

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 Phaeophytin gehalte 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 eine 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 den 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 Bleilochtalsperre 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?