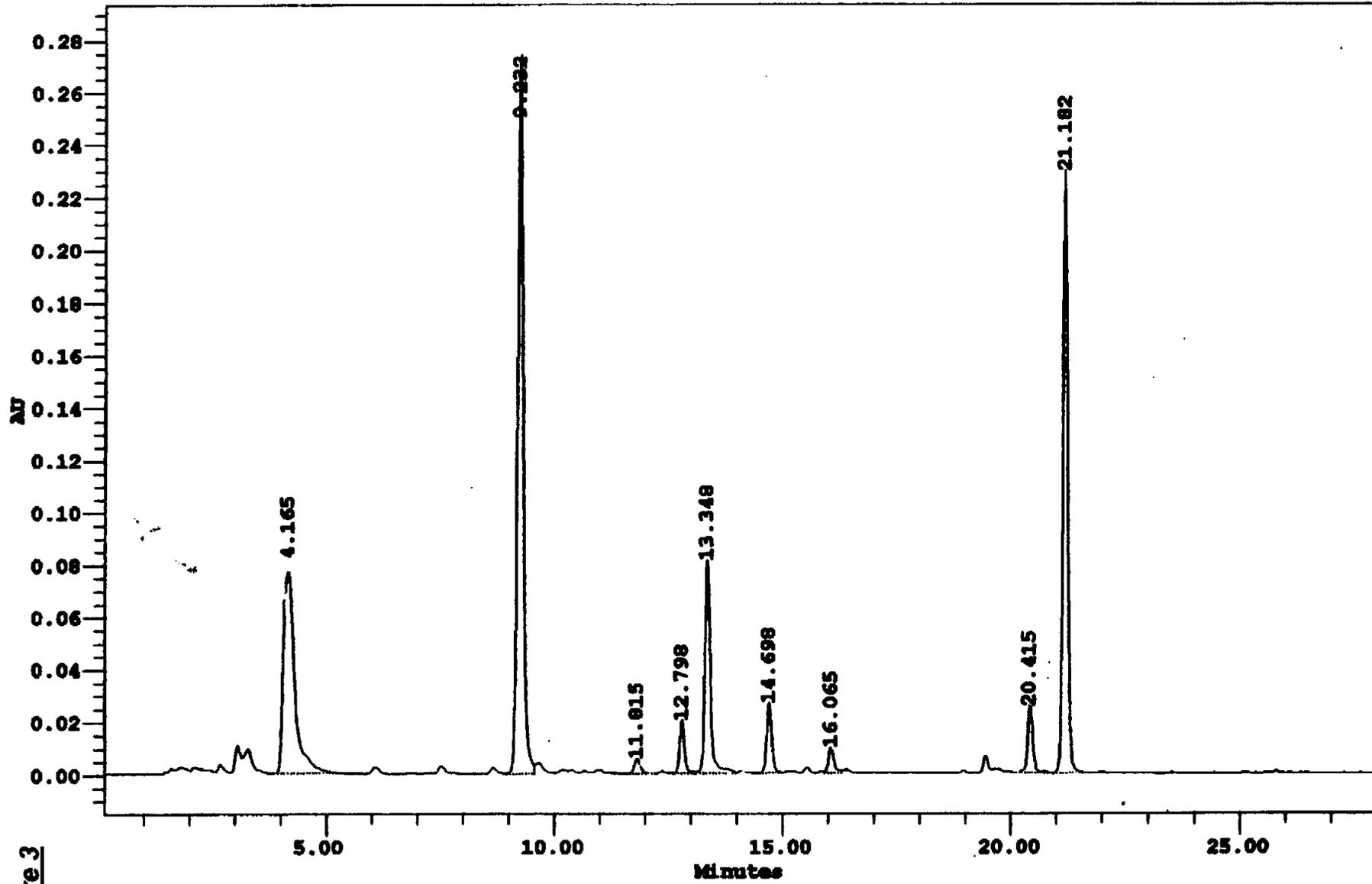
Figure 1



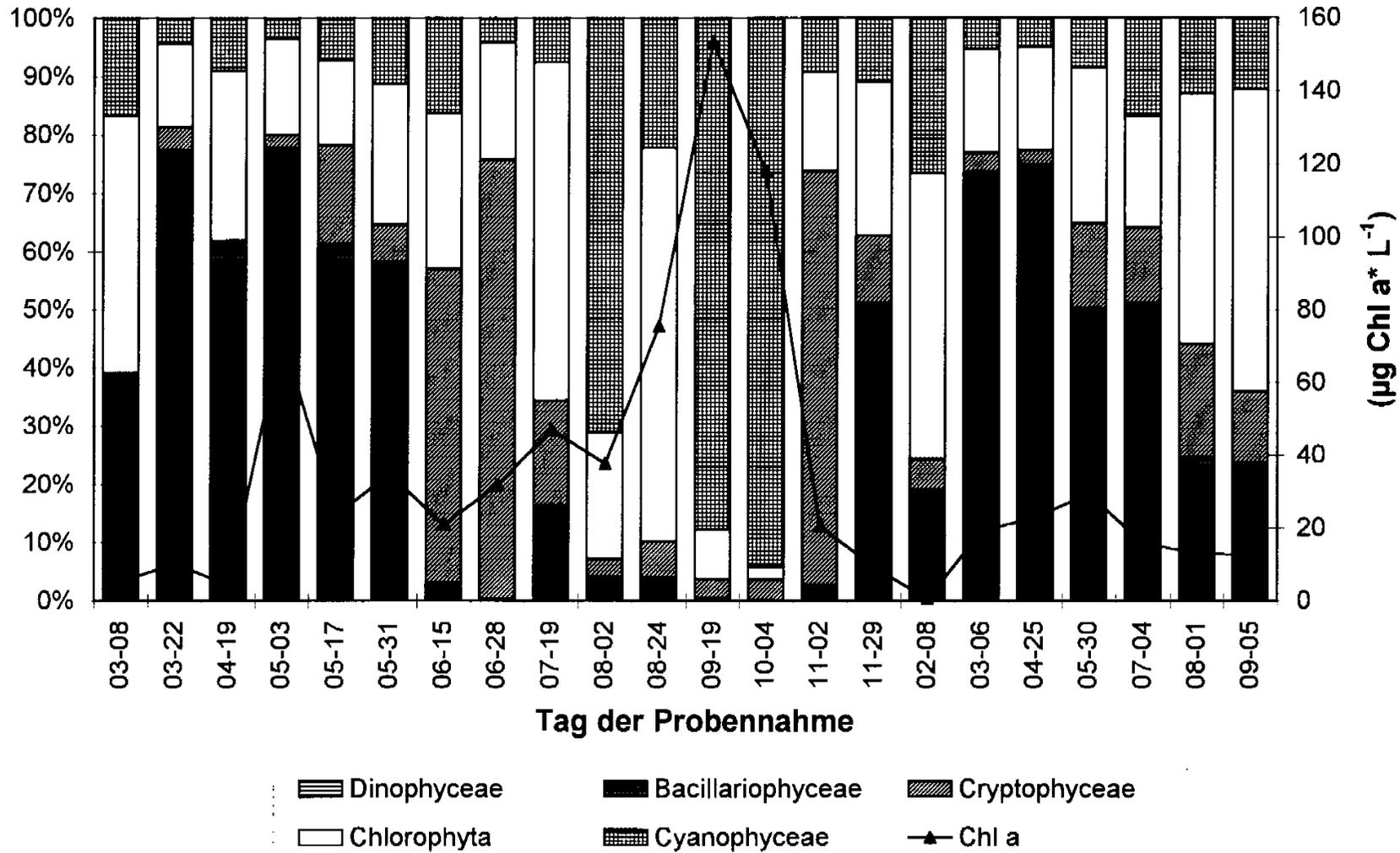
**Figure 2**



**Figure 3**



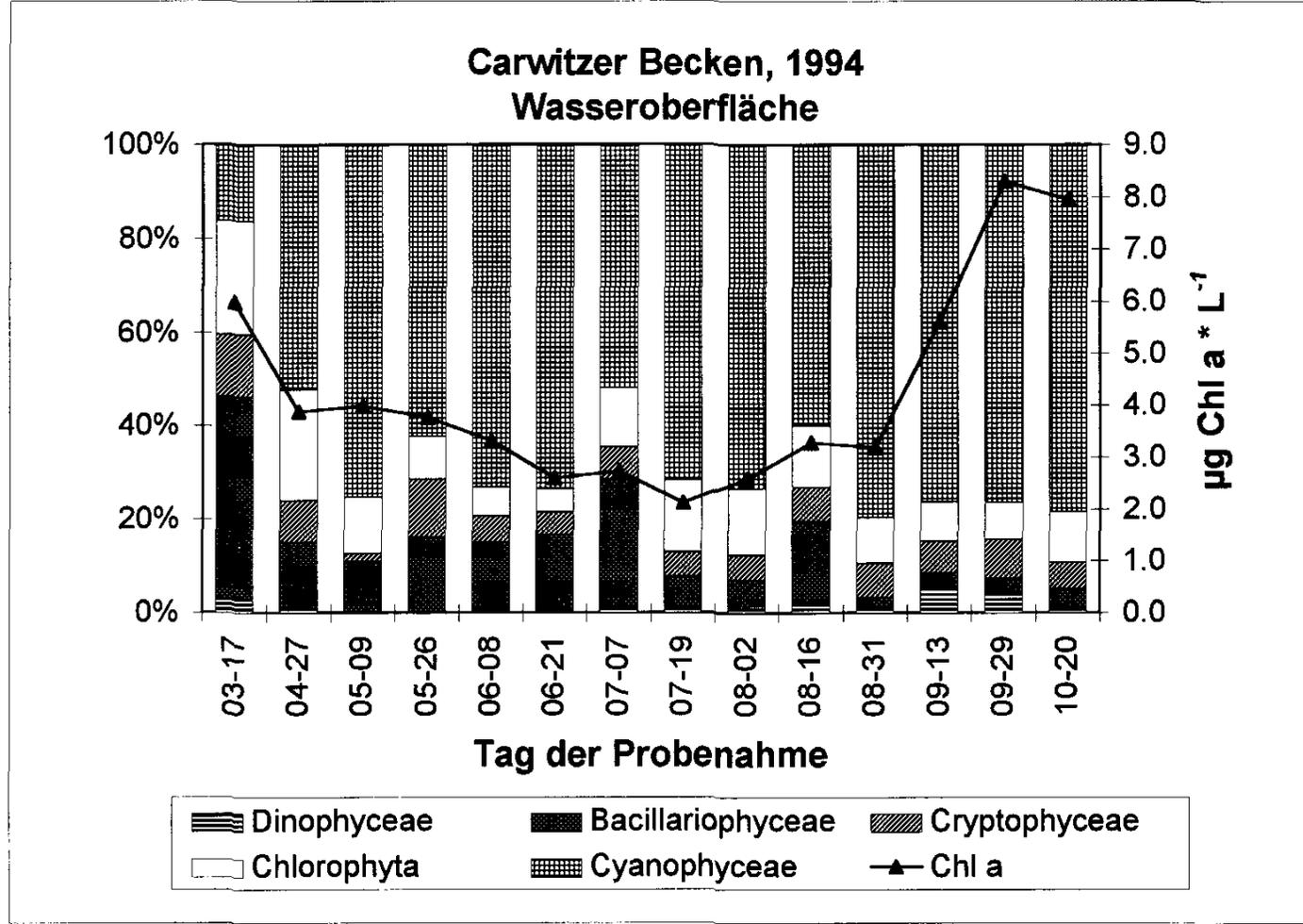
Vorsperre Ramoldsreuth  
1994/95



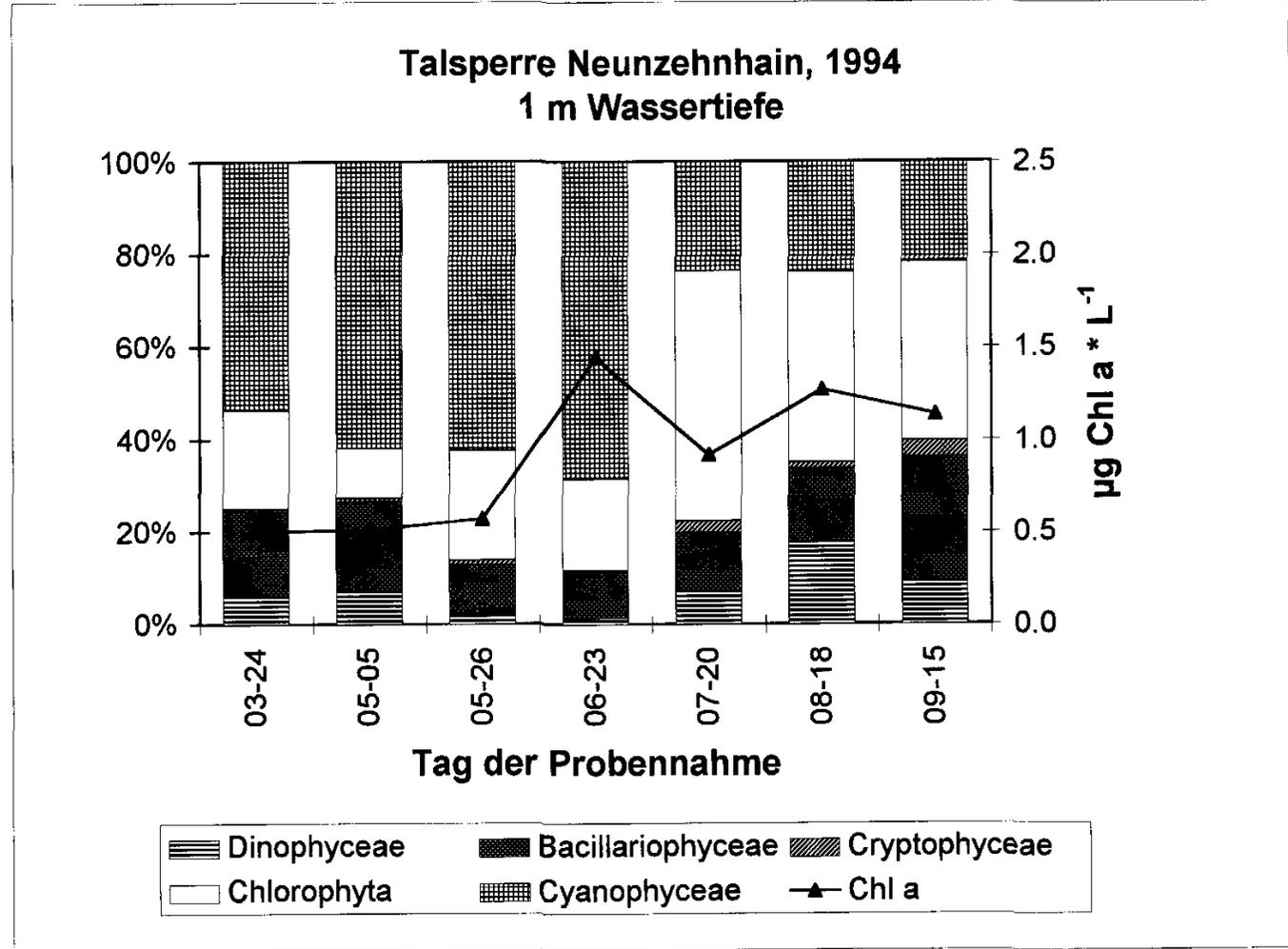
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

Figure 4

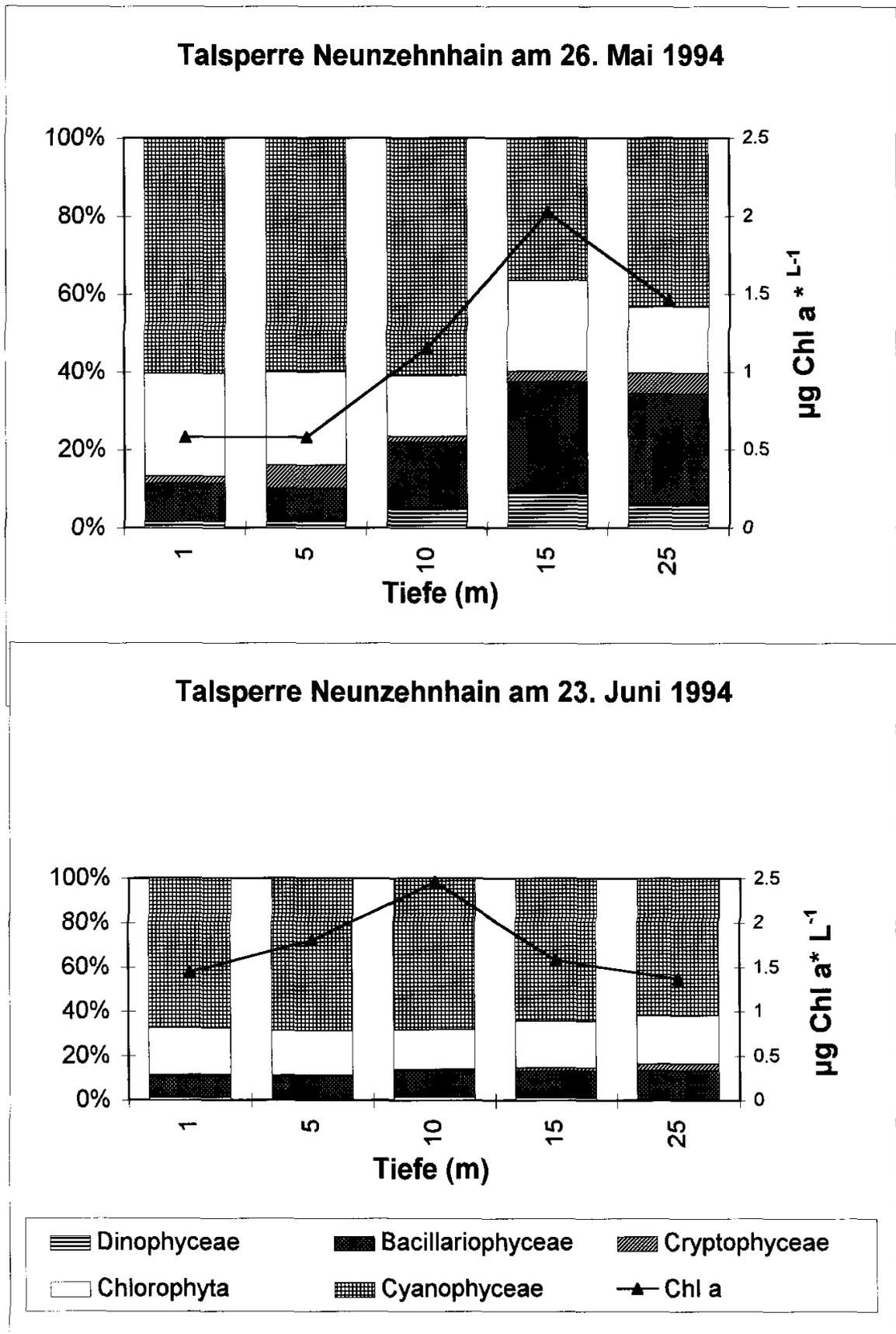
**Figure 5**



**Figure 6**

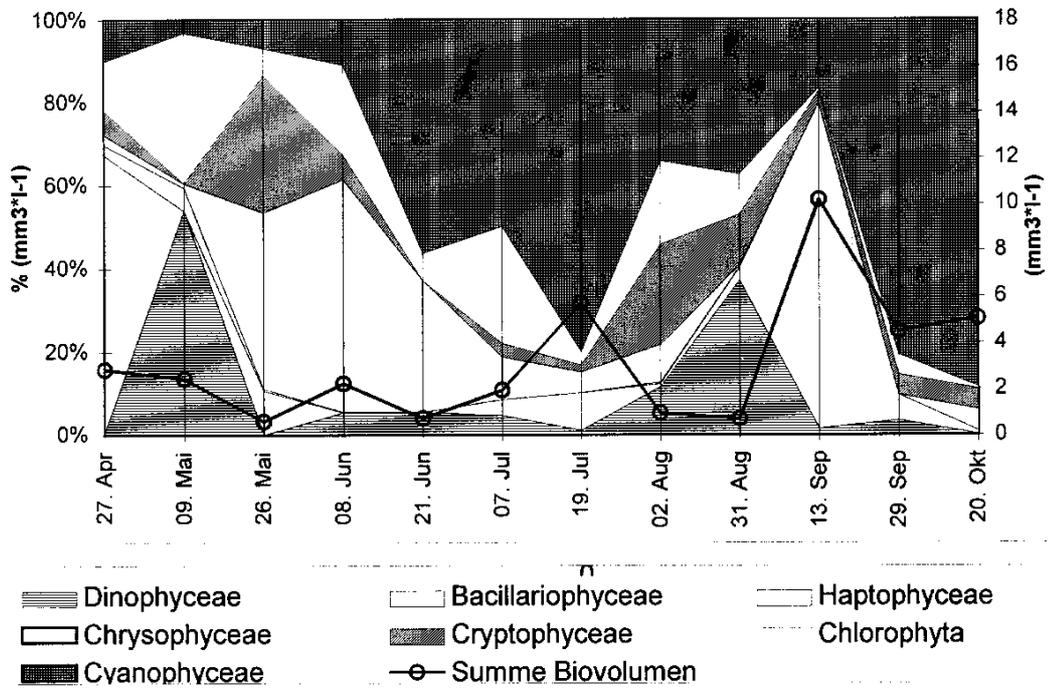


**Figure 7**

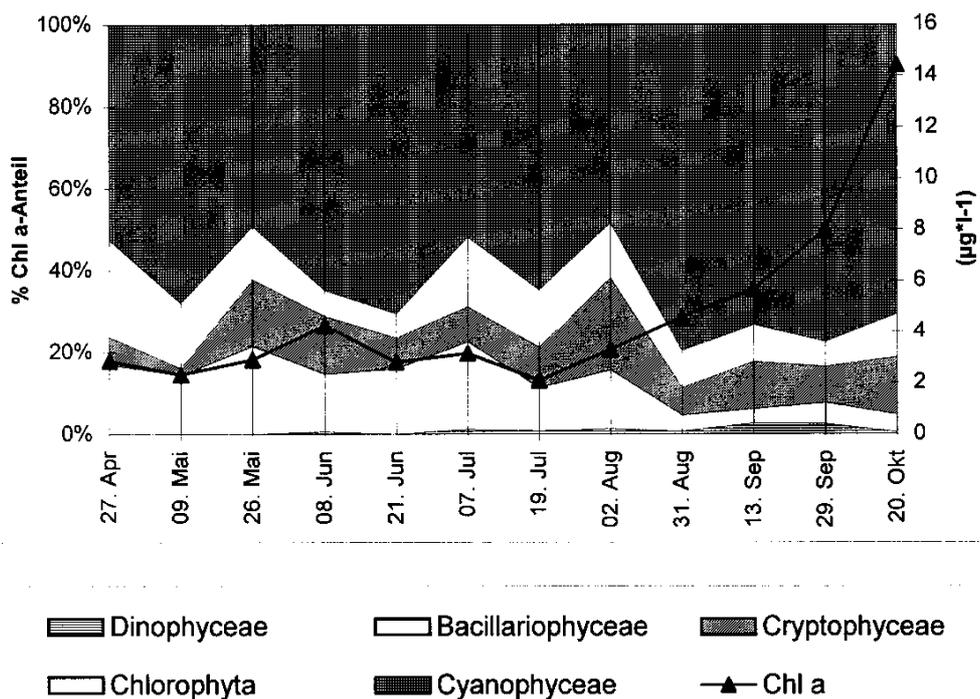


**Figure 8**

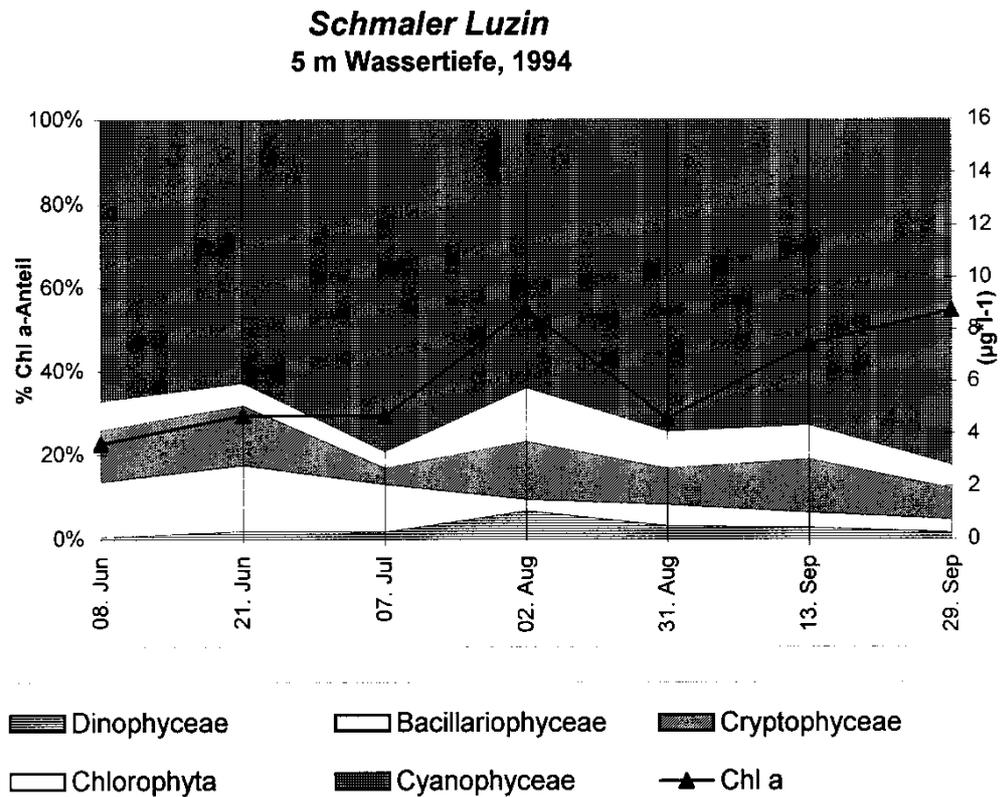
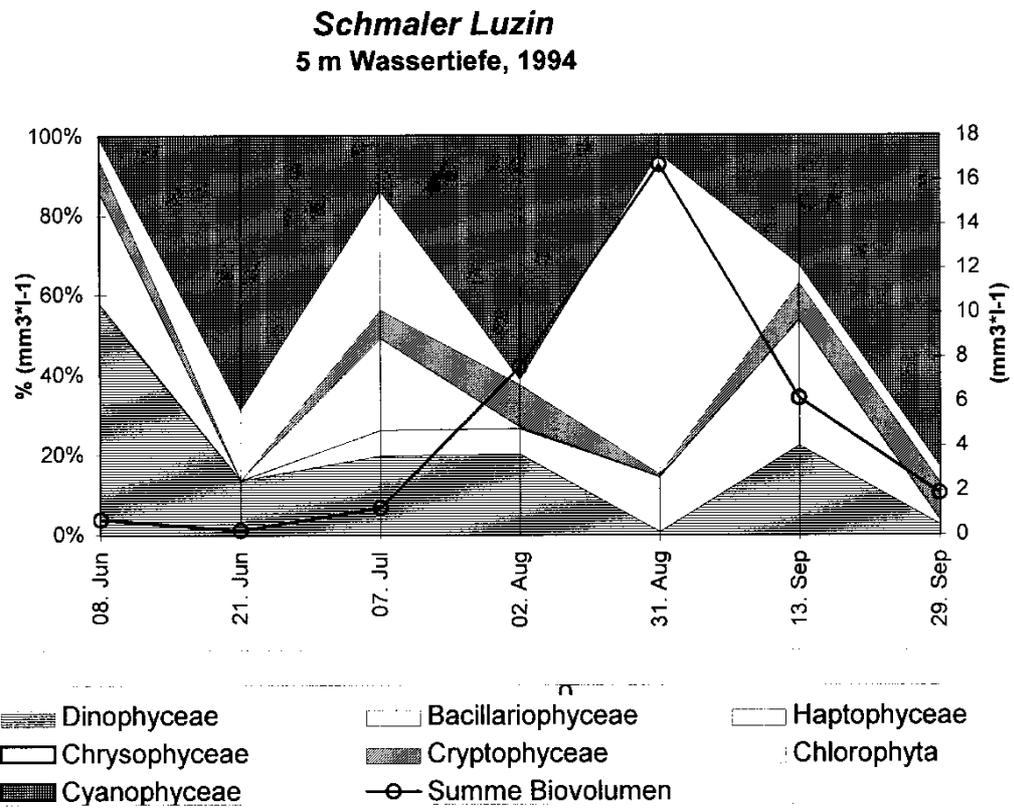
**Schmaler Luzin  
Wasseroberfläche, 1994**



**Schmaler Luzin  
Wasseroberfläche, 1994**

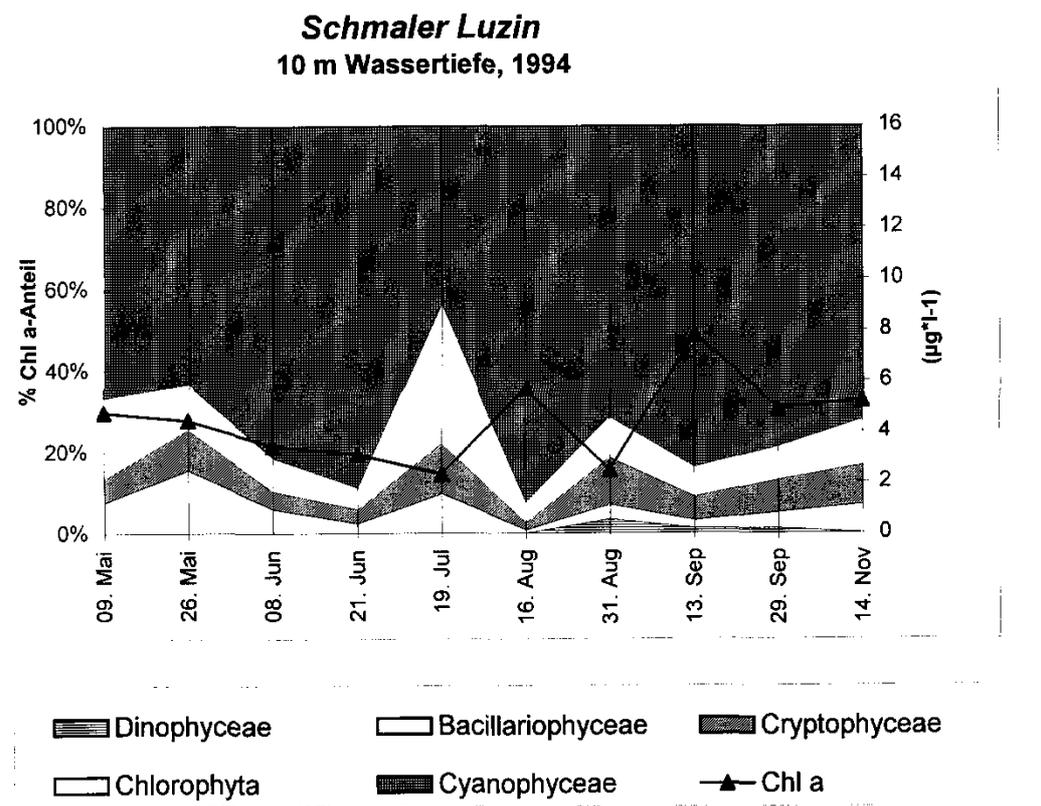
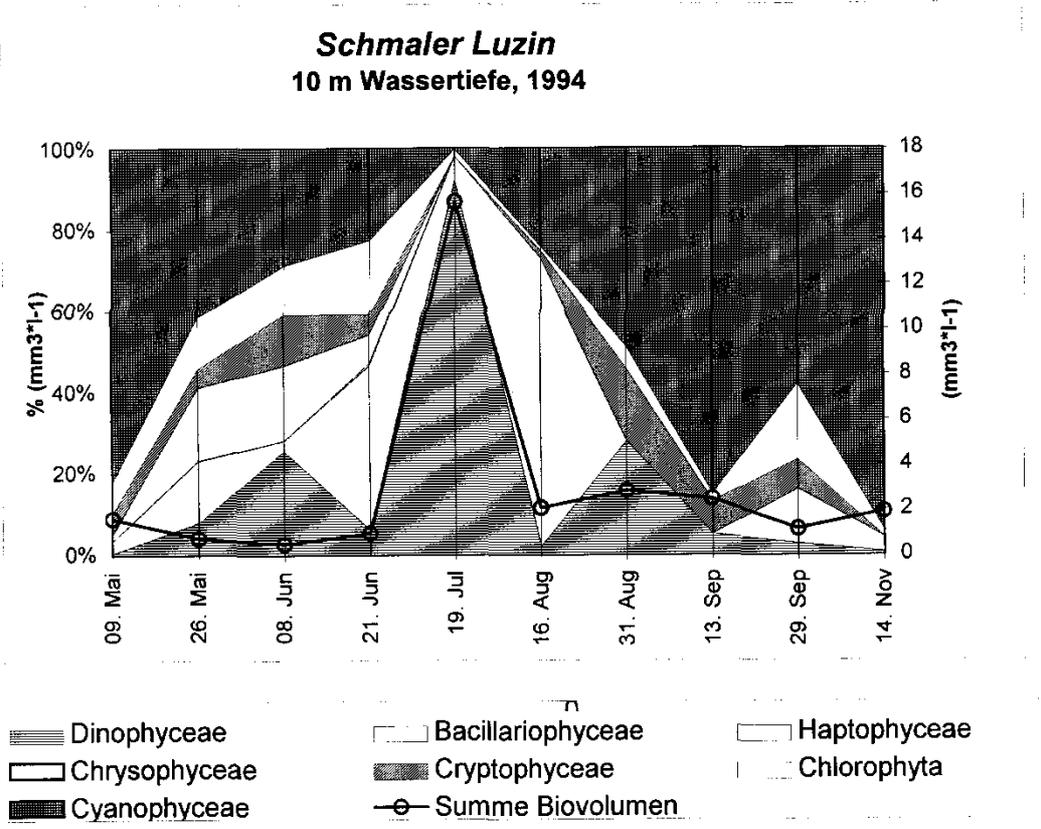


**Figure 9**



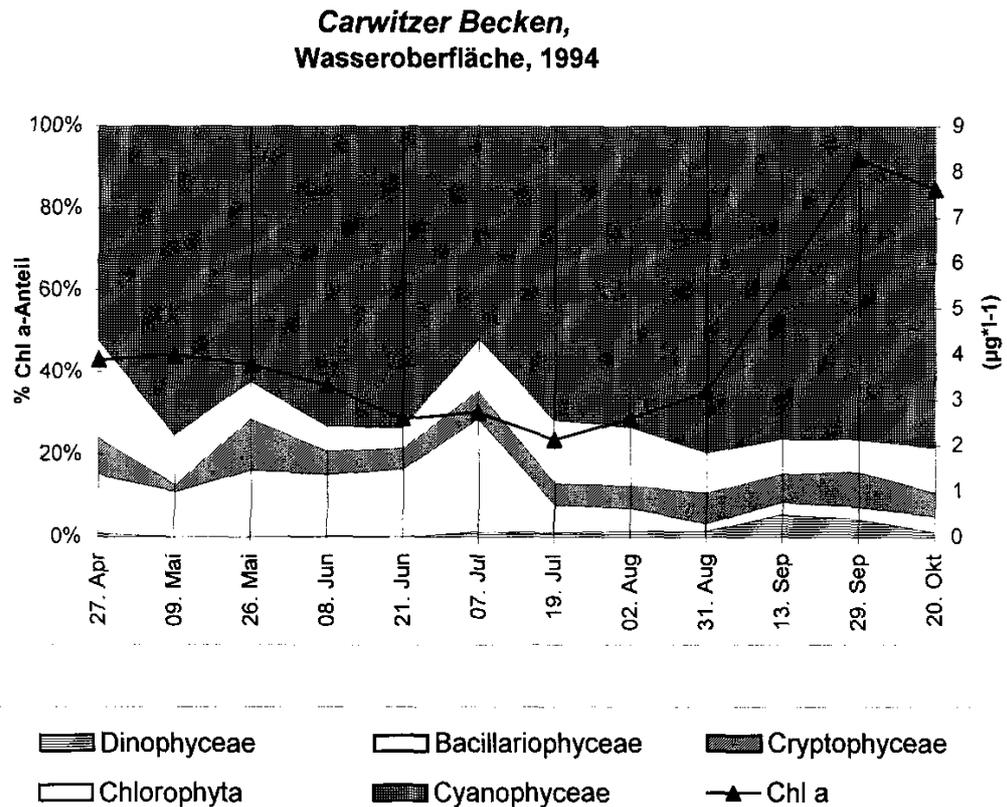
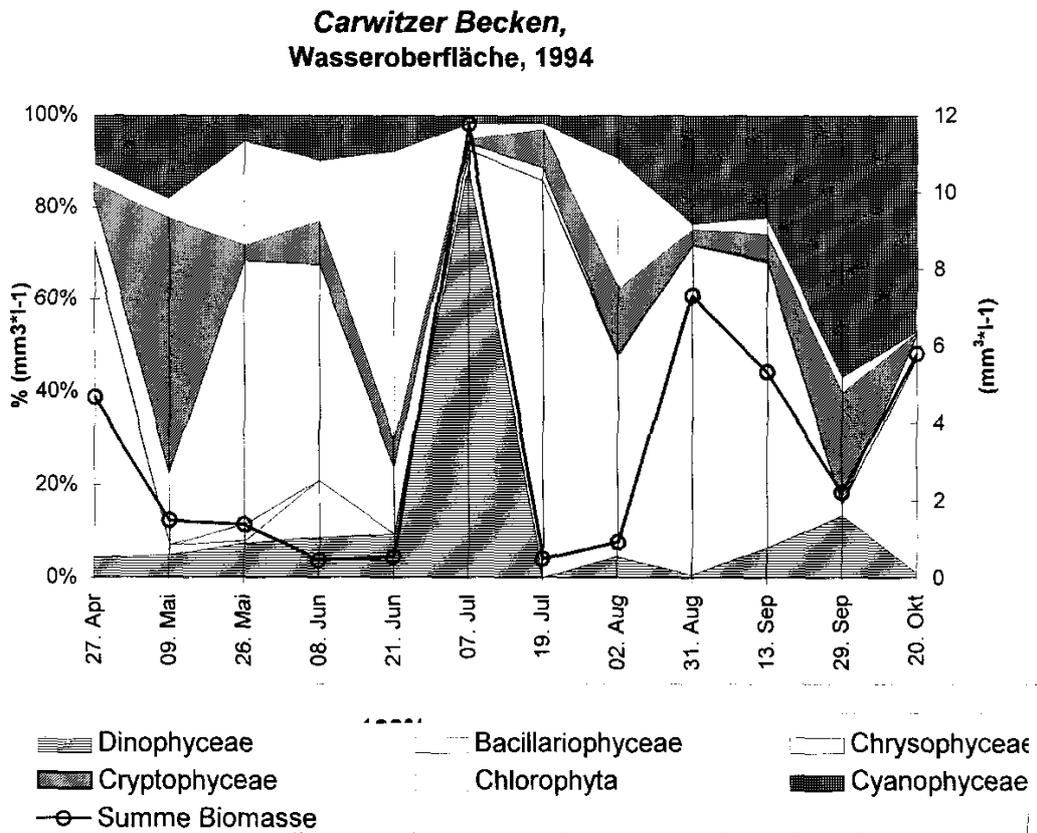
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 10**



HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

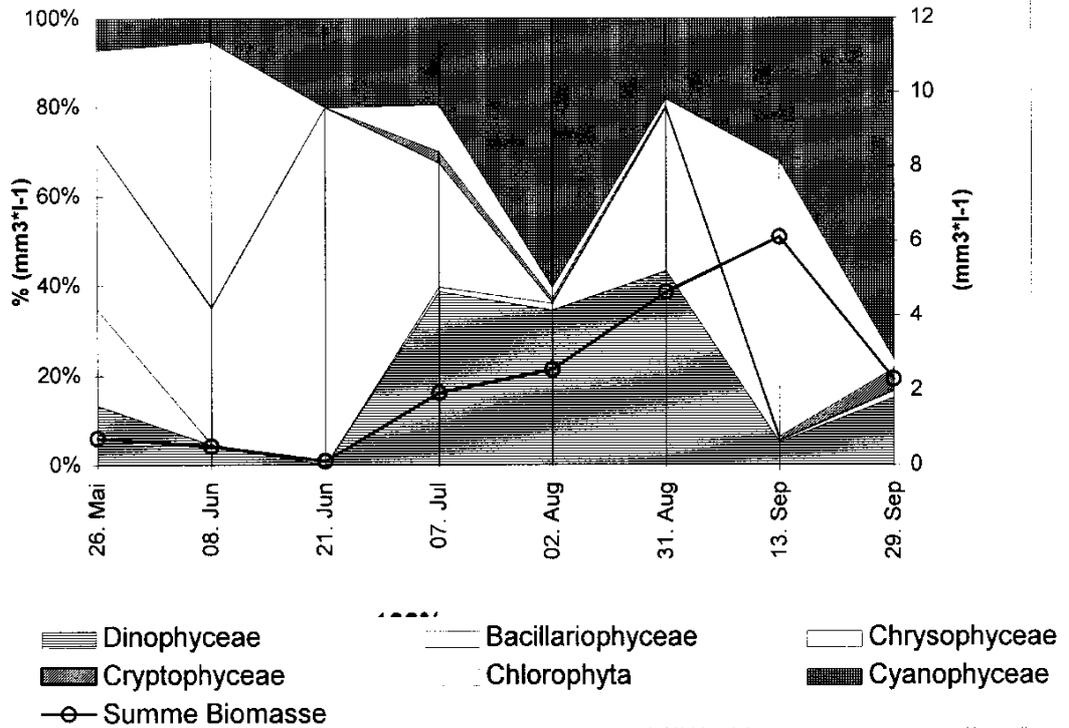
**Figure 11**



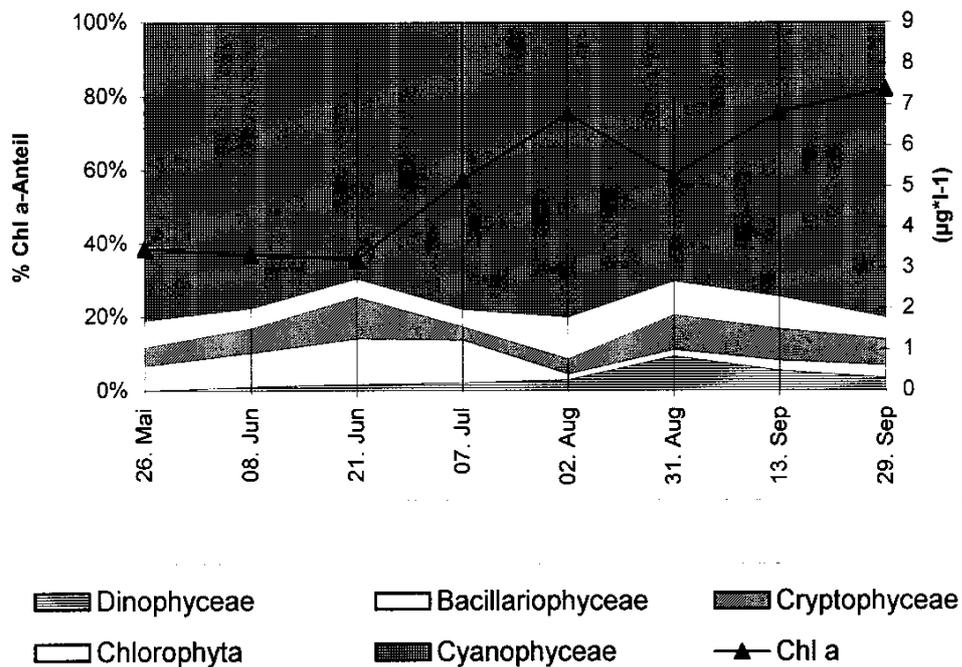
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 12**

**Carwitzer Becken,  
5 m Wassertiefe, 1994**

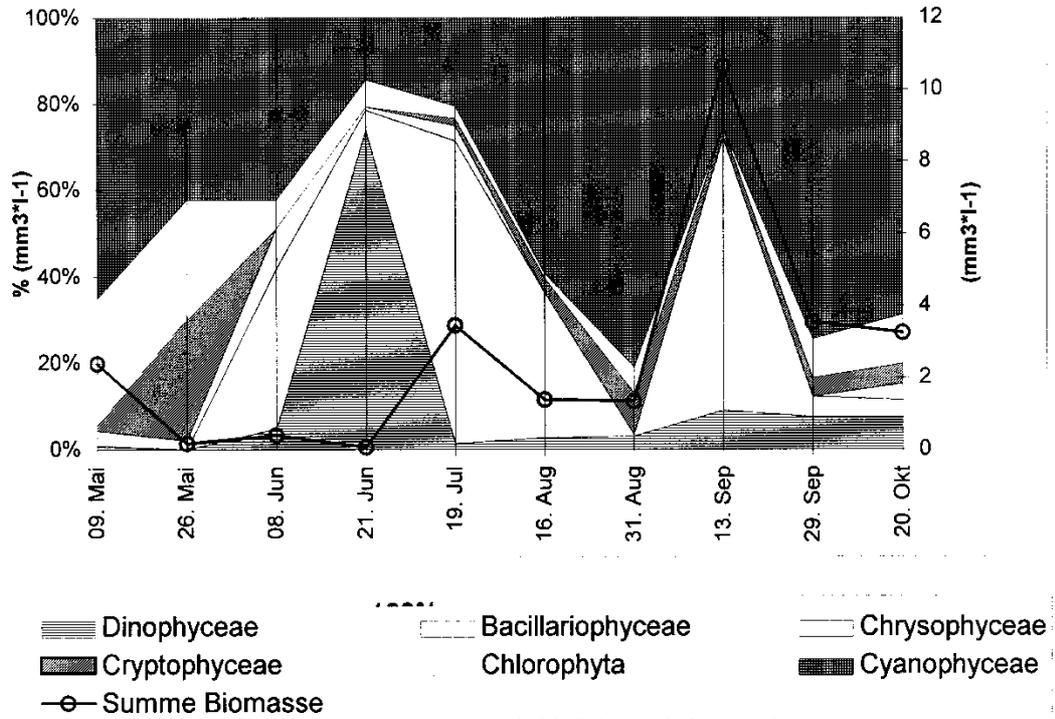


**Carwitzer Becken,  
5 m Wassertiefe, 1994**

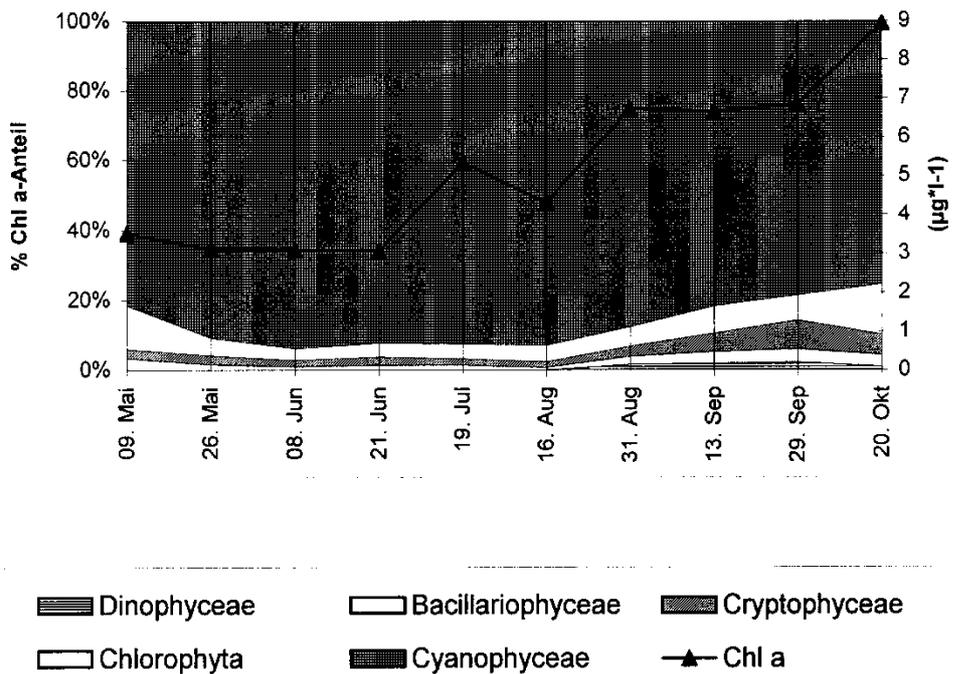


**Figure 13**

**Carwitzer Becken,  
10 m Wassertiefe, 1994**

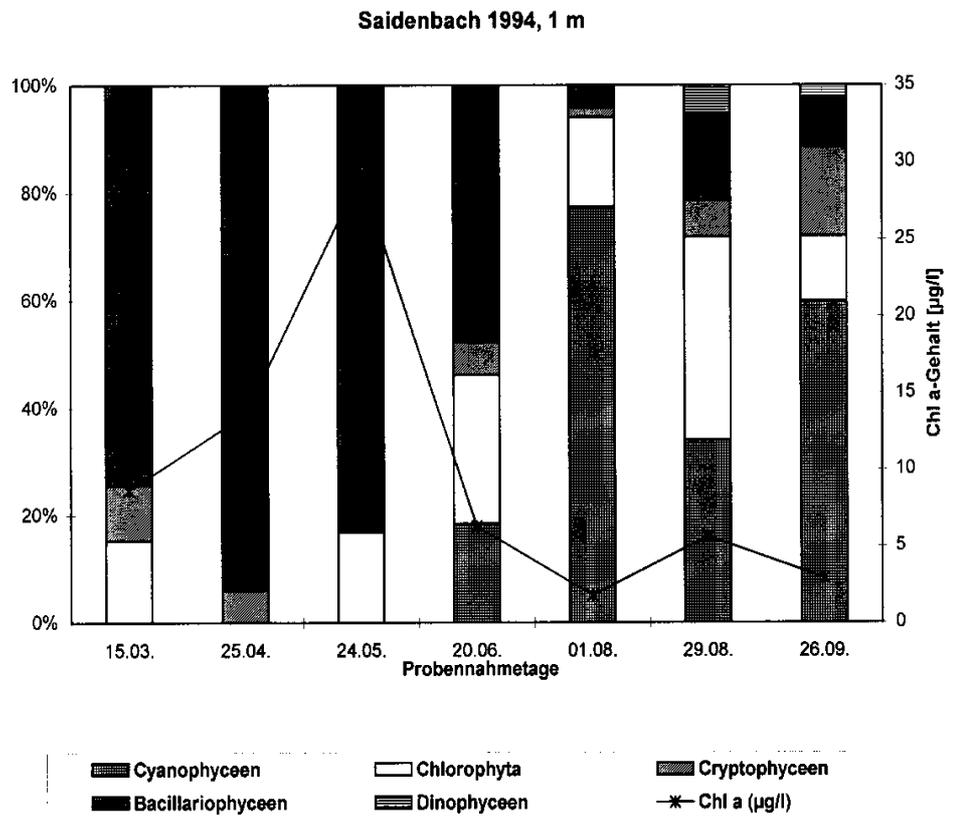
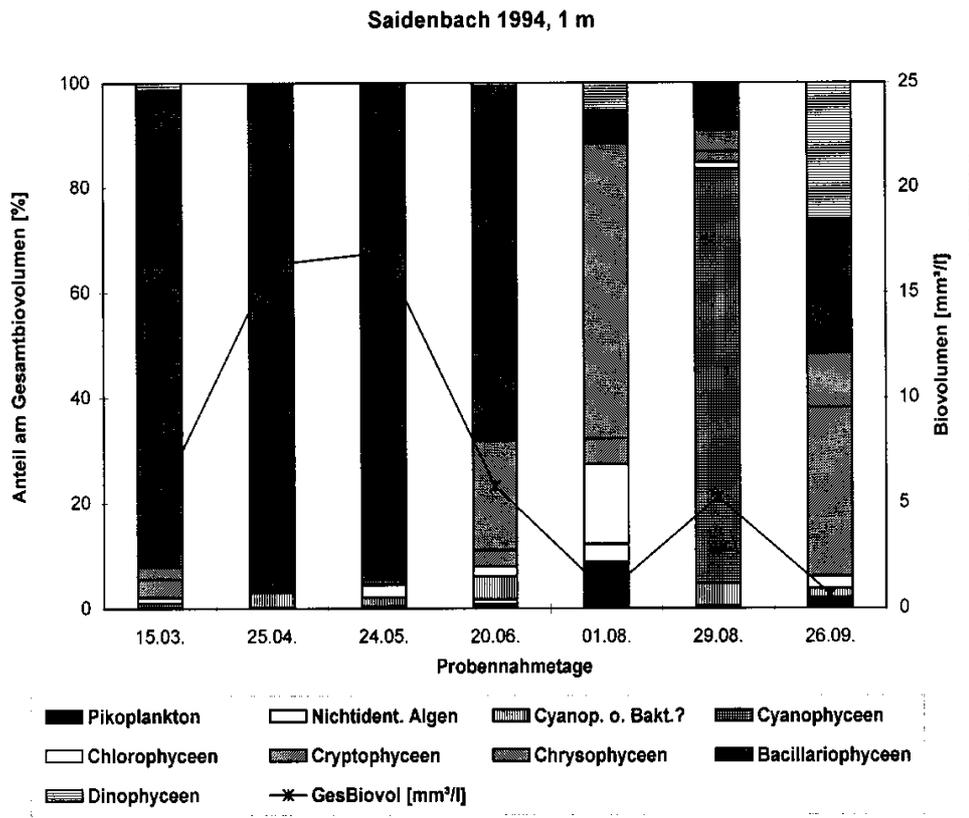


**Carwitzer Becken,  
10 m Wassertiefe, 1994**



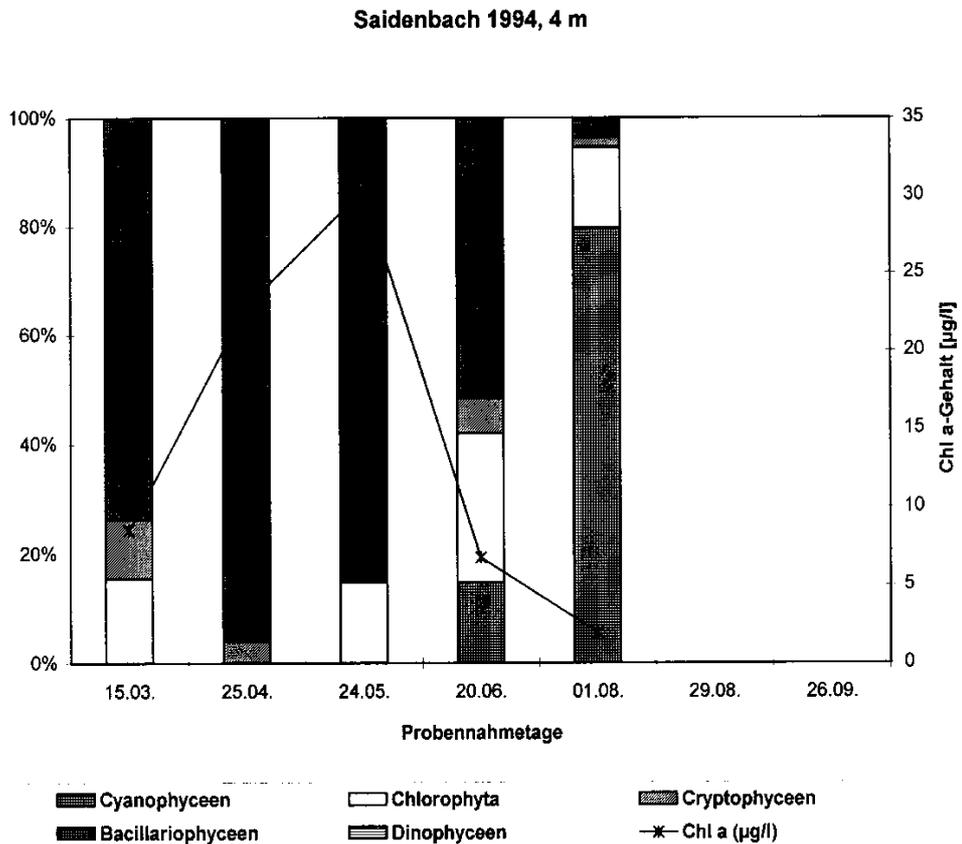
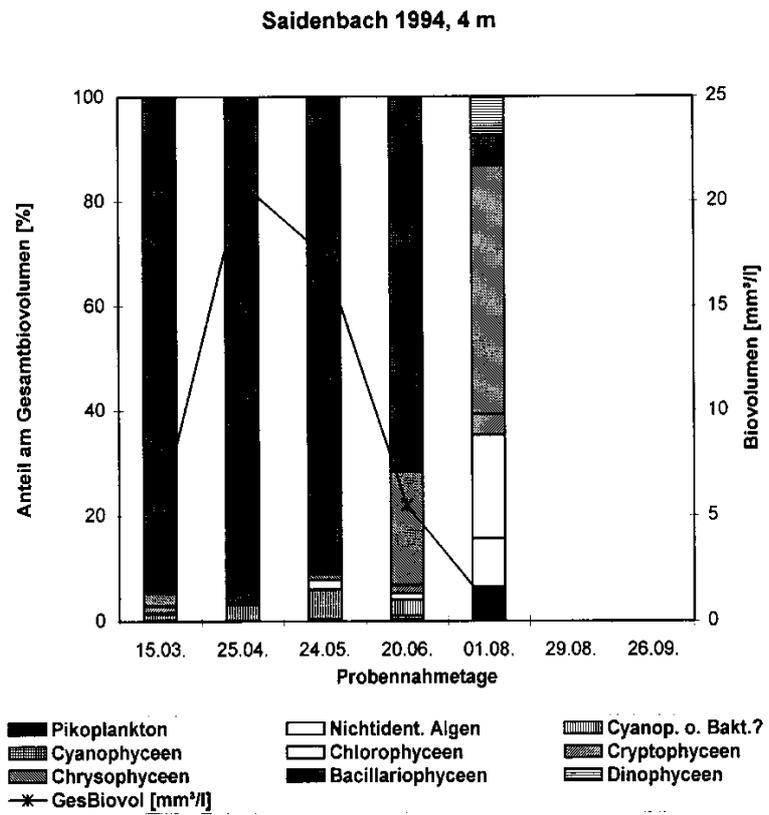
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 14**



HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

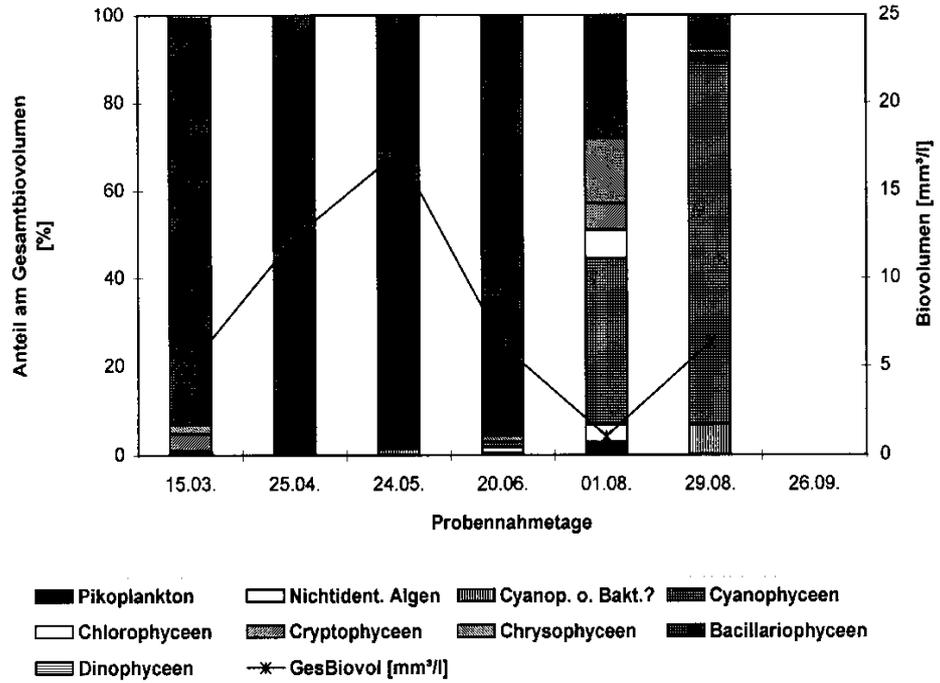
**Figure 15**



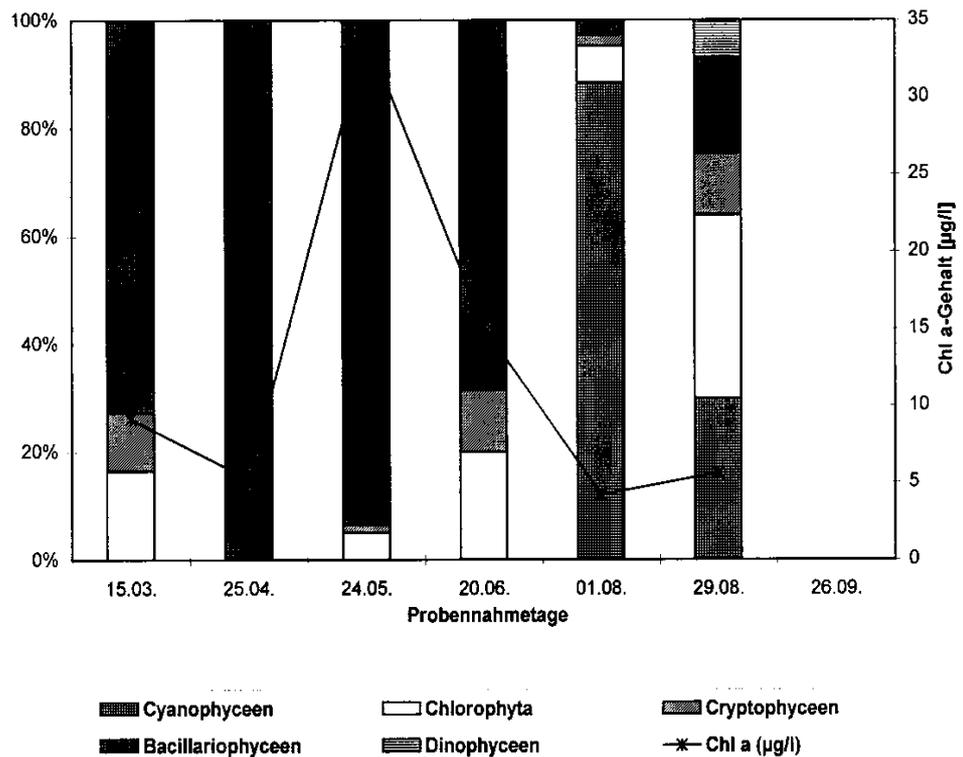
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 16**

Saidenbach 1994, 10 m

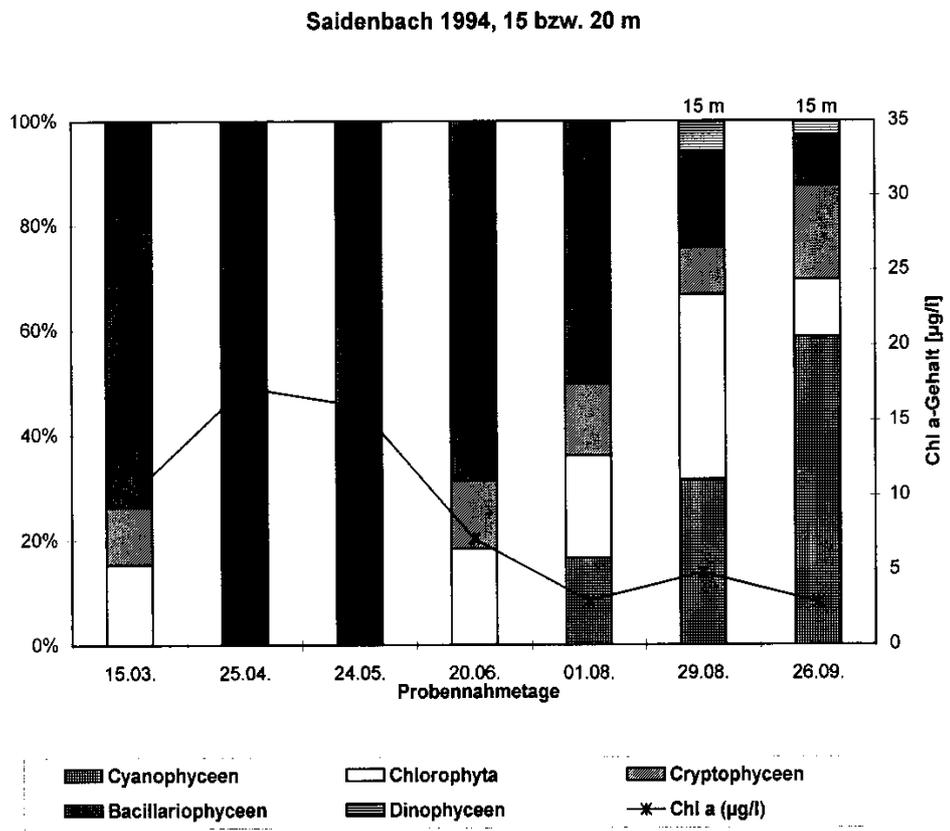
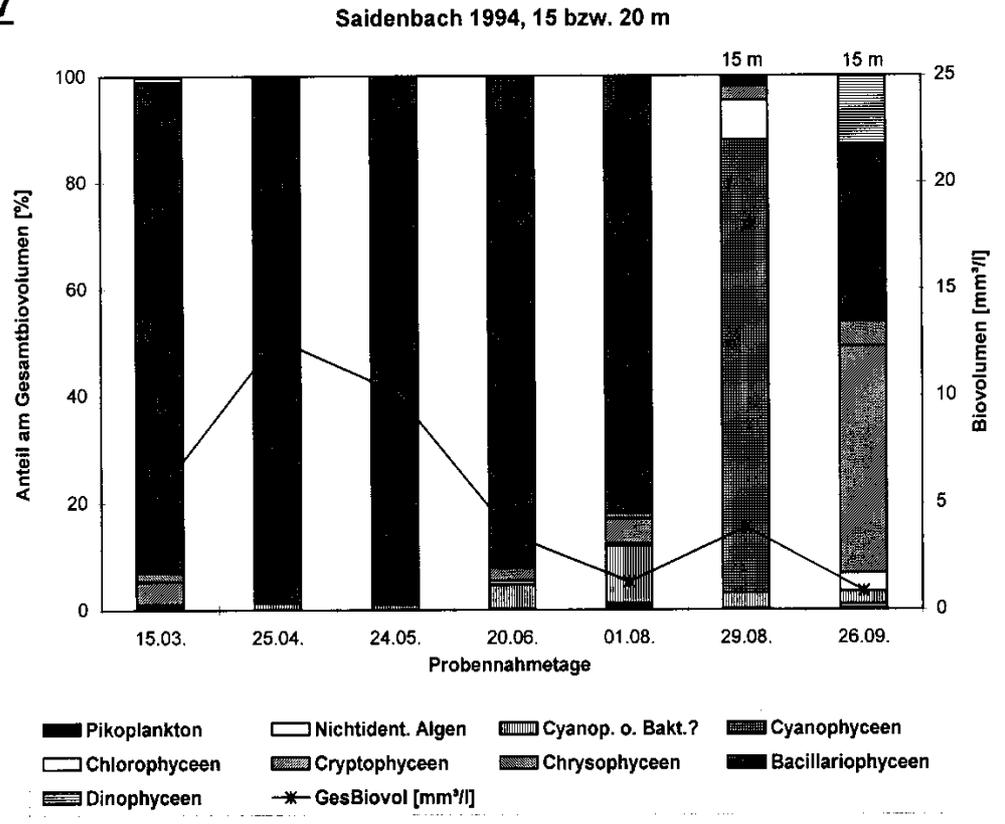


Saidenbach 1994, 10 m



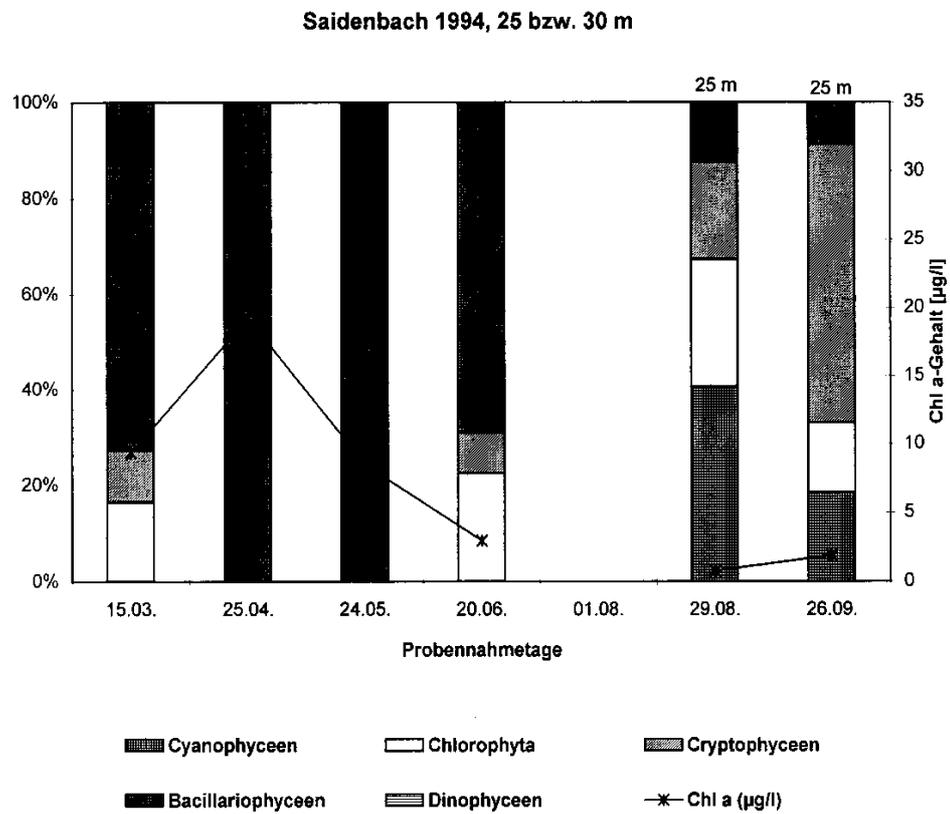
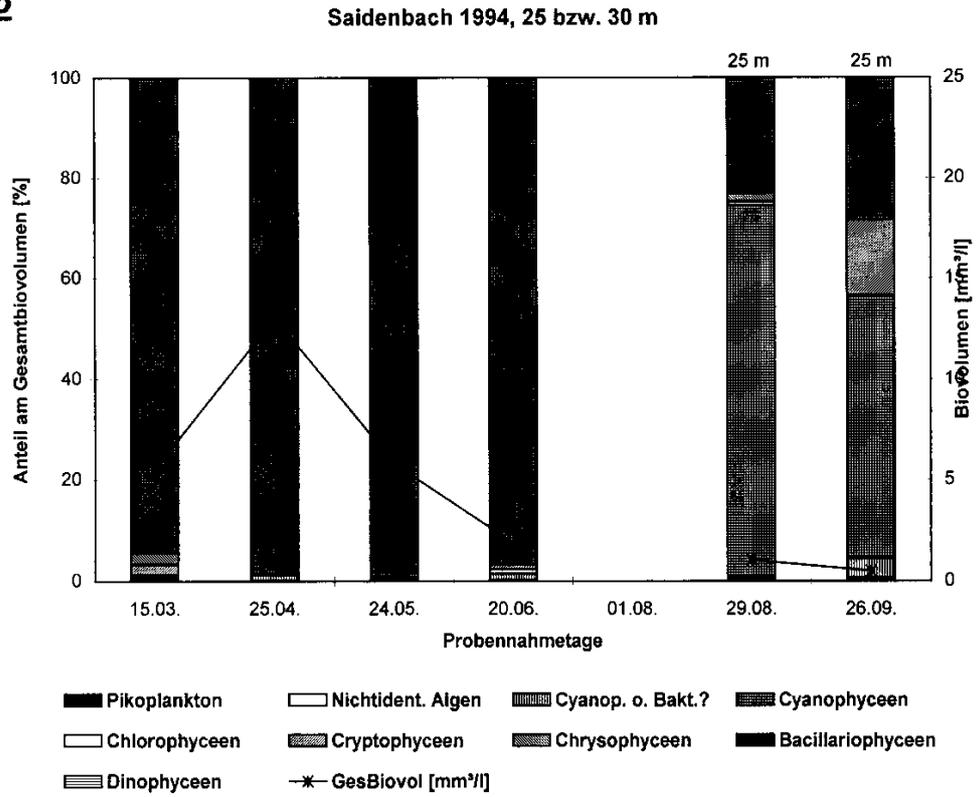
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 17**



HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

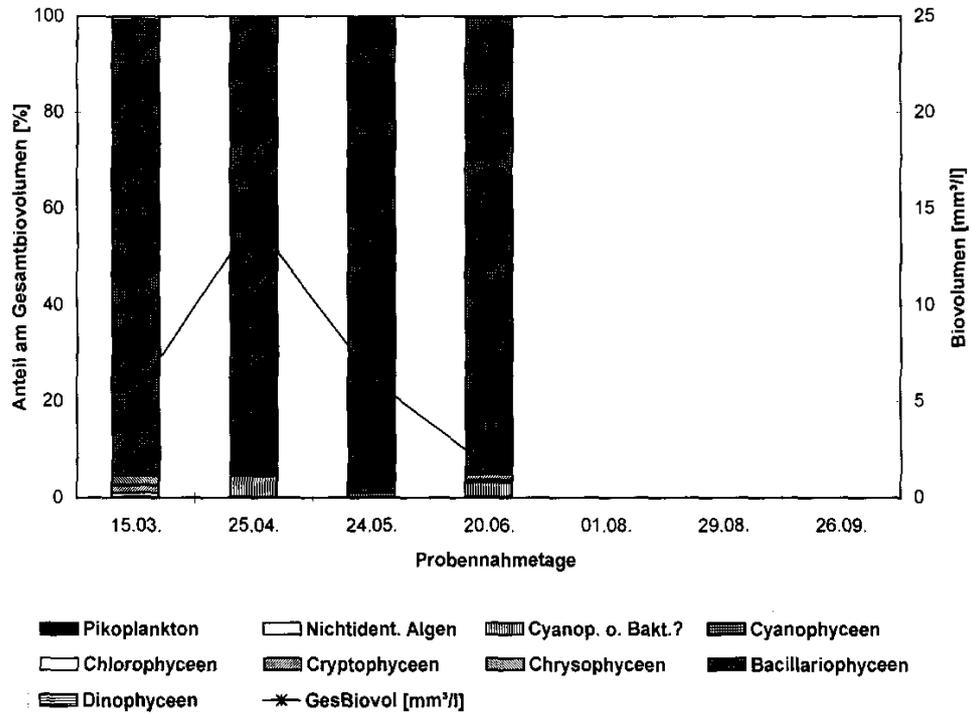
**Figure 18**



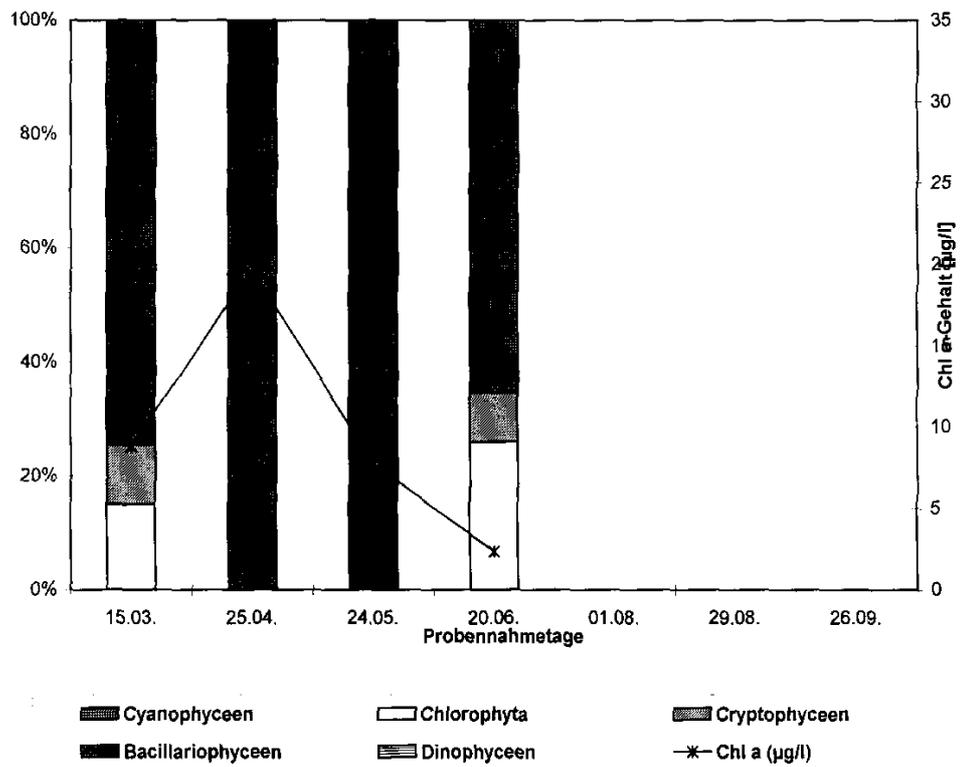
HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 19**

Saidenbach 1994, 40 m

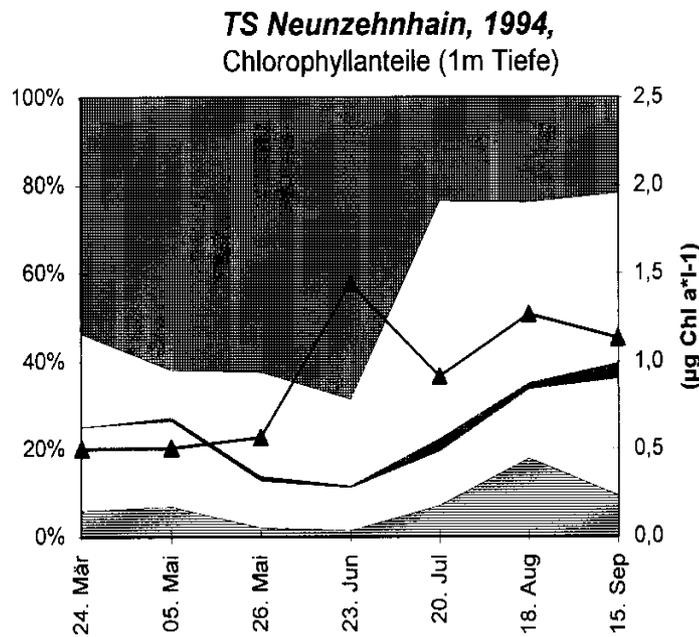
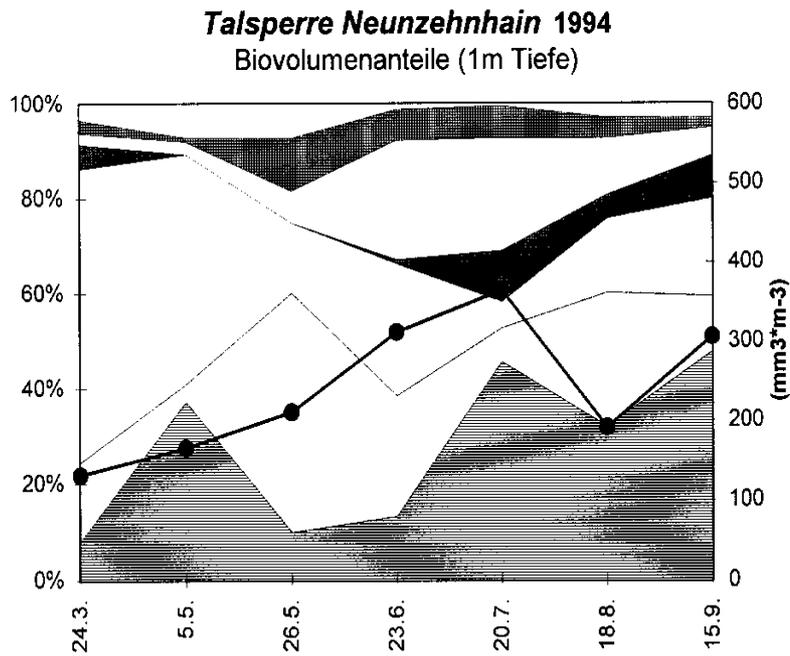


Saidenbach 1994, 40 m



HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

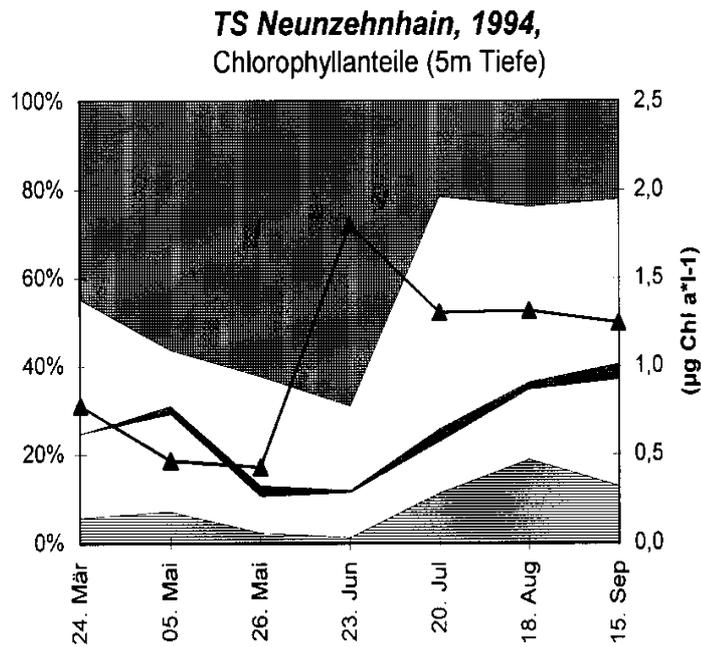
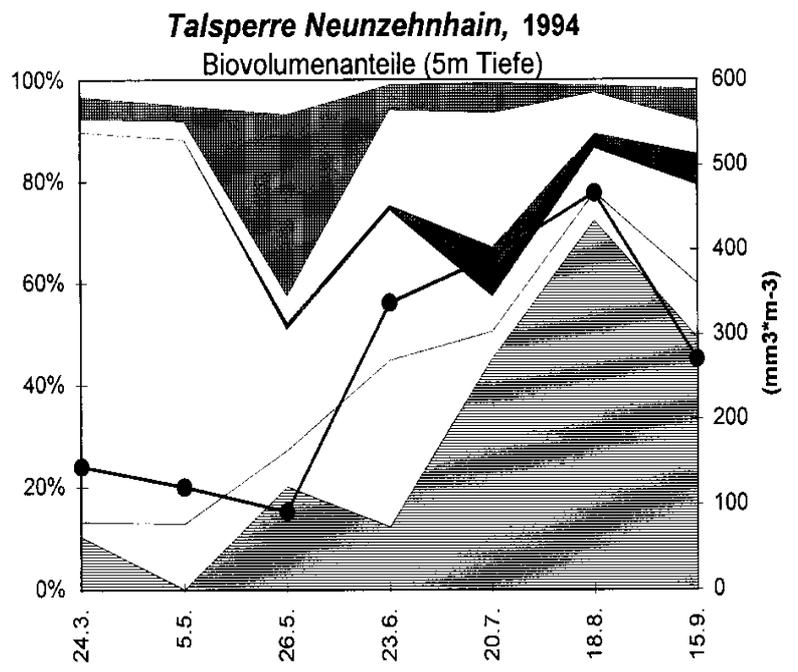
**Figure 20**



- |               |                     |               |
|---------------|---------------------|---------------|
| Dinophyceen   | Diatomeen           | Chrysophyceae |
| Cryptophyceen | Chlorophyceen       | Pikoplankton  |
| Nichtident.   | ● Gesamt Biovolumen |               |

HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

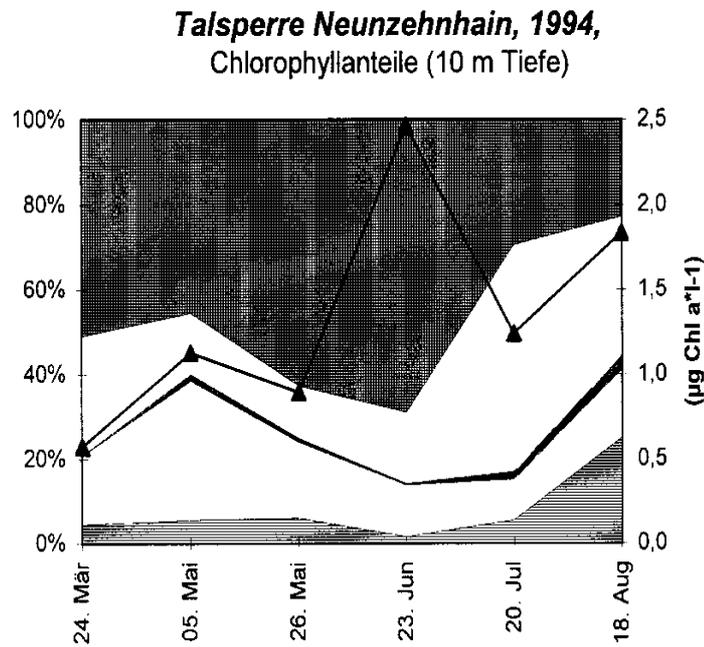
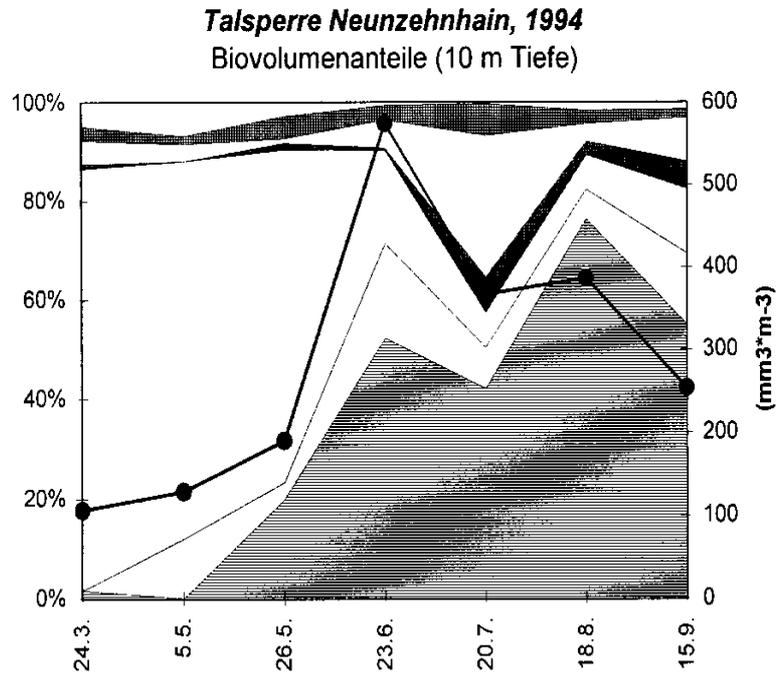
**Figure 21**



- |               |                   |               |
|---------------|-------------------|---------------|
| Dinophyceen   | Diatomeen         | Chrysophyceae |
| Cryptophyceen | Chlorophyceen     | Pikoplankton  |
| Nichtident.   | Gesamt Biovolumen |               |

HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

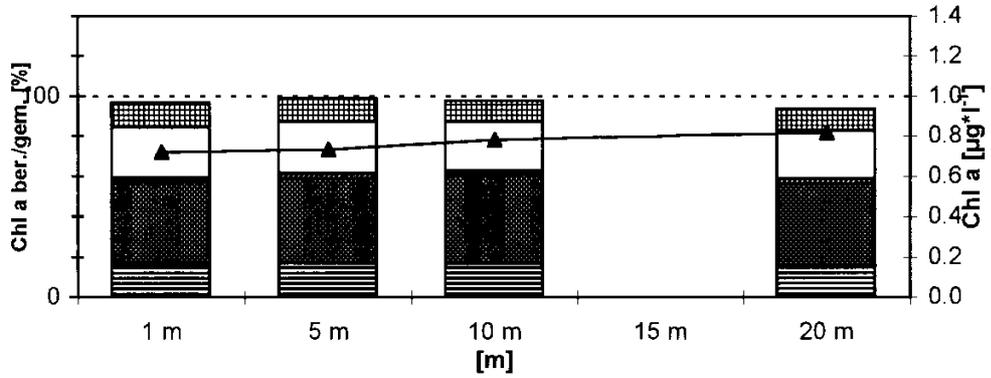
**Figure 22**



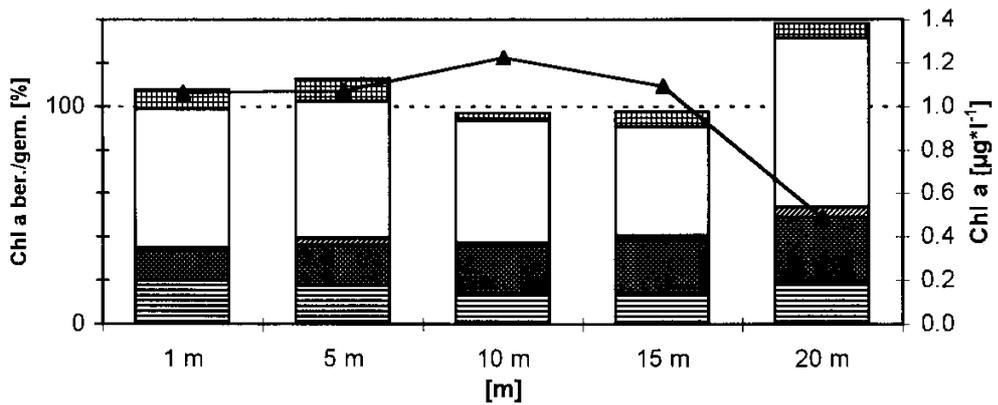
- |  |               |  |                   |  |               |
|--|---------------|--|-------------------|--|---------------|
|  | Dinophyceen   |  | Diatomeen         |  | Chrysophyceae |
|  | Cryptophyceen |  | Chlorophyceen     |  | Pikoplankton  |
|  | Nichtident.   |  | Gesamt Biovolumen |  |               |

**Figure 23**

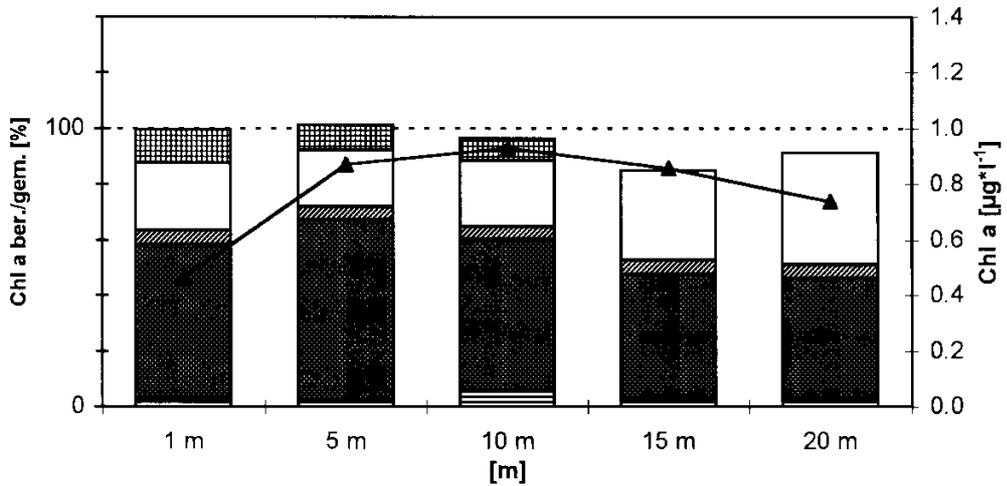
**Talsperre Neunzehnhain  
20. April 1995**



**18. Mai 1995**



**6. Juli 1995**



- |               |                           |
|---------------|---------------------------|
| Dinophyceae   | Bacillario-/Chrysophyceae |
| Cryptophyceae | Chlorophyta               |
| Cyanophyceae  | Chl a                     |

HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 24**

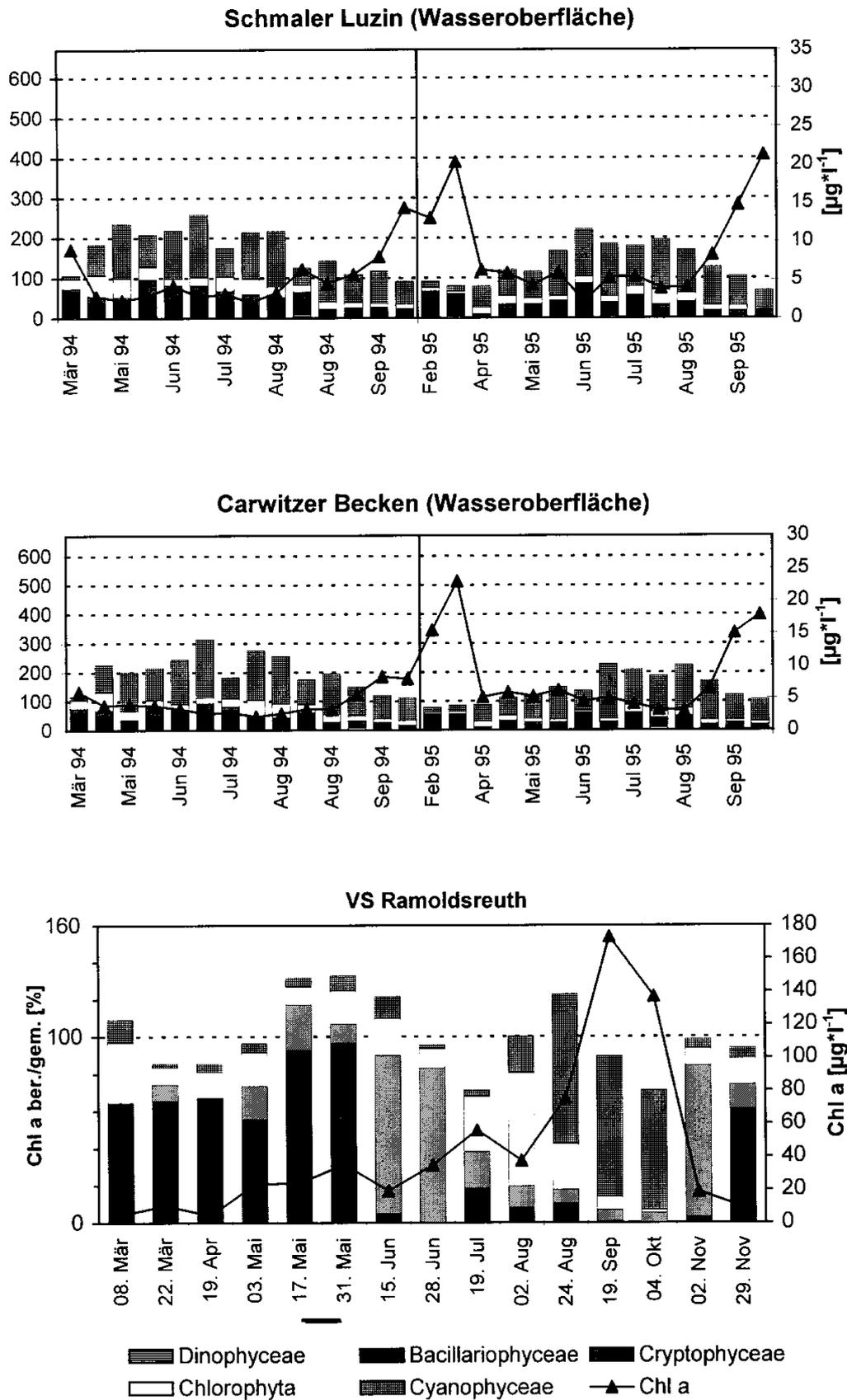
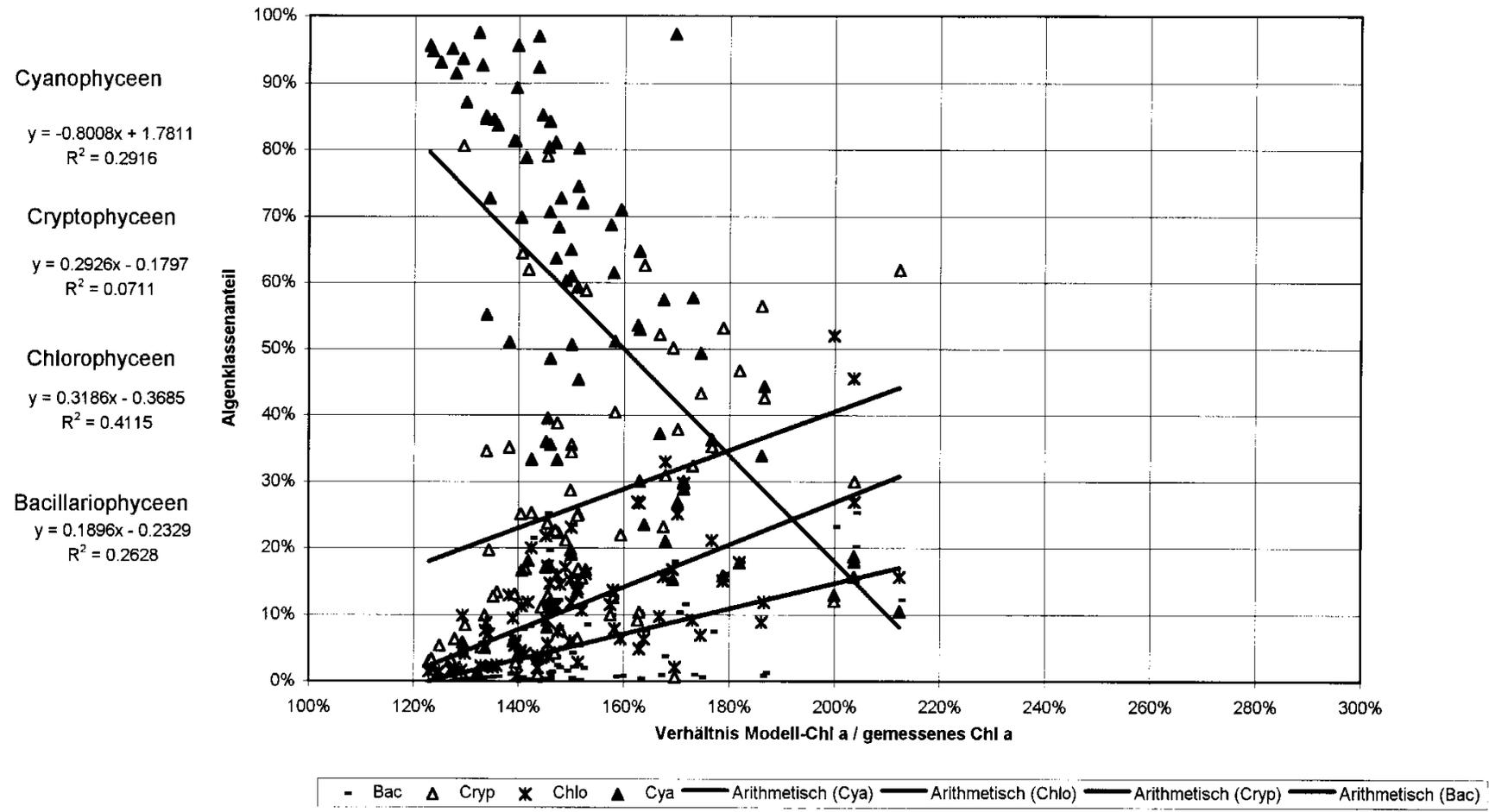
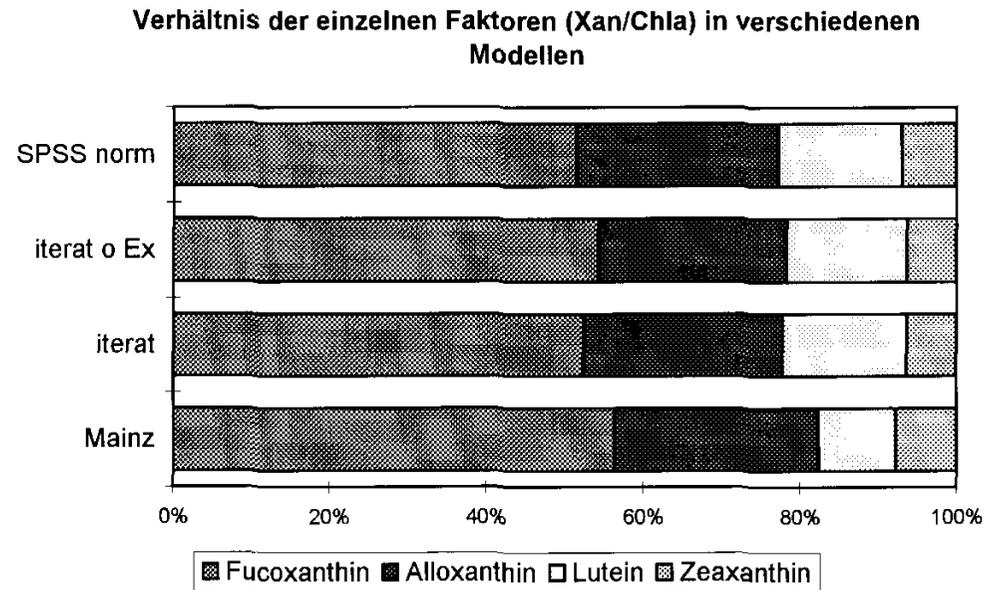


Figure 25

BLT: Auftragung aller Modelldaten (AK% gegen KW%) ohne 25.06.1996 und ohne Ausreißer (26.8. 5 und 10m)

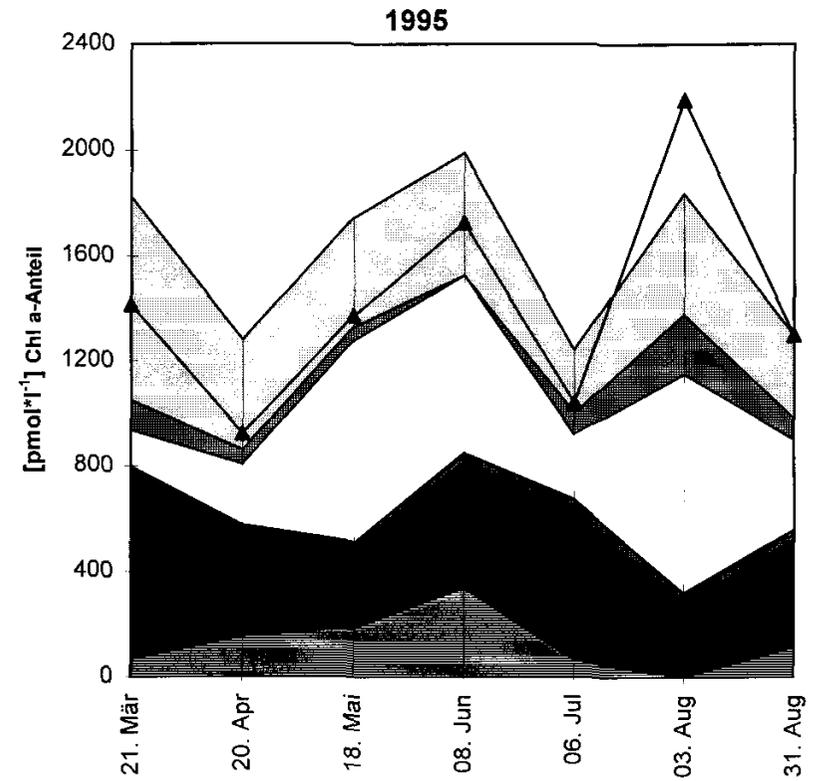
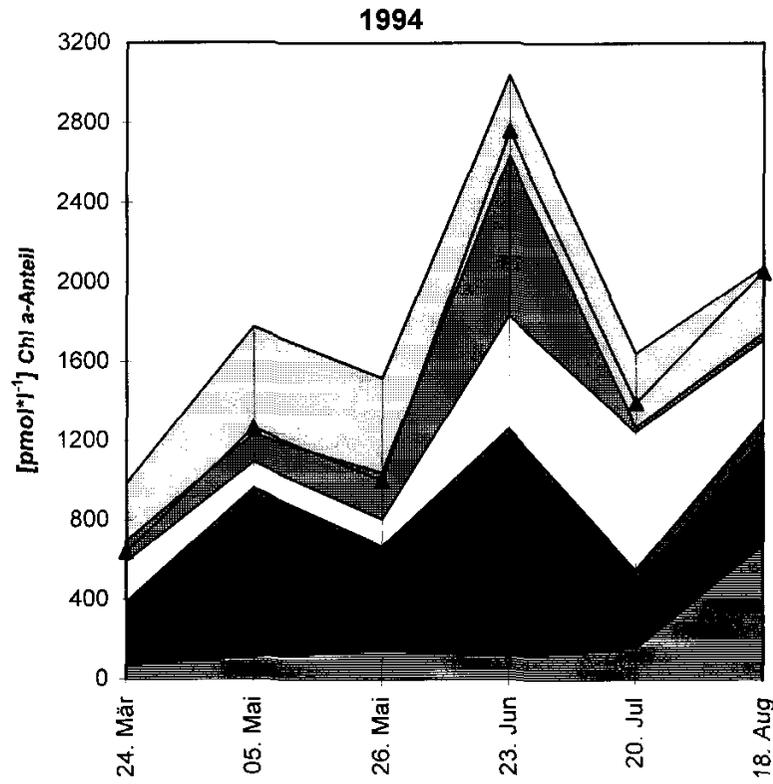


## HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 26**

HPLC-gestützte Phytoplanktonanalyse - Abschlußbericht - Anhang: Tabellen und Figuren

**Figure 27**



- Dinophyceae
- Bacillario-und Chrysophyceae
- Cryptophyceae
- Chlorophyta
- Cyanophyceae
- Eustigmatophyceae
- Chl a gemessen

Der Leser kann sich, im Falle der Nicht-Lesbarkeit der Abbildungen, an folgender Adresse weitere Informationen einholen:

**Prof. C. Wilhelm**  
**Universitaet Leipzig**  
**Institut fuer Botanik**  
**Johannisalle 21-23**  
**D-04103 Leipzig**

**phone: (0341) 9736874/0**

**fax: (0341) 9736899**

**Fax: (0341) 9736899**

**e-mail: [cwilhelm@rz.uni-leipzig.de](mailto:cwilhelm@rz.uni-leipzig.de)**