

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Hochschulschrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtsinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

Copyright and Moral Rights for this thesis are retained by the author and/or other copyright owners. The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus dem
Institut für Meereskunde
an der
Christian-Albrechts-Universität, Kiel

**BESTANDS- UND AKTIVITÄTSMESSUNGEN
DES NANO- UND PICOPLANKTONS MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE**



Diplomarbeit

vorgelegt von Andrea Detmer

Kiel

Februar 1992

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernt Zeitzschel danke ich vor allem für den Freiraum, mit dem ich diese Arbeit durchführen konnte, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für seine Betreuung geht mein Dank an Dr. Frank Jochem, der mir ebenfalls für eigene Ideen immer genügend Freiraum ließ und mit vielen praktischen Tips und Tricks helfen konnte.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Lenz für sein Vertrauen danken, daß mich besonders gegen Ende der Arbeit enorm motivierte.

Ohne die Hilfe, die manchmal an Zauberei grenzte, von Peter Fritsche und Rolf Werner wäre so manche Idee nicht in die Tat umgesetzt worden und auch die Mannschaft der FS Alkor trug zum Gelingen und zum Spaß an der Sache bei. Vielen Dank.

Hanna Giesenhagen schaffte es mit Ruhe und Umsicht, daß ich den Boden der Tatsachen nie unter den Füßen verlor und Jürgen deWall danke ich dafür, daß er selbst einer scheinbar ausweglosen Situation noch etwas Gutes abgewinnen konnte. Weiterhin bin ich Herbert auf dem Venne für seine ständige Hilfsbereitschaft und seine geduldigen Antworten auf viele Fragen dankbar. Verena Trenkel danke ich für stetige konstruktive Kritik, die viele Dinge relativierte.

Ein weiteres Danke schön geht an Dr. Volker Kachel, der jederzeit zu einem Informationsaustausch bereit war und immer einen Rat wußte.

Besonderer Dank allerdings geht an Frau Dr. Dagmar Barthel, ohne deren Anregung, Initiative und Förderung ich nie nach Kiel gekommen wäre. Dazu beigetragen haben auch meine Eltern und mein Bruder, deren Unterstützung ich immer sicher sein konnte.

Zu guter Letzt möchte ich insbesondere Stephan danken, der mir das Gefühl gab, immer für mich da zu sein.

INHALT

	Seite
1	EINLEITUNG 1
2	MATERIAL UND METHODEN 4
2.1	Herkunft des Probenmaterials..... 4
2.1.1	Freilandproben..... 4
2.1.1.1	Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht 4
2.1.1.2	Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91) 5
2.1.2	Kulturen 8
2.2	Bearbeitung des Probenmaterials 8
2.2.1	Abiotische Parameter 8
2.2.2	Biologische Parameter 9
2.2.2.1	Chlorophyll 9
2.2.2.2	Primärproduktion..... 9
2.2.2.3	Epifluoreszenzmikroskopie 10
2.2.3	Zytometrie..... 12
2.2.3.1	Prinzip der zytometrischen Messung 12
2.2.3.2	Aufbau des FLUVO II 13
2.2.3.3	Messung mit dem FLUVO II..... 16
2.2.3.4	Auswertung der zytometrischen Messungen..... 17
2.3	Experimente mit Kulturen 18
2.3.1	Methodische Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen 18
2.3.1.1	Verdünnungsexperimente 19
2.3.1.2	Ultraschall- und Detergensexperimente 19
2.3.2	Wachstumsphysiologie verschiedener <i>Synechococcus</i> -Stämme 20
2.3.2.1	Wachstumskurven 20
2.3.2.2	Veränderung der Wachstums- und Pigmenteigenschaften des <i>Synechococcus</i> -Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung 20

3	ERGEBNISSE	23
3.1	Vergleich der Zytometrie- und Mikroskopdaten	23
3.1.1	Kulturproben	23
3.1.2	Freilandproben.....	25
3.2	Methodische Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen	29
3.2.1	Verdünnungsexperimente	29
3.2.2	Ultraschall- und Detergensexperimente	31
3.3	Wachstumsphysiologie verschiedener <i>Synechococcus</i> -Stämme.....	32
3.3.1	Wachstumskurven	32
3.3.2	Veränderung der Wachstums- und Pigmenteigenschaften des <i>Synechococcus</i> -Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung	33
3.4	Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht.....	46
3.4.1	Nährstoffe	46
3.4.2	Chlorophyll	47
3.4.3	Primärproduktion.....	48
3.4.4	Zellkonzentrationen des autotrophen Pico- und Nanoplanktons	51
3.5	Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91)	54
3.5.1	Abiotische Parameter	54
3.5.1.1	Hydrographie	54
3.5.1.2	Sauerstoff und Schwefelwasserstoff	54
3.5.1.3	Nährstoffe	57
3.5.2	Biologische Parameter	61
3.5.2.1	Chlorophyll	61
3.5.2.2	Primärproduktion.....	65
3.5.2.3	Zellkonzentrationen des autotrophen Pico- und Nanoplanktons.....	69
3.5.2.4	Fluoreszenzeigenschaften des autotrophen Pico- und Nanoplanktons.....	74
4	DISKUSSION	76
4.1	Methodenkritik	76
4.1.1	Fraktionierung und Filter	76
4.1.2	Chlorophyllbestimmung	77
4.1.3	Bestimmung der Primärproduktion	78

III

4.1.4	Bestimmung der Zellabundanzen mittels Epifluoreszenzmikroskopie	79
4.2	Diskussion der Ergebnisse	81
4.2.1	Zytometrie.....	81
4.2.1.1	Vergleich der Methoden Zytometrie und Mikroskopie	81
4.2.1.2	Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen.....	85
4.2.2	Wachstumsphysiologie verschiedener <i>Synechococcus</i> -Stämme.	86
4.2.2.1	Wachstumsraten	86
4.2.2.2	Veränderung der Pigmenteigenschaften des <i>Synechococcus</i> - Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung	88
4.2.3	Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht	90
4.2.4	Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91)	95
4.2.4.1	Situation im sommerlichen Pelagial der östlichen Gotlandsee.....	95
4.2.4.2	Phototrophes Pico- und Nanoplankton in anoxischen Tiefen der östlichen Gotlandsee.....	99
4.3	Ausblick.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	LITERATUR.....	106

1 EINLEITUNG

Autotrophes Nano- und Picoplankton im Sinne der Größeneinteilung mariner Organismen nach SIEBURTH *et al.* (1978) nimmt im Gefüge des marinen pelagischen Systems eine wichtige Rolle ein. So sind in oligotrophen Gewässern Zellen der Größenfraktion $< 20 \mu\text{m}$ meistens häufiger und von größerer Bedeutung als solche der Größenfraktion $> 20 \mu\text{m}$ (MURPHY u. HAUGEN, 1985; GLOVER *et al.*, 1986a; GLOVER *et al.*, 1988; ITURRIAGA u. MARRA, 1988).

Dem autotrophen Nanoplankton (2-20 μm) werden außer kleinen Diatomeen und Dinoflagellaten vor allem nackte Flagellaten zugeordnet (JOINT u. POMROY, 1983; JOINT u. PIPE, 1984). Im Gegensatz dazu besteht autotrophes Picoplankton (0,2-2 μm) nicht nur aus eukaryontischen, sondern auch aus prokaryontischen Organismen. Dem eukaryontischen, autotrophen Picoplankton gehören dabei zum größten Teil sehr kleine Flagellaten z.B. der Gattungen *Micromonas*, *Aureococcus*, *Nannochloris* und *Chlorella* an (JOHNSON u. SIEBURTH, 1982). Die prokaryontische Komponente besteht zum einen aus Prochlorophyten, deren Vorkommen und Bedeutung erst in den letzten Jahren erkannt wurde (CHISHOLM *et al.*, 1988; LI u. WOOD, 1988; VAULOT *et al.*, 1989; OLSON *et al.*, 1990a), zum anderen wird sie von phycoerythrinreichen, coccalen Cyanobakterien dominiert (MURPHY u. HAUGEN, 1985; GLOVER *et al.*, 1986a; GLOVER *et al.* 1988a, b). Letztere werden meist der von RIPPKA *et al.* (1979) aufgestellten Gattung *Synechococcus* zugeordnet.

Durch die Untersuchungen von WATERBURY *et al.* (1979) und JOHNSON u. SIEBURTH (1979) konnte das globale Vorkommen von *Synechococcus* allgemein nachgewiesen werden. Studien der letzten zehn Jahre machten zudem auf die herausragende Bedeutung dieser Organismen hinsichtlich der Produktionsleistung der Ozeane aufmerksam (THRONDSSEN, 1978, 1979; JOHNSON u. SIEBURTH, 1982; JOINT u. POMROY, 1983; LI *et al.*, 1983; TAKAHASHI u. BIENFANG, 1983; TAKAHASHI u. HORI, 1984; GLOVER, 1985; MURPHY u. HAUGEN, 1985; OLSON *et al.*, 1985; TAKAHASHI *et al.*, 1985; GLOVER *et al.*, 1986a; LI u. WOOD, 1988; HOWARD u. JOINT, 1989; HALL u. VINCENT, 1990; JOCHEM, 1990a; OLSON *et al.*, 1990).

Außerdem wurde durch die Aufstellung des Konzeptes des "Microbial Loop" (AZAM *et al.*, 1983) eine weitere bedeutende Funktion dieser Kleinstplankter im Stoffkreislauf des Pelagials erkannt (THINGSTAD, 1987; HAGSTRÖM *et al.*, 1988). Der "Microbial Loop" stellt ein komplexes mikrobielles Nahrungsnetz im pelagischen Nahrungssystem dar, in der von Phytoplankton exsudiertes, gelöstes organisches Material die bakterielle Produktion

unterstützt und so dem System erhalten bleibt. In Ökosystemen, in denen als Primärproduzenten coccale Cyanobakterien dominieren, spielt dabei die Konsumierung dieser Zellen durch das Protozooplankton eine zentrale Rolle in der Vermittlung des organischen Materials von Primärproduzenten zu höheren trophischen Ebenen (HAGSTRÖM *et al.*, 1988).

Mit der Erkenntnis, daß autotrophes Picoplankton einen metabolisch aktiven Teil mikrobieller Gemeinschaften darstellt und am Umsatz von Kohlenstoff in großem Maße beteiligt sein kann, ging die Entwicklung neuer Methoden zu dessen Erfassung einher. Denn mit klassischen Methoden, wie z.B. der Utermöhlmethode, können sehr kleine Zellen quantitativ nicht genau genug erfaßt werden (REID, 1983; TAKAHASHI u. BIENFANG, 1983).

So stellte die Einführung der Epifluoreszenzmikroskopie und der damit verbundenen Fluoreszenzfärbungen einen großen Fortschritt auf diesem Gebiet dar (DeNOYELLES, 1968; ZIMMERMANN u. MEYER-REIL, 1974; DALEY u. HOBBIE, 1975; HOBBIE *et al.*, 1977; BROCK, 1978; PORTER u. FEIG, 1980; DAVIS u. SIEBURTH, 1982; HAAS, 1982; CARON, 1983).

Doch stellt sich heute unter anderem der zusätzliche Anspruch einer schnellen Erkennung und gleichzeitigen Messung verschiedenster Eigenschaften solcher Kleinstplankter, z.B. im Zusammenhang mit einem "remote sensing" (PLATT, 1989). Mit der Einführung der Durchflußzytometrie in die Planktonforschung (YENTSCH u. HORAN, 1989) konnte dieser Forderung nachgekommen werden.

Dabei sind die grundsätzlichen Prinzipien der zytometrischen Messung schon sehr viel älter. So wird die Zählung von Zellen im Fluß zum ersten Mal 1934 von MOLDAVAN erwähnt, und bei dem 1949 patentierten Coulter-Counter wurden dann Zellen hintereinander und einzeln gezählt und deren Volumen gemessen (eine Zusammenfassung der Geräteentwicklung geben MELAMED *et al.*, 1990). Automatisierte Methoden zur Zellerfassung und -zählung wurden zunächst zur Bearbeitung medizinischer Fragestellungen entwickelt und finden heute in der Krebsforschung, Immunbiologie, *etc.* Anwendung (HORAN u. WHEELLESS, 1977). Die Bedeutung dieser Entwicklung für die Planktonforschung zeigt sich unter anderem darin, daß die Hypothese eines kontinuierlichen Größenspektrums in den Ozeanen unter Anwendung eines Coulter-Counters aufgestellt wurde (SHELDON *et al.*, 1972).

Mit fortschreitender Entwicklung dieser Prinzipien bietet die Durchflußzytometrie heute die Möglichkeit einer simultanen, präzisen Messung multipler Parameter (Fluoreszenz, Volumen, Oberflächenstruktur *etc.*) einer individuellen Zelle (BURKILL, 1987; DEMERS

et al., 1989). So kann eine Wasserprobe innerhalb weniger Sekunden bis Minuten auf ihre qualitative und quantitative Zusammensetzung untersucht und die Heterogenität von Gemeinschaften oder Populationen bestimmt werden. Dabei erstreckt sich die Anwendbarkeit der Durchflußzytometrie in der Planktonforschung von experimentellen Ansätzen (OLSON *et al.*, 1983; OLSON *et al.*, 1988; VAULOT *et al.*, 1989) bis zu Bestandsaufnahmen im Freiland (BØRSHEIM *et al.*, 1989; OLSON *et al.*, 1990a, b; YUNEV *et al.*, 1990). Außerdem schreitet die Entwicklung solcher Geräte schnell voran (DEAN, 1990; FRANKEL *et al.*, 1990) und mit entsprechend kleinen und gegen Vibrationen unempfindlichen Geräten ist man heute sogar in der Lage, Messungen an Bord durchzuführen (OLSON *et al.*, 1985; LI u. WOOD, 1988; BØRSHEIM *et al.*, 1989; LI, 1989).

Bei Einsatz solcher Methoden und neu entwickelter Geräte muß eine Überprüfung hinsichtlich ihrer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erfolgen. Direkte Vergleiche zwischen Durchflußzytometrie und Epifluoreszenzmikroskopie sind bisher allerdings relativ selten.

Aus diesem Grund war eines der Hauptziele dieser Arbeit, Aussagen über die Genauigkeit der zytometrisch erhaltenen Datensätze zu gewinnen. Als Referenzdaten wurden epifluoreszenzmikroskopische Ergebnisse herangezogen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit galt der Untersuchung des autotrophen Picoplanktons. Hier sollte die Bedeutung von *Synechococcus* sp. in der zentralen Ostsee und in einem küstennahen Gebiet - der Kieler Bucht - dargestellt werden. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, um physiologische Eigenschaften von *Synechococcus* sp., deren Wichtigkeit für das globale Vorkommen dieses Organismus und die Einsatzmöglichkeiten der Durchflußzytometrie bei derartigen Fragestellungen bewerten zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herkunft des untersuchten Materials

2.1.1 Freilandproben

2.1.1.1 Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht

Von Mai bis September 1991 wurde die Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons auf den Stationen "Kieler Bucht" und "Boknis Eck" (Abbildung 2.1) untersucht. Beide Stationen werden im Rahmen des vom Institut für Meereskunde durchgeführten biologischen Monitorings regelmäßig beprobt und wurden wegen ihrer Vergleichbarkeit mit früheren Untersuchungen an Pico- und Nanoplankton ausgewählt. In den hier vorgestellten Untersuchungen erfolgte die Beprobung in Abständen von zwei bis vier Wochen (Tabelle 2.1). Die Proben wurden jeweils aus 2 und 15 m Tiefe mit einem Niskin-Wasserschöpfer (5 l) gezogen.

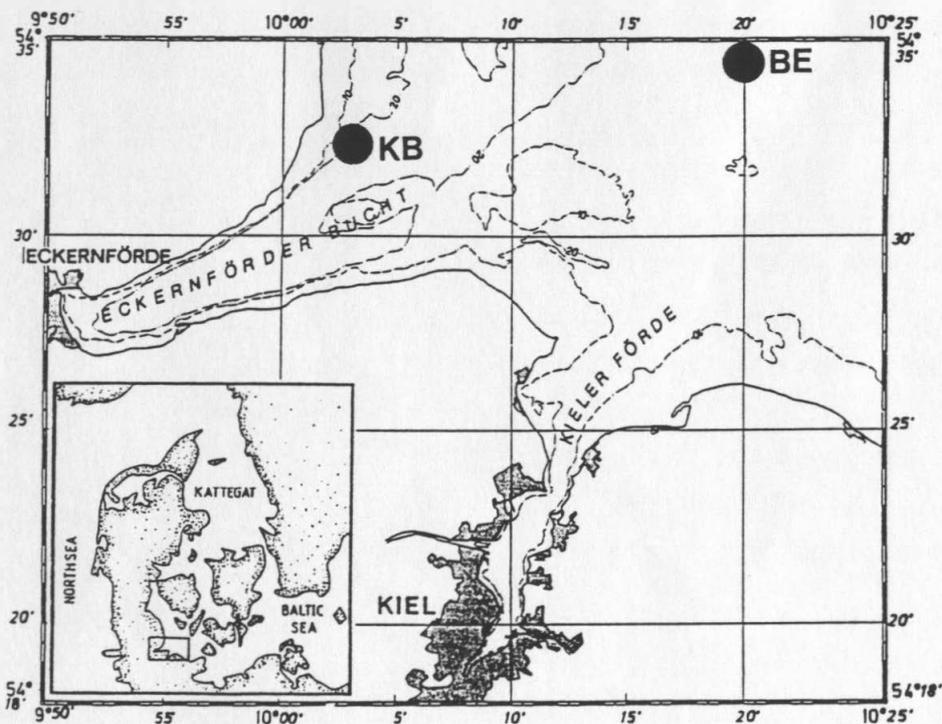


Abbildung 2.1: Lage der Stationen "Boknis Eck" (BE, 28 m) und "Kieler Bucht" (KB, 17 m)

Tabelle 2.1: Übersicht über die Probennahme in der Kieler Bucht, BE = "Boknis Eck", KB = "Kieler Bucht"

Station	Datum der Probennahme
BE	15.05., 21.05., 12.06., 17.06., 02.07., 22.07., 14.08., 05.09.
KB	21.05., 17.06., 22.07., 14.08.

2.1.1.2 Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91)

Im Zuge des BAMBI-Projektes (Baltic Microbial Biology Investigation) 1991 sollte mittels Zytometrie und Mikroskopie der Bestand des Pico- und Nanoplanktons in Form von Vertikalprofilen aufgenommen und mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen verglichen werden. Gleichzeitig konnten diese Ergebnisse zur Überprüfung der quantitativen Genauigkeit des Zytometers herangezogen werden, so daß eine Vervollständigung der unter 2.3.1 noch zu beschreibenden Versuche um Freilanddaten erlangt wurde.

Während BAMBI '91 wurden mit FS Alkor vom 26. Juli bis zum 13. August in der östlichen Gotlandsee zwei kurze Driftstudien von je vier Tagen durchgeführt. Eine Übersicht über das Probengebiet und die hier ausgewerteten Driftstationen zeigt die Abbildung 2.2. Die erste Driftstudie verlief vom 01.08. bis zum 04.08., die zweite vom 07.08. bis zum 10.08.91, wobei der verfolgte Wasserkörper mit einer kegelförmigen Argosboje markiert wurde. Die Stationen und die beprobten Tiefen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Beprobungszeit lag zwischen 6.30 und 8.00 Uhr morgens, mit Ausnahme der Stationen 435 und 450, die erst gegen 12.00 Uhr mittags beprobt wurden. Alle Proben wurden mit einer 12 x 10 l Rosette mit Wasserschöpfern vom Niskin-Typ genommen.

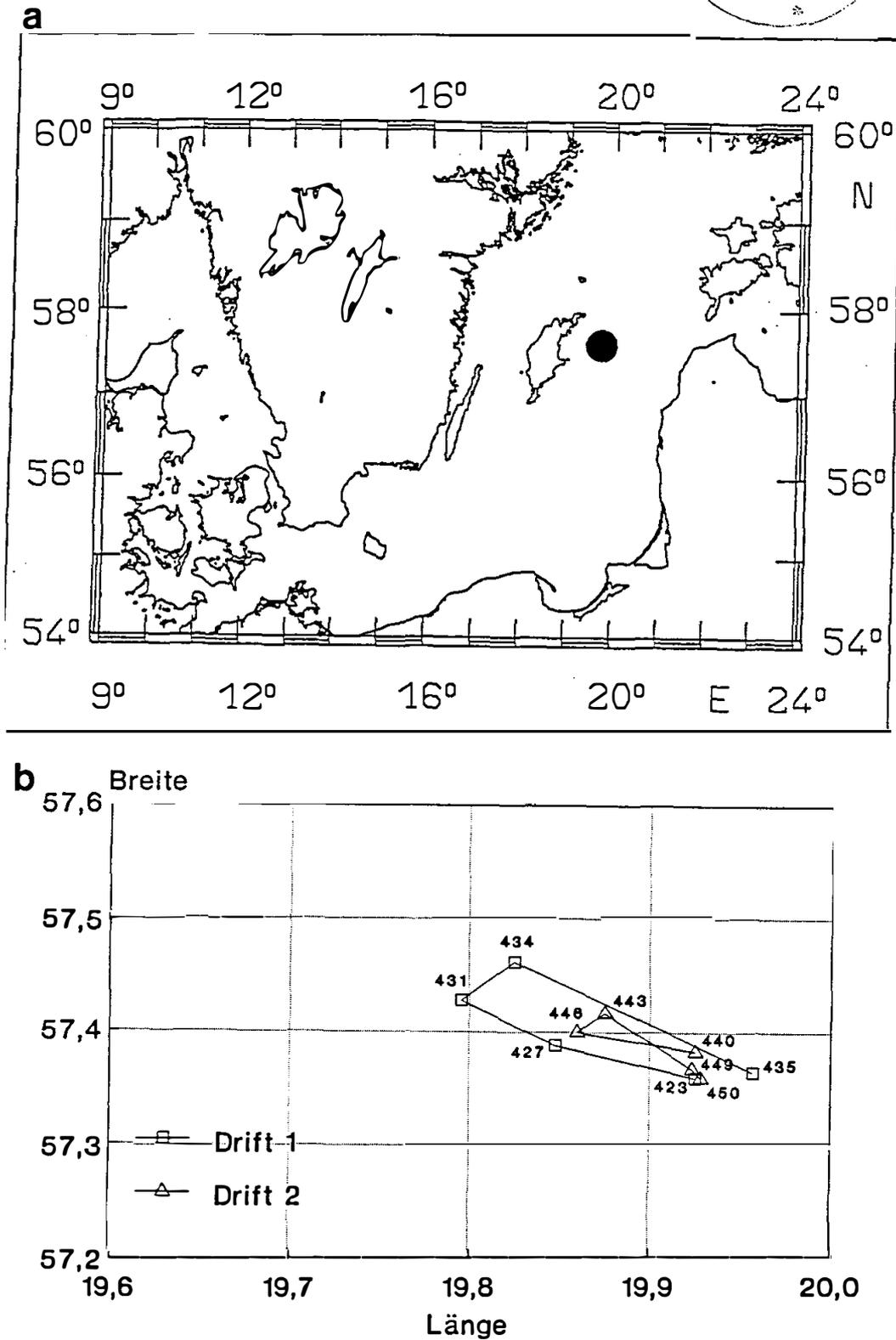


Abbildung 2.2: a) Überblick über das Untersuchungsgebiet während BAMBI '91; b) Driften während BAMBI '91, St. 423 bis 435 = erste Drift, St. 440 bis 450 = zweite Drift

Tabelle 2.2: Driftstationen und Probennahme während BAMBI '91; BWS = Bodewasserschöpfer (214 m), Station 423 bis 435 = erste Drift, Station 440 bis 450 = zweite Drift

Station	Datum	Position	Tiefe	Probentiefe [m]
423	01.08.	57°21,6'N 19°55,5'E	219	0,5,10,15,25,35,40,60,80
427	02.08.	57°23,3'N 19°50,9'E	196	0,5,10,15,25,35,60,80,100, 140,160
431	03.08.	57°25,7'N 19°47,7'E		0,5,10,15,25,35,60,80,100, 120,137
434	04.08.	57°27,7'N 19°49,5'E	220	0,5,10,15,25,35
435	04.08.	57°21,9'N 19°57,7'E	224	60,80,100,120,140,160
440	07.08.	57°23,0'N 19°55,5'E	206	0,5,15,15,25,35,60,80,100, 120,140,160
443	08.08.	57°24,0'N 19°51,6'E	192	0,5,10,15,25,35,60,80,100, 120,140,160
446	09.08.	57°25,0'N 19°52,5'E	195	0,5,10,15,25,35,60,80,100, 120,140,160
449	10.08.	57°25,0'N 19°55,4'E	213	0,5,10,15,25,35,60,80,100, 120,140,160
450	10.08.	57°21,6'N 19°56,8'E	214	180,BWS

2.1.2 Kulturen

Während dieser Arbeit wurden drei verschiedene *Synechococcus*-Stämme benutzt. Zwei dieser Stämme wurden Anfang 1990 aus der Kieler Bucht isoliert: KB9001 und KB9002. Diese Stämme unterschieden sich bezüglich ihres Pigmentgehaltes. Der Stamm KB9001 erscheint unter weißem Licht in Kultur rot, der Stamm KB9002 grün. Bei dem dritten Stamm, WH7803 (= DC-2), handelt es sich um ein Isolat aus dem Atlantik (von R. OLSON, Woods Hole, zur Verfügung gestellt).

Die Anzucht und Hälterung der Kulturen erfolgte bei 20 °C und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus. Die Lichtintensität betrug $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (BARLOW u. ALBERTE, 1985). Alle *Synechococcus*-Stämme wurden auf Schütteltischen angezogen oder mittels Magnetrührern in Bewegung gehalten, da in ruhenden Kulturen eine rasche Sedimentation der Zellen festzustellen war.

Maximales Wachstum wurde für die Ostseestämme auf f/2-Medium (GUILLARD, 1975) und für den Stamm WH7803 auf dem künstlichen Seewassermedium ASW (artificial seawater; WYMAN *et al.*, 1985) erreicht. Der Ansatz der Medien erfolgte je nach Herkunftsort der Kulturen mit Ostsee- oder Atlantikwasser, welches über $0,2 \mu\text{m}$ Membranfilter vorfiltriert wurde. Sämtliche Kulturgefäße bestanden aus Glas und wurden mit Aluminiumfolie oder Metallkappen verschlossen. Alle Kulturen wurden grundsätzlich steril behandelt, d.h. Medien und Gefäße wurden autoklaviert und eine Animpfung oder Probenentnahme fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Kulturen wurden regelmäßig auf frisches Medium überimpft, wobei dies im Falle der Ostseekulturen nach drei bis vier und im Falle der WH7803-Kulturen nach zwei Wochen geschah.

2.2 Bearbeitung des Probenmaterials

2.2.1 Abiotische Parameter

Als abiotische Parameter wurden bei den Proben aus der Kieler Bucht und während BAMBI '91 die gelösten Nährstoffe Nitrat, Nitrit, Ammonium, Phosphat und Silikat nach GRASSHOFF *et al.* (1983) gemessen.

Während BAMBI '91 wurde außerdem der Sauerstoffgehalt über die WINKLER-Methode und Schwefelwasserstoff bestimmt (GRASSHOFF *et al.*, 1983). Temperaturprofile wurden

mit einer ME-Multisonde aufgenommen. Die Salinität wurde durch Salinometrie aus diskreten Proben ermittelt.

Zur Messung der Eindringtiefe des Lichtes wurde eine Secchischeibe (Durchmesser 0,5 m) eingesetzt und die Tiefe der euphotischen Zone ($\leq 1\%$ -Lichttiefe) nach PARSONS *et al.* (1984) berechnet. Lichtmessungen innerhalb der Wassersäule erfolgten täglich gegen 12.00 Uhr mittags mit einem Licor-4 π -Quantameter.

2.2.2 Biologische Parameter

Als Standardparameter bei allen aus dem Freiland gewonnenen Proben wurden Primärproduktion und Chlorophyll für das gesamte Phytoplankton und in den vier Größenfraktionen $> 20 \mu\text{m}$, $20\text{-}5 \mu\text{m}$, $5\text{-}2 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ bestimmt. Ebenfalls wurden die Zellabundanz im Größenbereich $0,2$ bis $20 \mu\text{m}$ erfaßt.

2.2.2.1 Chlorophyll

Zur Chlorophyllbestimmung wurde zwischen 0,5 und 1 l Probenwasser mit einem Unterdruck von 150 bis 200 mm Hg (SHELDON, 1972; WATERBURY *et al.*, 1986) filtriert. Die Fraktionen $< 20 \mu\text{m}$ wurden durch eine Netzgaze mit einer Maschenweite von $20 \mu\text{m}$ vorfiltriert, die Fraktionen $5\text{-}20 \mu\text{m}$, $2\text{-}5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ ergaben sich durch die Vorfiltration über Membranfilter mit entsprechender Porengröße (Nuclepore, 45 mm Durchmesser). Jedes so erhaltene Filtrat wurde auf Glasfaserfilter (Whatman GF/F, 25mm Durchmesser) filtriert, die anschließend bis zu ihrer Aufarbeitung bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ (maximal vier Wochen) eingefroren wurden. Die Chlorophyllextraktion erfolgte in 90prozentigem Aceton. Der Chlorophyllgehalt wurde mit einem Kontron-Spektralfluorometer bestimmt, dessen Eichung gegen trichromatisch gemessenes Chlorophyll (Chlorophyllstandard, Fa. Serva) erfolgte.

2.2.2.2 Primärproduktion

Die Primärproduktion wurde durch die Aufnahme von H^{14}CO_3 nach STEEMANN NIELSEN (1952) bestimmt. Generell wurden 250 ml Probe in Polycarbonatflaschen (Fa. Nalgene) inkubiert. Die Proben aus der Kieler Bucht wurden mit einer Radioaktivität von $26,8 \mu\text{Ci NaH}^{14}\text{CO}_3$ pro Probe fünf bis sechs Stunden unter den beschriebenen

Kulturbedingungen (s. 2.1.2), die BAMBI-Proben mit einer Radioaktivität von 20,4 μCi $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ pro Probe *ca.* zwölf Stunden (07.00 bis 19.00 Uhr) *in situ* inkubiert. Alle Proben wurden nach der Inkubation mit $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) versetzt, um die photosynthetische Aktivität und damit die weitere Aufnahme von H^{14}CO_3 zu stoppen (JOICHEM, 1987). Als Dunkelkorrektur dienten bei den Proben der Kieler Bucht 45 ml und während BAMBI '91 250 ml Probe, die vor der Inkubation mit $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DCMU versetzt wurden (LEGENDRE *et al.*, 1983). Die Fraktionierung der Proben erfolgte nach der Inkubation, um zusätzlichen Streß für die Zellen durch "pre-screening" zu vermeiden (ITURRIAGA u. MITCHELL, 1986). Dazu wurden jeweils 45 ml der Probe durch eine 20 μm Netzgaze bzw. durch 5,0 und 2,0 μm Nuclepore-Membranen (25 mm Durchmesser) filtriert und die Filtrate wiederum auf 0,2 μm Filter (25 mm Durchmesser) filtriert. Diese Filter wurden mit 5 ml Lumagel SB versetzt und nach zwölf Stunden in einem Packard Tricarb Liquid-Szintillationszähler gemessen. Die zur Berechnung der Primärproduktion notwendige Bestimmung der Alkalinität erfolgte auf der Basis von Temperatur und Salinität aus einem Tabellenwert für die Ostsee.

2.2.2.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Zellzahlen des Pico- und Nanoplanktons wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dazu wurden definierte Volumina der Proben auf 0,2 μm Filter (Nuclepore) filtriert. Zur besseren Verteilung des Unterdrucks über den Nuclepore-Filtern diente eine 0,2 μm Membran als Unterlage (WATERBURY *et al.*, 1986). Die Nuclepore-Filter waren zur Vermeidung von Hintergrundfluoreszenz entweder schon schwarz vorgefärbt oder wurden zu diesem Zweck 24 h in Irgalanschwarz (Fa. Serva) eingelegt und vor der Benutzung mit destilliertem Wasser gespült (HOBBIE *et al.*, 1977). Für die Untersuchung von Cyanobakterien und eukaryontischen, autotrophen Zellen wurden zwei verschiedene Filter angefertigt. Zur Bestimmung der Abundanzen wurden, ohne vorherige Anfärbung der Zellen, 20 bis 40 ml Probe filtriert (= Autofluoreszenzfilter). Auf diesen Autofluoreszenzfiltern konnten unter Blauanregung Cyanobakterien aufgrund ihrer orange-gelblichen Autofluoreszenz von den rot fluoreszierenden eukaryontischen, autotrophen Zellen unterschieden werden (BROCK, 1978; JOHNSON u. SIEBURTH, 1979; DAVIS *et al.*, 1985; WATERBURY *et al.*, 1986; LI u. WOOD, 1988). Auf einen zweiten Filter wurde ein geringeres Volumen (5 ml) einer Parallelprobe filtriert und die Zellen mit Proflavin (Proflavin-hemisulfat, Fa. Serva; HAAS, 1982) angefärbt (= Proflavinfilter). Proflavin

färbt das Zytoplasma an, und so konnte unter Blauanregung nicht nur ein autofluoreszierender Chloroplast, sondern die ganze Zelle anhand des grünlich erscheinenden Plasmas erkannt werden. Größere Probenvolumina, die zur Ermittlung der Abundanzen benötigt wurden, konnten wegen Überfärbung nicht mit den entsprechenden Mengen Proflavin behandelt werden. Durch die Herstellung von Autofluoreszenz- und Proflavinfiltern konnten autotrophe Zellen ohne Unterschätzung vermessen werden und es konnte geklärt werden, ob zwei Chloroplasten zu einer oder zwei Zellen gehören.

Bakterien wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fa. Serva; PORTER u. FEIG, 1980; DAVIS *et al.*, 1985) angefärbt (Probenvolumen: 2 ml). DAPI färbt primär die DNA an, und die Zellen erscheinen unter UV-Anregung blau. Die bakterielle Kontamination der DAPI-Lösung wurde durch Sterilfiltration in regelmäßigen Abständen ausgeschlossen (HOBBIE, 1977).

Die Filter der Proben aus der Kieler Bucht wurden spätestens sechs Stunden nach Probennahme, die Filter der BAMBI-Fahrt sofort nach Probennahme (maximal 30 Minuten später) angefertigt. Die Anfärbung der Proben erfolgte immer im mit Formol fixierten Zustand (Endkonzentration: 1%). Die Filter wurden auf Objektträger gelegt, mit Immersionsöl (Cargille, Typ A; HOBBIE *et al.*, 1977; WATSON, 1977; HAAS, 1982) eingedeckt und anschließend bei -18 °C bis zur Auswertung eingefroren. Aufgrund des Ausbleichens der Zellen, gerade auf den Autofluoreszenzfiltern, fand die Auswertung der Filter spätestens nach vier Wochen statt (WATERBURY *et al.*, 1986). Pro Filter wurden für die Ermittlung der Zellkonzentrationen des autotrophen Pico- und Nanoplanktons je nach Dichte der Organismen entweder 150 Zellen (Fehler = $\pm 20\%$; VENRICK, 1978) oder 50 Felder eines speziellen Meßgitters (New Porton-Grid 12, Graticules Ltd., England; BØRSHEIM u. BRATBAK, 1987) ausgezählt. Zur Bestimmung der Bakterienkonzentrationen wurden immer über 200 Zellen (Fehler = $\pm 10\%$; VENRICK, 1978) bzw. 20 Meßfelder ausgezählt. Außerdem wurden mit Hilfe dieses Gitters 50 Zellen jeden Typs in Länge und Breite vermessen.

Die Auszählung erfolgte unter einem Zeiss-Mikroskop mit einem 100 x Öl-Neofluar-Objektiv. Es wurde eine Anregung im blauen Bereich des Spektrums (Bandpass-Excitationsfilter: 450-490 nm, FT 510, LP 520) und eine Anregung im ultravioletten Bereich des Spektrums (Bandpass-Excitationsfilter: 365 nm, FT 395, LP 397) verwendet, die Lichtquelle bestand aus einer Quecksilberbogenlampe (50 W).

2.2.3 Zytometrie

2.2.3.1 Prinzip der zytometrischen Messung

Das große Leistungsvermögen der Durchflußzytometrie besteht in der Fähigkeit, bei extrem hohem Probendurchsatz verschiedene Parameter einzelner Partikel gleichzeitig erfassen zu können.

Zum einen besteht die Möglichkeit, Fluoreszenzeigenschaften von Partikeln, im allgemeinen Zellen, zu qualifizieren und zu quantifizieren. Für diese Analyse eignen sich besonders autotrophe Organismen, deren Pigmente eine unterschiedliche Fluoreszenz ausstrahlen können. Die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht es zudem, spezielle Zellbestandteile anzufärben (z.B. DNA-Anfärbung mittels DAPI oder Hoechst 33342, BOUCHER *et al.*, 1991) und so heterotrophe Organismen, die nicht autofluoreszieren, der zytometrischen Analyse zugänglich zu machen.

Zum zweiten kann mit einem Durchflußzytometer das Volumen und die Oberflächenstruktur einzelner Partikel erfaßt werden. Größe und Oberflächenstruktur von Partikeln können wie in einem Coulter-Counter, also durch die Veränderung eines elektrischen Feldes, deren Größe proportional dem Volumen des gemessenen Partikels ist, oder durch Lichtstreuung der Partikel ermittelt werden. Da in dieser Arbeit keine Volumenmessungen durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle nicht weiter auf diese Möglichkeiten eingegangen werden.

Voraussetzung zur Bestimmung der oben erwähnten Parameter ist zunächst ein Aufbau, der einen so exakt zu manipulierenden Probendurchfluß zuläßt, daß jedes Partikel einzeln an einer bestimmten Stelle des Meßsystems erfaßt werden kann. Zu diesem Zweck wird die Probe in einer Meßkammer durch ein Meßloch mit sehr geringem Durchmesser (30-80 μm) geleitet. Meßkammern mit unterschiedlichen Meßlöchern sind austauschbar und die Größe des Meßlochs ist in Relation zu der Größe der zu untersuchenden Partikel möglichst klein gewählt. In der Meßkammer wird der Probenstrahl von einer Mantelflüssigkeit umgeben, um diesen möglichst definiert fließen zu lassen, d.h. mit gleichmäßigem Durchmesser und gleichbleibender Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der Mantelflüssigkeit wird dabei durch den variablen Druck einer Pumpe gesteuert. Mantelflüssigkeit und Antriebsdruck geben also die Geschwindigkeit des Probendurchflusses und den Probenstrahldurchmesser vor. So wird gewährleistet, daß sich innerhalb des Probenstroms die Partikel hintereinander arrangieren und jedes Partikel einzeln gemessen werden kann (HORAN u. WHEELLESS, 1977).

Jedes Partikel wird nun zur Erfassung seiner Fluoreszenzeigenschaften beim "Durchlaufen" des gebündelten und auf einen bestimmten, hinter dem Meßloch liegenden Punkt genau zentrierten Lichtstrahls mit einer exakten Energiemenge und einer bestimmten Wellenlänge (durch Filtersätze entsprechend eingestellt) angeregt. Die Energie- bzw. Lichtquelle für die Anregung ist dabei entweder ein Laser oder eine Quecksilberbogenlampe (STEEN, 1990). Durch unterschiedliche Filteraufsätze können die Partikel dann nur mit einem gewünschten Teil des Wellenlängenspektrums der Lampe oder des Lasers angeregt werden. Nach erfolgter Anregung mißt ein Detektor anschließend die Fluoreszenz der im Lichtstrahl angeregten Moleküle, wobei auch hier durch verschiedene Filter die Möglichkeit besteht, nur einen gewünschten Teil des emittierten Spektrums zu untersuchen. Die von den Detektoren aufgenommenen Signale werden anschließend verstärkt, durch einen Photomultiplier in äquivalente elektrische Pulse transformiert und an einen Computer weitergeleitet. Mit entsprechenden Programmen können die Messungen dann ausgewertet werden.

2.2.3.2 Aufbau des FLUVO II

Bei dem hier verwendeten Zytometer handelt es sich um das FLUVO II, konstruiert von Dr. V. KACHEL (Max-Planck-Institut für Biochemie, München/Martinsried).

Die Meßeinheit des FLUVO II besteht aus einer auswechselbaren Meßkammer, einer Quecksilberbogenlampe (100 W) zur Anregung der untersuchten Partikel, einem Oszilloskop (Fa. Hitachi) zur Beobachtung der Meßsignale während der Messung, drei Fluoreszenzdetektoren, einem Detektor für das Coultervolumen und Vor- und Feinverstärkern. Zusätzlich verfügt das FLUVO II über einen Motor, der ein über das Computerprogramm wählbares, genau definiertes Probenvolumen (31, 62, 125 oder 250 μ l) automatisch in die Meßkammer injiziert.

Bei der Meßkammer des FLUVO II handelt es sich um eine geschlossene Kammer, bei der die Probe nach Durchlaufen des Meßlochs nicht senkrecht nach unten ablaufen kann, sondern in einem Winkel von *ca.* 45° aufwärts nach rechts und links abgeleitet wird. Durch diese Art von Konstruktion ist es bei einem solchen Gerät nicht möglich, Partikel zu sortieren. Ein Querschnitt der Meßkammer (STEEN, 1990), der den Verlauf des Probenstrahls während der Messung verdeutlicht, ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt. Die Fokussierung des Anregungslichtes und die Aufnahme des emittierten Fluoreszenzlichtes erfolgt durch ein Zeiss 100 x Öl-Neofluar-Objektiv.

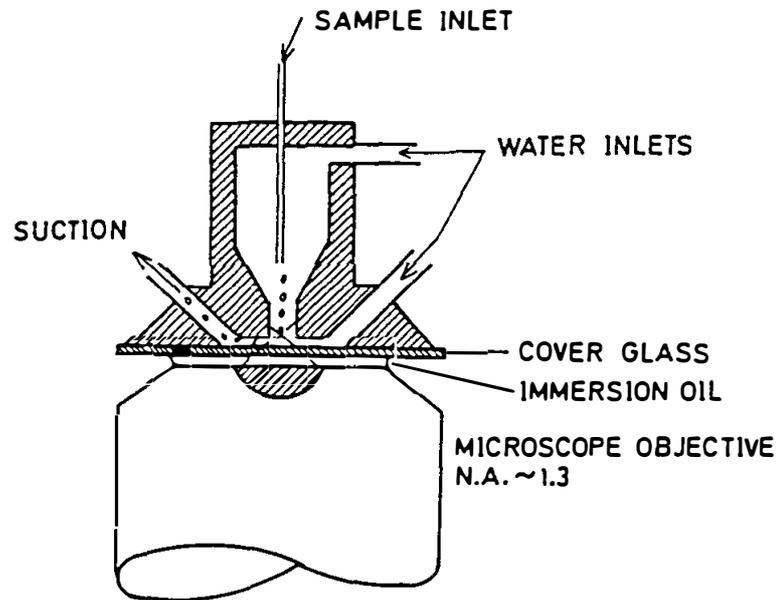


Abbildung 2.3: Querschnitt durch die Meßkammer des FLUVO II (STEEN, 1990; schematisch)

Die Einheit zur Auswertung der Messungen besteht aus einem Interface (Trigger, Peakdetektor u.a.; KACHEL, 1990) und einem Computer, der mit einem für dieses Zytometer speziellen Meßprogramm ausgestattet ist (KACHEL, 1990). Außerdem gehören eine Membrampumpe als Antrieb für den Wasser- und Probendurchfluß, eine Abfallflasche und ein Ultraschallbad zum notwendigen Aufbau.

Ein Schaltbild der eigentlichen Meßapparatur nach KACHEL (persönliche Mitteilung) zeigt Abbildung 2.4, aus der alle zur Anwendung gekommenen Filter und Spiegel zu ersehen sind.

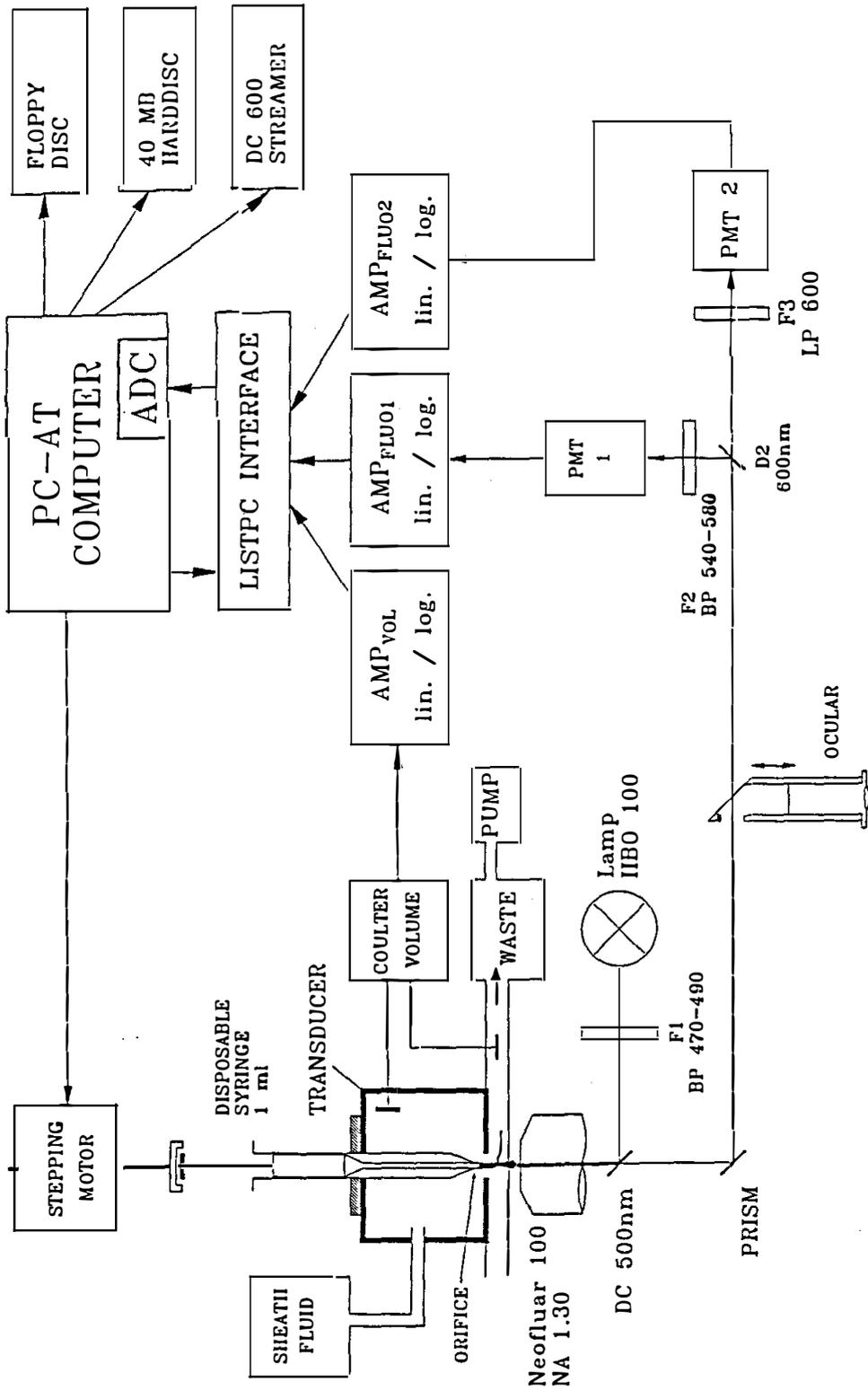


Abb. 2.4: Schaltbild des FLUVO II (KACHEL, persönliche Mitteilung)

2.2.3.3 Messung mit dem FLUVO II

Während der Messungen wurde der Raum abgedunkelt, um störenden Lichteinfall in die Meßapparatur zu vermeiden (STEEN, 1990; KACHEL, persönliche Mitteilung). Die Membranpumpe wurde *ca.* 15 Minuten vor Meßbeginn angestellt, um sämtliche Schläuche und die Meßkammer selbst vorzuspülen und um mögliche Salzreste zu lösen. Als Mantelflüssigkeit diente immer das Wasser, welches dem jeweiligen Probenwasser entsprach. Die Mantelflüssigkeit wurde grundsätzlich vor der Benutzung über $0,2\ \mu\text{m}$ Membranfilter vorfiltriert, da sich schon innerhalb weniger Stunden selbst in filtriertem Seewasser Partikel bis zu einer Größe von $4\ \mu\text{m}$ bilden können (SHELDON *et al.*, 1967), die dann während der Messung zu Verstopfungen des Meßlochs und zu verfälschten Ergebnissen beitragen können. Zusätzlich ist zwischen Vorratsbehälter der Mantelflüssigkeit und Meßkammer ein auswechselbarer $5\ \mu\text{m}$ Filter (Nuclepore) in einem Filterhalter angebracht, den die Mantelflüssigkeit passieren muß und der jeden Tag gewechselt wurde. Bei Verstopfung und Verunreinigungen der Meßkammer bzw. des Meßlochs wurde die Kammer ausgebaut und mit einer Seifenlösung gespült. Diese löst am Rand des Meßlochs klebende Partikel und fluoreszierende Reste des beim Zusammenbau der Kammer benutzten Fettes (KACHEL, persönliche Mitteilung). Die an die Meßkammer angeschlossenen probenab- und zuführenden Schläuche wurden je nach Bedarf (bei Undichtigkeit, Verstopfung, Abnutzung) ausgewechselt, um einen kontinuierlichen und ungestörten Probendurchfluß zu gewährleisten. Das Gerät wurde jeden Tag mit fluoreszierenden Referenzpartikeln einer bestimmten Größe als Standard ($1,34\ \mu\text{m}$ Durchmesser, Standardabweichung: $0,005$ bis $0,01\ \mu\text{m}$, Latex, Fa. Polyscience) geeicht. Ein Standard besteht dabei aus stabilem Material in Bezug auf Volumen und Fluoreszenz und dient der Optimierung der Messung bzw. der Kalibrierung des Gerätes (HORAN *et al.*, 1990). Diese Eichung wurde mehrmals am Tag wiederholt.

Alle Proben wurden vor der Messung durch eine $20\ \mu\text{m}$ Netzgaze filtriert und, soweit möglich, frisch gemessen, d.h., eine unnötige Fixierung und ein damit eventuell einhergehender Verlust an Fluoreszenz wurde vermieden. Allerdings war in den ersten drei Monaten dieser Arbeit eine direkte Aufarbeitung der Proben (Proben der Kieler Bucht) durch die Zytometrie nicht immer möglich (Reparatur und zweimaliger Austausch des Gerätes), so daß diese Proben mit Formol fixiert (Endkonzentration: 1 %) und bis zu zwei Wochen später gemessen wurden. Desweiteren wurden alle Proben unmittelbar vor der Messung einer zwei- bis vierminütigen Behandlung im Ultraschallbad unterzogen, um möglichst viele Zellklumpen in Einzelzellen zu trennen.

An Bord von FS Alkor während BAMBI '91 wurden alle Proben, wie oben beschrieben, vorbehandelt (Filtration über eine 20 μm Netzgaze, Ultraschall), aber immer unfixiert im Laufe des Tages gemessen. Dabei wurden die Proben bis zur Messung maximal vier Stunden bei 4 °C aufbewahrt.

Um die mit der Fixierung verbundenen Verluste der Fluoreszenz bewerten zu können, wurden Parallelproben mit Formol fixiert (Endkonzentration: 1 %) und vier Wochen nach der Ausfahrt nochmals zytometrisch gemessen und die Zellkonzentrationen bestimmt. Damit konnte auch eine Aussage über die Qualität der Messungen von den Proben aus der Kieler Bucht gemacht werden, die alle nur im fixierten Zustand gemessen worden waren (s.o).

2.2.3.4 Auswertung der zytometrischen Messungen

Mit der für das FLUVO II entwickelten Software bietet sich die Möglichkeit, jede Messung graphisch auszuwerten. Auf dem Computerbildschirm werden während der Messung alle einzelnen Meßpunkte in einem Koordinatensystem aufgetragen (Y-Achse = Chlorophyllfluoreszenz, X-Achse = Phycoerythrinfluoreszenz). Nach erfolgter Messung wird ein sogenanntes Fenster um die interessierenden Meßpunkte gelegt, und das Programm ist in der Lage, die im gewünschten Fenster aufgeführten Meßpunkte, z.B. zur Bestimmung der Zellkonzentration einer Probe, zu summieren. Diese Auswertung ist für insgesamt acht Populationen gleichzeitig möglich, d.h. bis zu acht Fenster können erstellt werden. Voraussetzung ist allerdings, daß die einzelnen Populationen auf dem Computerbildschirm unterschieden werden können und die entsprechenden Meßpunkte nicht übereinander liegen. Letzteres ist gerade bei Freilandproben nicht immer gegeben. Internes Rauschen des Gerätes kann außerdem zu Überlappung von Rausch- und Meßsignalen führen.

Um die in der Probe ursprünglich vorliegende Zellkonzentration zu bestimmen, muß das gemessene Probenvolumen bekannt sein. Eine Möglichkeit der Bestimmung des gemessenen Volumens ist die Zugabe einer definierten Menge Referenzpartikel zu einer definierten Menge Probe (OLSON *et al.*, 1985), so daß über die tatsächlich gemessene Anzahl an Referenzpartikeln auf das durchgelaufene Probenvolumen geschlossen werden kann. Diese Methode der Bestimmung der Zellkonzentration fand in der vorliegenden Arbeit für die meisten Proben aus der Kieler Bucht und einige Proben aus Kulturversuchen Anwendung, da in den ersten dreieinhalb Monaten dieser Arbeit nur Geräte ohne automatische Probeninjektion zur Verfügung standen. Die Zellkonzentrationen aller BAMBI-Proben und der meisten Proben aus Kulturversuchen konnten allerdings mit Hilfe der automatischen



Probeninjektion ermittelt werden, also durch Messung eines exakt definierten Probenvolumens (s. 2.2.3.2).

Von Freilandproben mit relativ geringen Zellkonzentrationen (100 bis 1000 Zellen·ml⁻¹) erfolgte die Messung über ein Volumen von 125 µl oder 250 µl. Bei Kulturproben wurden meist 31 µl gemessen, wobei oftmals Verdünnungen angesetzt wurden.

Pigmenteigenschaften und -verteilungen einzelner Populationen wurden wie die Zellkonzentrationen über die Erstellung von Fenstern ausgewertet. Mit dem Programm konnten für jede Population aus der ursprünglichen Meßaufzeichnung Häufigkeitsverteilungen für die Chlorophyll- und Phycoerythrinfluoreszenz erstellt werden. Gleichzeitig berechnete das Programm den arithmetischen Mittelwert, die Standardabweichung und die Maxima dieser Verteilungen. Die Chlorophyll- bzw. Phycoerythrinfluoreszenz entspricht dabei einer bestimmten Chlorophyll- bzw. PhycoerythrinKonzentration.

Veränderungen bezüglich der Pigmente wurden wie folgt ermittelt. Zu allen Proben wurden immer Referenzpartikel gleicher Größe und damit gleichen Fluoreszenzbetrages pro Partikel zugegeben (s.o.). Um Referenzpartikel und Population wurde nach jeder Messung je ein Fenster gelegt und aus jedem dieser Fenster eine Fluoreszenzverteilungskurve erstellt und arithmetische Mittelwerte und Maxima ermittelt. Die entsprechenden Werte der Zellen wurden dann durch die der Referenzpartikel dividiert, so daß sich relative Fluoreszenzwerte, in der Einheit "pro Zelle", bezogen auf die hier benutzten Referenzpartikel ergaben. Damit ist gewährleistet, daß sich elektronische Veränderungen des Gerätes (unterschiedliche Signalverstärkung, Veränderung der Anregungsenergie der Lichtquelle durch Altern der Hg-Lampe, etc.) nicht in der Meßauswertung niederschlagen.

2.3 Experimente mit Kulturen

2.3.1 Methodische Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen

Zur Klärung der Meßgenauigkeit und zur Entwicklung von Verfahren, die die Zählgenauigkeit des Zytometers erhöhen, wurden Versuche mit einer WH7803-Kultur durchgeführt. Dazu wurden zwei Aspekte berücksichtigt: a) der für die Messung beste Konzentrationsbereich, b) Methoden der Probenvorbehandlung zur Auflösung von Zellklumpen und damit Erhöhung der meßbaren Ereignisse.

2.3.1.1 Verdünnungsexperimente

Zur Ermittlung günstiger Probenkonzentrationen für die zytometrische Messung wurden mit einer WH7803-Kultur zwei Experimente (I, II) durchgeführt. Aus einer Kultur mit hoher Zellkonzentration ($> 500 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹) wurden mehrere parallele Verdünnungsreihen hergestellt. Die Verdünnungsstufen waren 1:1, 1:5, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:1000. Die Ausführung des Experiments I bestand darin, daß die Zellkonzentrationen in den oben aufgeführten Verdünnungsstufen einer Probe (Probenkonzentration) zytometrisch und mikroskopisch ermittelt wurden. Daraus konnte jeweils die ursprüngliche Konzentration in der unverdünnten Probe (Endkonzentration) berechnet und anschließend die jeweiligen Ergebnisse verglichen werden. Von jeder Verdünnung wurden jeweils fünf aufeinanderfolgende zytometrische Messungen durchgeführt und drei Filter für die mikroskopische Zählung hergestellt.

Mit dem Experiment II wurde der Frage nachgegangen, inwiefern unmittelbar aufeinanderfolgende Messungen ein und derselben Probe zu unterschiedlichen quantitativen Ergebnissen führen bzw. ob sie reproduzierbar sind. Dabei war auch von Interesse, inwiefern die Reproduzierbarkeit von einem bestimmten Konzentrationsbereich in der Probe abhängig ist. Dazu wurde nur mit drei Verdünnungsstufen gearbeitet: 1:1, 1:5 und 1:1000, was einem Konzentrationsbereich von $> 25 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ und einem zwischen $0,2 \cdot 10^6$ bis $25 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ entsprach. Eine Probe jeder Verdünnung wurde zehnmal hintereinander mit dem Zytometer gemessen und die Endkonzentration ermittelt. Zum Vergleich wurden wiederum je drei Parallelfilter für die Mikroskopie angefertigt.

2.3.1.2 Ultraschall- und Detergensexperimente

Für den zweiten Aspekt, Verbesserung der Zählergebnisse durch Vorbehandlung der Probe, wurden zwei weitere Experimente (III, IV) durchgeführt. Dazu wurden Proben derselben WH7803-Kultur vor jeder Messung einer Behandlung mit Ultraschall und/oder mit Detergens (Triton X 100) unterzogen. Experiment III wurde in einem Konzentrationsbereich $> 1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹, Experiment IV in einem Konzentrationsbereich von $< 0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ durchgeführt. In beiden Experimenten wurden die Proben zunächst ohne jegliche Vorbehandlung mit dem Zytometer gemessen, dann einer unterschiedlichen Ultraschallbaddauer und einer Zugabe von verschiedenen Mengen an Detergens (s. Abbildung 3.6) unterzogen und sofort im Anschluß an die Behandlung

gemessen. Die Endkonzentration wurde ebenfalls wie bei den Experimenten I und II mikroskopisch aus je drei Parallelzählungen festgestellt und zum Vergleich herangezogen.

2.3.2 Wachstumsphysiologie verschiedener *Synechococcus*-Stämme

2.3.2.1 Wachstumskurven

Um einen Überblick über die Wachstumseigenschaften der kultivierten *Synechococcus*-Stämme unter den gegebenen Bedingungen zu erhalten, wurden von den Stämmen KB9001, KB9002 und WH7803 Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden alle drei Stämme zu Beginn des Untersuchungszeitraumes in Ansätzen von je einem Liter angeimpft (KB9001 und KB9002 in f/2, WH7803 in ASW) und unter den beschriebenen Kulturbedingungen (s. 2.1.2) gehalten. Jeden zweiten Tag wurden Proben entnommen und mittels Zytometrie und Mikroskopie die Zellabundanz bestimmt. Das Wachstum aller Stämme wurde über einen Zeitraum von 42 Tagen verfolgt. Aus den Zytometer- und Mikroskopdaten wurde je eine Wachstumskurve erstellt. Aus dem Bereich der exponentiellen Wachstumsphase wurden Wachstumsraten μ (Formel 1) und Verdopplungszeiten t_d (Formel 2) errechnet (SCHLEGEL, 1985) und Kurven bzw. Daten wurden miteinander verglichen. Für den weiteren Vergleich der beiden Datensätze wurde eine Korrelationsberechnung durchgeführt.

$$\mu = (\ln N_{t_x} - \ln N_{t_0}) / (t_x - t_0) \quad (1)$$

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

N_{t_0} = Zellkonzentration zum Zeitpunkt t_0

N_{t_x} = Zellkonzentration zum Zeitpunkt t_x

2.3.2.2 Veränderung der Wachstums- und Pigmenteigenschaften des *Synechococcus*-Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung

Anhand verschiedener Kultivierungsbedingungen hinsichtlich Nitratangebot und Lichtintensität sollten in den folgenden zwei Versuchen Erkenntnisse über die physiologischen Anpassungsfähigkeiten von *Synechococcus* sp. am Beispiel des Stamms WH7803 gewonnen werden.

So sollte untersucht werden, ob das für Cyanobakterien typische Pigment Phycoerythrin aufgrund von unterschiedlichen Lichtverhältnissen und verschiedener Nitratkonzentrationen

ab- bzw. aufgebaut wird. Phycoerythrin wird als ein Stickstoffspeicherstoff angesehen und sollte demnach bei Stickstoffarmut abgebaut werden (WYMAN *et al.*, 1985; GLOVER *et al.*, 1988). Zudem wurde auch die Veränderung bezüglich des Chlorophylls in diesen Versuchen verfolgt.

Hiermit sollten anhand der Pigmentveränderungen auch die qualitativen Möglichkeiten der Zytometrie bzw. die Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber geringfügigen Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung und des Pigmentgehaltes einer Zelle erprobt werden.

Versuch I: Der *Synechococcus*-Stamm WH7803 wurde in ASW-Medium in vier Ansätzen mit verschiedenen Nitratkonzentrationen angezogen. Die Konzentrationen waren $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N2), $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N20) und $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N30). Desweiteren wurde eine Kontrolle in ASW-Medium mit üblicher Nitratkonzentration ($6800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) angesetzt. Die Anzucht der Stammkultur, aus der alle vier Ansätze angeimpft wurden, erfolgte zuerst in ASW-Medium üblicher Zusammensetzung und anschließend auf ASW-Medium ohne Nitrat. Diese Kultur wurde nach zwei Wochen für die Beimpfung der Versuchsansätze benutzt. Trotz dieser Behandlung der Stammkultur wurde durch das Inokulum noch soviel Nitrat in die Ansätze eingebracht, daß es nicht gelang, einen Ansatz ganz ohne Nitrat herzustellen, und die niedrigst mögliche Nitratkonzentration war $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Das Volumen der Ansätze betrug ein Liter; und die Ansätze wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Stammkulturen gehalten (vgl. 2.1.2). In zweitägigem Abstand wurde eine Probe für Zytometrie und Mikroskopie entnommen. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 55 Tage. Sowohl aus den Zytometer- als auch aus den Mikroskopdaten wurden Wachstumskurven erstellt. Zusätzlich wurde mit dem Datensatz eine Korrelationsberechnung durchgeführt.

Versuch II: Dieser Versuch war zum einen die Wiederholung des Versuchs I inklusive einer Parallele pro Ansatz, zum anderen wurde der gleiche Versuch unter 90prozentiger Lichtreduktion ($2,2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durchgeführt. Allerdings unterschied sich die Gewinnung einer nitratverarmten bzw. -losen Kultur hierbei von der des Versuchs I. Als Stammkultur diente eine WH7803-Kultur, die in ASW-Medium üblicher Zusammensetzung angezogen wurde. Die Zellen wurden über einen $0,2 \mu\text{m}$ Filter (Nuclepore) filtriert, auf dem Filter mit nitratfreiem Medium mehrmals gespült und anschließend in nitratfreiem Medium resuspendiert. Diese Behandlung gewährleistete eine Minimierung des Nitratintrags durch das Inokulum in die Versuchsansätze. Die Zellen überstehen diese Prozedur ungeschädigt, wie die mikroskopische Untersuchung mehrerer so behandelter Proben zeigte. Der Nitratgehalt in der Lösung resuspendierter Zellen betrug $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Aus dieser Lösung

wurden alle Ansätze mit dem gleichen Volumen beimpft. Die Nitratkonzentrationen waren $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N0), $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N5), $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N15) sowie $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ansatz N30). Pro Konzentration wurden vier Ansätze hergestellt, jeweils zwei für den Hellversuch (Hellansätze) und zwei für den Versuch unter Lichteinschränkung ("Dunkel"-Ansätze). Auch hier wurde je eine Kontrolle in ASW-Medium mit einer Nitratkonzentration von $6800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ angesetzt. Das Volumen eines Ansatzes betrug bei diesem Versuch jeweils nur 100 ml. Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurde Nitrat gemessen, alle zwei Tage wurden wie beim Versuch I Proben entnommen, jedoch nur zytometrisch untersucht. Es wurden Wachstumskurven erstellt und, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, relative Fluoreszenzwerte für die Pigmente berechnet. Die Versuchsdauer betrug 22 Tage.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vergleich der Zytometrie- und Mikroskopdaten

3.1.1 Kulturproben

Die Übereinstimmung der zytometrisch und mikroskopisch gewonnenen Daten war innerhalb der einzelnen Versuche mit Kulturen sehr unterschiedlich (Tabelle 3.1, Abbildung 3.1).

Mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,62 ist die Übereinstimmung der zytometrisch und mikroskopisch gewonnenen Ergebnisse bei der Aufnahme der Wachstumskurven (2.3.2.1) als moderat zu bezeichnen. Dagegen ergab sich für die Daten des Versuchs I (2.3.2.2) mit $r = 0,96$ eine starke Korrelation. Dabei ist zu beachten, daß die Bestimmung der Zellkonzentrationen bei der Aufnahme der Wachstumskurven über Referenzpartikel als interne Standards nach OLSON *et al.* (1985) erfolgte. Beim Versuch I hingegen wurden definierte Probenvolumina mit Hilfe des Motors gemessen. Für den gesamten Datensatz aus Kulturversuchen ergab sich mit $r = 0,78$ eine moderate Korrelation.

Tabelle 3.1: Korrelationskoeffizienten (r), Irrtumswahrscheinlichkeiten (p ; t-Test), Anzahl der Proben (n) und lineare Regressionen für die Kulturproben, Y = Mikroskop-Werte, X = Zytometer-Werte

	r	p	n	Formel
Wachstumsexperiment	0,62	< 0,008	46	$Y = 36,40 + 0,53 \cdot X$
Versuch I	0,96	< 0,0001	49	$Y = 0,29 + 0,65 \cdot X$
Gesamt Kulturen	0,78	< 0,001	95	$Y = 11,99 + 0,71 \cdot X$

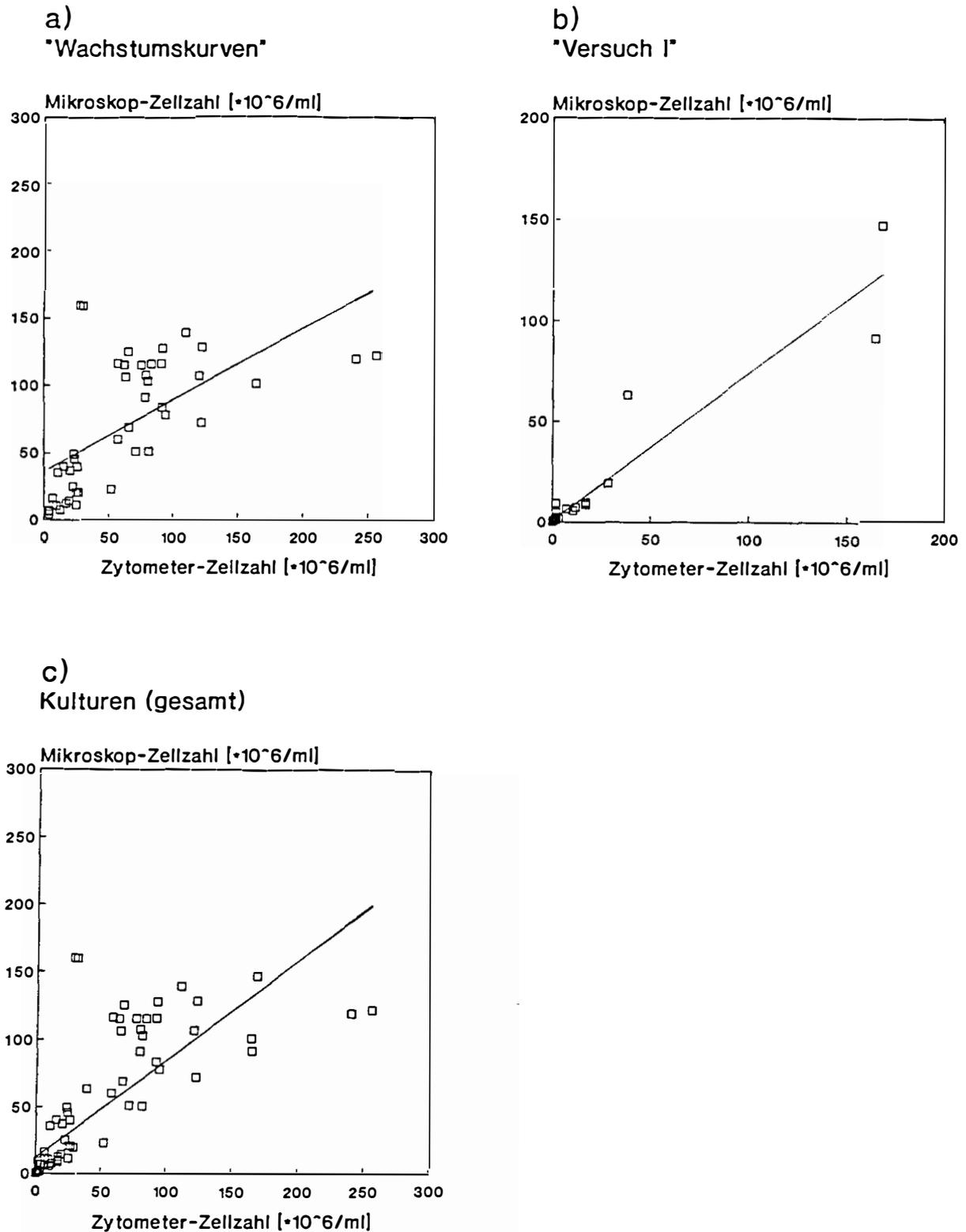


Abbildung 3.1: Korrelation der Zytometer- und Mikroskopdaten für a) Proben der Wachstumskurven, b) Proben des Versuchs I; c) Korrelation der gesamten aus Kulturversuchen gewonnenen Daten

3.1.2 Freilandproben

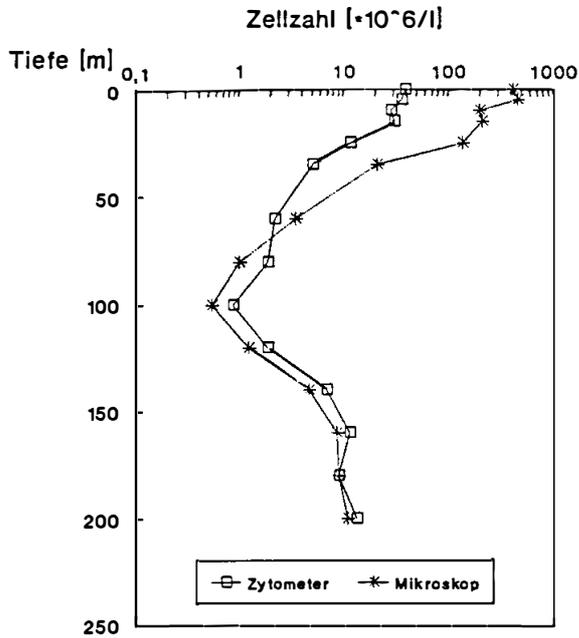
Der methodische Vergleich während BAMBI '91 erbrachte für autotrophes Nanoplankton (hauptsächlich Flagellaten) und coccale Cyanobakterien unterschiedliche Ergebnisse. Während die Übereinstimmung der ermittelten Zellkonzentrationen bei den Flagellaten bis auf die Werte für die Oberfläche und 200 m Tiefe gut erschien, ergaben sich bei den coccalen Cyanobakterien im Bereich der oberen 50 m große Unterschiede (Abbildung 3.2 a, b). Hier waren die mittels Zytometer bestimmten Zahlen immer niedriger als die der mikroskopischen Bestimmung. In größeren Tiefen stimmten die Daten dann gut überein, wobei die Zytometerdaten leicht über den Mikroskopdaten lagen. Entsprechend dieser Ergebnisse macht die Berechnung der linearen Regression, in die alle BAMBI-Messungen eingegangen sind, deutlich, daß die Korrelation der Daten für Flagellaten ($r = 0,88$) stark, hingegen für coccale Cyanobakterien ($r = 0,71$) nur moderat ist (Tabelle 3.2, Abbildung 3.2 c, d). Die Steigung der "Flagellaten"-Regression liegt mit 0,83 dem theoretisch optimalen Wert von 1,0 am nächsten und macht so zusätzlich die gute Übereinstimmung der Daten deutlich. Im Gegensatz dazu zeigt die Steigung der Regressionsgeraden für coccale Cyanobakterien mit 4,29 eine starke Unterschätzung der Zellabundanz durch die Zytometrie.

Die Berechnung der Korrelation für alle Freilandproben zusammen ergab einen Wert für r von 0,74, der als moderat angesehen werden kann.

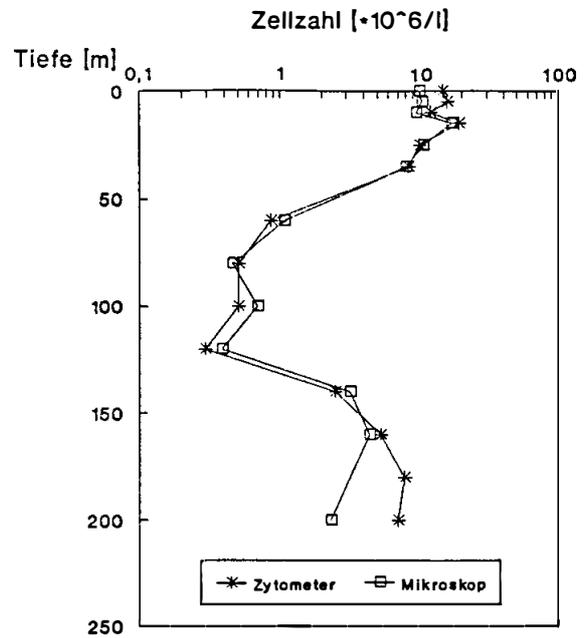
Tabelle 3.2: Korrelationskoeffizienten (r), Irrtumswahrscheinlichkeiten (p ; t-Test), Anzahl der Proben (n) und lineare Regressionen für Proben aus dem Freiland, Y = Mikroskop-Werte, X = Zytometer-Werte

	r	p	n	Formel
Cyanobakterien	0,71	< 0,001	80	$Y = 8431,16 + 4,28 \cdot X$
Flagellaten	0,88	< 0,001	80	$Y = 973,31 + 0,83 \cdot X$
Gesamt Freiland	0,74	< 0,001	160	$Y = -8295,10 + 4,29 \cdot X$

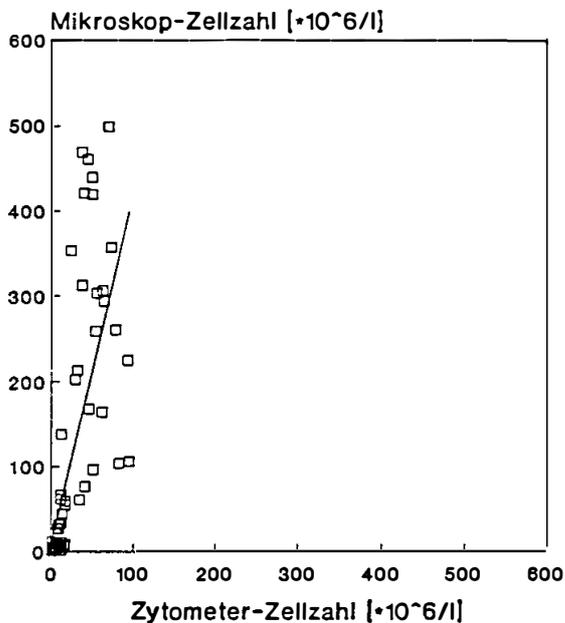
a)
Coccale Cyanobakt., BAMBI '91



b)
Flagellaten, BAMBI '91



c)
Coccale Cyanobakt., Freilandproben



d)
Flagellaten, Freilandproben

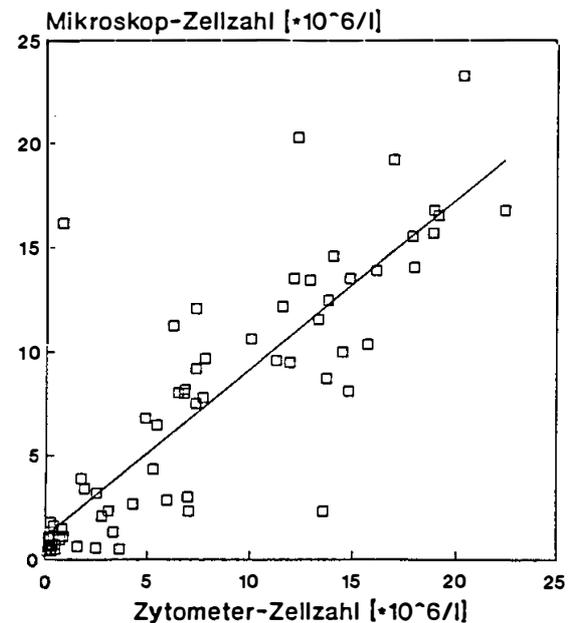


Abbildung 3.2: Vergleich der Zytometer- und Mikroskopdaten für die BAMBI-Proben (Freilandproben), a) vergleichendes Vertikalprofil für coccale Cyanobakterien der BAMBI-St. 449/450, b) vergleichendes Vertikalprofil für Flagellaten der BAMBI-St. 449/450, c) Korrelation der Zytometer- und Mikroskopdaten aller BAMBI-Proben für coccale Cyanobakterien, d) Korrelation der Zytometer- und Mikroskopdaten aller BAMBI-Proben für Flagellaten

Die zytometrischen Messungen von fixierten Proben bis zu vier Wochen nach der Probennahme ergaben unterschiedliche Verluste bezüglich der Zellabundanz für coccale Cyanobakterien und Flagellaten (Abbildung 3.3).

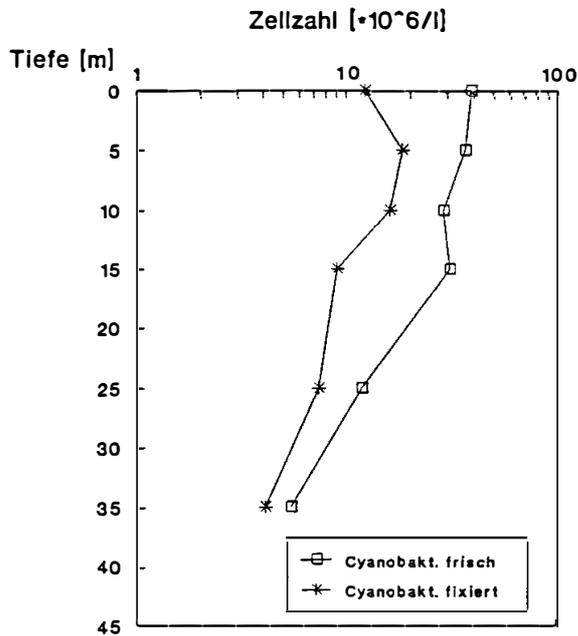
Innerhalb aller Proben konnte eine starke Abschwächung der zellulären Autofluoreszenz beobachtet werden, so daß ein großer Teil der Zellen nicht mehr detektierbar war. Daraus ergaben sich für die Formolproben erhebliche Unterschätzungen der Zellabundanz. Diese lagen im Fall der coccalen Cyanobakterien im Vergleich zu Ergebnissen aus Frischwassermessungen zwischen 10 und 70 Prozent, sowie für Flagellaten zwischen 76 und 96 Prozent. Die in Tabelle 3.3 aufgeführten Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten zeigen, daß die Beziehung zwischen frisch und fixiert ermittelten Zellabundanz für die Flagellaten nicht mehr signifikant war.

Aus diesem Grund wurden auch die zytometrisch ermittelten Ergebnisse der Freilandproben der Stationen "Boknis Eck" und "Kieler Bucht" (nur im fixierten Zustand gemessen) hier nicht weiter ausgewertet.

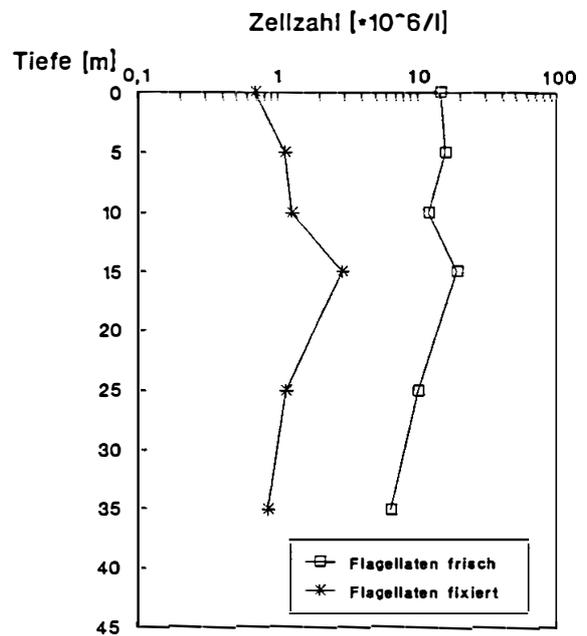
Tabelle 3.3: Korrelationskoeffizienten (r), Irrtumswahrscheinlichkeiten (p; t-Test), Anzahl der Proben (n) und lineare Regressionen frisch und fixiert gemessener Proben für coccale Cyanobakterien und Flagellaten, Y = "frisch"-Werte, X = "fixiert"-Werte

	r	p	n	Formel
Cyanobakterien	0,72	< 0,008	12	$Y = 9537 + 1,69 \cdot X$
Flagellaten	0,38	< 0,223	12	$Y = 9310 + 2,25 \cdot X$

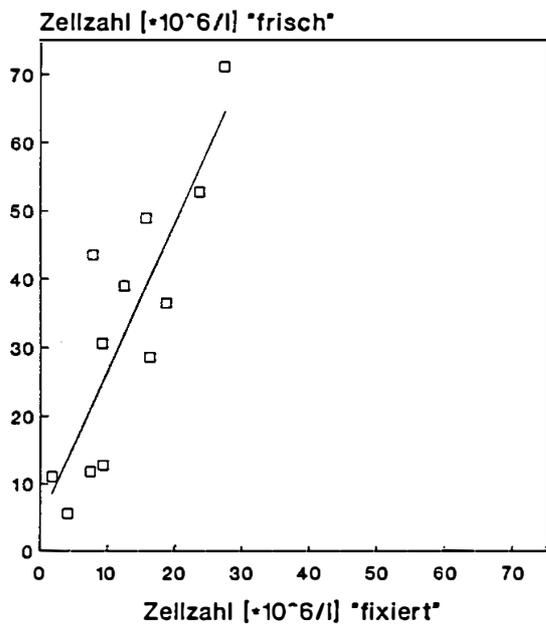
a)
Coccale Cyanobakt., BAMBI '91



b)
Flagellaten, BAMBI '91



c)
Coccale Cyanobakterien, BAMBI '91



d)
Flagellaten, BAMBI '91

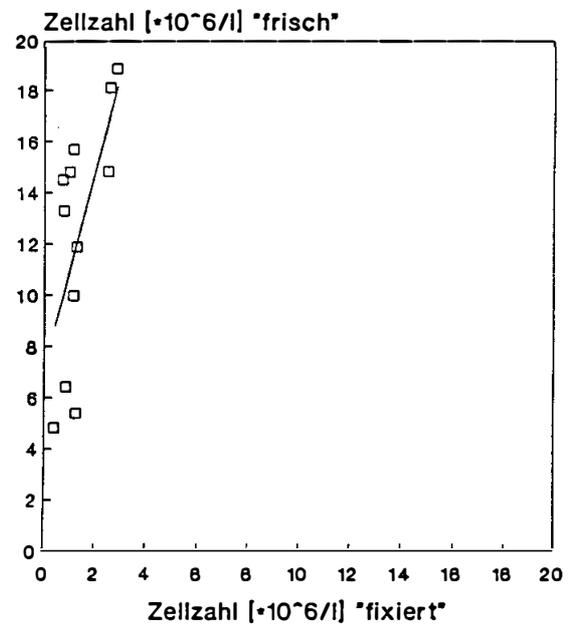


Abbildung 3.3: Vergleichendes Vertikalprofil zytometrisch ermittelter Zellabundanz frischer und fixierter Proben für a) coccale Cyanobakterien und b) Flagellaten (BAMBI '91, St. 449/450, obere 35 m) und Korrelation der aus frischen und fixierten Proben zytometrisch ermittelten Daten für c) coccale Cyanobakterien und d) Flagellaten

3.2 Methodische Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen

3.2.1 Verdünnungsexperimente

Der Vergleich von zytometrischen und mikroskopischen Daten aus dem Verdünnungsexperiment I ergab eine Erhöhung der ermittelten Endkonzentration mit steigender Verdünnung. Dies galt sowohl für die Zytometer- als auch für die Mikroskopdaten (Abbildung 3.4). Je niedriger die Zellkonzentration in der zu bearbeitenden Probe war, um so höher fiel die aus dieser Probe zurückberechnete Endkonzentration aus. Bei einer Probenkonzentration von $> 1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (Verdünnungsstufen 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:200) lagen die Zytometerwerte immer über den Mikroskopwerten. Dies weist darauf hin, daß in diesem Bereich die Messung mit dem Zytometer genauer ist, wenn die zur Mikroskopie herangezogene Probe nicht genügend verdünnt ist. Lag die Probenkonzentration unter $0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (Verdünnungsstufe 1:1000), ergaben sich mit dem Zytometer gegenüber den Mikroskopdaten erniedrigte Werte. Allerdings wichen die Werte für die Endkonzentrationen bei einer Probenkonzentration zwischen $0,2 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (Verdünnungsstufe 1:400) nicht mehr voneinander ab. Ab einer Verdünnung von 1:400 war keine Erhöhung der zytometrisch gemessenen Zellkonzentration mehr zu beobachten.

Das Verdünnungsexperiment II ergab eine gute Reproduzierbarkeit der quantitativen Ergebnisse einzelner, direkt nacheinander durchgeführter Zytometermessungen in einem Probenkonzentrationsbereich zwischen $0,2 \cdot 10^6$ und $25 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (Verdünnungsstufe 1:1000 bzw. 1:5; Abbildung 3.5) mit Varianzen von 15,98 bzw. 7,80. Bei einer Probenkonzentration von $> 25 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (Verdünnungsstufe 1:1) ergab sich bei zehn aufeinanderfolgenden Messungen die sehr viel höhere Varianz von 25,17. Auch aus diesem Versuch wird die ansteigende Endkonzentration mit steigender Verdünnungsstufe der Probe deutlich.

Experiment I

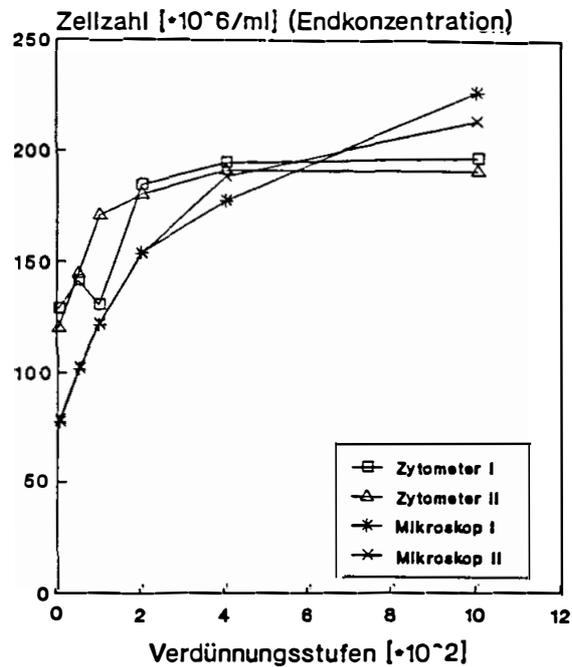


Abbildung 3.4: Aus Zytometermessungen und Mikroskopzählungen ermittelte Endkonzentrationen verschiedener Verdünnungsstufen derselben Probe; jeder Punkt ist der Mittelwert fünf aufeinanderfolgender Messungen bzw. aus drei Filterzählungen

Experiment II

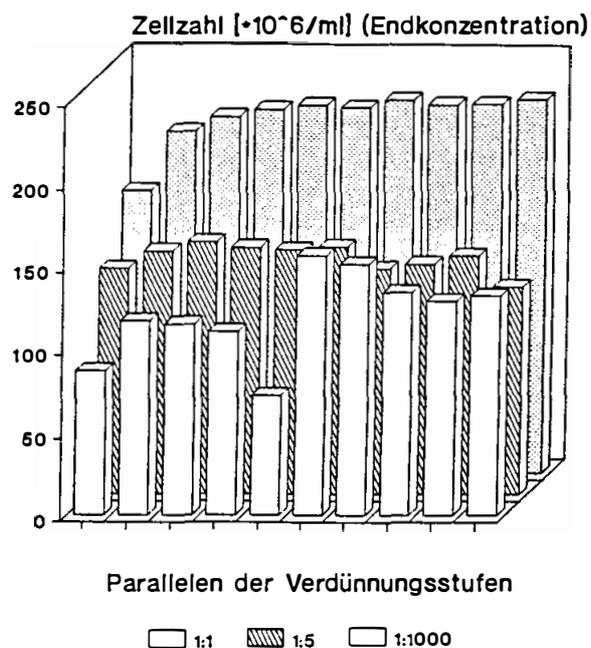


Abbildung 3.5: Variabilität von zehn aufeinanderfolgenden Zytometermessungen in Abhängigkeit von der Zellkonzentration (verschiedene Verdünnungsstufen) ein und derselben Probe

3.2.2 Ultraschall- und Detergensexperimente

In den Ultraschall- bzw. Detergensversuchen (Experiment III und IV) konnte die Anzahl der gemessenen Zellen in einer unverdünnten Probe in Abhängigkeit von der Konzentration in dieser Probe in unterschiedlichem Ausmaße gesteigert werden (Abbildung 3.6). Durch eine zwei- bis sechsminütige Ultraschallbehandlung konnte bei einer Endkonzentration von $> 1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ eine Steigerung um *ca.* sechs Prozent (Experiment III) und bei einer Endkonzentration von $< 0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ eine Steigerung um *ca.* 20 Prozent (Experiment IV) erzielt werden. Die Detergensbehandlung und die Kombination aus Detergens und Ultraschall führten nicht zu einer auffälligen Verbesserung der Ergebnisse im Konzentrationsbereich $> 1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹. Im Konzentrationsbereich $< 0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ hingegen konnte auch durch diese Vorbehandlungen eine Verbesserung erzielt werden, wobei diese immer unter den Ergebnissen lag, welche nur durch Ultraschallbehandlung erhalten worden waren. Abbildung 3.6 zeigt diese Ergebnisse einschließlich einer Gegenüberstellung der mikroskopisch ermittelten Daten mit denen der unbehandelten Probe. Den mikroskopisch ermittelten Konzentrationen liegen je fünf Parallelzählungen zugrunde.

Die Art der Behandlung hatte keinen Einfluß auf die Qualität der Fluoreszenzsignale, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Zellen durch die Behandlung nicht geschädigt wurden. Die mikroskopische Betrachtung bestätigte diesen Eindruck.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden alle mit dem Zytometer gemessenen Proben so verdünnt, daß eine größtmögliche Übereinstimmung mit den Mikroskopdaten und eine gute Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen gewährleistet wurde, also in einem Bereich von $1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹. Weiterhin wurden alle Proben mit ein- bis zwei Minuten Ultraschall vorbehandelt. Die hier vorgestellten Ergebnisse machen zudem deutlich, daß die höchste Meßgenauigkeit für quantitative Fragestellungen beim FLUVO II in einem Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ bis $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ zu erwarten ist.

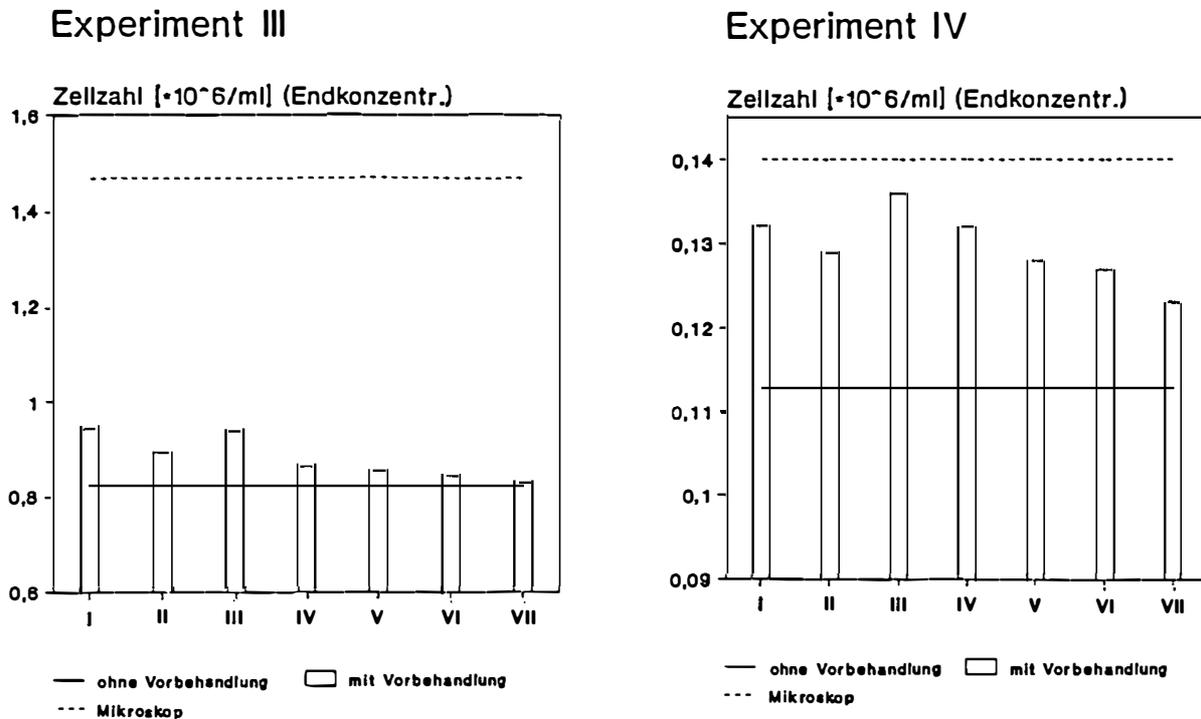


Abbildung 3.6: Veränderung der mit dem Zytometer ermittelten Zellkonzentrationen durch Ultraschall- und Detergensbehandlung im Vergleich zur Messung ohne Vorbehandlung und mikroskopischer Zählung derselben Probe: Experiment II = Konzentration $> 1 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$; Experiment IV = Konzentration $< 0,2 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$; I = 2'US, II = 4'US, III = 6'US, IV = 1 Tr. Detergens, V = 3 Tr. Detergens, VI = 2'US + 1 Tr., VII = 4'US + 3 Tr.; US = Ultraschall, Tr. = Tropfen

3.3 Wachstumsphysiologie verschiedener *Synechococcus*-Stämme

3.3.1 Wachstumskurven

Alle drei *Synechococcus*-Stämme zeigten einen ähnlichen Wachstumsverlauf (Abbildung 3.7). So durchliefen alle Kulturen eine zwei- bis dreitägige lag-Phase und traten dann in die exponentielle Phase ein. Diese dauerte bei den Stämmen WH7803 und KB9002 16 Tage und beim Stamm KB9001 ungefähr 22 Tage. Innerhalb der darauffolgenden stationären Phase erreichten alle drei Stämme mit $100 \cdot 10^6$ bis $150 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$ maximale

Zellabundanzen. Die Absterbephase deutete sich innerhalb des Versuchszeitraums von 45 Tagen nur beim Stamm WH7803 an.

Die vergleichende Betrachtung der mittels Zytometer- und Mikroskopdaten erstellten Wachstumskurven der drei *Synechococcus*-Stämme KB9001, KB9002 und WH7803 zeigte, daß die zytometrisch bestimmten Daten großen Schwankungen unterlagen und sowohl höher als auch niedriger als die mikroskopisch bestimmten Werte waren. Hierbei ist zu beachten, daß die Konzentrationsbestimmung der Proben über Referenzpartikel als interne Standards erfolgte (OLSON *et al.*, 1985). Aus den Zytometerdaten ließen sich keine Wachstumsraten (μ) oder Verdopplungszeiten (t_d) bestimmen, da aus dem Verlauf der Kurven eine exponentielle Phase nicht eindeutig zu erkennen war. So wurden zur Berechnung der maximalen Wachstumsraten bzw. minimalen Verdopplungszeiten nur die Mikroskopdaten herangezogen. Es ergaben sich folgende Werte:

$$\text{KB9001: } \mu = 0,256 \cdot \text{d}^{-1}, t_d = 2,71 \text{ d}$$

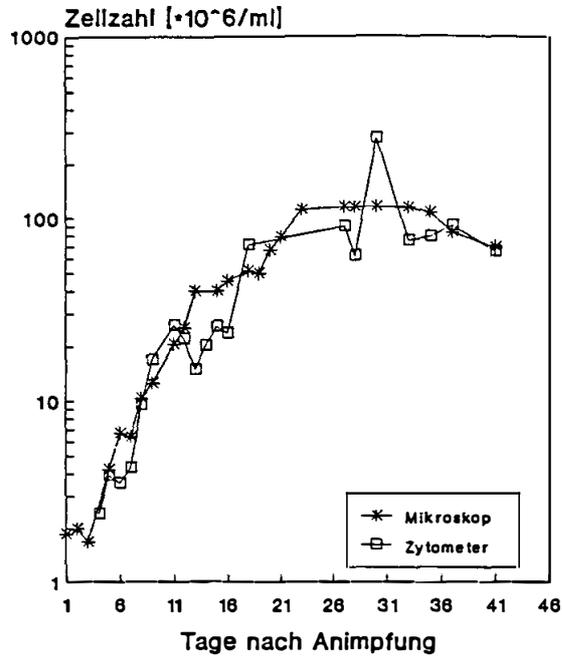
$$\text{KB9002: } \mu = 0,259 \cdot \text{d}^{-1}, t_d = 2,68 \text{ d}$$

$$\text{WH7803: } \mu = 0,260 \cdot \text{d}^{-1}, t_d = 2,67 \text{ d}$$

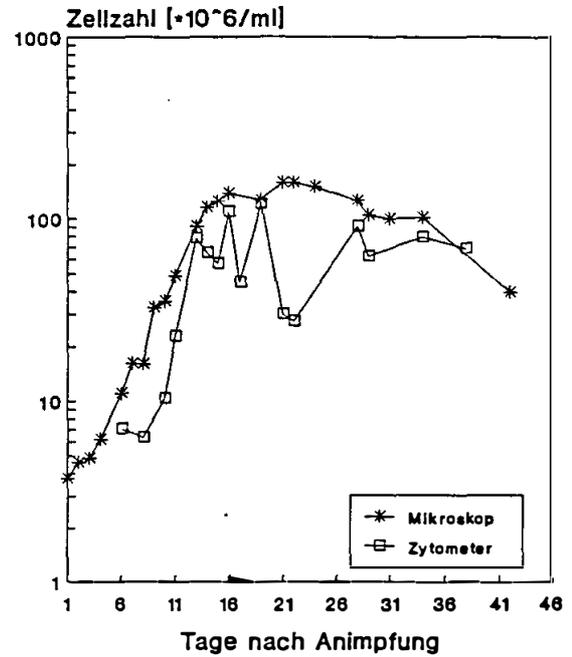
3.3.2 Veränderung der Wachstums- und Pigmenteigenschaften des *Synechococcus*-Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung

Der Versuch I zeigte anhand der Wachstumskurven eine deutliche Abhängigkeit der Wachstumseigenschaften des WH7803-Stamms von der Nitratkonzentration (Abbildung 3.8). Dies wurde unter Anwendung beider Methoden deutlich, wobei die zytometrischen Messungen der ersten zwölf Versuchstage nicht ausgewertet werden konnten. Aus den Mikroskopdaten ergab sich für alle Ansätze eine *ca.* 15tägige lag-Phase. Die aus der darauffolgenden exponentiellen Phase berechneten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Der entsprechende Wert für den Ansatz N2 wurde nicht berechnet, da hier kein Wachstum beobachtet wurde und die Zellkonzentration bei $0,1 \cdot 10^6$ bis $0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ stagnierte. Die stationäre Phase erreichten die Ansätze in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration zu unterschiedlichen Zeiten. Dies war für den Ansatz N20 am 24. Tag, für den Ansatz N30 am 28. Tag und für die Kontrolle am 31. Tag der Fall. Ebenfalls gemäß der zugegebenen Nitratmenge erreichten die Ansätze niedrigere bzw. höhere Zellkonzentrationen in dieser Phase. Maximale Zellkonzentrationen lagen für

9001



9002



WH7803

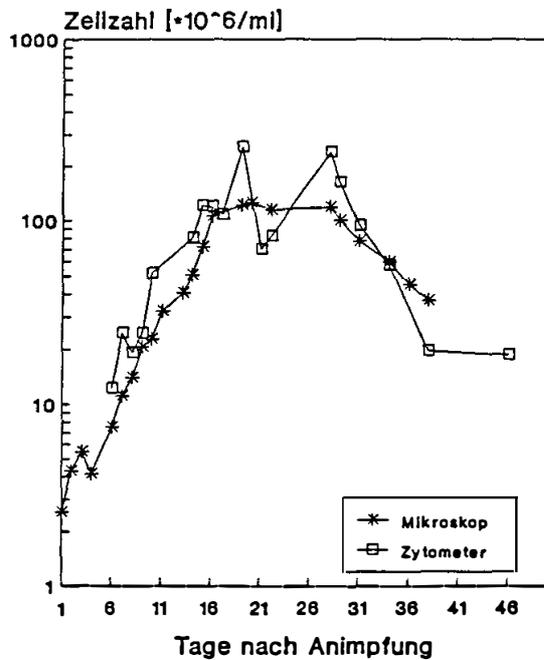


Abbildung 3.7: Zytometrisch und mikroskopisch ermittelte Wachstumskurven der drei *Synechococcus*-Stämme KB9001, KB9002 und WH7803

den Ansatz N20 mit $2 \cdot 10^6$, den Ansatz N30 mit *ca.* $20 \cdot 10^6$ und die Kontrolle mit $60 \cdot 10^6$ bis $100 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ vor.

Der Unterschied der verschiedenen Ansätze in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration bestand also hauptsächlich in dem Zeitpunkt, zu dem die stationäre Phase erreicht wurde und in der maximalen Zellkonzentration in dieser Phase. Hinsichtlich der mikroskopisch ermittelten Wachstumsraten war - zumindestens für die Ansätze N20, N30 und die Kontrolle - festzustellen, daß die entsprechenden Populationen mit zunehmender Nitratkonzentration mehr Teilungen pro Tag durchlaufen konnten. Die zytometrisch ermittelten Wachstumsraten zeigten diese Tendenz nur für die Ansätze N20 und N30.

Eine gute Übereinstimmung der zytometrischen und mikroskopischen Daten ergab sich für die Kontrolle (Kurvenverlauf, Wachstumsraten, Verdopplungszeiten). Bezüglich der maximal erreichten Zellkonzentrationen in der stationären Phase stimmten die Daten für die Kontrolle und die Ansätze N20 und N30 gut überein. Keine besonders gute Vergleichbarkeit ergaben die Daten für den Ansatz N2; die zytometrischen Daten wiesen hier große Schwankungen auf. Ansonsten lagen die mikroskopisch ermittelten Wachstumsraten immer unter den zytometrisch gewonnenen Wachstumsraten, die Verdopplungszeiten entsprechend darüber.

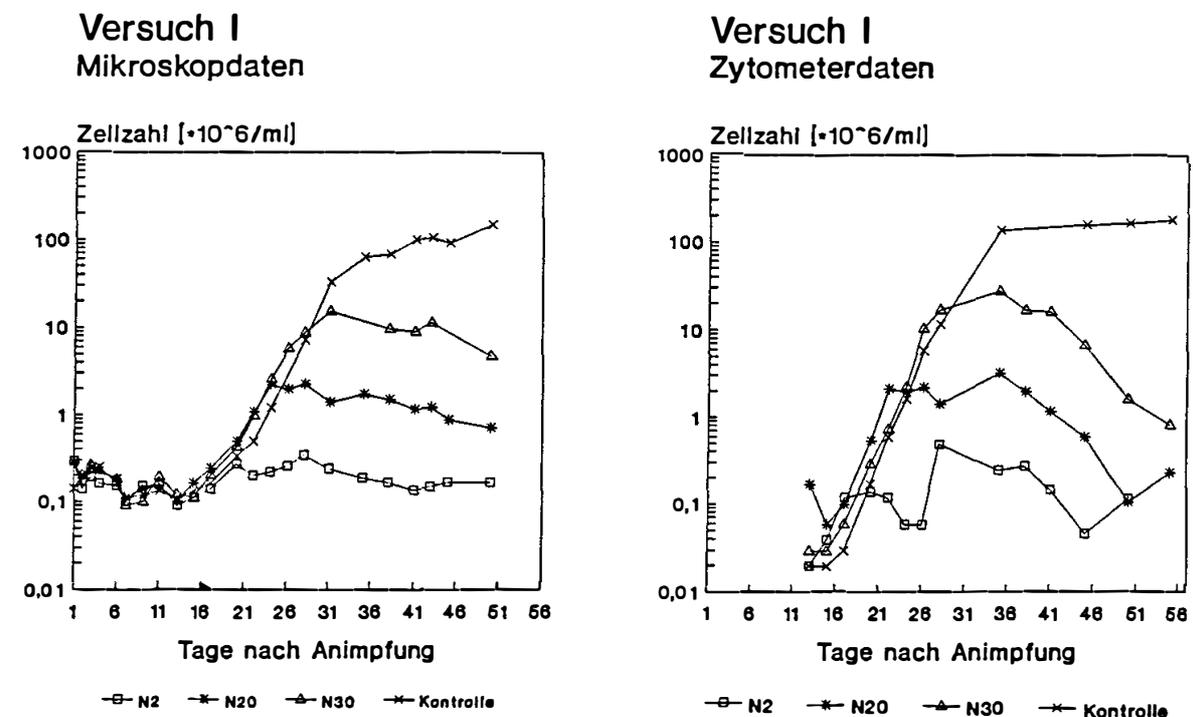
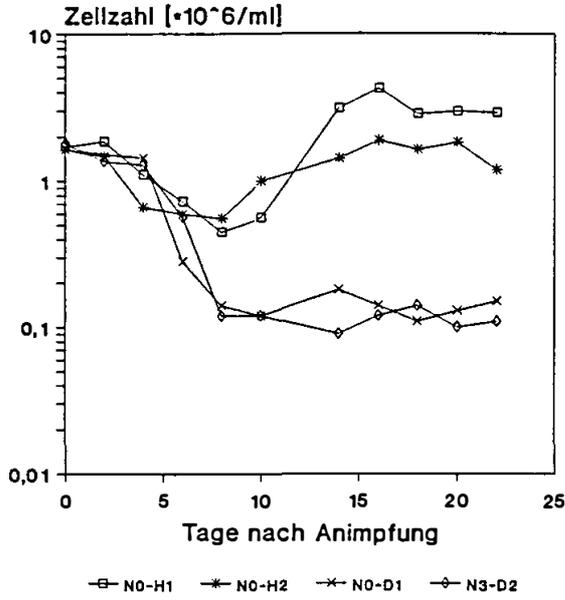


Abbildung 3.8: Zytometrisch und mikroskopisch ermittelte Wachstumskurven der verschiedenen Ansätze des Versuchs I

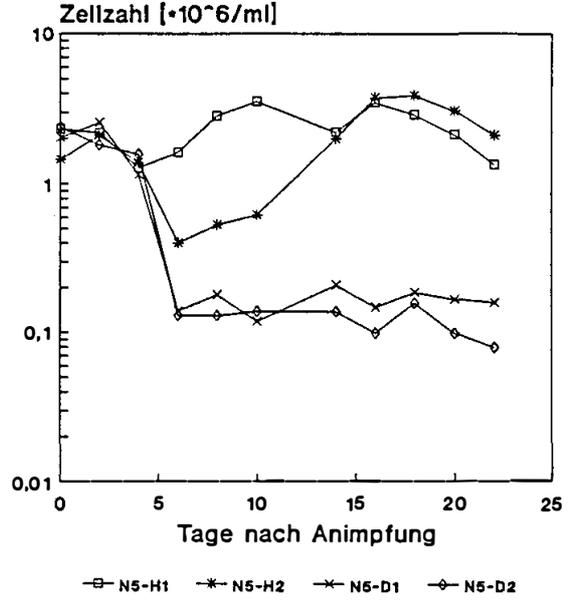
Prinzipiell bestätigte der Versuch II die oben aufgeführten Ergebnisse für die Hellansätze. Aus den Wachstumskurven (Abbildung 3.9 und 3.10) wird ersichtlich, daß alle Hellansätze bis auf die Kontrolle in den ersten fünf bis zehn Tagen eine lag-Phase durchliefen. Die Ansätze N0-H1/2 (N0 = ohne Nitrat, H1/2 = Hellansatz, Parallele 1 und 2), N5-H1/2 und N15-H2 hatten in dieser Phase eine Abnahme der ursprünglich angeimpften Zellkonzentration von $ca. 2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ um $ca. 26$ bis 81 Prozent zu verzeichnen, während in den Ansätzen N30-H1/2 die Zellkonzentrationen bis zum Erreichen der exponentiellen Phase konstant blieben. Die Hellansätze traten entsprechend der zur Verfügung stehenden Nitratkonzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die exponentielle Phase ein, d.h. die lag-Phase war um so kürzer, je mehr Nitrat vorhanden war. Im Falle des Kontrollansatzes und der Ansätze N30-H1/2 erfolgte der Eintritt in die exponentielle Phase am vierten Tag, bei den Ansätzen N5-H1/2 und N15-H1/2 am sechsten Tag und bei den Ansätzen N0-H1/2 erst am achten Tag. Die Dauer der exponentiellen Phase war ebenso von der Nitratmenge der Ansätze abhängig. Die Ansätze N0-H1/2 traten am 14. Tag, die Ansätze N5-H1/2 am 15. Tag und die Hellkontrolle zwischen dem 16. und 18. Tag in die stationäre Phase ein. Für die Ansätze N15-H1/2 war das am zehnten Tag der Fall, was im Zusammenhang mit der Nitratkonzentration eine Ausnahme darstellt. Bei den Ansätzen N30-H1/2 war wegen der großen Schwankungen der Zellkonzentrationen ab dem achten Tag dieser Übergang nur schwer festzulegen. Bezüglich der in der stationären Phase erreichten maximalen Zellkonzentrationen unterschieden sich die Ansätze N0-H1 und N5-H1/2 mit $3,1 \cdot 10^6$ bis $3,6 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ von den Ansätzen N15-H1/2 und N30-H1/2 mit $5,0 \cdot 10^6$ bis $6,0 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹. In der Hellkontrolle wurden am 20. Tag $448 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ gemessen.

Unter 90prozentiger Lichteinschränkung konnte in allen Ansätzen außer in der Kontrolle kein Wachstum beobachtet werden (Abbildung 3.9 und 3.10). Diese hatten alle nach einer fünftägigen lag-Phase einen Einbruch zu verzeichnen. Die Zellkonzentrationen nahmen hier im Durchschnitt von anfänglich $2,0 \cdot 10^6$ auf $0,1 \cdot 10^6$ bis $0,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ ab (mit Ausnahme des Ansatzes N15-D1; D = "Dunkel"), um dann aber für den übrigen Beobachtungszeitraum unabhängig von der Nitratkonzentration zu stagnieren. Die "Dunkel"-Kontrolle wies nur einen Einbruch der Zellkonzentration auf $ca. 0,7 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ in den ersten vier Tagen auf. Die Zellkonzentration stieg hier anschließend in einer nur zweitägigen exponentiellen Phase auf $2,2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ an und erreichte in der stationären Phase ein Maximum von $ca. 5,0 \cdot 10^6$ bis $6,0 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹, also Konzentrationen, die den Hellansätzen N15 und N30 entsprachen.

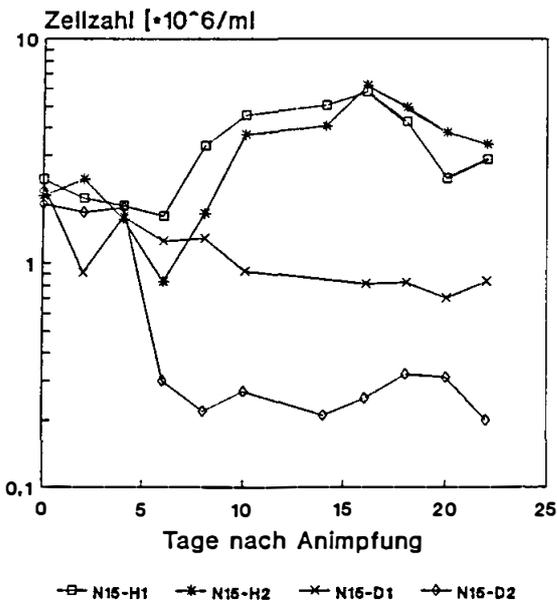
Versuch II
"ohne" Nitrat



Versuch II
5 μmol Nitrat pro l



Versuch II
15 μmol Nitrat pro l



Versuch II
30 μmol Nitrat pro l

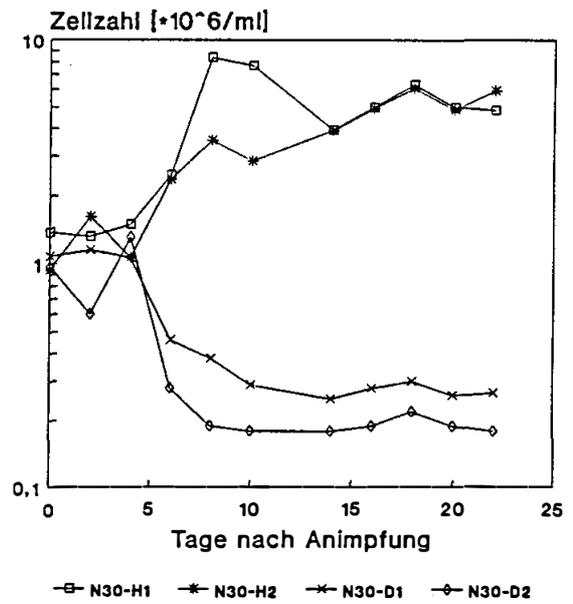


Abbildung 3.9: Zytometrisch ermittelte Wachstumskurven der Ansätze N0, N5, N15 und N30 des Versuchs II

Versuch II Kontrolle

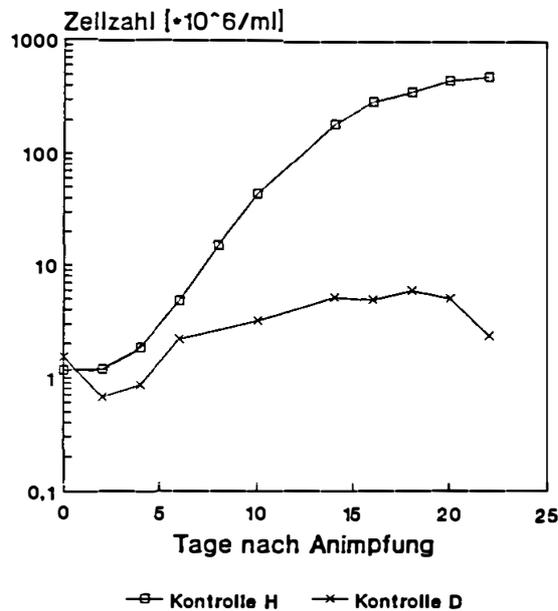


Abbildung 3.10: Zytometrisch ermittelte Wachstumskurven der Kontrollen des Versuchs II, H = Hellkontrolle, D = "Dunkel"-Kontrolle

Die in Tabelle 3.4 aufgeführten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten sind mit denen des Versuchs I nicht direkt zu vergleichen, da die Ausführung der beiden Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand und nicht von gleichen Voraussetzungen (Vorgeschichte der Kultur) ausgegangen werden kann. Deswegen können an dieser Stelle nur die relativen Unterschiede der verschiedenen Ansätze bewertet werden. In den Ansätzen N0-H1/2 und N30-H1/2 zeigte sich eine größere Abweichung der Parallelen voneinander, was auch aus dem Verlauf der entsprechenden Wachstumskurven ersichtlich wird. Wie beim Versuch I nahm die Wachstumsrate mit steigender Nitratkonzentration tendenziell zu bzw. die Verdopplungszeit ab. Eine Ausnahme bildete der Ansatz N0-H1, der eine auffällig hohe Wachstumsrate aufwies. Der Einfluß der unterschiedlichen Nitratkonzentrationen auf die Wachstumsraten war in beiden Versuchen ähnlich. Im Versuch I erreichte der Ansatz N5 58 Prozent des Wachstumspotentials der Kontrolle, Ansatz N30 99 Prozent. Im Versuch II wurde die positive Beziehung zwischen Nitratmenge und Wachstumspotential ebenso deutlich. Die Ansätze N0-H1/2 erreichten 82 bzw. 37 Prozent des durch die Hellkontrolle vorgegebenen Wachstumspotentials. Bei den Ansätzen N5-H1/2 lag dieser Wert bei 50 bis 53 Prozent, bei den Ansätzen N15-H1/2 bei 65 bis 68 Prozent und bei den Ansätzen N30-

H1/2 bei 78 bzw. 54 Prozent. Die Wachstumsrate der "Dunkel"-Kontrolle umfaßte im Vergleich zur Hellkontrolle nur 34 Prozent. Sieht man von den extremen Werten von 82 Prozent und von 54 Prozent der Ansätze N0-H1 und N30-H2 ab, ergab sich ein mit zunehmender Nitratmenge ansteigendes Wachstumsvermögen in den einzelnen Ansätzen.

Am 24. Tag des Versuches war in den Ansätzen N5-H1/2 kein Nitrat mehr meßbar. In den entsprechenden "Dunkel"-Ansätzen wurden noch 3,6 bis 4,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nachgewiesen. In den Ansätzen N15-H1/2 lag eine Nitratkonzentration von 0,2 bis 0,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vor, die jeweiligen "Dunkel"-Ansätze enthielten 9,3 bis 10,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Nitrat. Die Ansätze N30-H1/2 enthielten im Vergleich zu den übrigen Hellansätzen mit 1,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ noch am meisten Nitrat. Dies traf auch für die entsprechenden "Dunkel"-Ansätze mit einer verbliebenen Nitratkonzentration von 20,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu. In der Hell- und "Dunkel"-kontrolle wurden Nitratkonzentrationen von 740 bzw. 1668 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen, womit der Nitratverbrauch hier erheblich über dem der übrigen Ansätze lag.

Tabelle 3.4: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten aller Ansätze der Versuche zu Wachstums- und Pigmenteigenschaften des WH7803-Stamms, M = mikroskopisch ermittelt, Z = zytometrisch ermittelt

Versuch	Ansatz	Wachstumsrate [d ⁻¹]	Verdopplungszeit [d]
Versuch I	Kontrolle (M)	0,464	1,49
	Kontrolle (Z)	0,469	1,48
	N30 (M)	0,458	1,51
	N30 (Z)	0,679	1,02
	N20 (M)	0,374	1,85
	N20 (Z)	0,577	1,20
Versuch II	Kontr. Hell	0,554	1,25
	Kontr. Dunkel	0,218	3,18
	N0-H1/2	0,458/0,207	1,51/3,35
	N5-H1/2	0,279/0,293	2,48/2,37
	N15-H1/2	0,360/0,376	1,93/1,84
	N30-H1/2	0,431/0,301	1,61/2,30

Die Veränderung der Autofluoreszenz und damit der Pigmentzusammensetzung bzw. des Pigmentgehaltes pro Zelle anhand entsprechender zytometrischer Messungen sind beispielhaft für die Ansätze N0-H1 und N30-D2 dargestellt (Abbildung 3.11). Daraus wird ersichtlich, daß die durchschnittliche zelluläre Chlorophyllfluoreszenz in den "Dunkel"-Ansätzen anstieg, was in der Darstellung einer Verschiebung der Meßsignale auf der Y-Achse nach oben entspricht. In den Hellansätzen nahm die durchschnittliche zelluläre Chlorophyllfluoreszenz dagegen ab. Die Referenzpartikel lagen dabei immer an der gleichen Stelle, was zeigt, daß die einzelnen Messungen einem Vergleich unterzogen werden dürfen. Die durchschnittliche zelluläre Phycoerythrinfluoreszenz schien allerdings keiner Zu- oder Abnahme zu unterliegen, was einer Verschiebung der Meßsignale auf der X-Achse entspräche.

Die Veränderung der aus den Zytometermessungen berechneten durchschnittlichen Fluoreszenzwerte pro Zelle über die Zeit in Abhängigkeit von Nitratmenge und Lichtstärke ist in den Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 dargestellt. Dabei sind nur die Verschiebungen der Verteilungsmaxima dargestellt; die durch die arithmetischen Verteilungsmittelwerte berechneten Trends verhalten sich genauso. Bei den nachfolgenden prozentualen Angaben (Tabelle 3.5) handelt es sich um die aus den Parallelen berechneten Mittelwerte der Verteilungsmaxima. Zudem beziehen sich die Angaben immer auf die Veränderung zwischen Versuchsstart (= Tag 0) und Versuchsende (= Tag 20 oder 22). Bei Schwankungen sind jeweils Maximal- und Endwerte angegeben.

In den Hellansätzen fiel der Wert für die relative Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle während des gesamten Versuchszeitraums um *ca.* 60 Prozent. Eine starke Veränderung in der Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle war in den Hellansätzen N30-H1/2 zu verzeichnen. Dort stieg die Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle nach fünf Tagen um 155 Prozent an, um dann am 15. Tag auf einem Wert zu stagnieren, der noch um 38 Prozent höher lag als der Ausgangswert zur Zeit des Versuchbeginns. In den übrigen Hellansätzen stieg die Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle innerhalb des Versuchszeitraums zwischen 31 und 45 Prozent an, in den Ansätzen N15-H1/2 nahm sie dagegen um vier Prozent ab.

In allen "Dunkel"-Ansätzen nahm die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle über die Versuchszeit zu. Der Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle in den "Dunkel"-Ansätzen um 111 bis 140 Prozent korrelierte deutlich mit der zunehmenden Menge an Nitrat in diesen Ansätzen. Die Veränderung der Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle in den "Dunkel"-Ansätzen bestand in einer Zunahme um 12 bis 31 Prozent und zeigte keinen Zusammenhang mit der jeweiligen Nitratkonzentration.

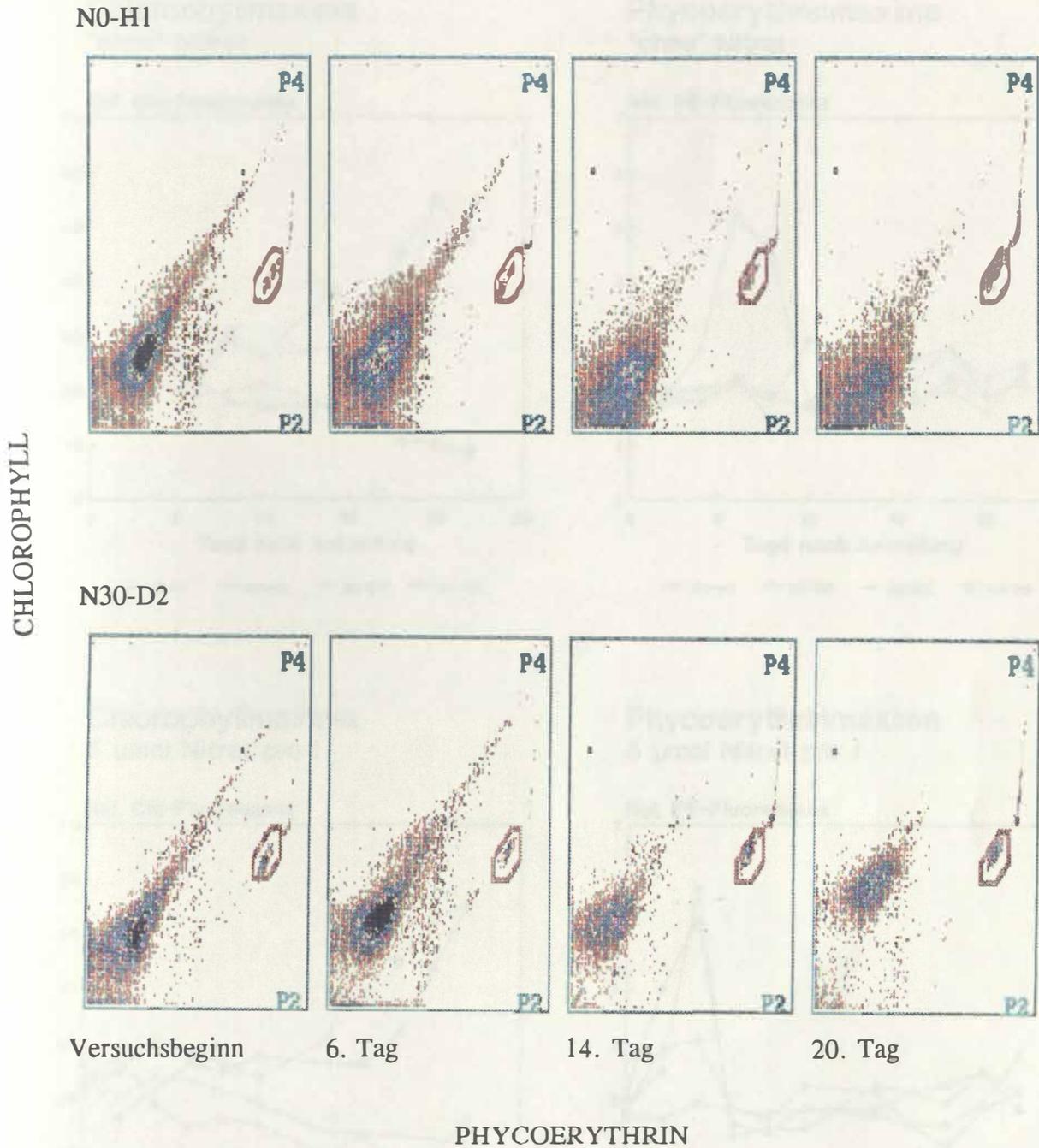
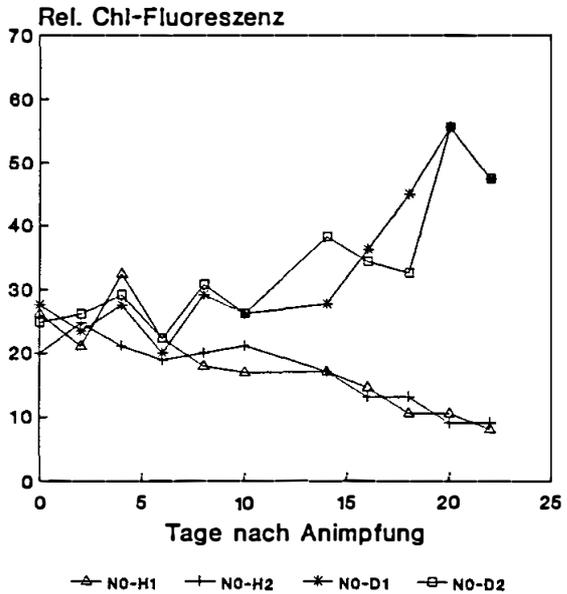
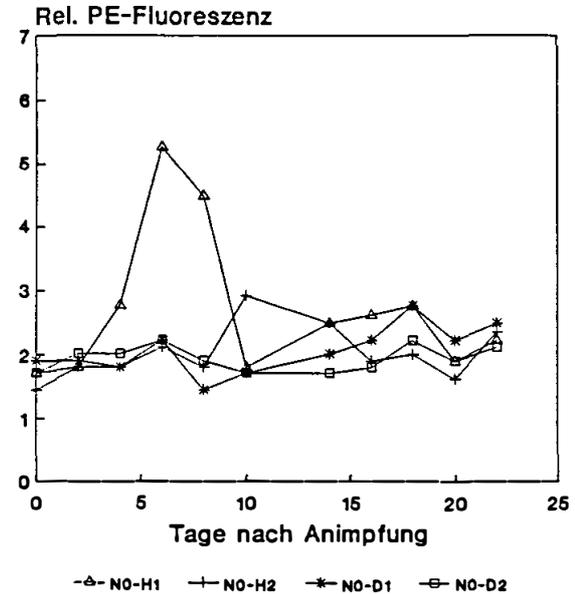


Abbildung 3.11: Darstellung zytometrischer Messungen (Drei-Dekaden-Logarithmus), die die Pigmentveränderung im Versuch II am Beispiel der Ansätze N0-H1 und N30-D2 verdeutlichen; zur Vergleichbarkeit der Messungen ist um die Referenzpartikel ein Fenster gelegt; verschiedene Populationsdichten beruhen auf unterschiedlichen Probenvolumina

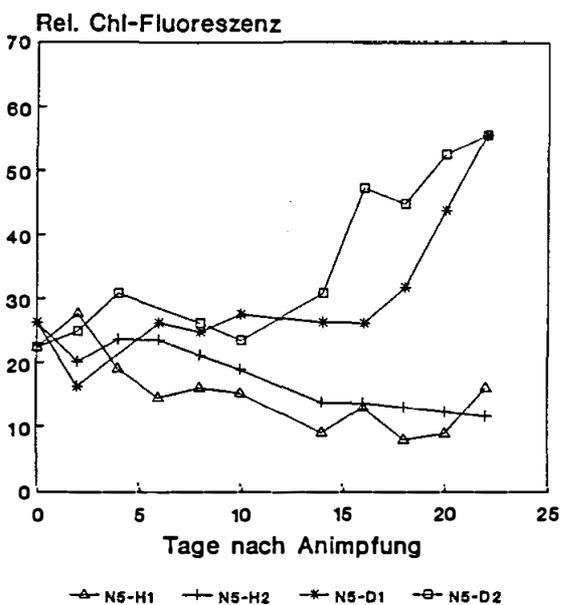
Chlorophyllmaxima
"ohne" Nitrat



Phycoerythrinmaxima
"ohne" Nitrat



Chlorophyllmaxima
5 µmol Nitrat pro l



Phycoerythrinmaxima
5 µmol Nitrat pro l

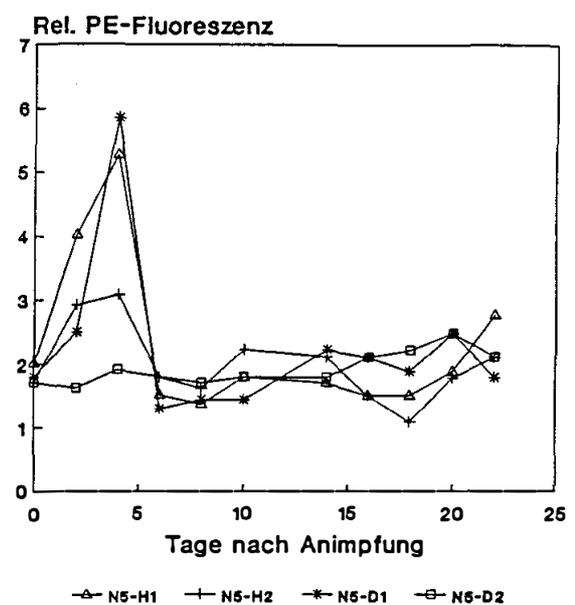
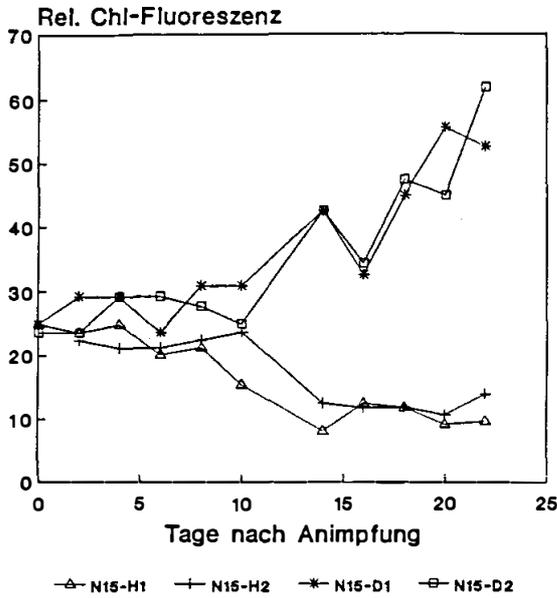
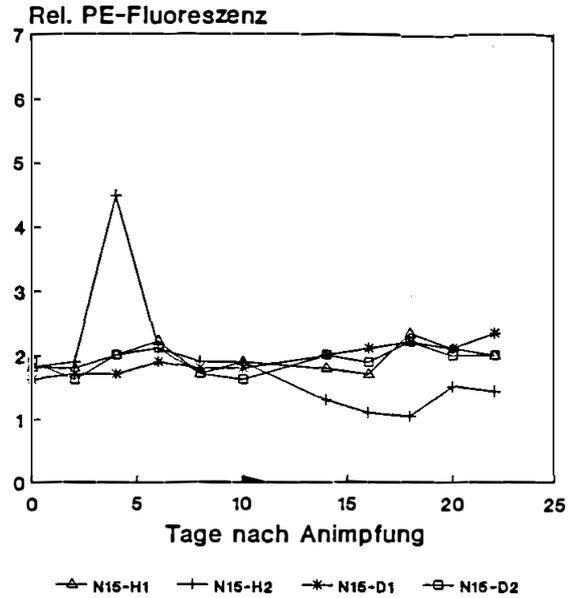


Abbildung 3.12: Veränderung der durchschnittlichen zellulären Chlorophyll- bzw. Phycoerythrinfluoreszenz (berechnet aus den Verteilungsmaxima) für die Ansätze N0 und N5 des Versuchs II

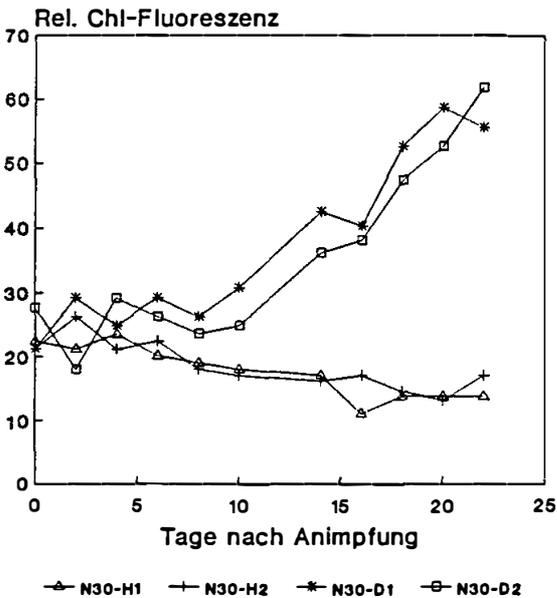
Chlorophyllmaxima
15 µmol Nitrat pro l



Phycoerythrinmaxima
15 µmol Nitrat pro l



Chlorophyllmaxima
30 µmol Nitrat pro l



Phycoerythrinmaxima
30 µmol Nitrat pro l

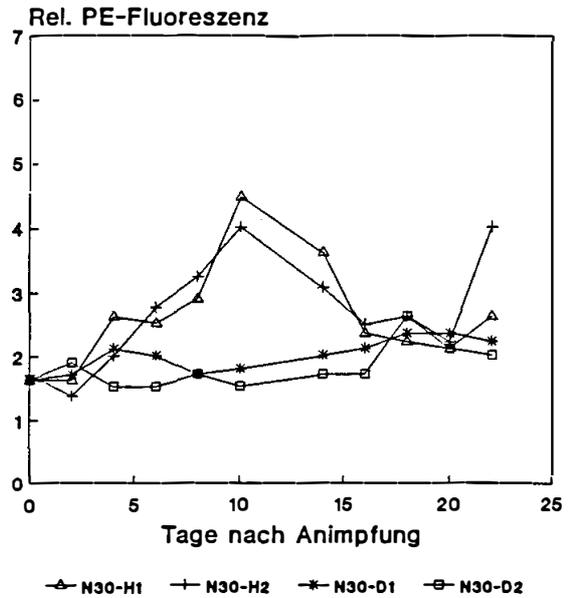
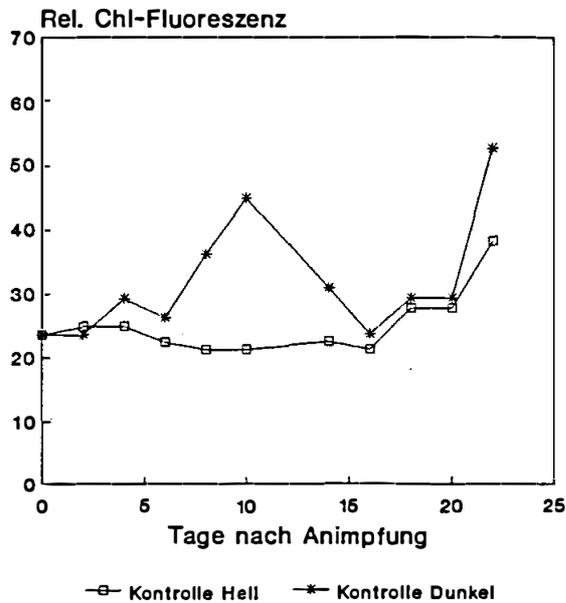


Abbildung 3.13: Veränderung der durchschnittlichen zellulären Chlorophyll- bzw. Phycoerythrinfluoreszenz (berechnet aus den Verteilungsmaxima) für die Ansätze N15 und N30 des Versuchs II

Chlorophyllmaxima Kontrollen



Phycoerythrinmaxima Kontrollen

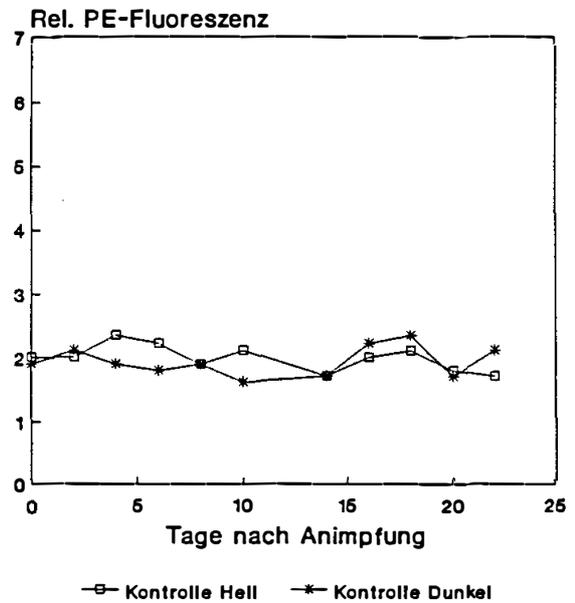


Abbildung 3.14: Veränderung der durchschnittlichen zellulären Chlorophyll- bzw. Phycoerythrinfluoreszenz (berechnet aus den Verteilungsmaxima) für die Kontrollen des Versuchs II

In der Hellkontrolle war die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle bis zum 16. Tag konstant und stieg dann bis zum 22. Tag um 61 Prozent an. In der "Dunkel"-Kontrolle stieg die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle bis zum zehnten Tag um 90 Prozent an, fiel bis zum 16. Tag wieder auf den Ausgangswert zurück und stieg innerhalb der nächsten sieben Tage erneut um 120 Prozent an. Die Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle unterlag in den Kontrollen geringen Schwankungen bei gleichbleibender Tendenz.

Tabelle 3.5: Ab- und Zunahmen der relativen Fluoreszenzwerte (basierend auf den gegen Referenzpartikel normierten Maxima der Fluoreszenzhäufigkeitsverteilungen) des Chlorophylls und des Phycoerythrins pro Zelle in den verschiedenen Ansätzen, PE = Phycoerythrin. Allen Angaben liegt die Veränderung zwischen Tag 0 und Tag 20 bzw. 22 zugrunde. Ausnahmen sind in Klammern gesetzt

Ansatz	Veränderung der rel. Chl-Fluoreszenz pro Zelle	Veränderung der rel. PE-Fluoreszenz pro Zelle
Kontrolle H Kontrolle D	+ 61 % (+ 90 %, Tag 10), + 120 %	keine Veränderung keine Veränderung
N0-H1/2	- 63 %	+ 45 %
N5-H1/2	- 56 %	+ 31 %
N15-H1/2	- 61 %	- 4 %
N30-H1/2	- 38 %	(+ 155 %, Tag 5), + 38 %
N0-D1/2	+ 111 %	+ 30 %
N5-D1/2	+ 129 %	+ 12 %
N15-D1/2	+ 136 %	+ 24 %
N30-D1/2	+ 140 %	+ 31 %

3.4 Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht

3.4.1 Nährstoffe

Auf der Station "Boknis Eck" blieb die Nitratkonzentration in 2 m Tiefe in der Zeit von Mai bis Mitte Juni mit $0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ konstant. Mitte Juli wurde mit $0,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Maximum registriert, dem eine Abnahme der Konzentration auf $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bis Mitte August folgte. In 15 m Tiefe stieg die Nitratkonzentration bis Mitte Juni von 0,5 auf $5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an und fiel dann bis Mitte August auf $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ab.

Die Phosphatkonzentration stieg in 2 m Tiefe von 0,05 auf $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ leicht an. In 15 m Tiefe zeigte die Phosphatkonzentration ebenso wie die Nitratkonzentration einen Anstieg bis Mitte Juni von 0,05 auf $0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und fiel dann innerhalb der nächsten beiden Monate auf $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ab.

Die Silikatkonzentration lag in 2 m Tiefe zu Beginn der Untersuchung bei $2,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, stieg bis Mitte Juni auf $5,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an und ging bis Mitte August auf $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zurück. Die Entwicklung der Silikatkonzentration auf dieser Station in 15 m Tiefe verlief parallel zu der in 2 m Tiefe, ausgehend von $9,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ im Mai wurde Mitte Juni mit $18,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Maximum erreicht. In der nachfolgenden Zeit fiel die Silikatkonzentration wieder auf $9,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ab.

Die Nitritkonzentration lag in 2 m Tiefe durchgehend bei 0,07 bis $0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und in 15 m Tiefe zwischen 0,11 und $0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ mit einem Maximum Mitte Juni von $0,48 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Ammonium wies wie Nitrit in 2 m Tiefe keine Schwankungen auf, die Konzentrationen lagen durchgehend bei $0,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. In 15 m Tiefe war wie bei Nitrat, Phosphat und Silikat ein Maximum Mitte Juni mit $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ feststellbar, ansonsten wurden Konzentrationen von 0,1 bis $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen.

Auf der Station "Kieler Bucht" blieb die Nitratkonzentration in 2 m Tiefe über den gesamten Untersuchungszeitraum mit $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ konstant und war damit niedriger als auf der Station "Boknis Eck". In 15 m Tiefe verlief die Entwicklung für Nitrat entgegengesetzt zu derjenigen auf der Station "Boknis Eck", bis Mitte Juli erfolgte eine sehr schnelle Abnahme von 3,0 auf $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Innerhalb der folgenden vier Wochen stieg der Nitratgehalt dann auf $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an.

Die Phosphatkonzentration stieg bis Mitte August von 0,2 auf 0,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an und erreichte somit höhere Werte als auf der Station "Boknis Eck" in dieser Tiefe. In 15 m Tiefe fiel sie kontinuierlich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 0,5 auf 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ab.

Silikat fiel in beiden Tiefen während der gesamten Untersuchung von 2,5 auf 0,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2 m) bzw. von 14,0 auf 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (15 m) ab.

Nitrit stagnierte in 2 m Tiefe ebenfalls wie auf der Station "Boknis Eck" zwischen 0,05 und 0,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. In 15 m Tiefe kam es zu einer Abnahme von 0,26 auf 0,02 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Ammonium lag in 2 m Tiefe im allgemeinen mit einer Konzentration von 0,02 bis 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vor, Mitte Juni wurde allerdings mit 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Maximum registriert. In 15 m Tiefe war Mitte Juni mit 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Minimum zu verzeichnen, ansonsten lag hier die Ammoniumkonzentration zwischen 1,0 und 1,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Auf beiden Stationen lagen über den ganzen Untersuchungszeitraum von Mitte Mai bis Anfang September an der Oberfläche nitratverarmte Verhältnisse vor. In 15 m Tiefe war dies nur für die Station "Kieler Bucht" der Fall, auf der Station "Boknis Eck" waren zumindestens im Juli größere Mengen an Nitrat (5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vorhanden.

3.4.2 Chlorophyll

Beide Stationen wiesen mit Gesamtchlorophyllkonzentrationen von 4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Maximum Mitte Juli auf (Abbildung 3.15). Von Mai bis Juni kam es bis zum Erreichen dieses Maximums zu einer kontinuierlichen Zunahme des Gesamtchlorophylls ausgehend von 1,0 bis 1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ und nach dem Maximum wieder zu einer Abnahme bis Mitte August auf durchschnittlich 1,0 bis 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Eine Ausnahme dieser Entwicklung war die Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe. Hier unterlag das Gesamtchlorophyll bis auf ein Maximum in der ersten Hälfte des Juni (2,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) nur geringen Schwankungen zwischen 1,8 und 2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Weiterhin war auf dieser Station auffällig, daß von Mai bis Anfang Juni das Gesamtchlorophyll in 2 m Tiefe höher lag als das in 15 m Tiefe und daß diese Verhältnisse sich ab Juni bis zum Ende der Untersuchung umkehrten.

Zu- und Abnahme des Anteils der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion verliefen parallel zur Zu- und Abnahme des Gesamtchlorophylls, wobei die Bedeutung dieser Fraktion ab Juli in allen Proben stark anstieg und dieser Sprung in 15 m Tiefe am deutlichsten war. Dort nahm ihr Anteil am Gesamtchlorophyll von 10 auf 84 Prozent zu, in 2 m Tiefe von 10 auf 56 Prozent. Dabei lagen die Anteile der entsprechenden Fraktion auf der Station "Boknis Eck" höher als auf der Station "Kieler Bucht". Die Fraktionen des Nanoplanktons (2-5 μm und 5-

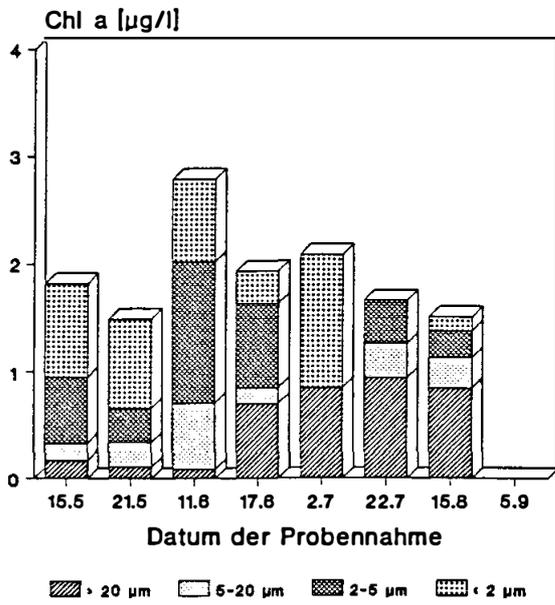
20 μm) nahmen bis Mitte Juni auf der Station "Kieler Bucht" zusammen immer einen Anteil von 60 bis 80 Prozent ein, auf der Station "Boknis Eck" lagen die entsprechenden Anteile zwischen 35 und 80 Prozent, was auf die Bedeutung dieser Fraktionen bezüglich der Biomasse hinweist. Der Anteil des Nanoplanktons ging ab Mitte Juni zugunsten der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion auf 15 bis 30 Prozent zurück (Ausnahme: Station "Kieler Bucht", 2 m). Die Fraktion des Picoplanktons konnte nur auf der Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe einen größeren Anteil ausmachen. Ihr Anteil am Gesamtchlorophyll lag dort bei 15 bis 60 Prozent. Ansonsten blieb ihr Anteil mit null bis 22 Prozent eher gering, so daß dieser Fraktion in Bezug auf ihre Biomasse keine bedeutende Rolle zukam.

3.4.3 Primärproduktion

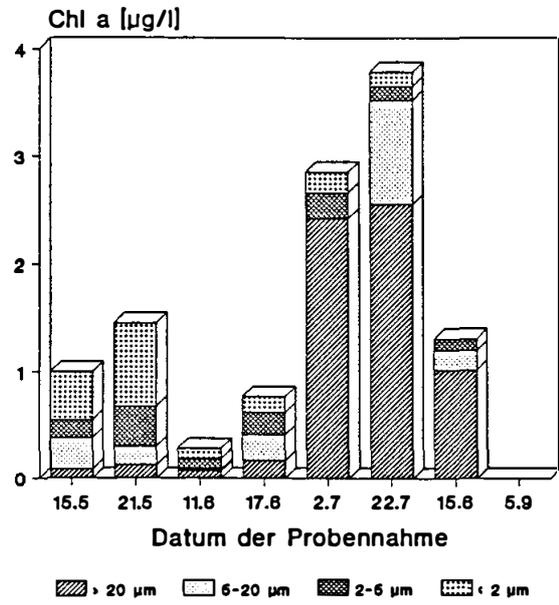
Die Entwicklung der Gesamtprimärproduktion folgte generell der des Gesamtchlorophylls (Abbildung 3.16). Mit Ausnahme der Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe wurden Produktionsmaxima des gesamten Phytoplanktons im Juli erreicht. Auf der Station "Boknis Eck" wurde ein zweites, höheres Maximum Anfang September in 15 m Tiefe beobachtet. Das Produktionsmaximum der Station "Boknis Eck" in 15 m Tiefe lag mit $2,5 \mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ über dem der Station "Kieler Bucht" mit $0,5 \mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ in 2 m Tiefe bzw. $2,2 \mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ in 15 m Tiefe. In 2 m Tiefe nahm die Gesamtprimärproduktion auf der Station "Boknis Eck" von Mai bis Juni zu, erreichte ihr Maximum mit $1,5 \mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und fiel dann bis zum Ende der Untersuchung auf $0,5 \mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ab. Damit waren auf der Station "Kieler Bucht" in 2 m Tiefe die Werte wie beim Chlorophyll merklich niedriger als in der entsprechenden Tiefe bei "Boknis Eck". Der Vergleich von Chlorophyll- und Produktionsentwicklung zeigt, daß die Biomassemaxima mit den Produktionsmaxima zusammenfielen.

Die Beteiligung der einzelnen Fraktionen an der Gesamtprimärproduktion unterschied sich von der am Gesamtchlorophyll. Auf der Station "Boknis Eck" war wie beim Chlorophyll eine Zunahme des Anteils der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion zu verzeichnen, wobei dieser Anteil 70 Prozent niemals überschritt und im Mittel bei 40 Prozent lag. Da hier die Fraktionen des Nanoplanktons zusammen nur 10 bis 20 Prozent ausmachten, kam demzufolge die größere Bedeutung der Picoplanktonfraktion zu, deren Anteil in 2 m Tiefe im Laufe der Untersuchung von 83 auf 38 Prozent abfiel und in 15 m Tiefe zwischen 15 und 78 Prozent lag. Auf der Station "Kieler Bucht" machte diese Fraktion in 2 m Tiefe 40 bis 60 Prozent und in 15 m Tiefe 15 bis 60 Prozent aus. Hier zeigte sich bei fast allen Proben eine zunehmende Bedeutung des Picoplanktons ab Mitte Juni.

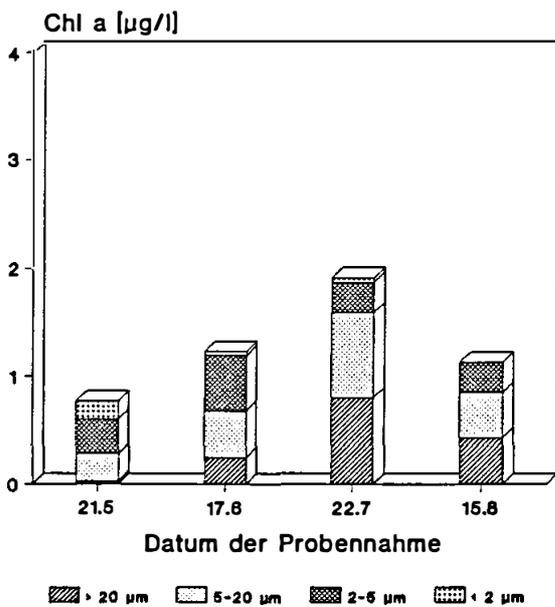
Chlorophyll
Boknis Eck, 2m



Chlorophyll
Boknis Eck, 15m



Chlorophyll
Kieler Bucht, 2m



Chlorophyll
Kieler Bucht, 15m

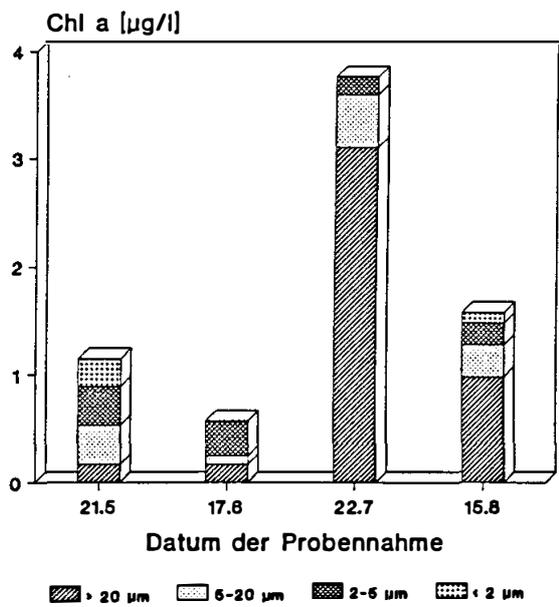
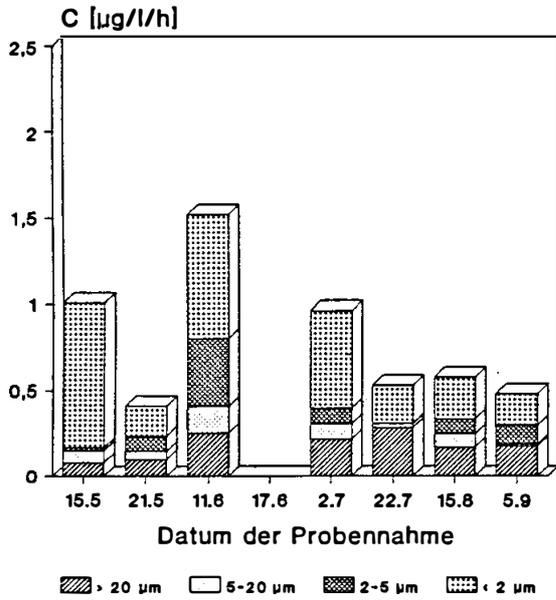
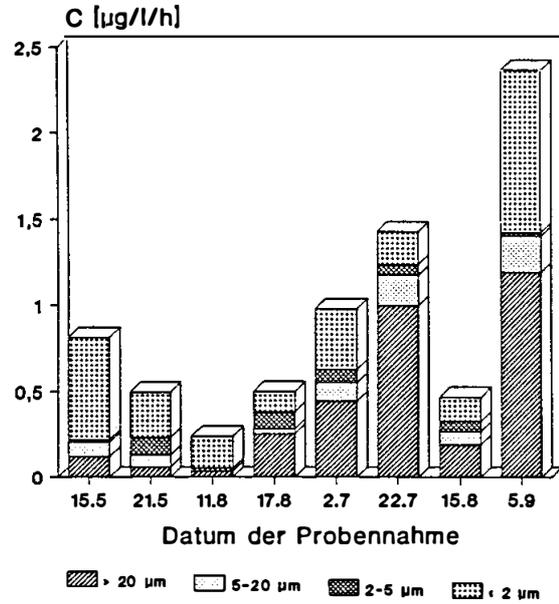


Abbildung 3.15: Entwicklung der Chlorophyllkonzentrationen des gesamten Phytoplanktons und der verschiedenen Größenfraktionen auf den Stationen "Boknis Eck" und "Kieler Bucht"

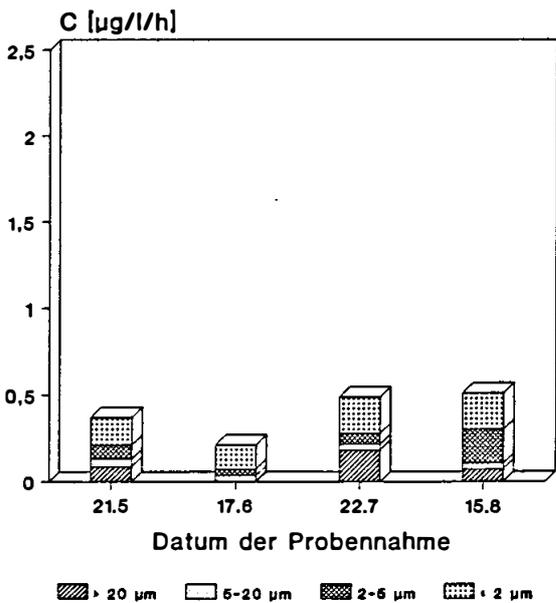
Primärproduktion
Boknis Eck, 2m



Primärproduktion
Boknis Eck, 15m



Primärproduktion
Kieler Bucht, 2m



Primärproduktion
Kieler Bucht, 15m

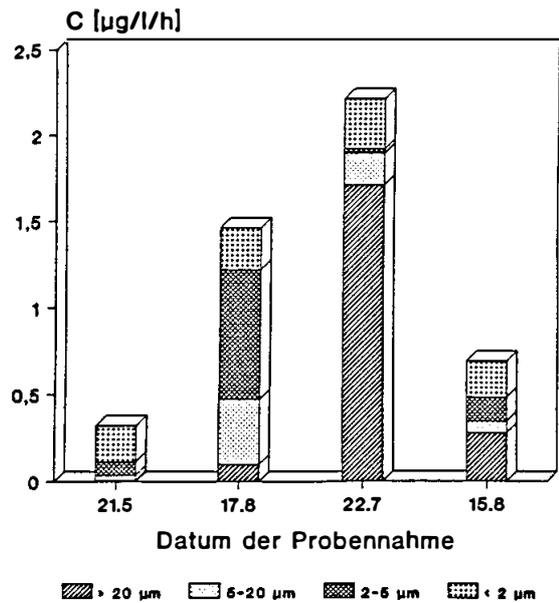


Abbildung 3.16: Entwicklung der Primärproduktion des gesamten Phytoplanktons und der verschiedenen Größenfraktionen auf den Stationen "Boknis Eck" und "Kieler Bucht"

3.4.4 Zellkonzentrationen des autotrophen Pico- und Nanoplanktons

Die Größenfraktion 0,2 bis 2,0 μm bestand in allen Proben ausschließlich aus coccalen Cyanobakterien vom *Synechococcus*-Typ (Länge: 0,78-1,56 μm , Breite: 0,55-0,78 μm). Größer als 2,0 μm waren nur eukaryontische Zellen, wobei die autotrophen Zellen zum größten Teil Flagellaten waren. Die Animpfung von Probenwasser (15.05. und 21.05., 1 ml) auf f/2-Medium (3 ml) ergab nach ein bis zwei Wochen Kultivierung (vgl. 2.1.2) folgende, häufigste Arten: *Nephroselmis pyriformes*, *Chrysochromulina* sp., *Micromonas* sp. *Pseudopedinella* sp., *Micromonas* sp. und *Ochromonas* sp. Die durchschnittliche Größe dieser Taxa war 2,2 bis 4,4 μm für Breite und Länge. Bezüglich der Zusammensetzung des Pico- und Nanoplanktons konnten auf beiden Stationen keine Unterschiede festgestellt werden.

Die mikroskopischen Zählungen ergaben eine Abnahme der Zellabundanz des Nanoplanktons von Mai bis September und im Gegensatz dazu eine Zunahme der Zellabundanz der coccalen Cyanobakterien (Abbildung 3.17). Letztere lagen zwischen $2 \cdot 10^6$ und $85 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{l}^{-1}$. Die höchsten Nanoplanktonkonzentrationen wurden mit $45 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{l}^{-1}$ auf der Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe ermittelt, wohingegen die maximalen Konzentrationen in 15 m Tiefe nur zwischen $5 \cdot 10^6$ bis $30 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{l}^{-1}$ lagen. Es zeigte sich in Analogie zu den Produktionsmessungen eine mit der Zeit zunehmende Abundanz des Picoplanktons, die dann ab Mitte Juli die Abundanz des Nanoplanktons überschritt. Pico- und Nanoplanktonkonzentrationen lagen auf der Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe im Durchschnitt höher als auf der Station "Kieler Bucht" in vergleichbarer Tiefe, was den Chlorophyll- und Produktionsmessungen entspricht.

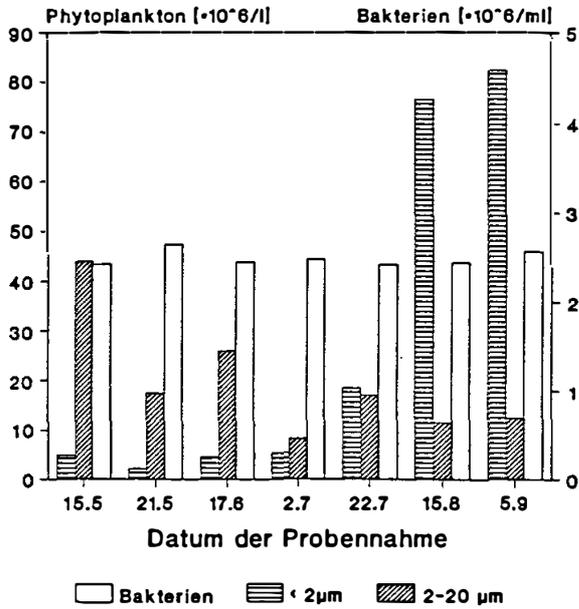
In 15 m Tiefe waren die Zellabundanz des Nanoplanktons auf beiden Stationen ähnlich. Die coccalen Cyanobakterien allerdings wiesen auf der Station "Kieler Bucht" in den Monaten Juli und Juni niedrigere Zellkonzentrationen in dieser Tiefe auf wie auf der Station "Boknis Eck". Diese Verhältnisse kehrten sich Mitte August um. Zu diesem Zeitpunkt war die Konzentration der coccalen Cyanobakterien auf der Station "Kieler Bucht" mit $65 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{l}^{-1}$ doppelt so hoch als auf der Station "Boknis Eck". Letzteres zeigte sich aber nicht hinsichtlich der Chlorophyll- und Produktionsergebnisse.

Die Entwicklung der Bakterienpopulationen verlief je nach Tiefe unterschiedlich, ist aber in den entsprechenden Tiefen auf beiden Stationen als ähnlich zu betrachten. Auf beiden Stationen stagnierten die Bakterienkonzentrationen in 2 m Tiefe zwischen $2,0 \cdot 10^6$ und $2,6 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$. In 15 m Tiefe nahmen die Konzentrationen von Mai bis September kontinuierlich ab. Auf der Station "Boknis Eck" lag in dieser Tiefe die höchste Bakterienkonzentration des Untersuchungszeitraumes im Mai mit $4,36 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$ vor,

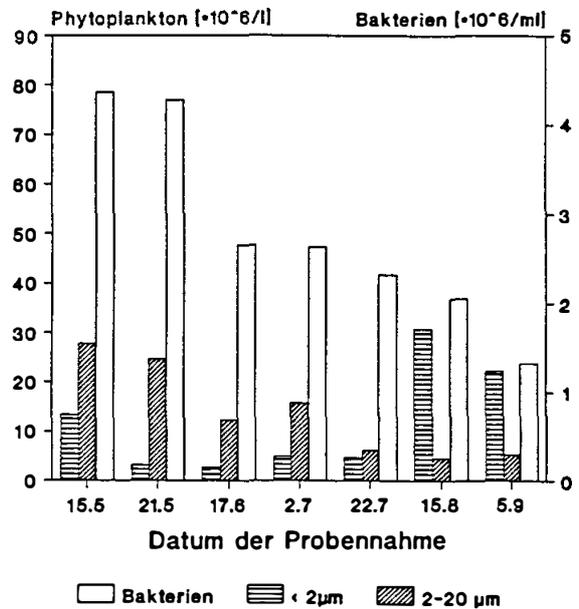
die bis September auf $1,33 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ abfiel. Mit $2,48 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ lag in der entsprechenden Tiefe auf der Station "Kieler Bucht" die höchste Konzentration im Mai fast um die Hälfte niedriger und sank bis August auf $1,64 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ ab.

Die Ergebnisse der Zytometermessungen werden hier nicht weiter aufgeführt, da alle Proben nur in fixiertem Zustand bis zu zwei Wochen nach Probennahme gemessen werden konnten. Es standen zum direkten Vergleich keine gemessenen Frischwasserproben zur Verfügung und so konnte der Einfluß der Fixierung auf die Autofluoreszenzeigenschaften der Zellen bei diesen Proben nicht eingeschätzt werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der mikroskopischen Zählungen ergaben sich allerdings bei der zytometrischen Messung der fixierten Proben Verluste zwischen 17 und 72 Prozent. Die unter 3.1.2 beschriebenen Ergebnisse zeigten zudem, daß die Unterschätzung der mit dem Zytometer aus formolfixierten Proben ermittelten Zellkonzentrationen immer zu groß ist, um solche Daten verwenden zu können.

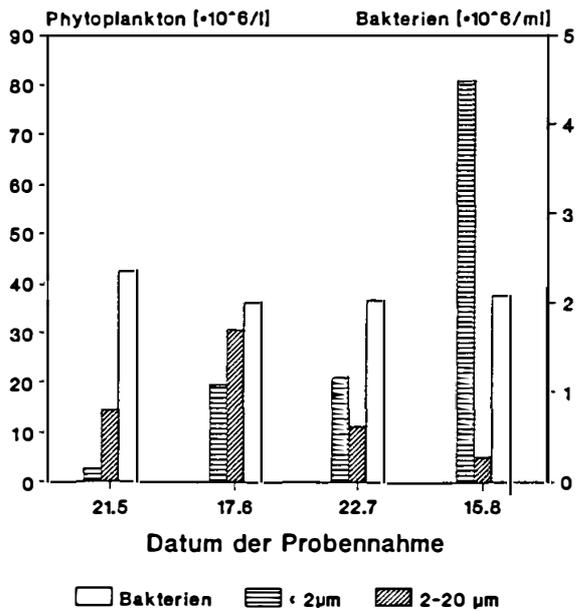
**Zellzahlen
Boknis Eck, 2m**



**Zellzahlen
Boknis Eck, 15m**



**Zellzahlen
Kieler Bucht, 2m**



**Zellzahlen
Kieler Bucht, 15m**

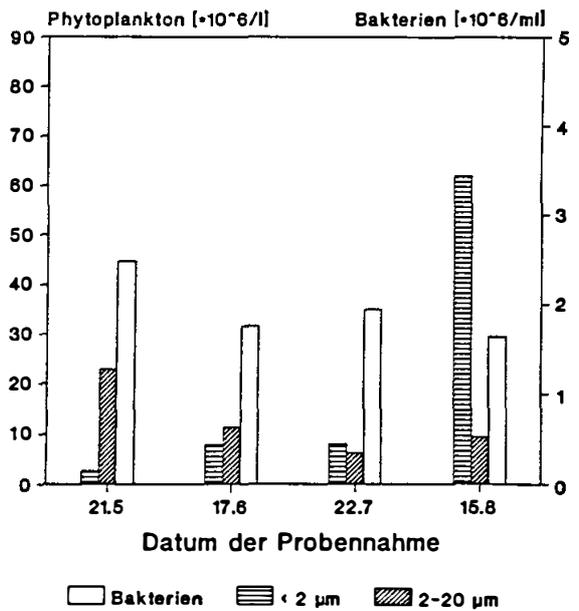


Abbildung 3.17: Entwicklung der Abundanzen von Pico- und Nanophytoplankton sowie der Bakterien auf den Stationen "Boknis Eck" und "Kieler Bucht"

3.5 Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91)

3.5.1 Abiotische Parameter

3.5.1.1 Hydrographie

Die stark ausgeprägte Thermokline (Abbildung 3.18) lag durchgehend in 10 m Tiefe. Die Oberflächentemperatur lag während beider Driften zwischen 20 und 24 °C. In der Thermokline kam es zu einem Temperaturabfall bis auf *ca.* 10 °C in 12 m Tiefe. In einer Tiefe von 60 m zeigte sich ein Temperaturminimum von 4 °C. Unterhalb von 80 m Tiefe blieb die Temperatur mit 5 °C annähernd konstant.

Die Salinität lag durchgehend auf allen Stationen an der Oberfläche zwischen 7,8 und 8,0, veränderte sich nicht bis in die Tiefe von 60 m und stieg dann auf *ca.* 11 bis 12 an.

Die Quantametermessungen ergaben erwartungsgemäß einen exponentiellen Abfall der Lichtintensität mit der Tiefe (Abbildung 3.19). Die Werte in der Wasseroberfläche lagen während der ersten Drift bis auf Station 423 zwischen 780 und 850 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, während der zweiten Drift unterlagen sie mit 260 bis 900 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ größeren Schwankungen. Die euphotische Zone ($\leq 1\%$ -Lichttiefe) erstreckte sich während der ersten Drift zwischen 14,8 und 16,2 m Tiefe und während der zweiten Drift zwischen 12,1 und 14,8 m Tiefe. Die Secchi-Tiefe schwankte während der ersten Drift zwischen 5,5 und 6 m und während der zweiten Drift zwischen 5 und 5,5 m Tiefe.

3.5.1.2 Sauerstoff und Schwefelwasserstoff

Der Sauerstoffgehalt (Abbildung 3.20) stieg innerhalb der oberen 40 m von 8,0 bzw. 10,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ auf *ca.* 11,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ an. Danach erfolgte mit der Tiefe ein kontinuierlicher Abfall des Sauerstoffgehaltes. Unterhalb von 130 m war auf beiden Driftabschnitten kein Sauerstoff mehr nachweisbar, stattdessen wurde ein rascher Anstieg der H_2S -Konzentration auf bis zu 90,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ registriert. Zwischen den beprobten Stationen zeigte sich kein Unterschied bezüglich dieser Verteilung.

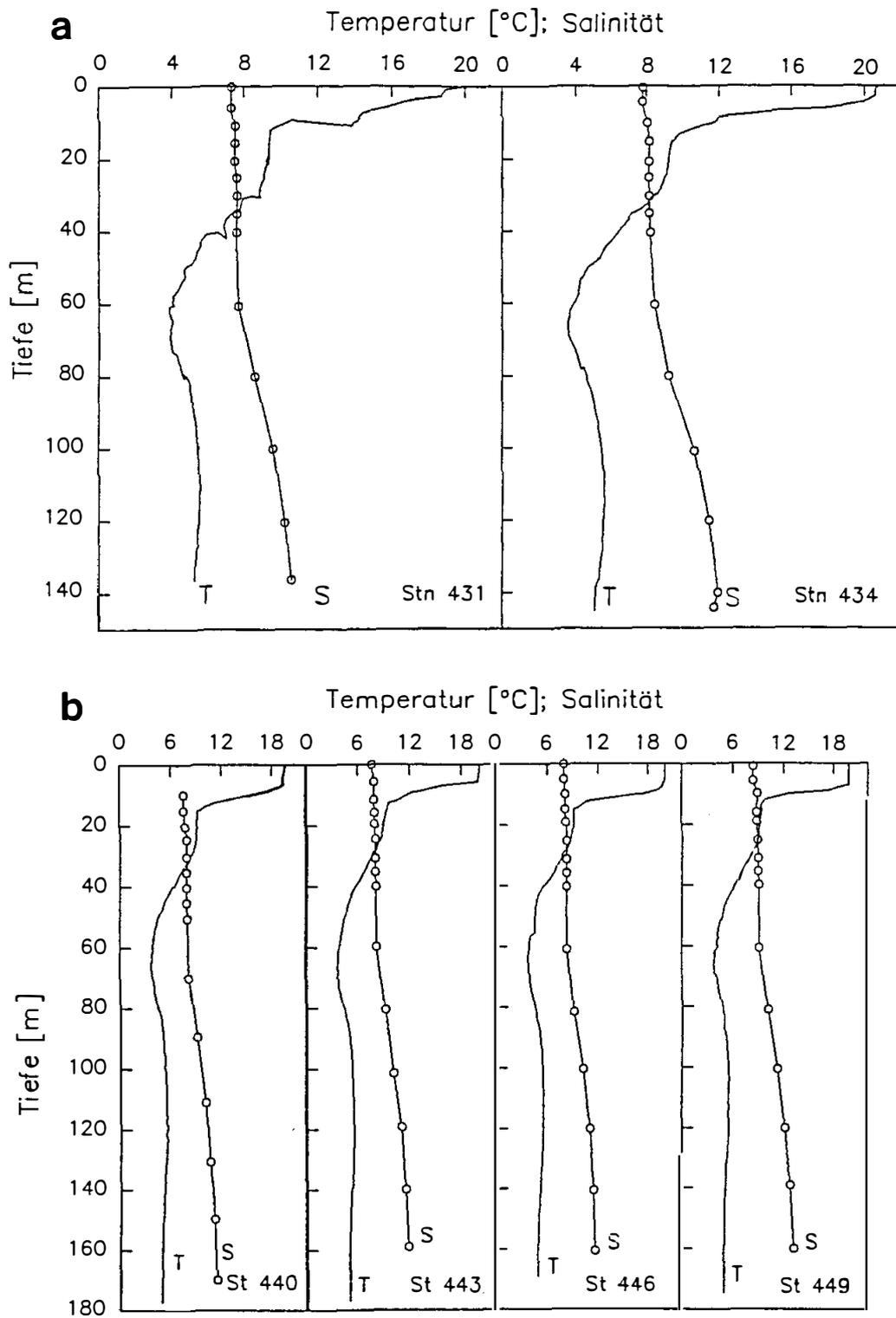


Abbildung 3.18: Temperatur- und Salinitätsprofile der BAMBI-Stationen; a) erste Drift; b) zweite Drift

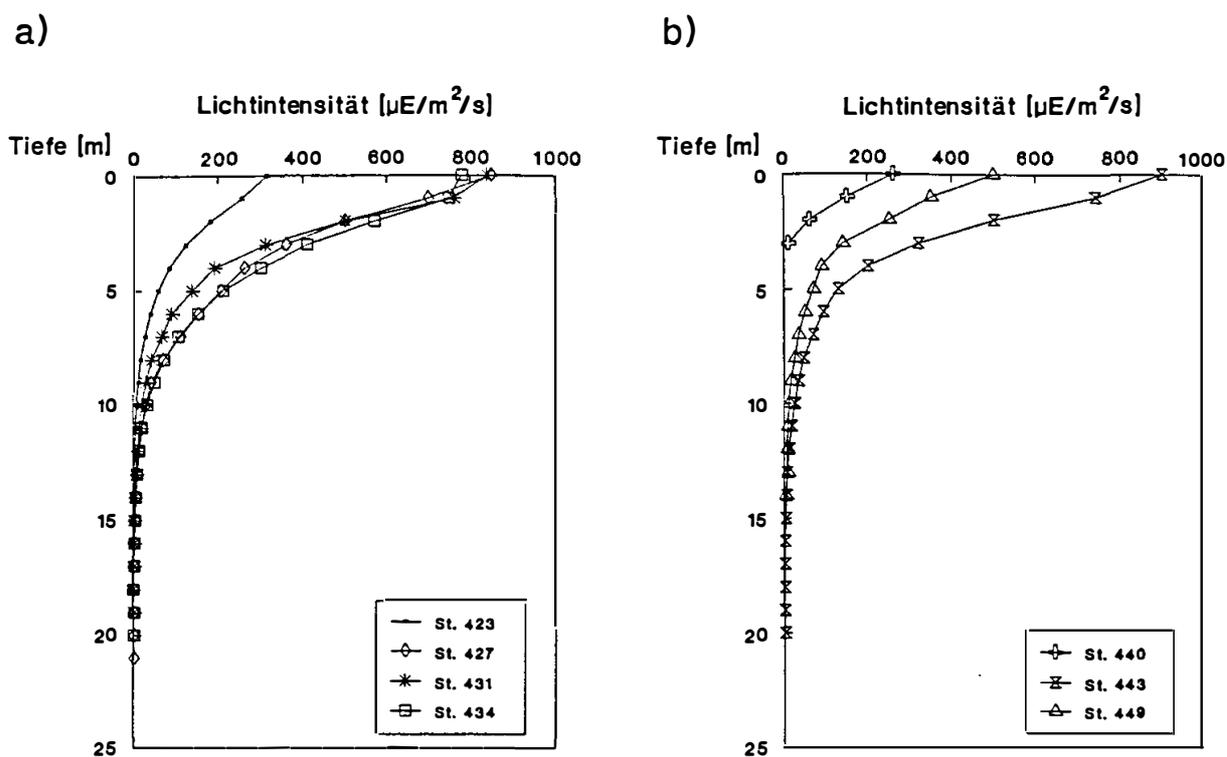


Abbildung 3.19: Lichtintensitäten auf den BAMBI-Stationen; a) erste Drift; b) zweite Drift

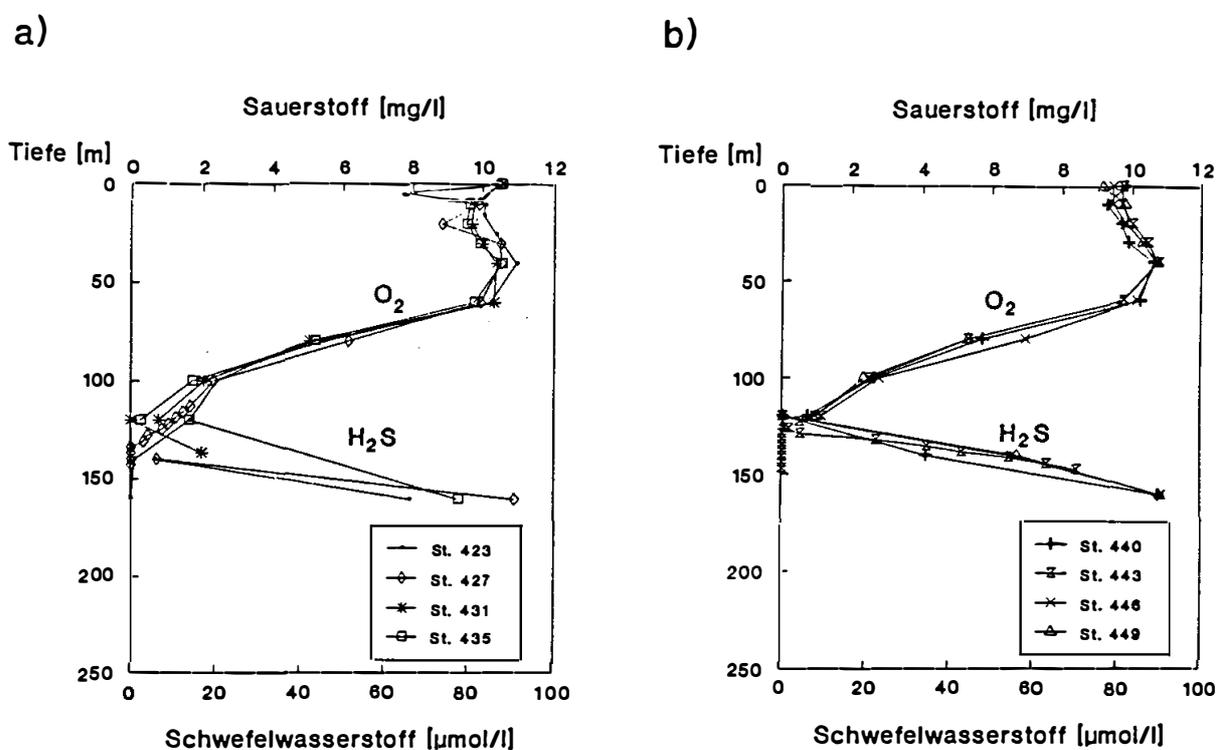


Abbildung 3.20: Sauerstoffgehalt [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] und H_2S -Konzentrationen [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] auf den BAMBI-Stationen; a) erste Drift; b) zweite Drift

3.5.1.3 Nährstoffe

Die Vertikalprofile der Nährstoffe zeigten auf allen Stationen einen sehr ähnlichen Verlauf und es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Driftstudien festgestellt werden.

In der euphotischen Zone lag bezüglich der Nitratverteilung (Abbildung 3.21) eine schwach ausgeprägte primäre Nutrikline zwischen 10 und 15 m Tiefe vor. Während der ersten Drift lagen die Nitratkonzentrationen an der Oberfläche zwischen $0,08$ und $0,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und in 15 m Tiefe zwischen $0,32$ und $0,44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Auf den ersten beiden Stationen (St. 440, St. 443) der zweiten Drift wurde diese primäre Nutrikline mit Nitratkonzentrationen zwischen $0,78$ und $0,90 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ etwas deutlicher, um sich dann auf den letzten beiden Stationen (St. 446, St. 449) aufzulösen. Zwischen 60 und 100 m Tiefe stieg die Nitratkonzentration an und erreichte mit $9,0$ bis $11,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in 100 m Tiefe ein sehr stark ausgeprägtes Maximum, um dann zwischen 100 und 140 m Tiefe wieder auf oberflächenähnliche Werte abzufallen.

Nitrit (Abbildung 3.21) lag in der euphotischen Zone während der ersten Drift mit $0,1$ bis $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vor. Während der zweiten Drift variierten die Konzentrationen in der euphotischen Zone etwas mehr und lagen zwischen $0,07$ und $0,22 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nitrit zeigte ein Tiefenmaximum in 80 m Tiefe. Hier wurden Konzentrationen von $0,55 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ registriert. Unterhalb dieser Tiefe nahmen die Konzentrationen auf weniger als $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ab.

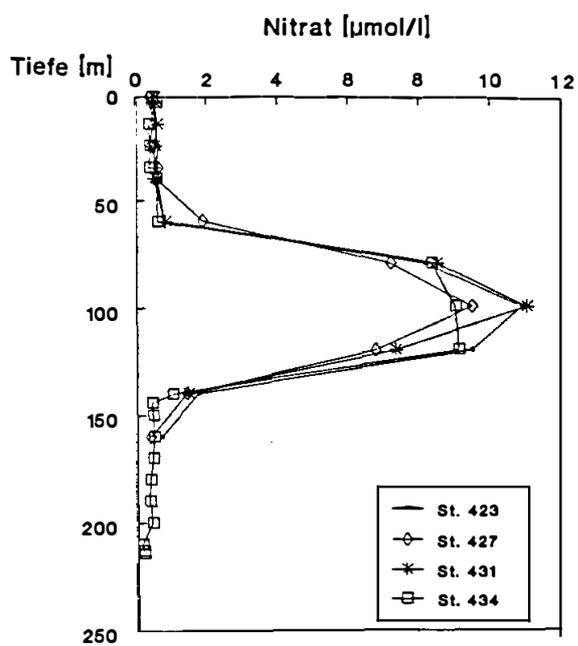
Ammonium (Abbildung 3.22) lag in der euphotischen Zone mit durchschnittlich $< 0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vor und zeigte in den oberen 35 m keine auffälligen Schwankungen. In 40 m Tiefe stieg die Konzentration auf *ca.* $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an. In 120 m Tiefe fand sich eine ausgeprägte Nutrikline für Ammonium.

Die Phosphatkonzentrationen (Abbildung 3.23) stiegen innerhalb der euphotischen Zone kontinuierlich von $0,1$ auf $0,3$ (erste Drift) bzw. $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (zweite Drift) an. Unterhalb von 40 m Tiefe war eine stärkere Zunahme zu verzeichnen und in 150 m Tiefe wurden $7,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphat gemessen.

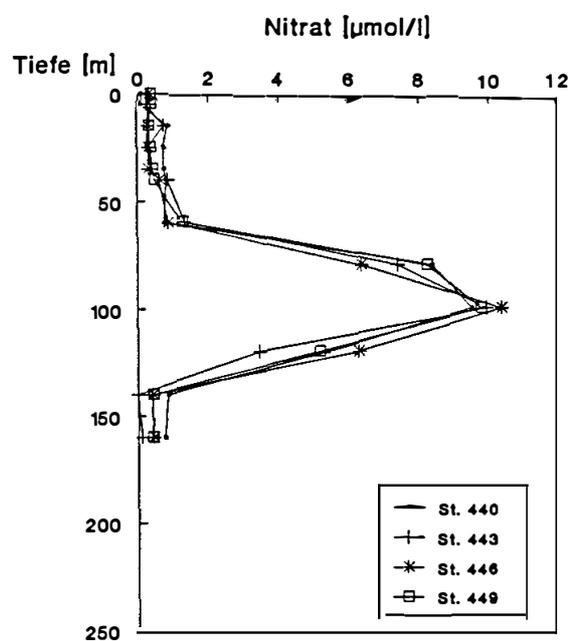
Silikat (Abbildung 3.23) wies innerhalb der oberen 35 m Konzentrationen von $8,0$ bis $10,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf. Bis 60 m Tiefe erfolgte ein leichter Anstieg auf $12,0$ bis $13,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und wie im Falle von Nitrat und Phosphat kam es unterhalb dieser Tiefe zu einer starken Zunahme der Silikatkonzentration. In 150 m Tiefe wurden Konzentrationen von $80,0$ bis $95,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht.

Aufgrund dieser Nährstoffverteilung wies der während BAMBI '91 untersuchte Wasserkörper eine stark ausgeprägte Nutrikline in einer Tiefe von 60 bis 80 m auf und innerhalb der euphotischen Zone lagen mehr oder weniger oligotrophe Verhältnisse vor. Nur bezüglich des Nitrats konnte eine schwache Nutrikline in *ca.* 15 m Tiefe registriert werden.

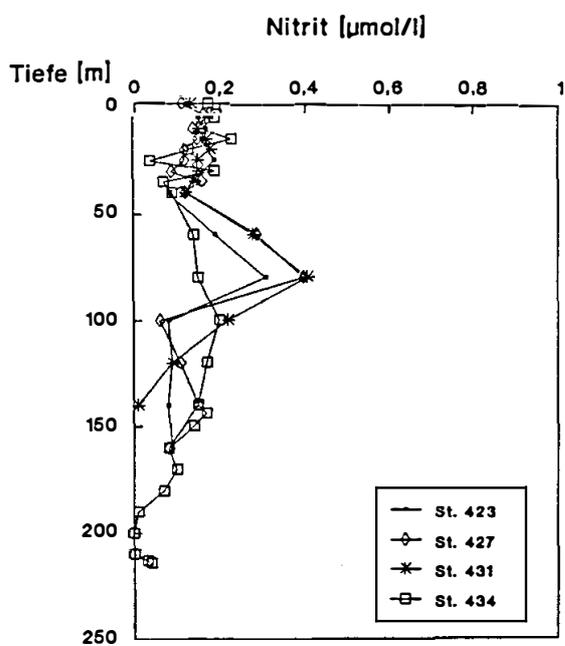
BAMBI '91, 1.Drift



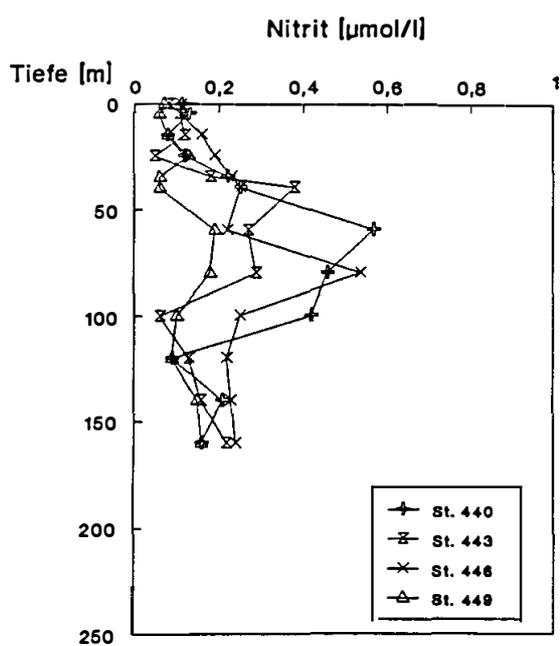
BAMBI '91, 2.Drift



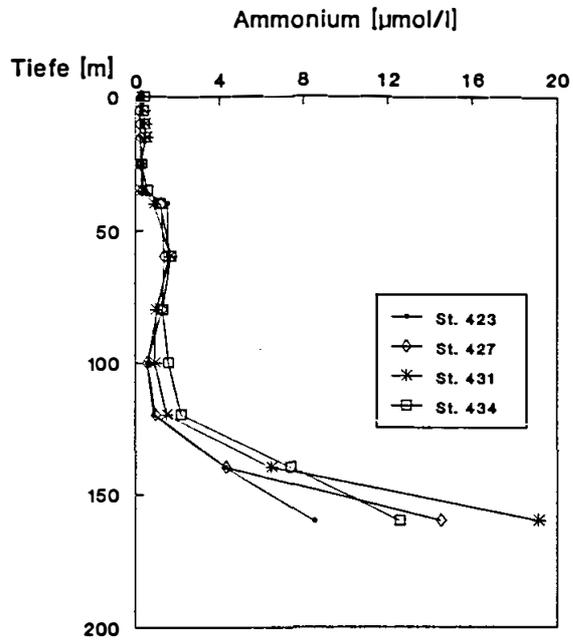
BAMBI '91, 1.Drift



BAMBI '91, 2. Drift

Abbildung 3.21: Nitrat- und Nitritkonzentrationen [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] auf den BAMBI-Stationen

BAMBI '91, 1.Drift



BAMBI '91, 2. Drift

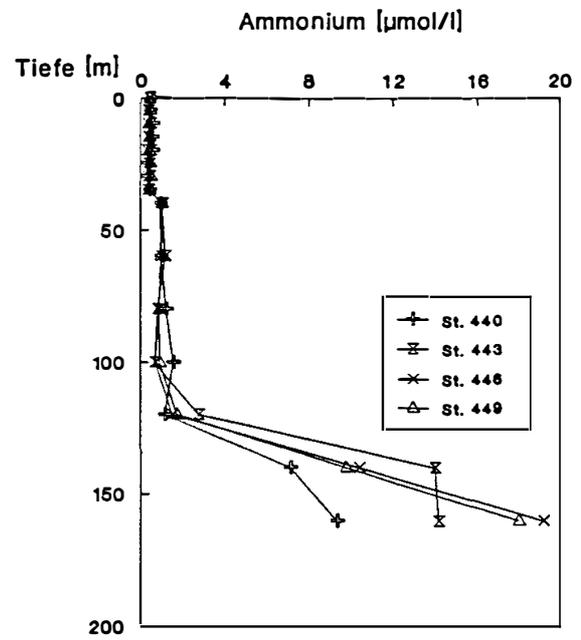
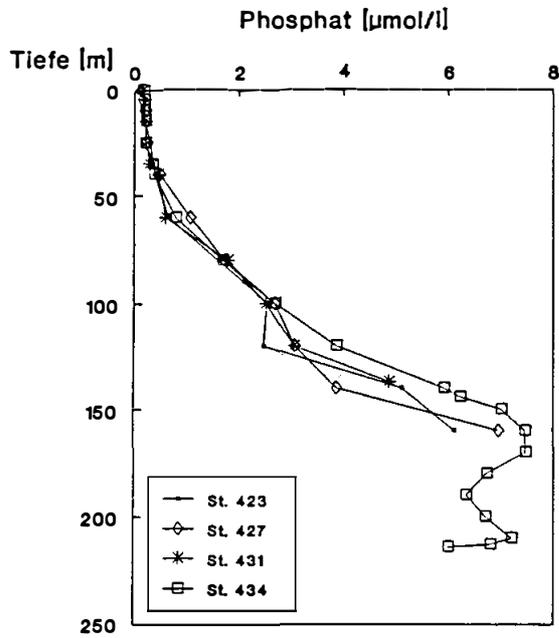
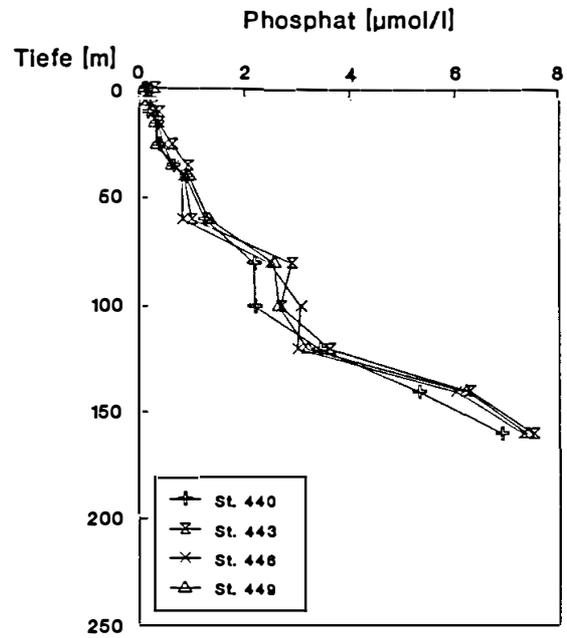


Abbildung 3.22: Ammoniumkonzentrationen [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] auf den BAMBI-Stationen

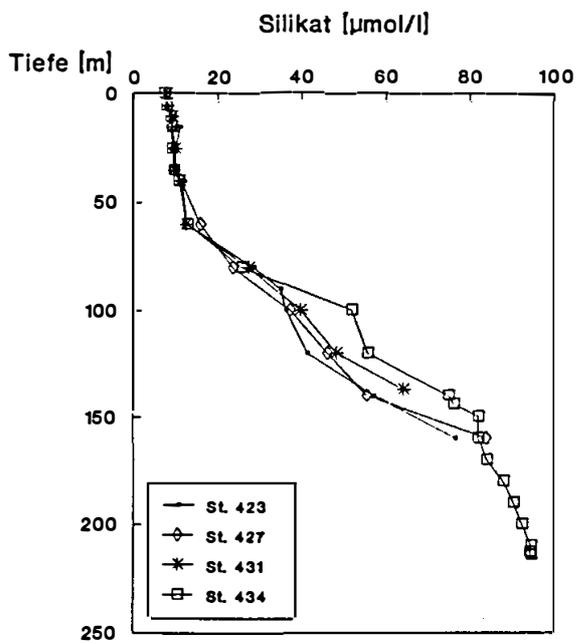
BAMBI '91, 1.Drift



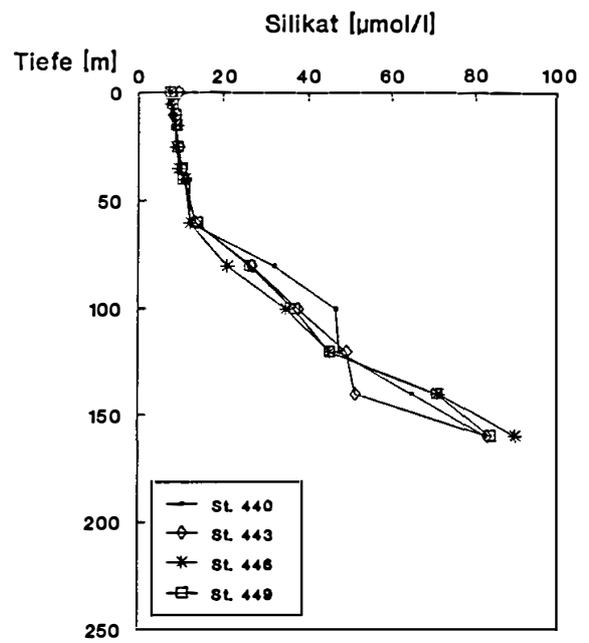
BAMBI '91, 2. Drift



BAMBI '91, 1.Drift



BAMBI '91, 2.Drift

Abbildung 3.23: Phosphat- und Silikatkonzentrationen [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] auf den BAMBI-Stationen

3.5.2 Biologische Parameter

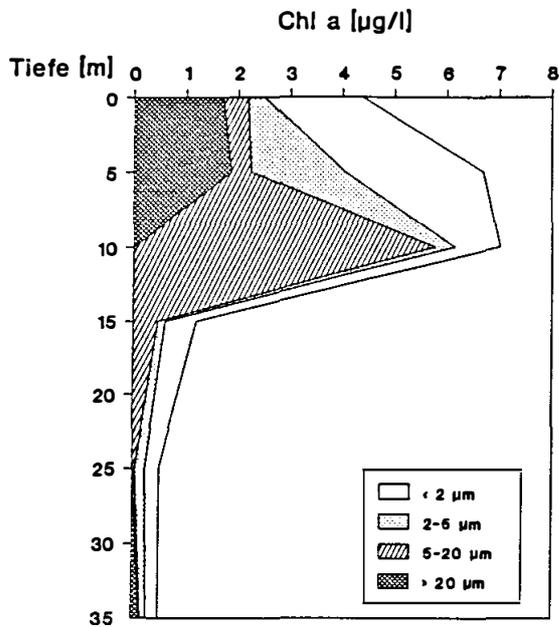
3.5.2.1 Chlorophyll

Die Chlorophyllverteilung (Abbildung 3.24 und 3.25) zeigte während beider Driften ein Tiefenmaximum in 10 m Tiefe. Ausnahmen waren die Stationen 427 (Maximum in 5 m Tiefe) und 443 (Oberflächenmaximum). Dabei waren die Maxima während der ersten Drift ($5,5$ bis $13 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) höher als die der zweiten Drift ($3,0$ bis $5,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Generell erfolgte unterhalb des Tiefenmaximums eine Abnahme des Gesamtchlorophylls. Die Chlorophyllkonzentrationen in 35 m Tiefe lagen während beider Driftabschnitte zwischen $0,5$ und $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

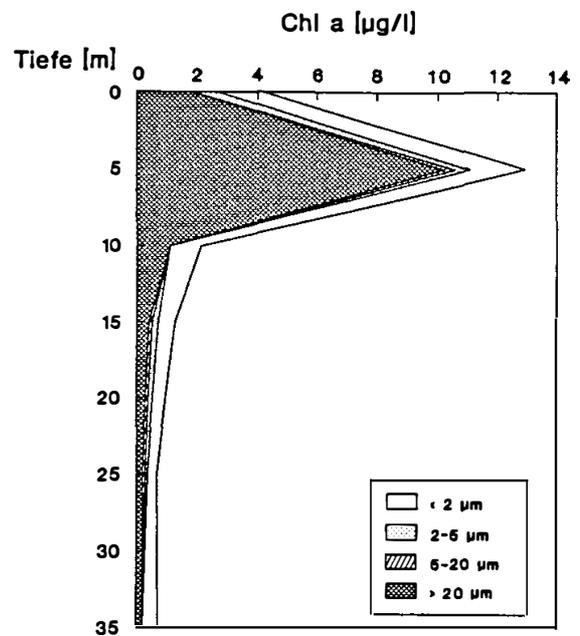
Für die einzelnen Größenfraktionen ergab sich jeweils der größte Anteil in der Fraktion $> 20 \mu\text{m}$ und der zweitgrößte Anteil in der $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion. Die Fraktionen $2-5 \mu\text{m}$ und $5-20 \mu\text{m}$ hatten im allgemeinen keine größere Bedeutung. Bezüglich der Verteilung der Fraktionen zeigte sich, daß die $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion der Verteilung des Gesamtchlorophylls mit der Tiefe folgte. Dies war auch für die $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion mehr oder weniger der Fall, wobei diese Fraktion oberhalb der Thermokline (10 m) von größerer Bedeutung war als unterhalb der Thermokline. Die Fraktionen $5-20 \mu\text{m}$ und $2-5 \mu\text{m}$ hingegen blieben in ihrer Tiefenverteilung relativ konstant, allerdings ergab sich für die $5-20 \mu\text{m}$ -Fraktion bis auf Station 423 ein Oberflächenmaximum.

Die zeitliche Entwicklung des über die oberen 35 m integrierten Gesamtchlorophylls (Abbildung 3.26) bestand im Laufe der ersten Drift in einer Zunahme von 98 auf $131 \text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Am vierten Tag (St. 434) erfolgte eine Abnahme auf $91 \text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Während der zweiten Drift kam es zu einer Abnahme des Gesamtchlorophylls von 102 auf $56 \text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Dabei ist zu beachten, daß die Chlorophyllkonzentrationen der Fraktionen $< 2 \mu\text{m}$, $2-5 \mu\text{m}$ und $5-20 \mu\text{m}$ über die Zeit relativ konstant blieben und die eigentlichen Zu- und Abnahmen des Gesamtchlorophylls durch die Konzentrationsänderungen der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion zustande kamen. Aus Tabelle 3.6 ist zu ersehen, daß der Anteil der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion bis auf Station 423 zwischen 34 und 63 Prozent lag und damit ein bis zwei Drittel des Gesamtchlorophylls ausmachte. Ähnliches galt für die $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion, ihr Anteil lag zwischen 26 und 53 Prozent und konnte zwischen einem Drittel und der Hälfte des Gesamtchlorophylls ausmachen. Im Laufe der zweiten Drift dominierte diese Fraktion. Die dazwischenliegenden Fraktionen $5-20 \mu\text{m}$ und $2-5 \mu\text{m}$ machten bis auf Station 423 jeweils weniger als 15 Prozent aus.

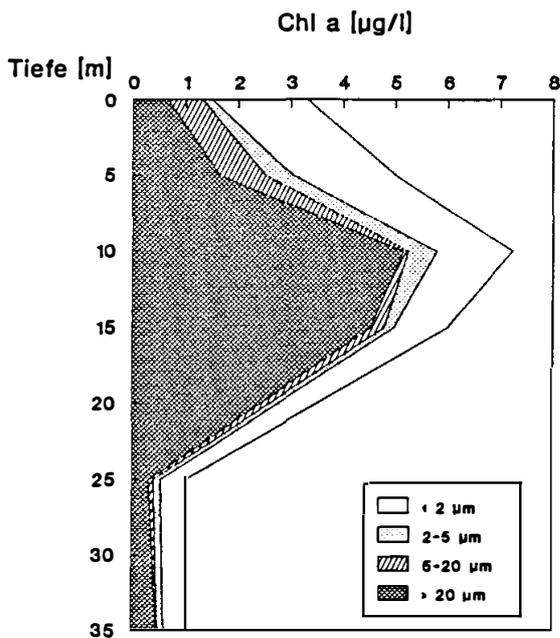
Chlorophyll
BAMBI '91, St. 423



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 427



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 431



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 434

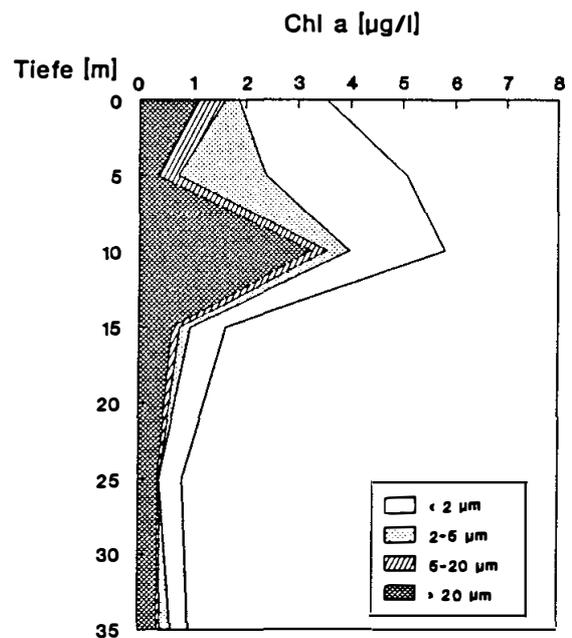
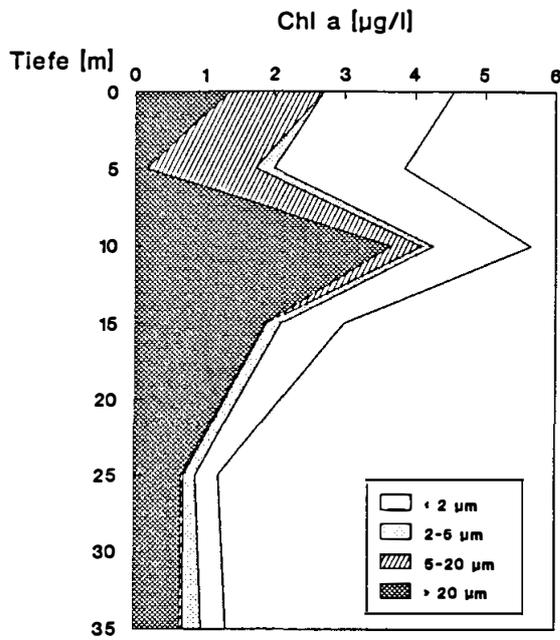
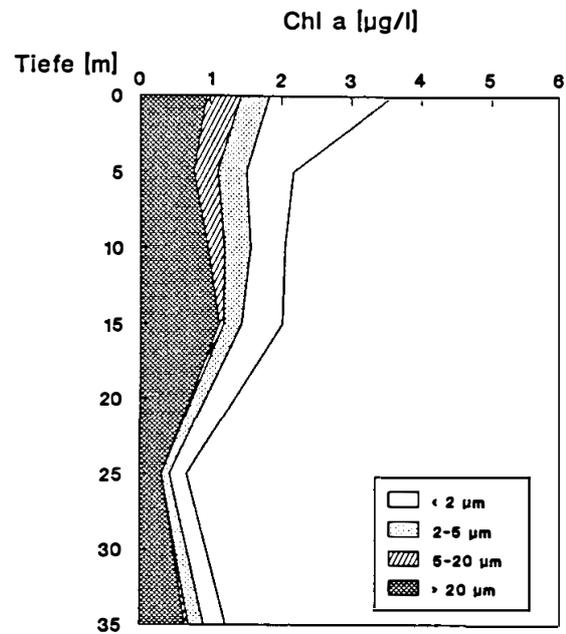


Abbildung 3.24: Vertikalprofile des größenfraktionierten Chlorophylls [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] während der ersten Drift von BAMBI '91, zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen

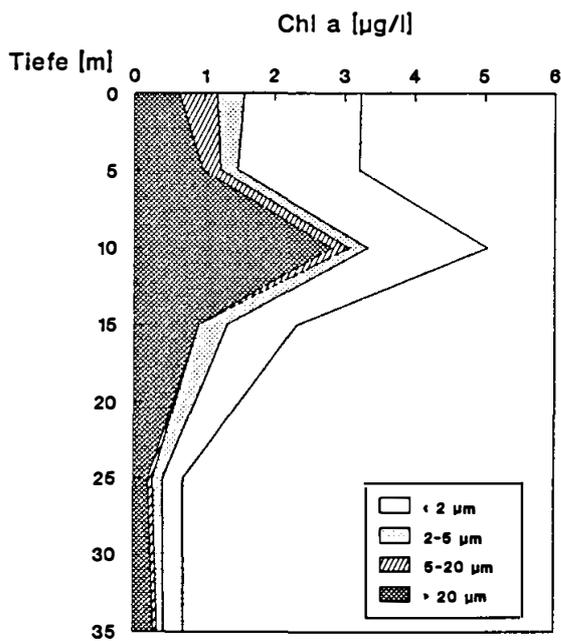
Chlorophyll
BAMBI '91, St. 440



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 443



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 446



Chlorophyll
BAMBI '91, St. 449

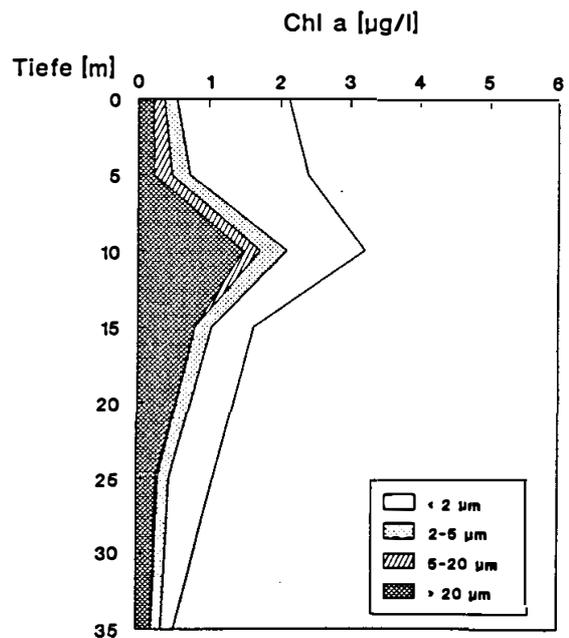


Abbildung 3.25: Vertikalprofile des größenfraktionierten Chlorophylls [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] während der zweiten Drift von BAMBI '91

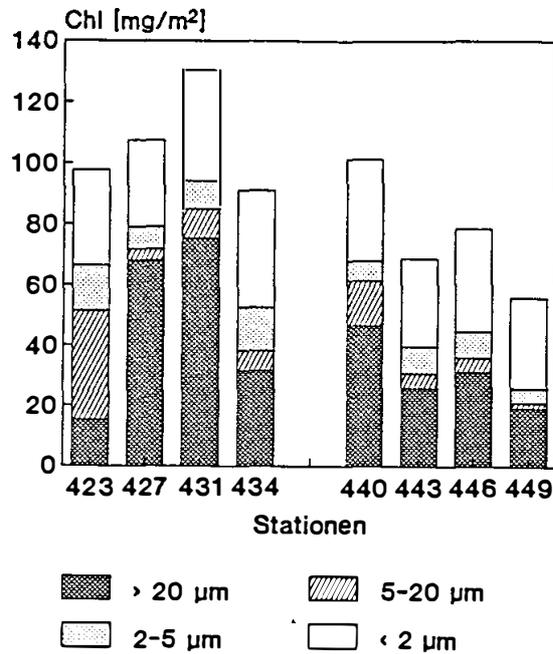


Abbildung 3.26: Über die Wassersäule von 35 m integriertes, größenfraktioniertes Chlorophyll [mg·m⁻²] während BAMBI '91 (St. 423 bis St. 434 = 1.Drift, St. 443 bis St. 449 = 2.Drift)

Tabelle 3.6: Prozentuale Anteile der Größenfraktionen am über die oberen 35 m integrierten Gesamtchlorophyll während BAMBI '91, (St. 423 bis St. 434 = 1.Drift, St. 443 bis St. 449 = 2.Drift)

Station	> 20 µm	5-20 µm	2-5 µm	< 2 µm
423	15,6 %	37,0 %	15,5 %	32,0 %
427	63,5 %	3,5 %	6,7 %	26,4 %
431	57,5 %	7,4 %	7,0 %	27,7 %
434	34,8 %	7,3 %	15,8 %	42,1 %
440	46,1 %	14,6 %	6,4 %	32,9 %
443	37,6 %	7,2 %	12,9 %	42,3 %
446	39,6 %	6,3 %	11,1 %	43,0 %
449	34,3 %	3,5 %	8,4 %	53,9 %

3.5.2.2 Primärproduktion

Im Gegensatz zur Vertikalverteilung des Chlorophylls zeigte die Primärproduktion stets ein Oberflächenmaximum (Abbildung 3.27 und 3.28). Während der ersten Drift wurde dort eine Gesamtproduktion von 4,6 bis 11,0 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreicht. Während der zweiten Drift lagen die entsprechenden Werte mit 4,4 bis 14,5 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ etwas höher. In 10 m Tiefe (erste Drift) bzw. in 5 m Tiefe (zweite Drift) wurden nur noch 0,65 bis 1,8 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. 1,8 bis 4,5 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ produziert. In 25 m Tiefe wurden 0,08 bis 0,11 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (erste Drift) und 0,11 bis 0,46 $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (zweite Drift) gemessen. Damit wurde für die Tiefe von 25 m ebenfalls wie für die Oberfläche während der zweiten Drift eine im Vergleich zur ersten Drift höhere Produktivität registriert.

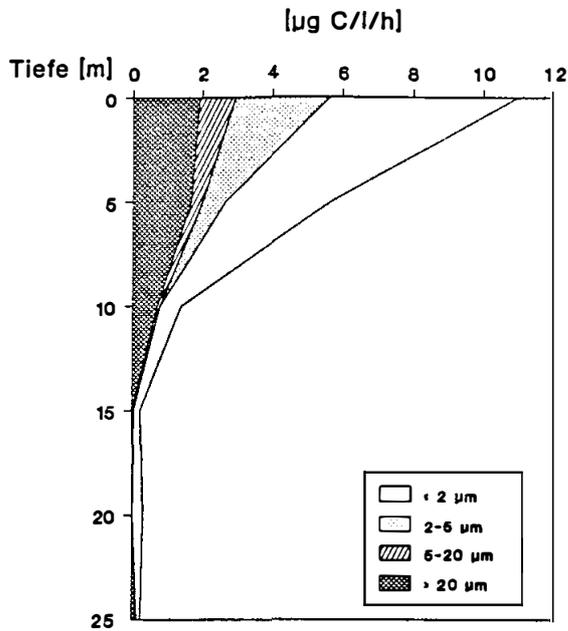
Alle Fraktionen folgten in der Vertikalverteilung der Gesamtprimärproduktion. Unterhalb von 15 m Tiefe war die Dominanz der $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion - außer auf den Stationen 423 und 449 - auffällig.

Die über die oberen 25 m integrierte Gesamtprimärproduktion (Abbildung 3.29) lag während der ersten Drift zwischen 460 und 855 $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, wobei innerhalb der ersten drei Tage eine Abnahme erfolgte und am vierten Tag erneut der Ausgangswert erreicht wurde. Während der zweiten Drift zeigte sich innerhalb der ersten drei Tage ebenfalls eine Abnahme der Gesamtprimärproduktion von 570 auf 380 $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$. Mit 1055 $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ wurde am letzten Tag dieser Drift (St. 449) die höchste Gesamtprimärproduktion gemessen. Die integrierte Primärproduktion zeigte deutliche Parallelen zur Höhe der Oberflächenproduktion (0 bis 5 m), so daß diese den größten Teil an der integrierten Produktion ausmachte.

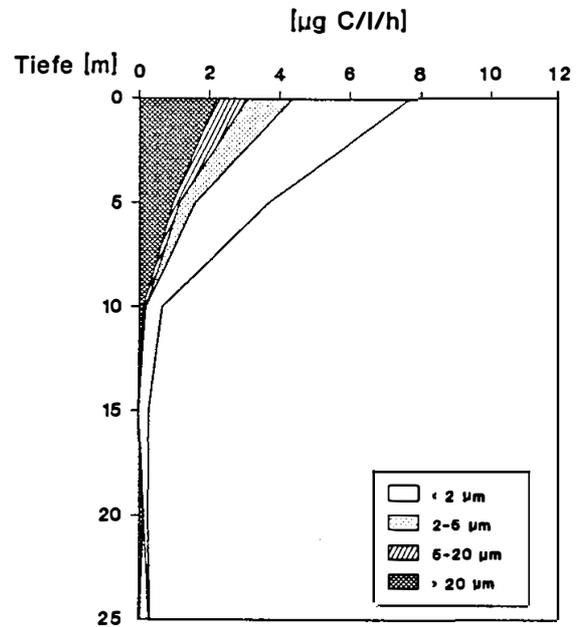
Der Anteil der einzelnen Größenfraktionen an der integrierten Gesamtprimärproduktion war auf allen Stationen ähnlich (Tabelle 3.7). Immer stellte die $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion einen Anteil von 22 bis 26 Prozent und blieb damit relativ konstant. Die Fraktion $< 2 \mu\text{m}$ hatte mit 51 bis 60 Prozent den größten Anteil, und wie beim Chlorophyll kam den Fraktionen 5-20 μm und 2-5 μm mit 6,5 bis 16 Prozent die geringste Bedeutung zu.

Im Laufe beider Driften nahmen die Anteile der Fraktionen 5-20 μm und 2-5 μm zu Gunsten der $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion ab. Der Anteil des Picoplanktons an der Primärproduktion war höher als am Chlorophyll; der Anteil der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion an der Produktion dagegen war deutlich geringer als am Chlorophyll.

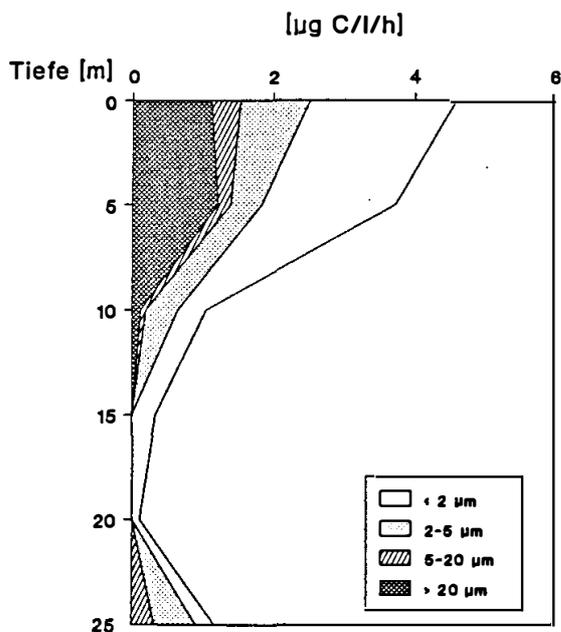
Primärproduktion
BAMBI '91, St. 423



Primärproduktion
BAMBI '91, St. 427



Primärproduktion
BAMBI '91, St. 431



Primärproduktion
BAMBI '91, St. 434

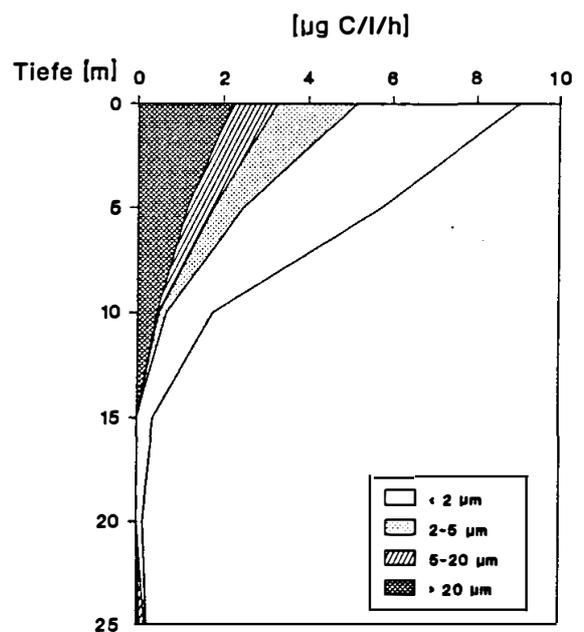
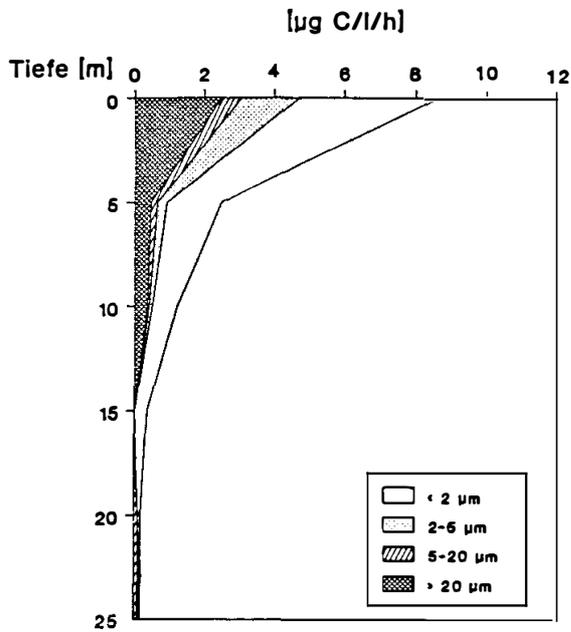
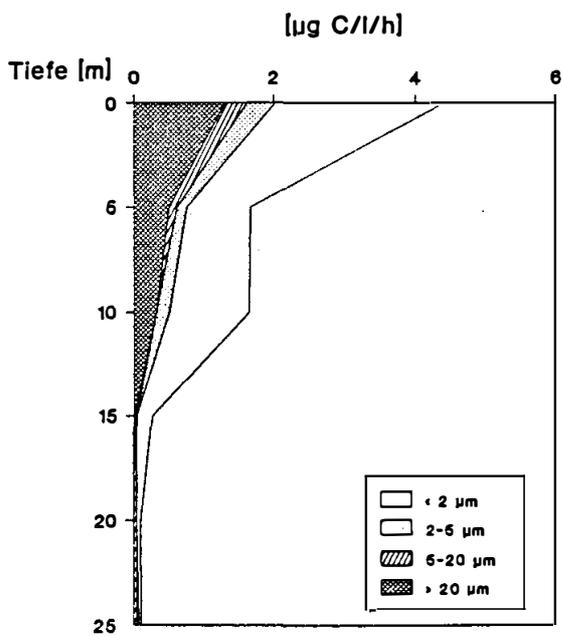


Abbildung 3.27: Vertikalprofile der größenfraktionierten Primärproduktion [$\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] während der ersten Drift von BAMBI '91, zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen

Primärproduktion
BAMBI '91, St. 440



Primärproduktion
BAMBI '91, St. 446



Primärproduktion
BAMBI '91, St. 449

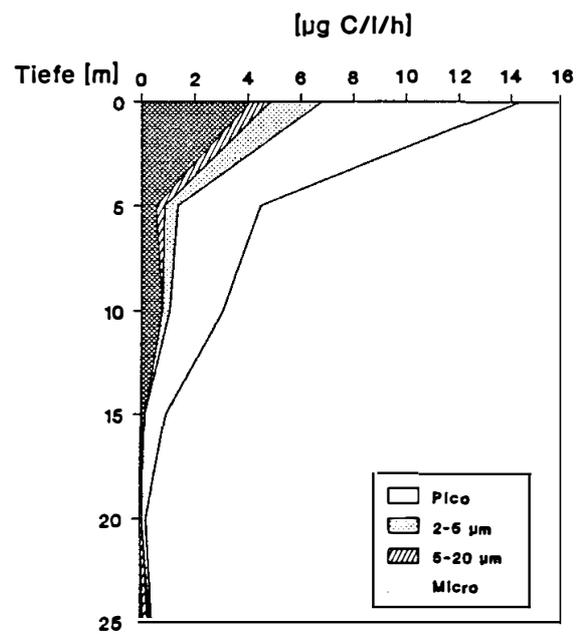


Abbildung 3.28: Vertikalprofile der größenfraktionierten Primärproduktion [$\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] während der zweiten Drift von BAMBI '91, zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen

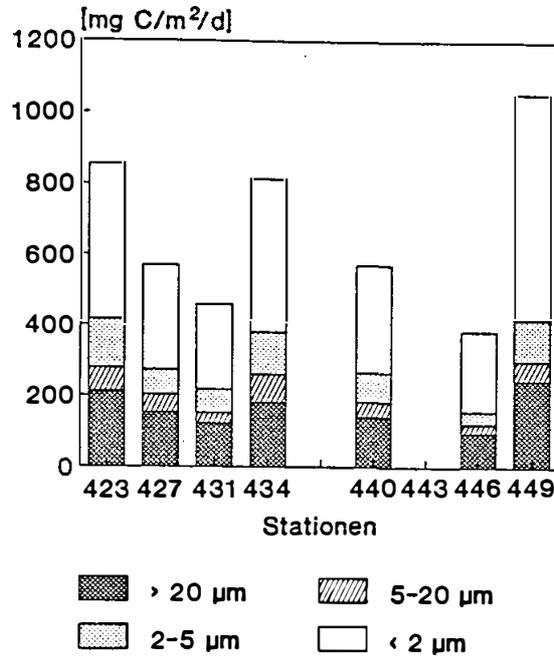


Abbildung 3.29: Über die Wassersäule von 25 m integrierte, größenfraktionierte Primärproduktion [$\text{mg C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$] während BAMBI '91 (St. 423 bis 434 = erste Drift, St. 440 bis 449 = zweite Drift)

Tabelle 3.7: Prozentuale Anteile der Größenfraktionen an der über 25 m integrierten Primärproduktion während BAMBI '91, (St. 423 bis 434 = erste Drift, St. 440 bis 449 = zweite Drift)

Station	> 20 µm	5-20 µm	2-5 µm	< 2 µm
423	25,0 %	7,7 %	16,0 %	51,3 %
427	26,8 %	9,1 %	12,5 %	52,1 %
431	26,5 %	6,7 %	14,5 %	52,4 %
434	22,2 %	9,8 %	14,6 %	53,4 %
440	24,7 %	7,5 %	14,5 %	53,4 %
446	25,5 %	6,5 %	9,1 %	59,2 %
449	23,3 %	5,2 %	11,2 %	60,4 %

3.5.2.3 Zellkonzentrationen des autotrophen Pico- und Nanoplanktons

Aufgrund der Zytometermessungen und den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten drei autotrophe Populationen innerhalb des Pico- und Nanoplanktons unterschieden werden (Abbildung 3.30). Dabei handelte es sich im Bereich des Picoplanktons hauptsächlich um coccale Cyanobakterien, cf. *Synechococcus* sp. (Fenster 1), und im Bereich des Nanoplanktons vermutlich um Cryptophyceen (Fenster 2) sowie sonstige phototrophe Flagellaten (Fenster 3). Die Signale oberhalb des Fensters 3 stammten von Bruchstücken der fädigen Blaualgen *Aphanizomenon flos-aquae* und *Nodularia spumigena*, welche eine starke Blüte in Form deutlich sichtbarer "patches" bildeten.

Die durchschnittlichen Maße der coccalen Cyanobakterien lagen bei $0,78 \mu\text{m}$ Breite und $2,2 \mu\text{m}$ Länge und die der Flagellaten zwischen $1,6 \mu\text{m}$ Breite und $6,2 \mu\text{m}$ Länge. Coccale Cyanobakterien und Flagellaten wurden durch die gesamte Wassersäule hindurch gefunden, wohingegen die Organismen im Fenster 2 nur in den oberen 35 m vorkamen waren. Bis in eine Tiefe von 10 m lag ein Teil der coccalen Cyanobakterien in Kolonien oder Aggregaten vor. Im Falle der Kolonien handelte es sich um *Microcystis* sp. und *Gloeotheca* sp. Diese Zellen wurden auf den Filtern nicht gezählt, da sie nicht zum coccalen Picoplankton gehören. Zellen innerhalb von Aggregaten (kein koloniales Erscheinungsbild) wurden in die Auswertung aufgenommen. Unterhalb der Tiefe von 10 m lagen nur noch unizelluläre coccale Cyanobakterien vor.

Die Erfassung der quantitativen Verteilung der coccalen Cyanobakterien und der Flagellaten ergab auf allen Stationen gleichartige Tendenzen (Abbildung 3.31 und 3.32, nur mikroskopische Daten), wobei nicht weiter auf die Organismen im Fenster 2 eingegangen werden soll, da ihr Gesamtanteil verschwindend gering war (0 bis 35 m Tiefe: ca. $100 \text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$). Obwohl zytometrisch und mikroskopisch ermittelte Daten auf ähnliche Verteilungsmuster der verschiedenen Populationen schließen lassen (vgl. 3.1.2), werden im folgenden nur mikroskopisch ermittelte Zellkonzentrationen herangezogen, da diese in den oberen 50 m genauer erschienen (s. 3.1.2).

Die phototrophen Flagellaten wiesen Oberflächenkonzentrationen von ca. $1,5\cdot 10^7$ bis $2\cdot 10^7 \text{ Zellen}\cdot\text{l}^{-1}$ auf. Während der ersten Drift erfolgte ein Abfall der Konzentration mit der Tiefe bis auf 25 m, wo entweder eine Zunahme bis auf 35 m Tiefe (Stationen 423, 427 und 434) oder konstante Zellzahlen (Station 431) festzustellen waren. Während der zweiten Drift entwickelte sich das Abundanzmaximum in 35 m Tiefe weiter (Stationen 440 und 443), um dann auf den letzten beiden Stationen auf 15 m Tiefe anzusteigen. Zwischen 35 und 60 m Tiefe fiel die Flagellatenkonzentration bis auf weniger als $0,05\cdot 10^7 \text{ Zellen}\cdot\text{l}^{-1}$ ab, stagnierte im Tiefenbereich von 60 bis 100 m und stieg anschließend in Korrelation mit den anaeroben

im Tiefenbereich von 60 bis 100 m und stieg anschließend in Korrelation mit den anaeroben Bedingungen wieder auf durchschnittlich $0,1 \cdot 10^7$ bis $0,7 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$ an, was einem Wert von bis zu 50 Prozent der Oberflächenabundanz entsprach.

Eine ähnliche Verteilung zeigten auch die coccalen Cyanobakterien, wobei die Zellkonzentrationen an der Oberfläche zwischen $35 \cdot 10^7$ und $46 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$ lagen (Ausnahme: Station 423), also um den Faktor 10 höher als die der Flagellaten. Innerhalb der euphotischen Zone erfolgte ein Abfall der Konzentrationen auf $2,1 \cdot 10^7$ bis $6,6 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$, allerdings ebenfalls wie bei den Flagellaten unter Ausbildung eines zweiten Maximums in einer Tiefe von 35 m. Unterhalb dieser Tiefe nahm die Konzentration weiter ab und erreichte meist in 100 bis 120 m Tiefe ihr Minimum mit $0,08 \cdot 10^7$ bis $0,3 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$. Wie im Fall der Flagellaten war hier ein Anstieg der Zellabundanzen coccaler Cyanobakterien unterhalb der Chemokline im anaeroben Bereich festzustellen. Es wurden Konzentrationen von $0,44 \cdot 10^7$ bis $0,86 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$ ermittelt, was aber nur 1 bis 2 Prozent der Oberflächenwerte entsprach.

Die Bakterienverteilung nahm mit der Tiefe im allgemeinen einen ähnlichen Verlauf, nur waren Ab- und Zunahmen nicht so ausgeprägt und die Konzentrationen im Vergleich zu den Flagellaten um den Faktor 1000 und im Vergleich zu den coccalen Cyanobakterien um den Faktor 100 höher.

Coccale Cyanobakterien und autotrophes Nanoplankton zeigten bezüglich der zeitlichen Entwicklung innerhalb der oberen 35 m verschiedene Trends. Während der ersten Drift nahmen die Oberflächenkonzentrationen der coccalen Cyanobakterien von $7,5 \cdot 10^7$ auf $35 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ zu. Während der zweiten Drift lagen die Konzentrationen im entsprechenden Tiefenbereich zwischen $38 \cdot 10^7$ und $46 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$. Die Konzentrationen des autotrophen Nanoplanktons nahmen über den gesamten Zeitraum ab. Während der ersten Drift schwankten die Konzentrationen zwischen $1,5 \cdot 10^7$ und $2 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ und nahmen dann während der zweiten Drift von $1,3 \cdot 10^7$ auf $0,9 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ ab.

Eine merkliche Veränderung der Bakterienkonzentrationen über die Zeit konnte nicht beobachtet werden.

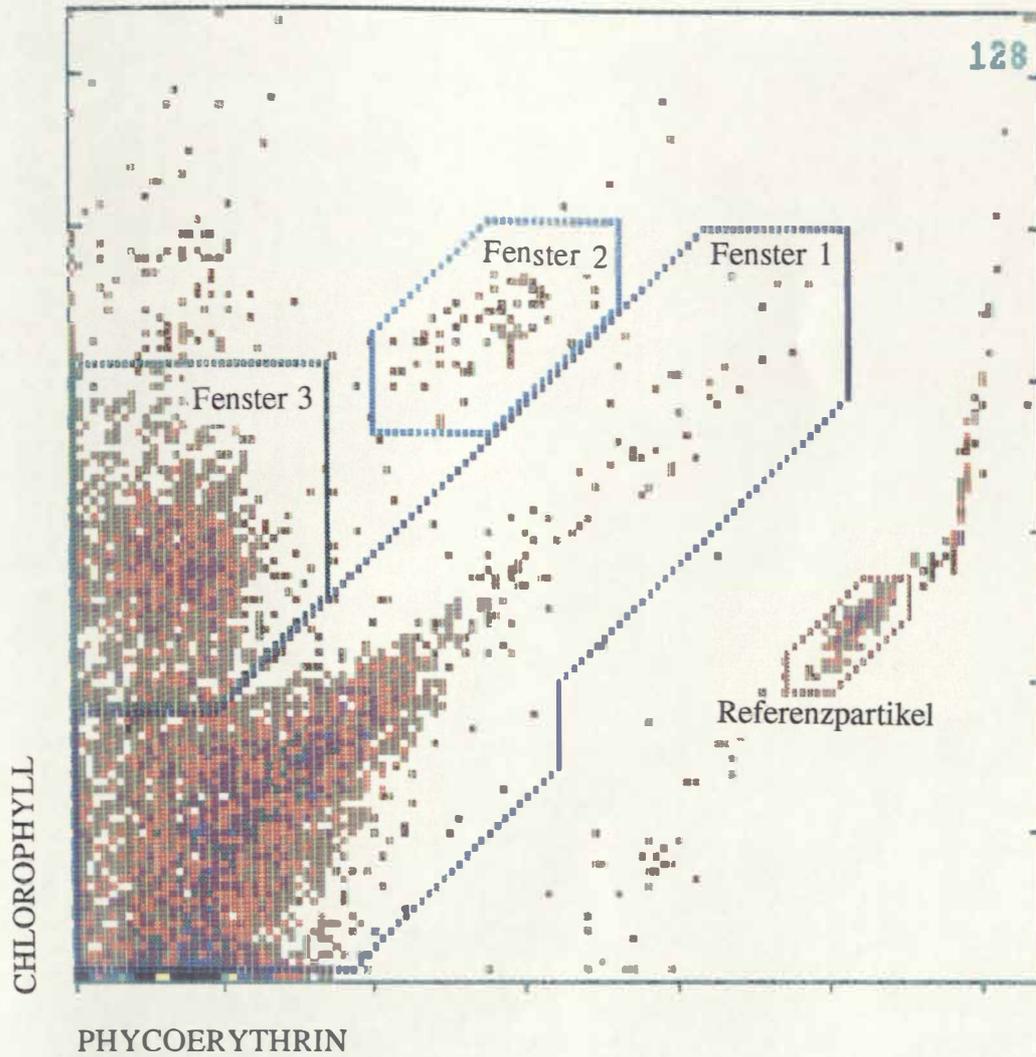
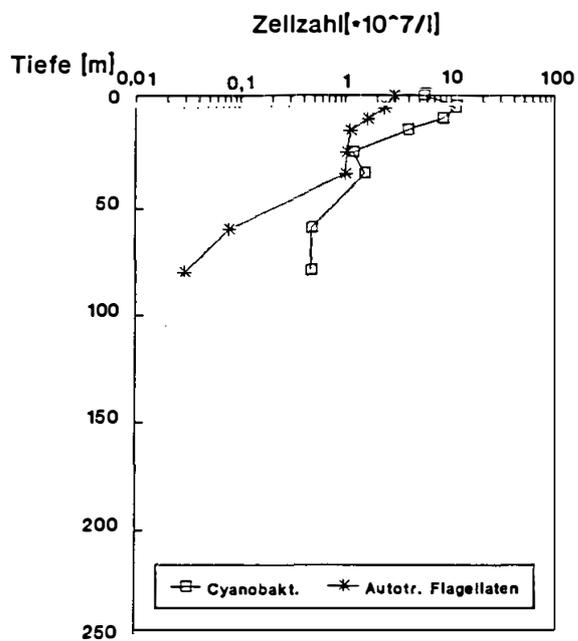
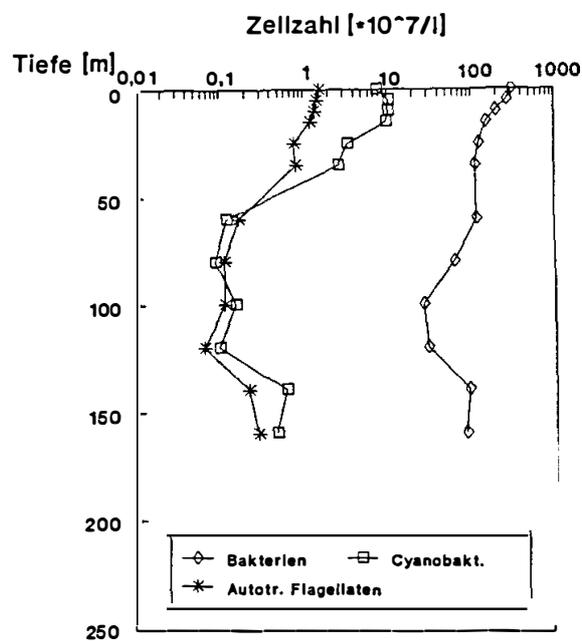


Abbildung 3.30: Zytometrische Darstellung (Drei-Dekaden-Logarithmus) des während BAMBI '91 aufgenommenen Bestandes des autotrophen Pico- und Nanoplanktons, Probe aus 5 m Tiefe, St. 449

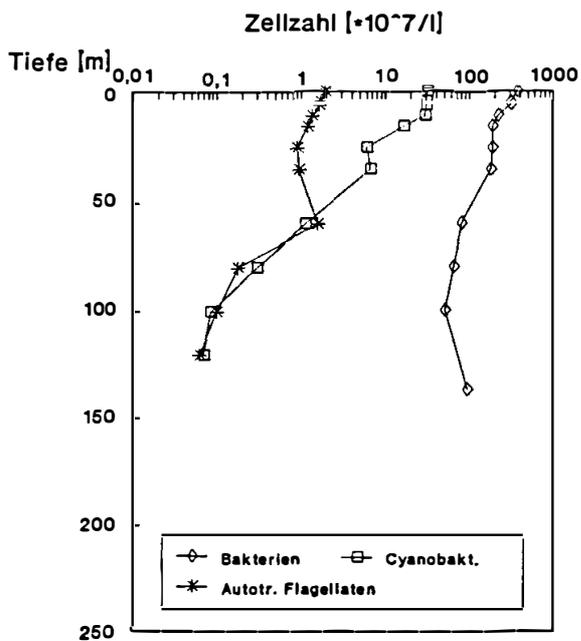
Zellzahlen
BAMBI '91, St. 423



Zellzahlen
BAMBI '91, St. 427



Zellzahlen
BAMBI '91, St. 431



Zellzahlen
BAMBI '91, St.434/435

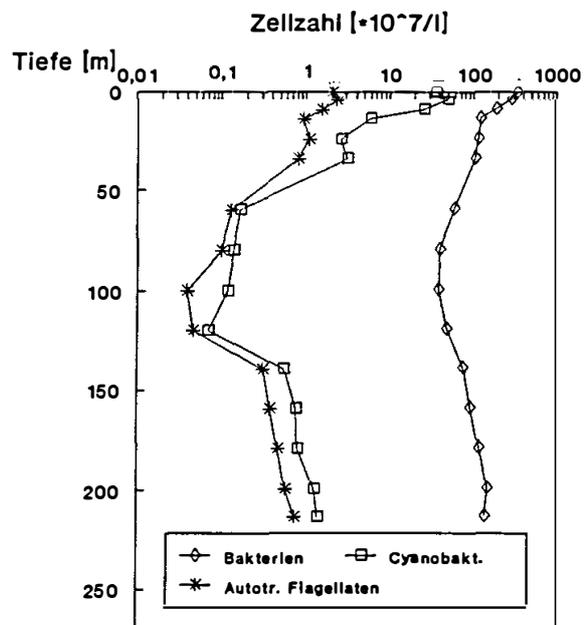
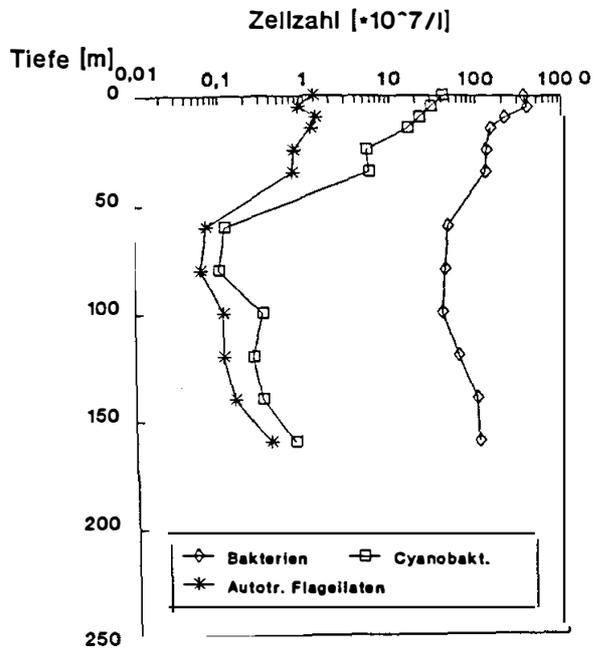
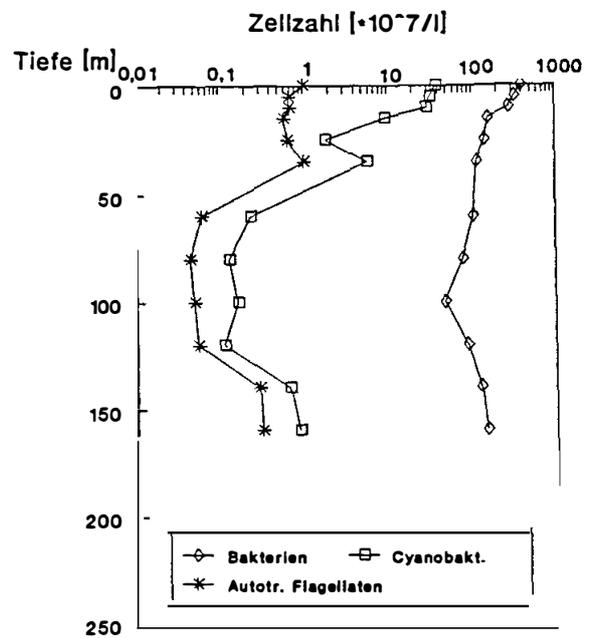


Abbildung 3.31: Vertikalprofile des autotrophen Pico- und Nanoplanktons und der Bakterien während der ersten Drift von BAMBI '91

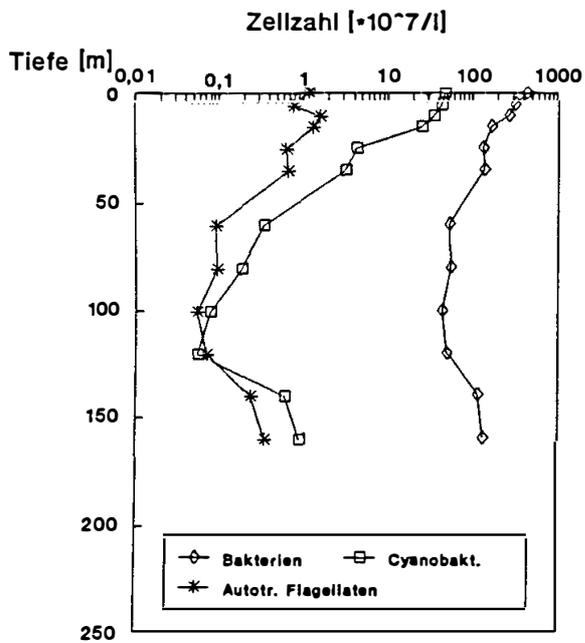
Zellzahlen
BAMBI '91, St. 440



Zellzahlen
BAMBI '91, St. 443



Zellzahlen
BAMBI '91, St. 446



Zellzahlen
BAMBI '91, St. 449/450

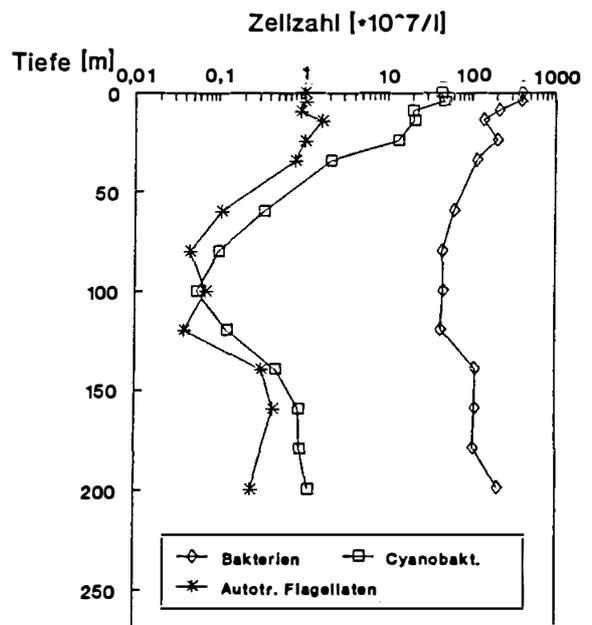


Abbildung 3.32: Vertikalprofile des autotrophen Pico- und Nanoplanktons und der Bakterien während der zweiten Drift von BAMBI '91

3.5.2.4 Fluoreszenzeigenschaften des autotrophen Pico- und Nanoplanktons

Die relative Chlorophyll- bzw. Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle unterlag sowohl bei den coccalen Cyanobakterien als auch bei den autotrophen Zellen des Nanoplanktons einer Veränderung mit der Tiefe (Abbildung 3.33).

Die coccalen Cyanobakterien wiesen bezüglich der Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle ein Oberflächenmaximum auf. Mit der Tiefe nahmen die entsprechenden Werte um *ca.* 80 Prozent ab und in 25 m Tiefe konnte ein zweites, allerdings schwächer ausgeprägtes Maximum beobachtet werden. Hier lag die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle um *ca.* 50 Prozent niedriger als an der Oberfläche. Danach fielen die Werte ab, ein leichter Anstieg wurde zwischen 100 und 150 m Tiefe registriert.

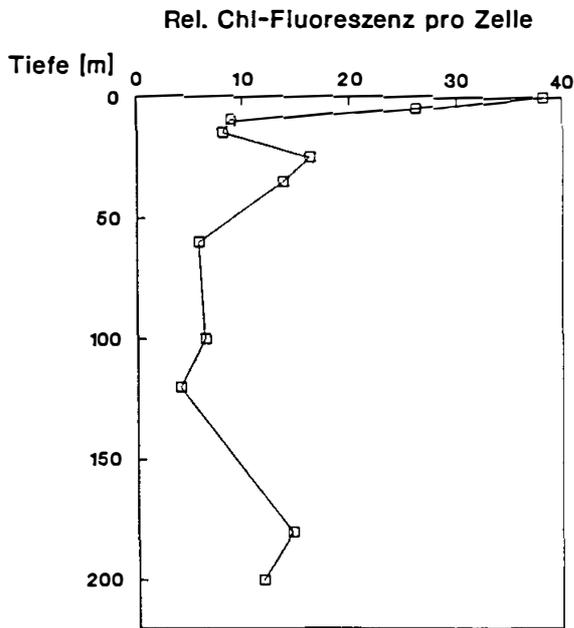
Die Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle unterlag hingegen nicht so großen Schwankungen. Gleich stark ausgeprägte Maxima lagen in 5 und 15 m Tiefe, danach erfolgte ein Abfall unter den Oberflächenwert. Zwischen 100 und 150 m Tiefe war ebenfalls ein Anstieg der Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle zu beobachten, wobei Oberflächenwerte erreicht wurden.

Bei den autotrophen Zellen des Nanoplanktons verlief die Vertikalverteilung der Chlorophyll- und Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle parallel. Nach Oberflächenmaxima nahmen die Werte bis auf ein Minimum in 25 bis 35 m Tiefe ab. Dabei lag dort die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle um *ca.* 60 Prozent niedriger. In 60 m Tiefe erreichten beide Werte ein sekundäres Maximum. Hier lag die Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle um *ca.* 10 Prozent niedriger als der Oberflächenwert. Der entsprechende Wert für die Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle war um *ca.* 60 Prozent niedriger. Unterhalb von 60 m Tiefe fielen die Werte ab. Zwischen 100 und 150 m Tiefe erfolgte erneut ein leichter Anstieg.

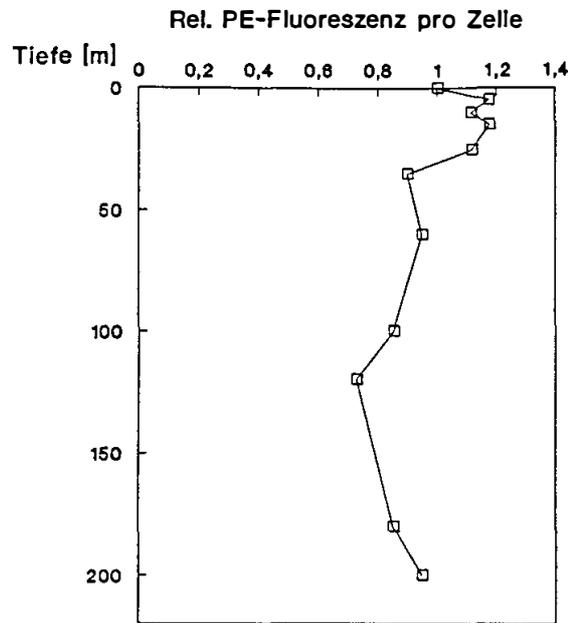
Grundsätzlich unterschieden sich die beiden Populationen also in der Lage des zweiten Maximums und in der Größe der relativen Chlorophyllfluoreszenz pro Zelle. Letztere lag bei den eukaryontischen, autotrophen Zellen um das drei- bis fünffache pro Zelle höher als bei den coccalen Cyanobakterien. Die relative Phycoerythrinfluoreszenz pro Zelle lag im Gegensatz dazu im ähnlichen Größenbereich.

Die niedrigen Werte der relativen Fluoreszenz pro Zelle zwischen 100 und 120 m Tiefe konnten auch auf den Filtern unter dem Epifluoreszenzmikroskop nachvollzogen werden. Hier zeigte sich im mikroskopischen Bild eine äußerst schwache Autofluoreszenz, wobei die coccalen Cyanobakterien oftmals leicht grünlich erschienen.

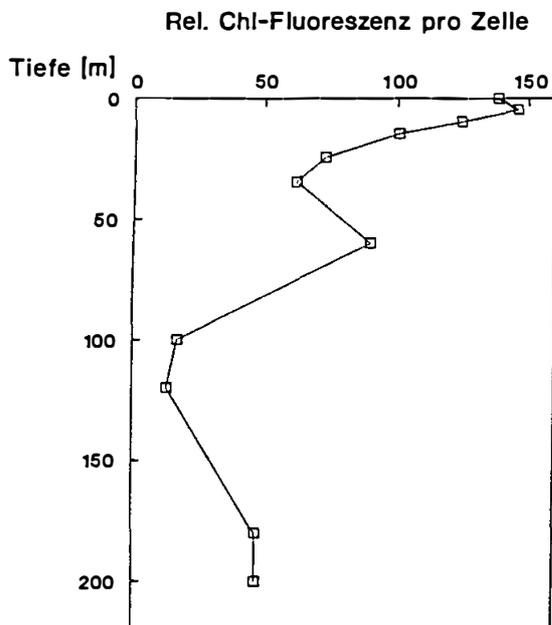
Chlorophyllmaxima
Coccale Cyanobakt., BAMBI '91



Phycoerythrinmaxima
Coccale Cyanobakt., BAMBI '91



Chlorophyllmaxima
Flagellaten, BAMBI '91



Phycoerythrinmaxima
Flagellaten, BAMBI '91

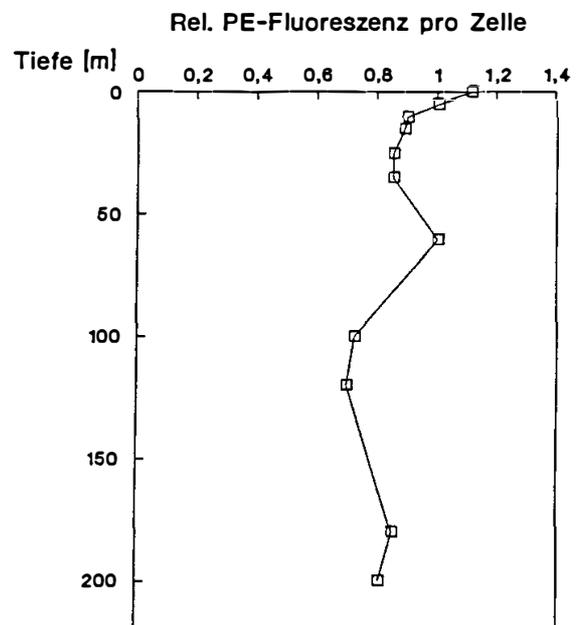


Abbildung 3.33: Vertikalprofil der durchschnittlichen zellulären Chlorophyll- und Phycoerythrinfluoreszenz coccaler Cyanobakterien und Flagellaten während BAMBI '91 am Beispiel der Stationen 449 und 450; dargestellt sind die Werte der Verteilungmaxima

4 DISKUSSION

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Fraktionierung und Filter

Die Diskussion über die Problematik der Fraktionierung wird immer wieder aufgegriffen und zeigt, daß die entsprechenden Ergebnisse einer Fehlerbetrachtung unterzogen werden müssen (SHELDON u. SUTCLIFFE, 1969; SHELDON, 1972; McCARTHY *et al.*, 1974; BERMAN, 1975; TAKAHASHI u. HORI, 1984; ELSER *et al.*, 1986; HILMER u. BATE; 1989).

Zur Fraktionierung werden Netze aus Gaze verschiedener Maschenweite und Filter verschiedener Materialien und unterschiedlicher Porengröße benutzt. Netze trennen zwei Größenfraktionen voneinander und Filter dienen der Entfernung von Partikeln aus einer Lösung (SHELDON, 1972). Die Maschenweite eines Netzes ist ein gutes Maß für die abzutrennende Fraktion (SHELDON u. SUTCLIFFE, 1969), doch zeigte sich während BAMBI '91 bei der Verwendung einer 20 μm Netzgaze, daß das Filtrat viele Bruchstücke fädiger Blaualgen enthielt. Auch SCHARENBERG (1991) bemerkte unter ähnlichen Bedingungen, daß *ca.* 20 Prozent der über 100 μm langen Blaualgenfäden eine 100 μm Netzgaze passieren konnten. Diese Fäden, deren Zelldurchmesser nur wenige μm ausmacht, gelangen also z.T. der Länge nach durch die Maschen. Somit ist anzunehmen, daß die während BAMBI '91 über eine 20 μm Netzgaze vorfiltrierten Proben noch kurze Bruchstücke der Blaualgenfäden enthielten. Dies muß zu einer Überschätzung der Fraktion 5-20 μm führen. Die Fraktionen 2-5 μm und $< 2 \mu\text{m}$ sind davon nicht betroffen, da diese Fraktionen durch die Filtration über Nuclepore-Filter mit Porengrößen von 5,0 μm und 2,0 μm gewonnen wurden und die Blaualgenbruchstücke auf diesen Filtern zurückgehalten wurden. Hier allerdings könnten diese Bruchstücke zur Verstopfung der Filterporen geführt haben, was wiederum Partikel, die eigentlich den Filter passiert haben müßten, auf dem Filter zurückhielt. Das hätte eine Unterschätzung der Fraktionen 2-5 μm und $< 2 \mu\text{m}$ zur Folge. Es werden sogar generell Partikel, die kleiner sind als die Porengröße des verwendeten Filters, auf diesem zurückgehalten (SHELDON u. SUTCLIFFE, 1969). Nuclepore-Filter neigen besonders zur Überladung (SHELDON, 1972) und der Grad der Verstopfung wird mit zunehmender Partikelkonzentration bzw. zunehmendem Probenvolumen immer stärker (TAKAHASHI u. HORI, 1984; JOCHEM, 1987). Außerdem ist zu bedenken, daß Zellen ohne starre Zellwand durch Poren fallen können,

deren Durchmesser kleiner ist als sie selbst (TAKAHASHI u. HORI, 1984; JOCHEM, 1987).

Aus dieser Diskussion sind für die Ergebnisse dieser Arbeit mehrere Folgerungen abzuleiten und bei der Interpretation entsprechend zu berücksichtigen:

- 1.) Bezüglich der Parameter Chlorophyll und Primärproduktion ist eine Überschätzung der Fraktion 5-20 μm anzunehmen.
- 2.) Die Fraktionen 2-5 μm und $< 2 \mu\text{m}$ wurden wahrscheinlich aufgrund der Verstopfung der Nuclepore-Filter durch Bruchstücke von Blaualgenfäden unterschätzt.
- 3.) Für den Fall, daß Zellen mit flexibler Körperform durch Filter fielen, deren Porengröße kleiner war als diese Zellen, wäre es zu einer Überschätzung der Fraktionen 2-5 μm und $< 2 \mu\text{m}$ gekommen.
- 4.) Aus den Punkten 2.) und 3.) ergibt sich der Anschein gegenläufiger Effekte und die ungeklärte Frage, welcher der beiden Effekte überwiegt oder ob sich diese sogar neutralisieren (ELSER *et al.*, 1986).
- 5.) Absolutwerte der beiden Parameter Chlorophyll und Primärproduktion sind mit einem gewissen Fehler behaftet und deshalb sollte die Gewichtung der Interpretation auf relativen Verhältnissen der Fraktionen zueinander liegen.

4.1.2 Chlorophyllbestimmung

Bei der Bestimmung von Chlorophyll mittels Fluorometrie wird vorausgesetzt, daß die gemessene Fluoreszenz verschiedener Proben nur auf Chlorophyll *a* zurückzuführen ist (LI, 1986). Dagegen fanden GIESKES u. KRAAY (1983) bei einem methodischen Vergleich zwischen Fluorometrie und HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie), daß sich bei der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes durch die Fluorometrie Überschätzungen (z.T. bis zu 40 Prozent) ergaben und diese Diskrepanz in tropischen Gewässern weiter zunahm. Die Autoren führten diese Überschätzung auf ein bis dahin unidentifiziertes Chlorophyll *a*-Derivat zurück, welches besonders in Fraktionen $< 1 \mu\text{m}$ auftrat und heute als den Prochlorophyten zugehörig bekannt ist (CHISHOLM *et al.*, 1988; VELDHUIS u. KRAAY, 1990). GUILLARD *et al.* (1985) postulierten als Ursache der unbekanntes Fluoreszenz

Zeaxanthin, ein für *Synechococcus* sp. typisches Pigment. Eine weitere Fehlerquelle der fluorometrischen Chlorophyllbestimmung könnte Chlorophyll *b* darstellen, doch konnte LORENZEN (1981) zeigen, daß das Verhältnis von Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *b* meistens so groß ist, daß der aus Chlorophyll *b* resultierende Fehler weniger als fünf Prozent beträgt und damit vernachlässigt werden kann.

Somit muß also davon ausgegangen werden, daß die Fluoreszenz innerhalb verschiedener Größenfraktionen unterschiedliche Ursachen haben kann und eine Vergleichbarkeit der entsprechenden Ergebnisse nicht immer gegeben ist. Innerhalb des Picoplanktons muß aufgrund dieser Befunde generell mit Überschätzungen gerechnet werden, da hier besonders *Synechococcus* sp. dominiert.

4.1.3 Bestimmung der Primärproduktion

Die methodische Problematik bei der Bestimmung der Primärproduktion besteht unter anderem in der Filtration der Zellen vor (pre-screening) oder nach (post-screening) der Inkubation.

McCARTHY *et al.* (1974) verglichen Ergebnisse der Primärproduktionsmessungen von vor und nach der Inkubation filtrierten Proben und kamen zu dem Schluß, daß eine Filtration vor der Inkubation gerade für Nanoplankton aufgrund des Grazingeffektes vorzuziehen sei. Als Alternative schlugen die Autoren vor, die Probe über ein GazeNetz vorzufiltrieren, um den größten Teil des herbivoren Zooplanktons zu entfernen. Als weiteren Nachteil des post-screenings wird der Verlust von ^{14}C durch Filtrationsstreß angeführt. Danach können die Zellen platzen und freiwerdendes ^{14}C kann durch den Filter laufen. Weiterhin zeigten WATERBURY *et al.* (1986) eine Überschätzung der *Synechococcus*-Produktion durch post-screening, so daß diese Organismen z.T. bis zu 100 Prozent der Gesamtprimärproduktion ausmachten. Dies führten die Autoren hauptsächlich auf größere Zellen zurück, die während der Fraktionierung zerstört wurden und deren Bruchstücke so in kleinere Fraktionen gelangen konnten. Dagegen muß angeführt werden, daß bei einer Filtration vor der Inkubation die Zellen ebenfalls platzen können und so ein bestimmter Anteil an ^{14}C gar nicht erst aufgenommen wird. Letzteres Verfahren minimiert zudem den physiologischen Streß der Zellen während der Inkubation (ITURRIAGA u. MITCHELL, 1986). Eine zwischen diesen beiden Methoden ebenfalls vergleichende Untersuchung führten TAKAHASHI u. BIENFANG (1983) durch. Die Autoren erhielten bei einer Filtration vor der Inkubation für die Fraktionen $< 3 \mu\text{m}$ und $20-40 \mu\text{m}$ um sechs Prozent höhere Anteile an der Gesamtproduktion als bei einer Filtration nach der Inkubation. Für die Fraktion 3-

20 μm lag das Verhältnis andersherum. Dieser Unterschied beeinflusste aber in keiner Weise die relativen Anteile der Fraktionen an der Gesamtproduktion.

Aufgrund dieser Aussagen und der Annahme, daß ein pre-screening das mikrobielle Nahrungssystem auseinanderreißt und somit einen signifikanten Eingriff darstellt (JOCHEM, 1989), wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit sämtliche Proben nach der Inkubation filtriert.

4.1.4 Bestimmung der Zellabundanz mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Auch die Bestimmung der Zellabundanz des autotrophen Pico- und Nanoplanktons mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie kann durch verschiedenartige methodische Probleme beeinflusst sein.

Für die Präparation und die Färbung der Proben sollten sogenannte Oberflächenfilter, z.B. Nuclepore-Filter, verwendet werden. Auf diesen Filtern versinken die Zellen nicht innerhalb der Poren, sondern bleiben auf der Oberfläche liegen und werden so nicht übersehen (GOLDBERG, 1952). Die Benutzung von Nuclepore-Filtern mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm hat sich dabei allgemein durchgesetzt (HOBBIE *et al.*, 1977; HAAS, 1982; CARON, 1983; GALVAO, 1990; MARTINUSSEN u. THINGSTAD, 1991). Ein weiteres Problem stellt die Art der Fixierung dar. Eine Fixierung der Probe vor Filtration und Färbung ist unerlässlich, um Flagellaten durch die weitere Präparation nicht zu zerstören (HEWES *et al.*, 1984; R. GRADINGER, pers. Mitteilung, AWI-Bremerhaven). Wenn auch über die Notwendigkeit der Fixierung als solcher kein Zweifel besteht, so muß die Art der Fixierung weiterhin diskutiert werden. Zum einen konnte HEWES *et al.* (1984) nachweisen, daß eine Fixierung von Flagellaten mit Glutaraldehyd höhere Zellzahlen zur Folge hat als solche mit Formaldehyd. Dabei nahm er die Ergebnisse der Glutaraldehydfixierung als richtig an, da sie gut mit Ergebnissen einer vergleichenden Coulterzählung übereinstimmten. Die Fixierung mit Glutaraldehyd soll zudem den Fluoreszenzverlust der Zellen herabsetzen (CRUMPTON, 1987).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine Fixierung mit Formaldehyd vorgezogen, da TSUJI u. YANAGITA (1981) zeigen konnten, daß weder die Benutzung von Glutaraldehyd noch von Formaldehyd starke Autofluoreszenzverluste zur Folge haben. Der Verlust soll nach zweimonatiger Aufbewahrung der Proben im gefrorenen Zustand nur zehn Prozent ausmachen, und die Autoren gehen von einer maximalen Lagerungszeit von sechs Monaten aus. Im Gegensatz zu dieser Meinung entstand bei der Auswertung der BAMBI-Filter der Eindruck zurückgehender Autofluoreszenz innerhalb von vier Wochen,

was die Zytometermessungen von fixierten Proben (vgl. 3.1.2) bestätigten. Die für diese Messungen verwendeten Proben wurden allerdings auch nicht im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Glutaraldehyd führt außerdem zu einem Schrumpfen der Zellen um *ca.* 30 Prozent innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Fixierung (BØRSHEIM u. BRATBAK, 1987), so daß ein richtiges Ausmessen der Zellen schwierig ist.

Weiterhin spielt die Stärke der Vorfärbung bzw. die Schwärzung der Filter mit Irgalanschwarz eine ausschlaggebende Rolle bei der Auswertung der Filter. Dabei schwanken die Angaben über die Färbedauer zwischen 5 Minuten (WATSON *et al.*, 1977) und 2 bis 24 Stunden (HOBBIE *et al.*, 1977). Eine längere Färbedauer von durchschnittlich 24 Stunden erwies sich als besonders gut und auf den entsprechenden Filtern war eine störende Hintergrundfluoreszenz nicht mehr zu beobachten. Im Vergleich dazu wurden zu Beginn der Arbeit auch fertig vorgefärbte Filter benutzt, doch war bei diesen Filtern immer eine gewisse Hintergrundfluoreszenz festzustellen und deren Verwendung wurde daraufhin eingestellt.

Der Vorteil von Färbungen liegt in der Tatsache, daß angefärbte Zellen lange auf den Filtern sichtbar bleiben und besser voneinander unterschieden werden können. Im Fall von Proflavin allerdings gibt CARON (1983) zu bedenken, daß dieses Fluorochrom auch Detritus anfärbt und so bei der Auswertung Komplikationen auftreten können. Außerdem zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit, daß es bei großen Probenvolumina, die mit entsprechend großen Mengen Proflavin angefärbt wurden, leicht zu einer Überfärbung von Organismen kam. Als Folge davon konnten viele Zellen nicht mehr voneinander unterschieden werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls bestätigt werden, daß mit Proflavin angefärbte Bakterien innerhalb weniger Sekunden nach Beleuchtung ausbleichen. Zählungen so angefärbter Bakterien ergaben immer geringere Ergebnisse als die der mit DAPI angefärbten Bakterien. Mit Proflavin angefärbte, autotrophe Zellen konnten jedoch mehrere Minuten beleuchtet werden, ohne zu verblassen, so daß sie vermessen werden konnten.

Abschließend kann festgestellt werden, daß sich die Anfärbung von Bakterien mit DAPI als gut erwies und Proflavin sich besonders zur Anfärbung kleinerer Mengen Phytoplankton eignete. Bei großen Probenvolumina ist allerdings die Herstellung von Autofluoreszenzfiltern und Parallelfiltern mit Proflavinanfärbung angebracht, um Größe und Morphologie der Organismen richtig erfassen zu können.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Zytometrie

4.2.1.1 Vergleich der Methoden Zytometrie und Mikroskopie

Der methodische Vergleich zwischen Zytometrie und Mikroskopie erbrachte je nach Art der untersuchten Proben eine bessere bzw. schlechtere Übereinstimmung der entsprechenden Daten. Auffällig war die allgemein gute Übereinstimmung bei Kulturexperimenten, wobei die Datensätze, die bei der Aufnahme der Wachstumskurven (s. 3.1.1) entstanden, Ausnahmen darstellen. In diesem Fall kann allerdings die Benutzung drei verschiedener Zytometer innerhalb des Versuchzeitraumes als eine der Ursachen angenommen werden. Eine größere Bedeutung für die schlechte Übereinstimmung der Daten hatte aber wahrscheinlich die Konzentrationsbestimmung über Referenzpartikel als interne Standards nach OLSON *et al.* (1985). Hier zeigten sich verschiedene Schwierigkeiten. Die Referenzpartikel neigten innerhalb der Lösung dazu, aus der Suspension auszufallen, und so mußte die Lösung vor jeder Entnahme aufgeschüttelt werden. Bei ungleichmäßiger Resuspendierung konnte es zur Entnahme ungleicher Mengen an Referenzpartikeln kommen. Daraus ergaben sich Schwankungen der Referenzpartikelkonzentration in den Proben und somit Schwankungen der daraus berechneten Probenkonzentrationen. Ein zusätzliches Problem ergab sich bei der Auswertung der Messung auf dem Computerbildschirm. Trotz Vorbehandlung jeder Probe inklusive der Referenzpartikel mit Ultraschall liegen nie alle Partikel einzeln in der Lösung vor. So tritt also immer ein Teil der Referenzpartikel in Form von Klumpen mit zwei, drei, vier und mehr Partikeln auf. Unter diesen Bedingungen werden die Referenzpartikel im Koordinatensystem der Meßaufzeichnung nicht nur an einer bestimmten Stelle, sondern an mehreren Stellen aufgezeichnet. Je mehr Partikel in einem Klumpen zusammenhängen, um so größer ist der Klumpen und die von ihm emittierte Fluoreszenz und desto höher und weiter rechts liegt ein von ihm erhaltener Meßpunkt in einem 2-Parameter-Koordinatensystem. Somit werden auf dem Bildschirm mehrere Meßwolken für die Referenzpartikel aufgezeichnet (s. Abbildung 3.30). Zur korrekten Bestimmung der Anzahl der gemessenen Referenzpartikel muß um jede dieser Meßwolken ein Fenster gelegt werden und die darin befindlichen Meßpunkte müssen einzeln summiert und mit einem Faktor, der den Grad der Verklumpung darstellt (bei einem Klumpen mit zwei Partikeln: Faktor 2), multipliziert werden. Es ist relativ einfach, einzeln und doppelt vorliegende Referenzpartikel voneinander zu unterscheiden, aber je mehr Partikel einen Klumpen ausmachen, um so schwerer ist ihre Trennung auf dem

Bildschirm und die Bestimmung des ihnen zugrundeliegenden Verklumpungsgrads. Diese Problematik hat zwangsläufig eine Unterschätzung der Referenzpartikelkonzentration in der Probe zur Folge und resultiert somit in einer Fehlbestimmung des gemessenen Probenvolumens und der eigentlichen Probenkonzentration.

Es läßt sich also abschließend feststellen, daß die Methode nach OLSON *et al.* (1985) Fehlern unterliegen muß, was die hier auf diese Weise ermittelten Ergebnisse durch ihre Ungenauigkeit bestätigen.

Mit dem Injektionsmotor des FLUVO II hingegen ist es ohne umständliche Berechnungen möglich, direkt definierte Volumina zu messen. Mit Begrenzung auf 250 μl als größtes Volumen werden allerdings oftmals zu wenig Ereignisse erfaßt, wenn die Konzentration in der Probe zu niedrig ist, so z.B. in den Proben aus 60 bis 100 m Tiefe während BAMBI '91, in denen im Durchschnitt nur 100 bis 1000 Zellen·ml⁻¹ vorlagen. Außerdem dehnt sich die Meßzeit bei einem Volumen von 250 μl auf 15 Minuten aus, was aber im Vergleich zu der Zeit, die für die Präparation und Auswertung eines Filters zur Mikroskopie benötigt wird, immer noch relativ schnell ist.

Die aus der Benutzung des Motors resultierende bessere Übereinstimmung der Methoden Zytometrie und Mikroskopie zeigte sich in den Kulturexperimenten (vgl. 3.1.1, Versuch I).

Im Gegensatz zu der guten Übereinstimmung der zytometrisch und mikroskopisch aufgestellten Datensätze bei Kulturen stand die weniger gute Übereinstimmung der Freilanddaten (s. 3.1.2).

Die in den oberen 50 m während BAMBI '91 besonders auffällige Diskrepanz im Falle der coccalen Cyanobakterien ist einfach zu erklären. In diesem Bereich der Wassersäule lagen vorwiegend koloniale oder anderweitig aggregierte coccale Cyanobakterien vor. Ein Aggregat von z.B. vier Zellen wird im Zytometer als ein Meßereignis registriert, die mikroskopische Untersuchung dagegen erbringt vier einzelne Zellen. Daraus resultiert konsequenterweise eine Unterschätzung der Konzentration durch das Zytometer. Unterhalb von 50 m Tiefe stimmten die Daten besser überein, da dort alle coccalen Cyanobakterien unizellulär vorlagen. Diese Ergebnisse entsprechen denen von OLSON *et al.* (1985), wobei die Autoren allerdings auf einen Erklärungsansatz verzichten.

Im Fall des autotrophen Nanoplanktons ergaben sich solche Probleme nicht, da zu dieser Größenfraktion hauptsächlich Flagellaten zählten und diese einzeln vorlagen. Hier wurde eine starke Korrelation zytometrisch und mikroskopisch ermittelter Daten erzielt.

Weitere Vergleiche der Methoden Zytometrie und Mikroskopie sind selten und liefern z.T. unterschiedliche Ergebnisse. LI u. WOOD (1988) fanden in einer Untersuchung bei

Freilandproben eine starke Korrelation der Daten für coccale Cyanobakterien ($r = 0,97$) und eine moderate Korrelation für kleine eukaryontische, autotrophe Zellen ($r = 0,68$). Dabei muß beachtet werden, daß es sich bei diesen Korrelationskoeffizienten um Werte aus einer logarithmischen Transformation handelt. Eine solche Transformation ergibt erfahrungsgemäß bessere Werte als eine Berechnung, die auf linearen Werten beruht. Im Falle der eukaryontischen Zellen lagen die Zytometerergebnisse über denen der Mikroskopie. Hier gehen die Autoren davon aus, daß die mikroskopischen Zählungen fehlerhaft waren. Dies könnte durchaus der Fall gewesen sein, da sie bei den mikroskopischen Untersuchungen zwei Chloroplasten identischer Form, Größe und Fluoreszenz als eine Zelle zählten, wenn die Chloroplasten benachbart zueinander lagen. Es erfolgte jedoch keine Absicherung, ob dieses Vorgehen korrekt war. Diese Problematik wurde während BAMBI '91 durch die Parallelfiter mit Proflavinfärbung umgangen. YUNEV *et al.* (1990) erhielten bei einem Methodenvergleich für Kulturen gute Übereinstimmungen von zytometrisch und mikroskopisch ermittelten Daten. Bei der Messung von Freilandproben ergaben sich jedoch höhere Zellabundanz durch zytometrische Messungen sowie eine durchschnittliche Diskrepanz der Methoden von fünf Prozent. Eine Erklärung für diese Abweichungen wurde von den Autoren allerdings nicht gegeben. Eventuell war das von ihnen gemessene Probenvolumen von $10 \mu\text{l}$ zu klein, allerdings ist bei der angegebenen Standardabweichung von 1 Prozent für wiederholte Messungen deren Richtigkeit anzunehmen. Gute Übereinstimmung der beiden Methoden für Freilandproben fanden BØRSHEIM *et al.* (1989) während der Untersuchung einer *Chrysochromulina*-Blüte, was den Ergebnissen hinsichtlich der Flagellaten in der hier vorgestellten Arbeit entspricht. Die Übereinstimmung wurde schlechter gegen Ende der Blüte, was die Autoren auf den schlechteren physiologischen Zustand und den Zerfall der Zellen zurückführten. Allerdings gaben die Autoren kein Maß für die Korrelation der Daten an, so daß ein Vergleich mit anderen Ergebnissen nicht möglich ist.

Bei einem Überblick über die bisher aufgeführten Untersuchungen und der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bleibt die Frage, warum die Übereinstimmung zytometrischer und mikroskopischer Daten bei Freilanduntersuchungen generell schlechter ist als bei Kulturuntersuchungen. Zur Beantwortung bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Zum einen muß in Freilandproben zusätzlich mit chlorophyllhaltigen und folglich fluoreszierenden Detrituspartikeln gerechnet werden (LI u. WOOD, 1988; YENTSCH u. CAMPBELL, 1991), die von den Zellen nicht immer unterschieden werden und erhöhte Zellzahlen verursachen können. Zum zweiten stellte sich innerhalb der hier vorliegenden Arbeit heraus, daß die Messung eines heterogenen Systems (Freiland) schwieriger ist als die einer homogenen Lösung (Kultur). Während BAMBI '91 führten z.B. Bruchstücke von

Blualgenfäden immer wieder zu Meßstörungen (z.B. durch kurzfristiges Verstopfen des Meßlochs) und somit zu Verfälschungen der Ergebnisse.

Weiterhin ergaben sich vielfältige Schwierigkeiten der Meßdurchführung an Bord von FS Alkor. Durch unruhige See kam es zu mechanischen Vibrationen, die das Gerät auf unterschiedliche Weise beeinflussten. So unterlag unter solchen Bedingungen die Halterung der Quecksilberbogenlampe leichten Vibrationen und der auf das Meßloch gerichtete Lichtstrahl wurde geringfügig nach rechts oder links ausgelenkt. Als Folge wurden nicht alle Partikel innerhalb des Probenstrahls mit der gleich starken Lichtmenge angeregt und wiesen deshalb unterschiedlich starke Emissionen auf. Bei der Meßaufzeichnung auf dem Computerbildschirm führte dieses Phänomen zu stärker streuenden Meßpunkten innerhalb einer Population und zu daraus resultierenden Mißinterpretationen der Messung. Die Vibrationen bei stärkeren Schwankungen des Schiffes können im weiteren auch einen un stetigen Fluß des Probenstrahls und der Mantelflüssigkeit verursachen und eine fast unmerkliche Verstellung der Mikrometerschrauben, mit denen die Meßkammer und damit das Meßloch justiert bzw. zentriert werden, zur Folge haben. Deswegen ist es für die angestrebte Vergleichbarkeit einzelner Messungen unerlässlich, Eichungen mit Referenzpartikeln in regelmäßigen Abständen zu wiederholen. Schwankungen im Stromnetz wirkten sich ebenfalls ungünstig auf die zytometrische Messung aus. Sie verursachten ein Flackern der Lampe und damit die oben beschriebenen Folgen. Außerdem waren sie der Grund für ein unregelmäßiges Arbeiten der Membranpumpe, die dann wiederum die Mantelflüssigkeit ungleichmäßig antrieb.

Einen weiteren mechanischen Angriffspunkt stellt die Meßkammer dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Meßkammern verschiedenartiger Konstruktion bezüglich des Meßlochs benutzt. Das Meßloch ist entweder in eine kleine Saphirplatte eingebohrt, die dann in den Boden der Meßkammer eingeklebt ist, oder befindet sich direkt im Boden der Meßkammer, welcher aus einem bestimmten Kunststoff besteht. Der Vorteil einer "Saphirkammer" ist die genauere Bohrung des Meßlochs und die Möglichkeit, allgemein kleinere Löcher zu bohren. Der Nachteil dieser Konstruktion ist jedoch die Ablösung des Klebstoffes und damit der Saphirplatte vom Boden der Kammer. Die Folge ist eine Undichtigkeit und das Eindringen von Luft in das Meßsystem, die sich dem Fluß des Probenstrahls in Form kleiner, durch das Meßloch aufsteigender Blasen entgegenstellt und damit zu Störungen führt.

4.2.1.2 Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Zytometermessungen

Für die höchstmögliche Genauigkeit quantitativer Messungen des FLUVO II ergaben die hier vorliegenden Ergebnisse einen Probenkonzentrationsbereich von $1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ (vgl. 3.2.1 und 3.2.2). Innerhalb dieses Bereiches kann mit Durchflußraten von 200 bis 300 Zellen·s⁻¹ im Vergleich zu mikroskopischen Daten quantitativ genau gemessen werden. Zudem stellte sich dieser Konzentrationsbereich für die hohe Reproduzierbarkeit aufeinanderfolgender Messungen als optimal heraus. Dieser Bereich größter Übereinstimmung zytometrisch und mikroskopisch ermittelter Daten liegt jedoch höher als der von LEGNER (1990) angegebene Bereich von $< 2,5 \cdot 10^5$ Zellen·ml⁻¹. Allerdings nennt der Autor nicht das für seine Untersuchungen verwendete Zytometer. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte, optimale Konzentrationsbereich für das FLUVO II stimmt gut mit der von vielen Autoren zur Benutzung eines Zytometers angegebenen Minimalkonzentration überein, nämlich 10^5 bis 10^7 Zellen·ml⁻¹ (OLSON, 1985; PHINNEY u. CUCCI, 1989). BURKILL (1987) setzt diesen Bereich mit $5 \cdot 10^4$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ etwas niedriger an.

Die Verdünnungsexperimente (vgl. 3.2.1) ergaben nicht nur Hinweise auf den optimalen Konzentrationsbereich des FLUVO II, sondern zeigten auch, daß bei der Präparation von Filtern für die mikroskopische Zählung ebenfalls ein bestimmter Konzentrationsbereich zu beachten ist. Die Tatsache, daß in den niedrigen Verdünnungsstufen (1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100) durch die Zytometrie eine höhere Endkonzentration ermittelt wurde, zeigt, daß zu dicht auf den Filtern liegende Zellen zu Unterschätzungen führen können. Wahrscheinlich neigt die zählende Person dazu, bei sehr dicht belegten Filtern, Zellen, insbesondere solche mit geringer Fluoreszenz, innerhalb des Meßgitters zu übersehen. Ferner können in einem solchen Fall Zellen auf den Filtern übereinander liegen, was nicht immer zu erkennen ist. Das Zytometer kann also genauer sein, wenn Filter von zu stark konzentrierten Proben hergestellt wurden. Aus den Verdünnungsstufen 1:200 und 1:1000 ergaben sich die höchsten durch die Mikroskopie ermittelten Zellkonzentrationen und Zytometer- und Mikroskopdaten stimmten am besten überein (= optimaler Konzentrationsbereich für das FLUVO II). Allerdings ergab sich bei zu hohen Verdünnungen (1:1000) wiederum eine Abweichung der Ergebnisse. Da bei so stark verdünnten Proben die Zellen auf dem Filter stark streuen, die Zellzahl pro Meßgitter sehr gering ist und meist weniger als 100 Ereignisse gezählt werden (Zählfehler = ± 30 %; VENRICK, 1978), kann es hier auch zu Über- und Unterschätzungen der Konzentration durch die Mikroskopie kommen. Dieses Problem kann durch Filtration entsprechend großer Probenvolumina umgangen werden.

Somit ist der Mikroskopie keine interne Grenze gesetzt. Bei einem Zytometer hingegen ist das meßbare Probenvolumen durch die Meßdauer begrenzt (die Messung von 1 ml Probe dauert durchschnittlich eine Stunde). Der Vorteil der Zytometrie liegt allerdings in dem äußerst geringen statistischen Fehler, da in jeder Messung sehr viel mehr Ereignisse gezählt werden als auf einem Filter.

Weiter geht aus Ergebnissen der Ultraschall- und Detergensversuche (vgl. 3.2.2) hervor, daß der optimalen Konzentrationsbereich von größerer Bedeutung ist als die verschiedenartige Probenvorbehandlung. Die Messung im optimalen Konzentrationsbereich (Experiment III) lieferte genauere Ergebnisse als im ungünstigen Bereich mit zusätzlicher Vorbehandlung der Probe (Experiment IV). Doch löst die Einhaltung des richtigen Konzentrationsbereiches nicht grundsätzlich das Problem der Zellaggregation und der damit verbundenen Unterschätzung durch das Zytometer.

Der bei den unterschiedlichen Behandlungsarten gewünschte Effekt - Auflösung von Zellklumpen und folglich Steigerung der gezählten Ereignisse pro Volumen - war durch Ultraschallbehandlung besser zu erreichen als durch Detergenzienzugabe. Es ist nicht eindeutig geklärt, inwiefern Detergenzien auf die Struktur der behandelten Zellen einwirken. Eventuell führen sie zu Lysis derselben (BURKILL, 1987; BOUCHER *et al.*, 1991). Die Cyanobakterien, die im Zuge dieser Experimente untersucht wurden, zeigten allerdings im mikroskopischen Erscheinungsbild keinerlei Schädigungen. WATERBURY *et al.* (1986) stellten für *Synechococcus* sp. ebenfalls eine extreme Resistenz gegenüber mechanischer Einwirkung fest. Diese Organismen sind wahrscheinlich gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen unempfindlicher als eukaryontisches Phytoplankton.

Die bisher diskutierten Ergebnisse beziehen sich nur auf Experimente mit Kulturen. Ähnliche Versuchsansätze mit Ultraschall- und Detergensbehandlung müßten mit Freilandproben durchgeführt werden, um auch in einem heterogenen System eine Aussage über die Genauigkeit der Zytometrie machen zu können.

4.2.2 Wachstumsphysiologie verschiedener *Synechococcus*-Stämme

4.2.2.1 Wachstumsraten

Die Ähnlichkeit der unter 3.3.1 beschriebenen Wachstumskurven, der daraus ermittelten Wachstumsraten sowie die vergleichbaren maximalen Zellabundanz in der stationären Phase machen deutlich, daß die verschiedenen Stämme KB9001, KB9002 und WH7803

ähnliche Wachstumseigenschaften unter den gegebenen Kulturbedingungen aufwiesen. Es ist deshalb anzunehmen, daß alle Stämme sich an die vorgegebenen Kulturbedingungen wie Licht, Temperatur usw. angepaßt hatten, da sie unter den gleichen Bedingungen zuvor schon sechs bis zwölf Monate kultiviert wurden. Die hier ermittelten Wachstumsraten von ca. 0,26 Teilungen pro Tag liegen um 50 Prozent unter den von BARLOW u. ALBERTE (1985) für WH7803 angegebenen Werten. Die Autoren erhielten mit 0,59 Teilungen pro Tag maximale Wachstumsraten bei einer Lichtintensität von $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, und bei einer Lichtintensität von $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bestimmten sie mit 0,24 Teilungen pro Tag Raten, die mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichbar sind. Erstaunlicherweise lagen die in den Versuchen I und II (s. 3.3.2.) ermittelten Wachstumsraten des Stammes WH7803 über denen des vorherigen Experimentes. Im Versuch II wurde mit einer Wachstumsrate von $0,55\cdot\text{d}^{-1}$ ein Wert erreicht, der unter den gegebenen Bedingungen einen Maximalwert darstellt (BARLOW u. ALBERTE, 1985). Warum die übrigen vergleichbaren Ansätze (Wachstumskurve WH7803, s. 3.3.1 und Kontrolle des Versuchs I, s. 3.3.2) grundsätzlich schlechter wuchsen, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Innerhalb des gesamten Zeitraums, in dem diese Experimente stattfanden, kam es allerdings zu einem Einbruch aller Kulturen. Dieser ca. dreiwöchige Einbruch, der sich in sehr langsamem Wachstum und hoher Empfindlichkeit der Kulturen gegenüber Störungen äußerte, fand zwischen der Aufnahme der Wachstumskurven bzw. der Ausführung des Versuchs I und der Ausführung des Versuchs II statt. Diese Unterbrechung des normalen Kulturverlaufs könnte der Grund für die unterschiedlichen Wachstumsraten sein.

Im Gegensatz dazu stehen die von MORRIS u. GLOVER (1981) und ITURRIAGA u. MITCHELL (1986) ermittelten Wachstumsraten, die bei 1,3 bis 2,3 Teilungen pro Tag liegen. JOCHEM (1990a) bestimmte für *Synechococcus* sp. in der Kieler Bucht Wachstumsraten zwischen 0,13 und 1,66 Teilungen pro Tag. An dieser Stelle drängt sich allerdings die Frage nach der Vergleichbarkeit solcher Daten auf. Selbst wenn die meisten Autoren mit dem Stamm WH7803 arbeiten, müssen doch verschiedene Kulturbedingungen (z.B. unterschiedliche Medien und Temperaturen) und die jeweilige Vorgeschichte der Kultur bedacht werden (GLIBERT *et al.*, 1986).

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen abschließend ein sehr hohes Wachstumspotential von *Synechococcus* sp. annehmen.



4.2.2.2 Veränderung der Pigmenteigenschaften des *Synechococcus*-Stamms WH7803 unter Nitrat- und Lichteinschränkung

Eine umfassende Betrachtung der Ergebnisse der Versuche I und II muß zu dem Schluß führen, daß die Anpassungsfähigkeiten des *Synechococcus*-Stamms WH7803 in Hinsicht auf verschiedene Nitrat- und Lichtbedingungen sehr vielfältig sind. Generell überlebten die Zellen in allen Ansätzen Versuchszeiträume von bis zu sieben Wochen.

Die Adaptation des Stammes WH7803 an sehr niedrige Lichtintensitäten (hier: $2,2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestand in der Zunahme der relativen Chlorophyllfluoreszenz und damit der Chlorophyllkonzentration pro Zelle. Dies ist gleichbedeutend mit einer Gößenzunahme der photosynthetischen Einheit oder mit der steigenden Anzahl photosynthetischer Einheiten pro Zelle (PERRY *et al.*, 1981; BARLOW u. ALBERTE, 1985). Zunehmender Pigmentgehalt bei geringen Lichtintensitäten ist charakteristisch für phototrophe Organismen und wurde sowohl bei Cyanobakterien (VIERLING u. ALBERTE, 1980; PRÉZELIN *et al.*, 1986) als auch bei anderem Phytoplankton beobachtet (PERRY *et al.*, 1981; RIVKIN *et al.*, 1982; HARDING *et al.*, 1983; GALLAGHER *et al.*, 1984). Der erhöhte Chlorophyllgehalt pro Zelle erlaubt es der Kultur also, unter solchen Bedingungen zu überleben. Die Zellen waren zwar nicht mehr zur Teilung fähig, konnten aber die Zellkonzentrationen konstant halten. Die Anpassung an ein Überleben unter starker Lichteinschränkung war dabei nur insofern von der zur Verfügung stehenden Nitratkonzentration abhängig, als daß das Ausmaß des Chlorophyllaufbaus mit zunehmender Nitratmenge anstieg. Eine hinreichende Stickstoffversorgung scheint demnach den Prozess der Photoadaptation zu fördern.

Die Tatsache, daß der Stamm WH7803 in der Lage war, den zellulären Chlorophyllgehalt unter Lichtreduktion um mehr als das Doppelte zu steigern, ist konform mit zahlreichen Berichten, wonach *Synechococcus* sp. im allgemeinen an geringere Lichtintensitäten und damit an größere Tiefen angepaßt ist. So konnten MORRIS u. GLOVER (1981) und BARLOW u. ALBERTE (1985, 1987) in Kultorexperimenten zeigen, daß der Stamm WH7803 bei Lichtintensitäten von 100 bis $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ einer Photoinhibition unterlag. MURPHY u. HAUGEN (1985) beobachteten Abundanzmaxima natürlicher Vorkommen von *Synechococcus* sp. am Boden der euphotischen Zone. Hier soll *Synechococcus* sp. an die gegebenen Bedingungen aufgrund der Verfügbarkeit des Pigmentes Phycoerythrin besonders gut angepaßt sein, da Phycoerythrin grünes Licht maximal absorbiert. Somit können diese Organismen den in größere Tiefen eindringenden Lichtanteil besser nutzen

(ALBERTE *et al.*, 1984; WOOD, 1985; GLOVER *et al.*, 1986b). Zudem zeigten GLOVER *et al.* (1985), daß Oberflächenpopulationen eine geringere photosynthetische Kapazität besitzen als Populationen in größeren Tiefen. KANA u. GLIBERT (1987a, b) gelang es aber, den Stamm WH7803 bei hinreichender Versuchszeit an Lichtintensitäten von bis zu $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ anzupassen. Zudem wurden im Freiland auch Oberflächenmaxima von *Synechococcus* sp. gefunden (WATERBURY *et al.*, 1979, 1986; JOHNSON u. SIEBURTH, 1979; OLSON *et al.*, 1985; JOINT u. POMROY, 1986; JOCHEM, 1988; BURKILL *et al.*, im Druck; JOCHEM *et al.*, im Druck).

Die Annahme einer Langzeitanpassung an "unübliche" Bedingungen (KANA u. GLIBERT, 1987a, b) könnte auch die Erklärung dafür sein, daß in den Hellansätzen mit einer Nitratkonzentration von 5 bis $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, was in der Natur guten Wachstumsvoraussetzungen entspricht, trotzdem ein Abbau von Chlorophyll erfolgte, obwohl in der entsprechenden Hellkontrolle eine Zunahme zu verzeichnen war. Hier könnten sich die Zellen an die durch die ASW-Rezeptur vorgegebene, sehr hohe Nitratkonzentration ($6800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) über die zuvor langfristige Kultivierung auf diesem Medium angepaßt haben. Somit entspräche eine Nitratreduktion auf 5 bis $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für diese Kultur einer erheblichen Nitratverarmung und die daraus resultierenden Ergebnisse lassen sich nicht auf ähnliche Nitratkonzentrationen in der Natur übertragen. Da Chlorophyll genau wie Phycoerythrin Stickstoff enthält, wäre ein Abbau dieses Pigmentes gleichbedeutend mit einer Mobilisierung von Stickstoff. Zudem brächte unter den gegebenen Bedingungen eine Zunahme des Chlorophyllgehaltes und damit eine höhere Fixierung von Kohlenstoff keinen Vorteil, da Stickstoff wegen der zuvor an hohe Nitratkonzentrationen angepaßten Aufnahme-Kinetik nicht schnell genug nachgeliefert werden könnte. Eine mit Nitratarmut verbundene Chlorophyllabnahme wurde ebenfalls von GLIBERT *et al.* (1986) beobachtet.

Die Annahme, daß Phycoerythrin für *Synechococcus* sp. einen Stickstoffspeicher darstellt, der bei Stickstoffmangel mobilisiert bzw. abgebaut wird (KURSAR *et al.*, 1981; BARLOW u. ALBERTE, 1985; WYMAN *et al.*, 1985), konnte durch den Versuch II nicht bestätigt werden. Statt einer Abnahme wurde in allen Ansätzen eine Zunahme dieses Pigments auf zellulärer Basis registriert. GLIBERT *et al.* (1986) fanden innerhalb einer vergleichenden Untersuchung für WH7803 stagnierende Zellkonzentrationen bei Stickstoffmangel und keine Veränderung des Phycoerythringehaltes. Bei diesen Experimenten wurde jedoch nur ein zweitägiger Stickstoffmangel herbeigeführt, danach erfolgte eine Nitratzugabe. Da in dem hier vorgestellten Experiment eine fünftägige lag-Phase und dann erst eine Veränderung im

Phycoerythringehalt der Zellen beobachtet wurde, muß davon ausgegangen werden, daß diese Autoren ihr Experiment zu früh abgebrochen haben.

Aufgrund der vielfältigen Beobachtungen vieler Autoren und der aus diesem Experiment hervorgehenden Ergebnisse kann angenommen werden, daß ein Hinweis für die globale Verbreitung und Dominanz von *Synechococcus* sp. in der Anpassung an unterschiedlichste Bedingungen besteht. Dabei fördern bestimmte Voraussetzungen, z.B. ein über einen längeren Zeitraum geschichteter Wasserkörper, die Manifestierung der jeweiligen Anpassung (JOINT, 1986).

Diese Experimente zeigen außerdem, daß eine Veränderung im Pigmenthaushalt einer Zelle mit der Durchflußzytometrie qualitativ und quantitativ erfassbar ist.

4.2.3 Entwicklung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons von Mai bis September in der Kieler Bucht

Bezüglich der Nährsalze ergab sich zu Beginn des Untersuchungszeitraums (Mitte Mai) auf beiden Stationen eine ähnliche Verteilung. Während sämtliche Nährsalze an der Oberfläche (2 m) verarmt waren, lagen in 15 m Tiefe noch alle Nährsalze in höheren Konzentrationen vor, und Nitrat war mit $3,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für die Phytoplanktongemeinschaft noch nicht limitierend. Auch JOCHEM (1990a) berichtete über im Vergleich zur Oberfläche höhere Nitratkonzentrationen im Tiefenwasser der Kieler Bucht während des Sommers.

Aufgrund der folgenden Verarmung an Nitrat auf der Station "Kieler Bucht" in 15 m Tiefe muß ab Anfang Juni Ammonium als hauptsächliche Stickstoffquelle angenommen werden, dessen Konzentration bis auf ein Minimum Mitte Juli immer zwischen $1,0$ und $1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ lag. Auch JOCHEM (1988, 1989) konnte zeigen, daß Stationen in der Kieler Bucht zwischen Mai und September nitratverarmt sind und Ammonium als Stickstoffquelle zur Verfügung steht. An der Oberfläche allerdings, wo Ammonium auf beiden Stationen mit $< 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vorlag, müssen andere Stickstoffquellen in Erwägung gezogen werden. So wies JOCHEM (1990a) auf die mögliche Bedeutung von Harnstoff und freien Aminosäuren hin.

Der Unterschied der hier untersuchten Stationen bezüglich der Nährsalze in 15 m Tiefe könnte in der küstennahen Lage der Station "Boknis Eck" begründet und ein damit verbundener allochthoner Nährsalzeintrag könnte für die höheren Konzentrationen verantwortlich sein. Das bessere Nährsalzangebot in 15 m Tiefe auf der Station "Boknis Eck" konnte von der Phytoplanktongemeinschaft allerdings nur z.T. in eine entsprechend höhere Biomasse und Produktivität umgesetzt werden. Hinsichtlich der Zellabundanzen des

autotrophen Pico- und Nanoplanktons ließ sich kein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Stationen feststellen. Somit muß also auf der Station "Boknis Eck" innerhalb des Untersuchungszeitraums ein anderer Faktor als Nitrat limitierend gewesen sein.

Die durchschnittlichen Chlorophyllkonzentrationen von 0,5 bis 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ zeigten eine relativ gute Übereinstimmung mit Ergebnissen früherer Untersuchungen. GALVAO (1990) fand in den Monaten Mai bis August auf den gleichen Stationen Chlorophyllkonzentrationen von *ca.* 1,0 bis 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Die entsprechenden Werte bei JOCHEM (1988, 1989) lagen mit *ca.* 2,0 bis 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ im gleichen Bereich. Auch das Mitte Juli auftretende Maximum des Gesamtchlorophylls wurde durch diese Untersuchungen bestätigt.

Bezüglich des Chlorophylls dominierte das Nanoplankton zu Beginn der hier vorgestellten Untersuchung, nahm mit der Zeit aber zugunsten der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion ab. JOCHEM (1989) berichtete andererseits für Stationen in der Kieler Bucht über eine durchgehende Dominanz des Nanoplanktons von Mai bis September mit einem Anteil am Gesamtchlorophyll von 40 bis 90 Prozent. Auch MOIGIS (1983) nahm für die typische Sommersituation in der Kieler Bucht eine Dominanz des Nanoplanktons an. Der von JOCHEM (1989) festgestellte parallele Verlauf des Nanoplanktonanteils zum Gesamtchlorophyll konnte ebenfalls nicht nachvollzogen werden. Stattdessen traf dies auf den Anteil des Mikroplanktons ($> 20 \mu\text{m}$) zu.

Der Anteil des Picoplanktons am Gesamtchlorophyll stimmte mit bis zu 20 Prozent relativ gut mit den entsprechenden Ergebnissen von JOCHEM (1988, 1989) überein, der ebenso einen durchschnittlichen Anteil von 20 Prozent für den gleichen Zeitraum ermittelte. Davon wich nur die Station "Boknis Eck" in 2 m Tiefe ab, wo das Picoplankton 15 bis 60 Prozent des Gesamtchlorophylls ausmachte. Auch THRONDSSEN (1979) fand im Oslofjord mit 50 Prozent eine stärkere Beteiligung der $< 5 \mu\text{m}$ -Fraktion am Gesamtchlorophyll.

Gute Übereinstimmungen mit früheren Studien (JOCHEM 1989; 1990a) ergaben sich für die Primärproduktion hinsichtlich des Produktionsmaximums Mitte Juli, doch war die Bedeutung des Picoplanktons in der hier vorgestellten Untersuchung mit einem bis zu 80prozentigen Anteil an der Gesamtprimärproduktion um mehr als das achtfache höher.

Entsprechende Untersuchungen in anderen Küstengebieten der Ostsee führten LARSSON u. HAGSTRÖM (1982) durch und fanden einen Anteil des Picoplanktons an der Primärproduktion von über 25 Prozent, der auffallend gering war. Allerdings wiesen die Autoren darauf hin, daß sie einen mit steigender Anzahl der Fraktionierungsstufen zunehmenden Verlust in der jeweiligen Fraktion feststellten. Einen Anteil von 15 bis 89 Prozent der $< 5 \mu\text{m}$ -Fraktion an der Primärproduktion ermittelte THRONDSSEN (1978) im Oslofjord. Am Eingang des Golfs von Finnland wurde eine Beteiligung der Fraktion

< 3 μm an Gesamtbiomasse und Gesamtprimärproduktion zwischen 47 und 50 Prozent ermittelt (KUPARINEN, 1984; HUTTUNEN u. KUPARINEN, 1986). Im allgemeinen scheint der Anteil des Picoplanktons an der Gesamtprimärproduktion in küstennahen Gebieten kleiner zu sein als in Gebieten des offenen Ozeans (JOCHEM, 1989).

Ein besonders auffälliger Unterschied zu früheren Studien im gleichen Gebiet (JOCHEM 1988, 1989, 1990a) war die Tatsache, daß das Picophytoplankton ausschließlich aus coccalen Cyanobakterien bestand. JOCHEM (1988, 1989) fand innerhalb des Picophytoplanktons immer eukaryontische, autotrophe Zellen, deren Anteil allerdings von Mai bis September stark abnahm. Mitte August konnten die coccalen Cyanobakterien sogar 98 Prozent des Picoplanktons ausmachen. Doch war die bei diesen Untersuchungen entsprechende Größenklasse als < 3 μm definiert und die jeweiligen Zellausmaße wurden nur über Autofluoreszenzfilter bestimmt. Es kann also in diesen Untersuchungen aufgrund der unter 2.2.2.3 und 4.1.4 beschriebenen Überlegungen zu einer Unterschätzung der Zellausmaße und damit einer Zuordnung bestimmter Zellen in die falsche Fraktion gekommen sein. Für andere Meeresgebiete scheint das Vorkommen von eukaryontischen, autotrophen Zellen innerhalb des Picoplanktons allerdings typisch zu sein (MURPHY u. HAUGEN, 1985; GLOVER, 1986a; GRADINGER u. LENZ, 1989; JOCHEM *et al.*, im Druck; JOCHEM u. ZEITZSCHEL, im Druck).

Auf eine sehr ausgeprägte Dominanz der coccalen Cyanobakterien innerhalb des Picoplanktons in zwei Brackwassergebieten im Mittelmeer wiesen ebenfalls ANDREOLI *et al.* (1989) hin.

Die absoluten Zellabundanz des autotrophen Pico- und Nanoplanktons unterschieden sich von denen vorangegangener Arbeiten. GALVAO (1990) bestimmte auf der Station "Kieler Bucht" Abundanz der coccalen Cyanobakterien von $50 \cdot 10^6$ bis $380 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{l}^{-1}$ und auf der Station "Boknis Eck" $80 \cdot 10^6$ bis $210 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{l}^{-1}$, wobei immer Oberflächenmaxima vorlagen. Letzteres entsprach zwar ab Mitte Juli den hier aufgezeigten Ergebnissen, doch die Abundanz der coccalen Cyanobakterien mit maximal $80 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{l}^{-1}$ lagen immer unter denen von GALVAO (1990). JOCHEM (1988, 1990a) fand für coccale Cyanobakterien in der Kieler Bucht im Sommer 1986 Populationsmaxima von $8 \cdot 10^6$ und $150 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{l}^{-1}$ und im Sommer 1989 auf der Station "Boknis Eck" ein Maximum von $150 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{l}^{-1}$. Dabei handelte es sich im Sommer 1986 um ein Oberflächenmaximum, wohingegen das Maximum im Sommer 1989 unterhalb der Oberfläche lag. In beiden Fällen wurde das Abundanzmaximum der coccalen Cyanobakterien im Zeitraum Juli/ August beobachtet, was den hier vorgestellten Ergebnissen nahe kommt. Sehr viel niedrigere Abundanzmaxima coccaler Cyanobakterien

in Brackwassergebieten des Mittelmeeres fanden ANDREOLI *et al.* (1989) mit $10 \cdot 10^6$ bis $18 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$.

Die über den gesamten Untersuchungszeitraum auf beiden Stationen und in beiden Tiefen zunehmenden Abundanzen der coccale Cyanobakterien korrelierten mit einem Temperaturanstieg von 9 bis 11 °C auf ca. 19 °C in 2 m Tiefe und von 6 bis 9 °C auf 15 bis 18 °C in 15 m Tiefe. Diese parallele Entwicklung konnte ebenso in früheren Untersuchungen von JOCHEM (1987, 1988) festgestellt werden. Bei diesen Untersuchungen korrelierten die Abundanzmaxima der coccalen Cyanobakterien mit einer Temperatur zwischen 17 und 20 °C. Auch KREMPIN u. SULLIVAN (1981) und MURPHY u. HAUGEN (1985) wiesen auf die signifikante positive Korrelation coccaler Cyanobakterien und Temperatur hin.

Die coccalen Cyanobakterien waren mit durchschnittlichen Ausmaßen von 0,78-1,56 x 0,55-0,78 µm kleiner als die der vergleichbaren Untersuchungen. JOCHEM (1988) beschrieb für die Kieler Bucht coccale Cyanobakterien mit einer Größe von bis zu 1,0 x 2,5 µm und KUOSA (1988) gab für die entsprechenden Zellen im Golf von Finnland 0,5 x 1,5 und 0,5-1,5 x 0,7-2,5 µm als Ausmaße an.

Bezüglich der autotrophen Flagellatenarten, die in der hier vorliegenden Studie nur für den Monat Mai untersucht wurden, zeigten sich im Vergleich zu früheren Untersuchungen ebenfalls Unterschiede. So fand JOCHEM (1990b) auf einer vergleichbaren Station in der Kieler Bucht die Arten *Micromonas* sp. und *Nephroselmis pyriformes* nicht im Mai, sondern erst ab Juli. Die Befunde für *Chrysochromulina* sp. und *Pseudopedinella* sp. stimmten hingegen überein.

Hinsichtlich der Abundanzen des autotrophen Nanoplanktons - also hauptsächlich der Flagellaten - zeigte sich auf den beiden Stationen "Kieler Bucht" und "Boknis Eck" kein besonders auffallender Unterschied. Dies entspricht den Untersuchungen von GALVAO (1990) auf den gleichen Stationen und in den gleichen Tiefen. Bei dieser Studie ergaben sich in 2 m Tiefe auf beiden Stationen Mitte Juni Abundanzmaxima pigmentierter Nanoflagellaten mit ca. $5,5 \cdot 10^6$ bis $6,0 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$. Dieser Zeitpunkt stimmt mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein, doch wurden mit $30 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ ("Kieler Bucht", 2 m) und $26 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ ("Boknis Eck", 2 m) sehr viel höhere Zellabundanzen ermittelt. Ein ähnlicher Unterschied der beiden Studien ergab sich auch für die Tiefe von 15 m. Während GALVAO (1990) in dieser Tiefe auf der Station "Kieler Bucht" einen leichten Anstieg der Zellabundanzen von $< 1 \cdot 10^6$ auf $3 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ von Mai bis August feststellte, fielen die Abundanzen im Sommer 1991 (diese Studie) kontinuierlich von $22 \cdot 10^6$

auf $10 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ ab, lagen aber wiederum höher. In der entsprechenden Tiefe auf der Station "Boknis Eck" wiesen die Nanoflagellaten mit gleichbleibenden Abundanzen von $< 1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ während der Untersuchung von GALVAO (1990) keine zeitliche Entwicklung auf, was der abnehmenden Konzentration von $28 \cdot 10^6$ auf $5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ im Sommer 1991 widerspricht. JOCHEM (1990a) ermittelte im Sommer 1989 für die Kieler Bucht ebenfalls niedrigere Abundanzen für autotrophe Nanoflagellaten der Größenfraktion 3-5 μ m. Mit $1,0 \cdot 10^6$ bis $1,5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ im Juli und einem darauffolgenden Abundanzmaxima von $5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot l $^{-1}$ ähnelten diese Zahlen der Untersuchung von GALVAO (1990).

Aus dem Vergleich der hier diskutierten Ergebnisse mit denen vorangegangener Studien (SMETACEK, 1975; SMETACEK *et al.*, 1984; JOCHEM, 1987) geht hervor, daß mit dem Zeitraum von Mai bis September die für die Kieler Bucht typische Sommersituation (= Stadium III; SMETACEK *et al.*, 1984) erfaßt wurde. Die Frühjahrsblüte und damit das primäre Biomasse- und Produktionsmaximum des Mikrophytoplanktons ist typisch für die Monate März und April (= Stadium I; SMETACEK *et al.*, 1984) und wurde somit nicht berücksichtigt. Die Herbstsituation mit einer weiteren typischen Dominanz des Mikrophytoplanktons durch größere Dinoflagellaten (= Stadium IV; SMETACEK *et al.*, 1984; JOCHEM, 1987) wurde ebenfalls nicht mehr erfaßt.

Die Sommersituation der Kieler Bucht ist gekennzeichnet durch die untergeordnete Rolle des Mikrophytoplanktons und die Dominanz des autotrophen Nano- und Picoplanktons, was innerhalb der hier vorgestellten Arbeit im Sommer 1991 für den Zeitraum Mai bis Mitte Juli nachvollzogen werden konnte. Danach nahm allerdings die Bedeutung des Mikrophytoplanktons im Zusammenhang mit der leicht ansteigenden Nitratkonzentration von 0,2 auf $1,0 \mu$ mol \cdot l $^{-1}$ früher als erwartet zu. Die bis Mitte Juli typische Dominanz der kleineren Fraktionen steht im engen Zusammenhang mit den durch die Frühjahrsblüte stark reduzierten Nährsalzkonzentrationen (JOCHEM, 1987). Unter diesen Voraussetzungen haben kleine Organismen aufgrund ihres geringen Verhältnisses von Volumen zu Oberfläche hinsichtlich der Aufnahmekinetik Vorteile gegenüber größerem Phytoplankton (PARSONS *et al.*, 1984; FOGG, 1987). Ein weiterer Vorteil des Picoplanktons besteht in der Möglichkeit, Ammonium als Stickstoffquelle zu nutzen (JOCHEM, 1987). Die bevorzugte Aufnahme von Ammonium gegenüber Nitrat durch Picoplankton konnten auch HARRISON u. WOOD (1988) feststellen. Auch wird die Möglichkeit der N₂-Fixierung für *Synechococcus* sp. diskutiert. Das Vorhandensein des dazu benötigten Enzyms Nitrogenase konnte bereits von McCARTHY (1980) nachgewiesen werden und MITSUI *et al.* (1986)

berichteten über N_2 -Fixierung bei marinen *Synechococcus* sp. PHILIPS *et al.* (1989) konnten bei dem *Synechococcus*-Stamm BG011 ebenfalls eine N_2 -Fixierung nachweisen, doch schien den Autoren die ökologische Bedeutung nicht besonders groß zu sein.

Während des Sommers 1991 beruhte also die Struktur und Dynamik der Phytoplanktongemeinschaft in der Kieler Bucht wahrscheinlich auf regenerierter Produktion im Sinne von DUGDALE u. GOERING (1967), was früheren Untersuchungen im gleichen Gebiet entspricht (SMETACEK *et al.*, 1984; JOCHEM, 1987).

Der Literaturvergleich führt somit zu dem Schluß, daß Absolutzahlen, wie z.B. Zellabundanzen der coccalen Cyanobakterien, nicht immer gleich sind und die Entwicklung der einzelnen Fraktionen durchaus von Jahr zu Jahr unterschiedlich sein kann. Auch JOCHEM (1990a) wies darauf hin, daß sich innerhalb zweier Studien in den Jahren 1986 und 1989 die maximalen Abundanzen der coccalen Cyanobakterien um 100 Prozent unterschieden. Die sommerliche Pico- und Nanoplanktongemeinschaft der Kieler Bucht kann also interne Schwankungen (Verschiebung der Abundanzmaxima, Schwankungen der Absolutzahlen, *etc.*) aufweisen, ohne die grundsätzliche Struktur zu verlieren. Das zeigt die Variabilität und damit auch die Stabilität des mikrobiellen Nahrungsnetzes und weist auf die Bedeutung des "Microbial Loop" für die Kieler Bucht hin.

4.2.4 Driftstudien in der östlichen Gotlandsee (BAMBI '91)

4.2.4.1 Situation im sommerlichen Pelagial der östlichen Gotlandsee

Die während BAMBI '91 in der östlichen Gotlandsee vorgefundene Situation entsprach durchaus der vorangegangener Studien. EDLER (1979) untersuchte unter anderem die Artensukzession in der östlichen Gotlandsee und beschrieb für die Monate Juli und August eine Blüte fädiger Blaualgen mit den dominanten Arten *Aphanizomenon flos-aquae* und *Nodularia spumigena*. Auch berichteten SÖRENSSON u. SAHLSTEN (1987) von einer Blüte der Art *Nodularia spumigena* in derselben Region. SCHARENBERG (1991) fand für das gleiche Gebiet eine sommerliche Blaualgenblüte mit einer Dominanz von *Aphanizomenon flos-aquae*.

Die hydrographischen und chemischen Voraussetzungen für diese Blüte waren in allen Untersuchungen ähnlich und stimmten mit den hier vorliegenden Ergebnissen überein. So lag meist eine 14 bis 18 m tiefe Deckschicht und eine Oberflächentemperatur von 17 bis 22 °C vor. Hinsichtlich der Nährsalze war die Deckschicht vor allem nitratverarmt. Nitrat als limitierender Faktor in der Ostsee (SEN GUPTA, 1972) erklärt die Ausbildung einer

Blüte fädiger Blaualgen, da diese Organismen in der Lage sind, elementaren Stickstoff zu fixieren. Sie sind somit nicht auf eine gelöst vorliegende Stickstoffquelle angewiesen. Auch SÖRENSSON u. SAHLSTEN (1987) machten darauf aufmerksam, daß in der östlichen Gotlandsee hauptsächlich elementarer Stickstoff und Ammonium als Stickstoffquellen dienen. Aufgrund dieser Befunde kann in der sommerlichen Ostsee zum einen von einer "regenerierten Produktion" im Sinne von DUGDALE u. GOERING (1967) ausgegangen werden. Zum anderen muß für die Organismen, die elementaren Stickstoff fixieren können, "neue Produktion" angenommen werden.

Weiterhin charakteristisch für die während BAMBI '91 vorgefundene Situation war die Dominanz des autotrophen Picoplanktons bezüglich der Chlorophyllkonzentration und der Primärproduktion. Diese Fraktion machte meist ein Drittel bis die Hälfte des Chlorophylls und immer über 50 Prozent der Primärproduktion aus. Dies entspricht der allgemeinen Vorstellung von der dominierenden Bedeutung coccaler Cyanobakterien in Systemen regenerierter Produktion (BIENFANG u. TAKAHASHI, 1983; JOINT u. POMROY, 1983; LI *et al.*, 1983; PLATT *et al.*, 1983a; TAKAHASHI u. BIENFANG, 1983; DOUGLAS, 1984; GLOVER *et al.*, 1986a; ITURRIAGA u. MITCHELL, 1986).

Die Vorjahresuntersuchung (BAMBI '90; SCHARENBERG, 1991) ergab für das Picoplankton mit 49 bis 68 Prozent bzw. 45 bis 57 Prozent eine ähnlich hohe Beteiligung am Gesamtchlorophyll bzw. an der Gesamtprimärproduktion. Übereinstimmend mit den Ergebnissen während BAMBI '90 hatten die Fraktionen 2-5 μm und 5-20 μm während BAMBI '91 mit maximal 22 Prozent den geringsten Anteil am Gesamtchlorophyll. Allerdings kam diesen Fraktionen mit 22 bis 44 Prozent ein größerer Anteil an der Primärproduktion zu, der während BAMBI '91 nur bei maximal 25 Prozent lag. Dafür kam dem Mikrophytoplankton mit 10 bis 21 Prozent hinsichtlich der Produktion eine geringere Bedeutung zu, wohingegen diese während BAMBI '91 immer über 22 Prozent lag. Dies ist mit der während BAMBI '90 weniger stark ausgeprägten Blüte fädiger Blaualgen zu erklären. Grundsätzlich aber war die Situation im Sommer 1990 der im Sommer 1991 sehr ähnlich.

Die mit der $> 20 \mu\text{m}$ -Fraktion einhergehenden, täglichen Schwankungen des über die oberen 35 m integrierten Gesamtchlorophylls können nicht als zeitliche Entwicklung interpretiert werden. Hier muß eher davon ausgegangen werden, daß die unterschiedlichen Werte durch die "patchiness" der Blaualgenblüte zustande kamen. So konnte vielfach während der Probennahme beobachtet werden, daß sich das Schiff in einem "patch" fädiger Blaualgen befand, während der Drifter selbst neben diesem "patch" trieb. Bei darauffolgenden Probennahmen konnten wiederum umgekehrte Verhältnisse vorliegen.

Zudem zeigte sich, daß innerhalb eines dichten Blaualgen-"patches" das Schiff selber eine unterschiedlich ausgeprägte "blaualgengfreie" Zone schaffte, die die Probennahme der oberen Meter deutlich beeinflusste.

Die während BAMBI '91 ermittelten Zellabundanz der coccalen Cyanobakterien von $35 \cdot 10^7$ bis $46 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot l^{-1}$ an der Oberfläche lagen erheblich über den für die westliche Gotlandsee gefundenen Werten von LARSSON u. HAGSTRÖM (1982), die $0,5 \cdot 10^7$ bis $8 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot l^{-1}$ ermittelten. Diese im Vergleich zu BAMBI '91 niedrigen Zellabundanz könnten aber durch die von den Autoren zur Quantifizierung angewandten Utermöhlmethode zustande gekommen sein. Dabei kann es aufgrund der sehr geringen Sinkraten coccaler Cyanobakterien vom *Synechococcus*-Typ zu erheblichen Unterschätzungen kommen (REID, 1983; TAKAHASHI u. BIENFANG, 1983). KUOSA (1988) ermittelte für den Golf von Finnland $20 \cdot 10^7$ coccale Cyanobakterien $\cdot l^{-1}$, was den Werten während BAMBI '91 entspricht. Die von SCHARENBERG (1991) während BAMBI '90 für die östliche Gotlandsee aufgeführten Zellabundanz lagen an der Oberfläche bei *ca.* $6,6 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot l^{-1}$. Allerdings wurden diese Zahlen mittels Durchflußzytometrie bestimmt, und vergleichende mikroskopische Zählungen werden nur vereinzelt aufgeführt, deuten aber auf eine starke Unterschätzung der zytometrisch ermittelten Zellabundanz in der Größenordnung einer Zehnerpotenz hin. Unter Berücksichtigung dieser Unterschätzung waren die Zellabundanz der coccalen Cyanobakterien im Sommer 1990 und 1991 ähnlich. Die in der Ostsee im Sommer vorgefundenen Zellabundanz coccaler Cyanobakterien entsprechen generell auch solchen in anderen Gebieten der Weltmeere, die zwischen 10^6 und 10^8 Zellen $\cdot l^{-1}$ liegen (JOHNSON u. SIEBURTH, 1979; WATERBURY *et al.*, 1979; KREMPIN u. SULLIVAN, 1981; LI *et al.*, 1983; PLATT *et al.*, 1983a; GLOVER *et al.*, 1985; MURPHY u. HAUGEN, 1985).

Die Charakteristik der vertikalen Verteilung coccaler Cyanobakterien und die damit verbundene Frage nach der Anpassung an bestimmte Lichtintensitäten wurde schon im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Experimenten diskutiert (vgl. 4.2.2.2). Die während BAMBI '91 vorgefundene Situation - Oberflächenmaxima der Zellabundanz der $< 2 \mu m$ -Fraktion - steht im Gegensatz zur allgemeinen Ansicht, wonach coccale Cyanobakterien am Boden der euphotischen Zone Abundanzmaxima bilden (MURPHY u. HAUGEN, 1985; GLOVER *et al.*, 1986b). Doch konnten, wie schon unter 4.2.2.2 erwähnt, in vielen Untersuchungen auch Oberflächenmaxima dieser Organismen nachgewiesen werden (JOHNSON u. SIEBURTH, 1979; WATERBURY *et al.*, 1979, 1986; OLSON *et al.*, 1985; JOINT u. POMROY, 1986; JOCHEM, 1988, 1990a; BURKILL *et al.*, im Druck). Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten erneut darauf hin,

daß *Synechococcus* sp. je nach Situation, in der Lage ist, unterschiedliche Adaptationen zu entwickeln.

Die während BAMBI '91 an der Oberfläche ermittelten Zellabundanz des autotrophen Nanoplanktons stimmen mit durchschnittlich $2 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$ gut mit den Ergebnissen des Vorjahres überein (SCHARENBERG, 1991). Bezüglich dieser Organismen unterschieden sich die beiden BAMBI-Untersuchungen einzig in dem während BAMBI '91 vorgefundenen Abundanzmaximum in 35 m Tiefe.

Für die durchschnittliche zelluläre Chlorophyll- und Phycoerythrinfluoreszenz lagen sowohl für coccale Cyanobakterien als auch für autotrophes Nanoplankton maximale Werte an der Oberfläche vor. Dieses Ergebnis kann mit dem Oberflächenmaximum der Primärproduktion in Zusammenhang gebracht werden. Das sekundäre Maximum der zellulären Chlorophyll- und Phycoerythrinfluoreszenz in 60 m Tiefe im Falle des Nanoplanktons korrelierte mit dem sprunghaften Anstieg der Nitratkonzentration in dieser Tiefe, was wiederum - wie schon unter 4.2.2.2 angedeutet - annehmen läßt, daß eine erhöhte Nitratversorgung den Chlorophyllaufbau fördern kann.

Dagegen schienen die coccalen Cyanobakterien die erhöhte Nitratkonzentration in dieser Tiefe nicht nutzen zu können. GLOVER *et al.* (1988a) konnten im Gegensatz dazu zeigen, daß *Synechococcus* sp. unter nitratverarmten Verhältnissen in Oberflächennähe weniger Phycoerythrin pro Zelle enthielt als nahe der Nitratkline. Allerdings weisen die Autoren darauf hin, daß verschiedene Stämme unterschiedlich auf Nitrat reagieren können, so daß die Ergebnisse nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

Es stellte sich also für die östliche Gotlandsee eine quantitative Dominanz der coccalen Cyanobakterien vom *Synechococcus*-Typ heraus. Die vorgegebene Situation - hauptsächlich die allgemeine Nährsalzarmut - ließ diese Dominanz erwarten, da vor allem eine Nitratarmut das Vorkommen von coccalen Cyanobakterien fördern kann (EPPLEY *et al.*, 1967; MALONE, 1971; McCARTHY *et al.*, 1974; JOINT, 1986). Auch muß an dieser Stelle wiederum die Möglichkeit der N₂-Fixierung für coccale Cyanobakterien in Betracht gezogen werden, wie sie schon unter 4.2.3 diskutiert wurde.

Wenn also fädige Blaualgen elementaren Stickstoff fixieren und coccale Cyanobakterien dies eventuell auch können, so bleibt die Frage, wie in diesem nährsalzverarmten Milieu so hohe Zellabundanz des autotrophen Nanoplanktons (maximal $2 \cdot 10^7$ Zellen \cdot l $^{-1}$) erklärt werden können. Eine zusätzliche Stickstoff- und Phosphatquelle könnte unter den gegebenen Voraussetzungen die Blüte der fädigen Blaualgen gewesen sein. GABRIELSON

u. HAMEL (1985) nahmen an, daß zerfallende Zellen von *Nodularia spumigena* gelöstes Nitrat und Phosphat in organischer und anorganischer Form liefern. Wenn dies während BAMBI '91 der Fall gewesen ist, ist aufgrund der geringen Nitratkonzentrationen in den oberen 35 m von einem sehr schnellen turn-over dieser Nährsalze auszugehen. Das weist auf ein eng gekoppeltes mikrobielles Nahrungsnetz im Sinne des "Microbial Loop" hin, in dem Stickstoff sehr schnell regeneriert werden kann. Zudem würde unter der Annahme, daß coccale Cyanobakterien elementaren Stickstoff fixieren können, der durch diese Quelle eingebrachte Stickstoff auch anderem Phytoplankton zur Verfügung stehen.

4.2.4.2 Phototrophes Pico- und Nanoplankton in anoxischen Tiefen der östlichen Gotlandsee

Ein unerwartetes Ergebnis der Bestandsaufnahme des autotrophen Pico- und Nanoplanktons in der östlichen Gotlandsee stellten die zunehmenden Zellabundanz der coccalen Cyanobakterien und des autotrophen Nanoplanktons in Korrelation zu den anaeroben Bedingungen unterhalb einer Tiefe von 150 m dar. Die hier gefundenen Zellabundanz machten im Falle der coccalen Cyanobakterien ein bis zwei Prozent und im Falle des Nanoplanktons 50 Prozent der jeweiligen Oberflächenkonzentration aus.

Über das Vorkommen von lebendem Pico- und Nanoplankton in größeren Tiefen gibt es vielfältige Beobachtungen. So berichteten HAMILTON *et al.* (1968) über das Vorkommen kleiner pigmentierter Zellen (1 bis 4 μm) bis in eine Tiefe von 3400 m, wobei die Zellen z.T. noch lebten. FOURNIER (1970, 1971) fand ebenfalls pigmentierte Zellen als Vertreter des Pico- und Nanoplanktons (1 bis 15 μm) bis in eine Tiefe von 5000 m. Er ermittelte Zellabundanz von $2,5 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^5$ Zellen $\cdot\text{l}^{-1}$ und wies darauf hin, daß die meisten dieser Zellen prokaryontisch organisiert waren. Außerdem beobachtete er Zellen in Teilung, was ihn auf lebende Zellen schließen ließ. PLATT *et al.* (1983b) berichteten über photosynthetisch aktive Phytoplankter, darunter auch coccale Cyanobakterien (*ca.* 1 μm), in 1000 m Tiefe. Gleichzeitig registrierten die Autoren in dieser Tiefe einen Sauerstoffgehalt von $0,2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$. Die gefundene Gemeinschaft ähnelte der an der Oberfläche vorkommenden Gemeinschaft bezüglich ihrer Zusammensetzung. SILVER u. ALLDREDGE (1981) fanden Picoplankton in "fecal pellets" und "marine snow" in größeren Tiefen und LOCHTE u. TURLEY (1988) wiesen auf coccale Cyanobakterien hin, die zusammen mit Phytodetritus in der Tiefsee vorkommen. Auch hier beobachteten die Autoren *in situ* aktives Wachstum und hohe Autofluoreszenz.

Bisher ist bei vielen dieser Beobachtungen nicht eindeutig geklärt, wie solch kleine Zellen in größere Tiefen gelangen können. FOURNIER (1971), PLATT *et al.* (1983b) und TAKAHASHI u. BIENFANG (1983) wiesen darauf hin, daß sehr kleine Zellen, speziell coccale Cyanobakterien, zu vernachlässigende Sedimentationsraten haben. Aufgrund dieser Überlegungen schloß FOURNIER (1971) auf Zellaggregate, die sich an der Wasseroberfläche bilden und so fähig sind, in größere Tiefen abzusinken. Auch LOCHTE u. TURLEY (1988) fanden heraus, daß Bakterien und Cyanobakterien assoziiert mit Detritus in der Lage sind, abzusinken, und SILVER u. GOWING (1986) beschrieben Detritus als "Zentrum photosynthetischer Organismen". Wenn diese Beobachtungen auf die in dieser Arbeit beschriebene Situation übertragbar sein sollten, hätten Zellaggregate oder Detrituspartikel in der ganzen Wassersäule gefunden werden müssen. Zellaggregate wurden aber nur im Falle der coccalen Cyanobakterien bis in eine Tiefe von 50 m beobachtet und unterhalb dieser Tiefe lagen alle Zellen unizellulär vor. SILVER u. GOWING (1986) erwähnten in ihrer Untersuchung allerdings Zellen, die mit "schnell sinkendem Detritus" assoziiert sind. Nach Meinung dieser Autoren werden Zellen über diese organischen Partikel sehr schnell an einen "Pool suspendierter Zellen" in größeren Tiefen abgegeben. Die Tatsache, daß innerhalb dieser Studie nur sehr geringe Zellabundanzen und keine organischen Partikel in Tiefen zwischen 50 und 100 m gefunden wurden, könnte somit diese Theorie unterstützen und eine schnelle Trennung der aggregierten Zellen könnte das Vorkommen der unizellulären Zellen in größeren Tiefen erklären.

Eine weitere Möglichkeit des vertikalen Transports könnte das Absinken dieser Zellen innerhalb von "fecal pellets" oder "marine snow" sein. SILVER u. ALLDREDGE (1981) untersuchten die Zusammensetzung dieser Partikel und fanden unter anderem gut pigmentierte und in der Teilung befindliche coccale Cyanobakterien und kleine eukaryontische, autotrophe Zellen. Das würde bedeuten, daß coccale Cyanobakterien aufgrund ihrer inerten Zellwandstrukturen für Grazer, wie z.B. Copepoden, unverdaulich sind und unangegriffen wieder ausgeschieden werden. Innerhalb der Wassersäule wurden bei der hier vorliegenden Studie allerdings keine "fecal pellets" gefunden, doch ergab die Untersuchung des Materials aus der Sinkstoffalle Partikel, deren Herkunft und Zuordnung bisher ungeklärt blieb (R. BOJE, persönliche Mitteilung, IFM-Kiel).

Unter Berücksichtigung einer Lebenserwartung coccaler Cyanobakterien und eukaryontischer, autotropher Zellen in der Tiefsee von mehreren Wochen bis Jahren (SILVER u. GOWING, 1986), drängt sich die Frage auf, in welcher Art und Weise die Organismen unter den in der östlichen Gotlandsee vorgefundenen Verhältnissen (kein Licht, kein Sauerstoff) überleben können.

Alle Cyanobakterien sind generell in der Lage, sowohl oxygene als auch anoxygene Photosynthese zu betreiben (CARR u. WYMAN, 1986). Bei dem hier beschriebenen Phänomen ist aufgrund totaler Lichtabwesenheit in einer Tiefe von 160 m allerdings jegliche Art von Phototrophie auszuschließen. Als Alternative bietet sich Photoheterotrophie an, d.h. die fakultative Fähigkeit einiger Arten, im Dunkeln durch Veratmung exogener Zucker überleben zu können (RIPPKA, 1972; CARR u. WYMAN, 1986).

Um die Lebensfähigkeit dieser Organismen zu untersuchen, wurde eine Wasserprobe (50 ml) aus 160 m Tiefe nach Zugabe einer Radioaktivität von $20,4 \mu\text{Ci H}^{14}\text{CO}_3$ unter anoxischen und oxischen Bedingungen an Deck inkubiert. Bei den Zellen des anoxischen Ansatzes war keine Aufnahme von ^{14}C zu verzeichnen, aber im oxischen Ansatz konnte eine Aufnahme gemessen werden (DETMER *et al.*, Manuskript). Zum einen könnte dies bedeuten, daß die Zellen unter anoxischen Bedingungen nicht mehr zur Produktion fähig sind, aber das Potential dazu noch besitzen. Daraus könnte geschlossen werden, daß die Zellen erst eine kurze Zeit unter diesen Bedingungen zugebracht haben und noch nicht irreversibel geschädigt wurden. Zum zweiten könnten die Zellen durch Heterotrophie überleben, was für einige *Synechococcus*-Stämme nachgewiesen werden konnte (WATERBURY *et al.*, 1986).

4.3 Ausblick

Einige der vielfältigen Möglichkeiten der Durchflußzytometrie für die Planktonforschung konnten mit dieser Arbeit erfolgreich dargestellt werden, doch muß deren weiterführende Entwicklung gefordert werden.

So sollten noch höhere Meßgeschwindigkeiten erreicht werden bzw. weitere Verfahren entwickelt werden, Partikel für die Zytometrie zu konzentrieren, da gerade die Messung von Partikeln $> 20 \mu\text{m}$ - die oft nur mit einigen $100 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ vertreten sind - sehr zeitintensiv ist (DUBELAAR *et al.*, 1989; OLSON *et al.*, 1989; PHINNEY u. CUCCI, 1989). Zur Empfindlichkeitssteigerung der Geräte könnte die verstärkte Anwendung von Farbstoffen wie DAPI, Chromomycin A3, Hoechst 33258 u. a. beitragen, so daß auch heterotrophe Organismen erfaßt und vor allem verschiedene Populationen bei Freilanduntersuchungen besser unterschieden werden könnten (BOUCHER *et al.*, 1991; OTTO, 1990). Die weitere Verwendung und Fortentwicklung von Farbstoffen zur Erfassung bestimmter Zellbestandteile oder zellulärer Vorgänge in einzelnen Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie stellt ein großes Potential zur Erlangung neuer Kenntnisse

hinsichtlich des Wachstums und der Physiologie von Planktonorganismen und der sie steuernden Prozesse dar.

Bezüglich der Bedeutung von *Synechococcus* sp. zeigte diese Arbeit, daß Ergebnisse verschiedener Experimente, wie z.B. Wachstumsraten, nicht ohne weiteres vergleichbar sind und vor allem stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig sind. Somit sind die entsprechenden Aussagen nicht auf Situationen im Freiland übertragbar. Daraus folgt die Forderung, ähnliche Experimente in verkürzter Form direkt *in situ* durchzuführen. Zu diesem Zweck eignet sich die Durchflußzytometrie auf Grund der Meßgeschwindigkeit und der angebotenen Parameterfülle besonders gut.

Mit einem verstärkten Einsatz der Zytometrie an Bord, der Entwicklung entsprechender Fixierungsmöglichkeiten und mit der Durchführung standardisierter Kurzzeitexperimente sollten weitere Aussagen über die Biologie und die physiologischen Fähigkeiten von *Synechococcus* sp. und der damit verbundenen globalen Bedeutung dieser Organismen möglich sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die quantitativen und qualitativen Möglichkeiten der Durchflußzytometrie in der marinen Planktonforschung untersucht. Daraus resultierte eine Aussage bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zytometrischer Messungen im Vergleich zu Daten, die durch die Epifluoreszenzmikroskopie ermittelt wurden.

Durch die Untersuchung des autotrophen Pico- und Nanoplanktons in einem küstennahen Gebiet (Kieler Bucht) und in der zentralen Ostsee (östliche Gotlandsee) sollte die Bedeutung dieser Größenfraktionen herausgestellt und die Einsatzmöglichkeiten der Durchflußzytometrie für ataxonomische Bestandsaufnahmen geprüft werden.

Weiterhin wurden physiologische Wachstumseigenschaften von *Synechococcus* sp. analysiert, um deren Einfluß auf die globale Verbreitung und den Erfolg dieses Organismus bewerten zu können.

1.) Die Genauigkeit des hier verwendeten Zytometers (FLUVO II) wurde durch den Vergleich zytometrisch und mikroskopisch ermittelter Datensätze aus Kultorexperimenten und Freilanduntersuchungen analysiert.

Der Vergleich ergab eine starke Korrelation experimentell erhaltener Datensätze unter Anwendung eines für das FLUVO II konstruierten Motors, mit dem die Messung eines genau definierten Probenvolumens möglich war. Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Bestimmung der Probenkonzentration durch die Zugabe eines internen Standards eine moderate Korrelation experimenteller Daten.

Bezüglich der Freilanddaten zeigte sich der negative Einfluß verklumpter bzw. aggregierter Zellen auf die zytometrisch ermittelte Probenkonzentration. Die Abundanz coccaler Cyanobakterien, die diese Verklumpungen aufwiesen, wurde mittels Durchflußzytometrie im Vergleich zu den Ergebnissen der Epifluoreszenzmikroskopie unterschätzt. Um die Ergebnisse der Zytometrie zu verbessern, wurden verschiedene Arten der Probenvorbehandlung auf ihre Effizienz bei der Trennung der Klumpen in einzelne Zellen getestet. Eine zwei- bis vierminütige Behandlung der Probe im Ultraschallbad erbrachte eine 20prozentige Verbesserung der Ergebnisse, wobei die Effektivität der Behandlung von der Probenkonzentration abhing. Der für das FLUVO II optimale Probenkonzentrationsbereich lag bei $1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹, in dem aufeinanderfolgende Messungen die geringste Varianz aufwiesen und somit die höchste Reproduzierbarkeit erreicht wurde.

Mit Formol fixierte Proben eigneten sich schon in einem Zeitraum von zwei bis vier Wochen nach Fixierung nicht mehr für die zytometrische Messung der

Fluoreszenzeigenschaften, da der Verlust der Autofluoreszenz - besonders bei autotrophen Nanoflagellaten - zu groß war.

2.) Außer den physikalischen und chemischen Standardparametern wurden bei den Freilanduntersuchungen die Chlorophyllkonzentration und die *in situ*-Primärproduktion in den Größenfraktionen $> 20 \mu\text{m}$, $20\text{-}5 \mu\text{m}$, $5\text{-}2 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ ermittelt. Weiterhin wurden die Zellabundanz des autotrophen Pico- und Nanoplanktons mittels Epifluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie bestimmt.

Die in der Kieler Bucht an der Oberfläche nitratverarmten Verhältnisse und die Dominanz des autotrophen Pico- und Nanoplanktons weisen auf die in diesem Gebiet typische Sommersituation hin. Der Anteil des Picoplanktons am Gesamtchlorophyll machte *ca.* 20 Prozent aus, wohingegen das Nanoplankton mit 35 bis 80 Prozent einen höheren Anteil hatte. 15 bis 83 Prozent der Gesamtprimärproduktion fielen auf das Picoplankton und 10 bis 20 Prozent auf das Nanoplankton. Abundanzmaxima der coccalen Cyanobakterien standen im Zusammenhang mit der sommerlichen Erwärmung des Wassers auf 15 bis 19 °C.

Das sommerliche Pelagial der östlichen Gotlandsee war ebenfalls durch eine Nitratverarmung an der Oberfläche gekennzeichnet. Das Picoplankton war mit 27 bis 53 Prozent am Gesamtchlorophyll und mit 51 bis 60 Prozent an der Gesamtprimärproduktion beteiligt. Das Nanoplankton machte am Gesamtchlorophyll bzw. an der Gesamtprimärproduktion einen Anteil von 16 bzw. 15 bis 23 Prozent aus. Bezüglich der Zellabundanz lag für coccale Cyanobakterien und autotrophe Nanoflagellaten ein Oberflächenmaximum vor. Ein unerwarteter Anstieg der Zellabundanz unterhalb von 120 m Tiefe ging mit der Ausbildung der Chemokline und anoxischen Verhältnissen einher. Die dort vorgefundenen Zellen waren bei Inkubation unter oxischen Bedingungen zur Produktion fähig.

3.) Hinsichtlich des Wachstumsvermögens von *Synechococcus* sp. wurden drei Experimente durchgeführt. Am Beispiel des Stamms WH7803 wurden Wachstumsraten und zelluläre Pigmentveränderungen in Abhängigkeit von Licht und Nitrat untersucht.

Wachstumsraten lagen in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration zwischen 0,26 und 0,55 Teilungen pro Tag. Unter Lichtreduktion auf $2,2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ war der Stamm WH7803 durch die Zunahme des zellulären Chlorophyllgehaltes bei konstant bleibender Zellkonzentration in der Lage, bis zu sieben Wochen zu überleben. Das Ausmaß des Chlorophyllaufbaus war von der zugegebenen Menge an Nitrat abhängig.

Die Annahme, daß das für *Synechococcus* sp. typische Pigment Phycoerythrin einen Stickstoffspeicher darstellt und bei Nitratmangel abgebaut wird, konnte nicht bestätigt

werden. In allen Ansätzen - selbst in denen ohne Nitrat - wurde ein Aufbau dieses Pigmentes beobachtet.

Sowohl die Ergebnisse der Freilanduntersuchungen als auch der Kulturexperimente lassen vermuten, daß coccale Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus* über vielfältige physiologische Adaptationsmöglichkeiten verfügen, die u.a. zu ihrer weltweiten Verbreitung beitragen.

6 LITERATUR

- Alberte R.S., Wood A.M., Kursar T.A., Guillard R.R.L. (1984): Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* ssp. *Plant Physiol.* 75, 732-739.
- Andreoli C., Rascio N., Dalla Vecchia F., Talarico L. (1989): An ultrastructural research on natural populations of picoplankton from two brakish water environments in Italy. *J. Plankton Res.* 11, 1067-1074.
- Azam F., Fenchel T., Field J. G., Gray J. S., Meyer-Reil L. A., Thingstad F. (1983): The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257-263.
- Barlow R.G., Alberte R.S. (1985): Photosynthetic characteristics of phycoerythrin-containing marine *Synechococcus* spp. *Mar. Biol.* 86, 63-74.
- Barlow R.G., Alberte R.S. (1987): Photosynthetic characteristics of phycoerythrin-containing marine *Synechococcus* spp. II. Time course responses of photosynthesis to photoinhibition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 39, 191-196.
- Berman T. (1975): Size fractionation of natural aquatic populations associated with autotrophic and heterotrophic carbon uptake. *Mar. Biol.* 33, 215-220.
- Bienfang P.K., Takahashi M. (1983): Ultraplankton growth rates in a subtropical ecosystem. *Mar. Biol.* 76, 213-218.
- Børshheim K.Y., Bratbak G. (1987): Cell volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 36, 171-175.
- Børshheim K. Y., Harboe T., Johnsen T., Norland S., Nygaard K. (1989): Flow cytometric characterization and enumeration of *Chrysochromulina polylepis* during a bloom along the Norwegian coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 54, 307-309.
- Boucher N., Vaultot D., Partensky F. (1991): Flow cytometric determinations of phytoplankton DNA in cultures and oceanic populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71, 75-84.
- Brock T.D. (1978): Use of fluorescence microscopy for quantifying phytoplankton, especially filamentous blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 23, 158-160.
- Burkill P. H. (1987): Analytical flow cytometry and its application to marine microbial ecology. In: Sleight M. A.(ed.), *Microbes in the sea*, Ellis Herwood Ltd., 139-166.
- Burkill P.H., Leaky R.J.G., Owens N.J.P., Mantoura R.F.C. (im Druck): *Synechococcus* and its importance to the microbial foodweb of the northwest Indian Ocean. *Deep-Sea Res.*
- Caron D. A. (1983): Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Env. Microbiol.* 46, 491-498.

- Carr N.G., Wyman M. (1986): Cyanobacteria: their biology in relation to the oceanic picoplankton. In: Photosynthetic Picoplankton, Platt T., Li W.K.W. (eds.), Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 214, 159-204.
- Chisholm S. W., Olson R. J., Zettler E. R., Goericke R., Waterbury J. B., Welschmeyer N. A. (1988): A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340-343.
- Crumpton W.G. (1987): A simple and reliable method for making permanent mounts of phytoplankton for light and fluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* 32, 1154-1159.
- Daley R.J., Hobbie J.E. (1975): Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* 20, 875-882.
- Davis P.G., Caron D.A., Johnson P.W., Sieburth J.McN. (1985): Phototrophic and apochlorotic components of picoplankton and nanoplankton in the North Atlantic: geographic, vertical, seasonal and diel distributions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 21, 15-26.
- Davis P.G., Sieburth J.McN. (1982): Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton populations in marine waters by epifluorescence microscopy. *Ann. Inst. oceanogr. Paris* 58(s), 249-260.
- Dean P.H. (1990): Commercial instruments. In: Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L. (eds.), *Flow cytometry and sorting*, 2nd edition, Wiley-Liss, Inc., New York u.a., 171-186.
- Demers S., Davis K., Cucci T. L. (1989): A flow cytometric approach to assessing the environmental and physiological status of phytoplankton. *Cytometry* 10, 644-652.
- DeNoyelles Jr. F. (1968): A stained-organism filter technique for concentrating phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 13, 562-565.
- Detmer A., Trenkel V., Giesenhausen H., Jochem F.J. (Manuskript): Phototrophic and heterotrophic pico- and nanoplankton in anoxic depths of the Central Baltic Sea.
- Douglas D.J. (1984): Microautoradiography-based enumeration of photosynthetic picoplankton with estimates of carbon-specific growth rates. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 14, 223-228.
- Dubelaar G. B. J., Groenewegen A. C., Stokdijk W., van den Engh G. J., Visser J. W. M. (1989): Optical plankton analyser: a flow cytometer for plankton analysis, II: Specifications. *Cytometry* 10, 529-539.
- Dugdale D.J., Goering J.J. (1967): Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12, 196-206.
- Edler L. (1979): Phytoplankton succession in the Baltic Sea. *Acta Bot. Fennica* 110, 75-78.
- Elser J.J., Elser M.M., Carpenter S.R. (1986): Size fractionation of algal chlorophyll, carbon fixation and phosphatase activity: relationships with species-specific size distributions and zooplankton community structure. *J. Plankton Res.* 8, 365-383.
- Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy J.J. (1969): Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14, 912-920.

- Fogg, G.E. (1987): Marine planktonic cyanobacteria. In: Fay, P., Van Baalen G. (eds.), The cyanobacteria, Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 391-414.
- Fournier R.O. (1970): Studies on pigmented microorganisms from aphotic marine environments. *Limnol. Oceanogr.* 15, 675-682.
- Fournier R.O. (1971): Studies on pigmented microorganisms from aphotic marine environments. II. North Atlantic distribution. *Limnol. Oceanogr.* 16, 952-961.
- Frankel S.L., Binder B.J., Chisholm S.W., Shapiro H.M. (1990): A high-sensitivity flow cytometer for studying picoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 35, 1164-1169.
- Gabrielson J.O., Hamel K.S. (1985): Decomposition of the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Botan. mar.* 28, 23-27.
- Gallagher J.C., Wood A.M., Alberte R.S. (1984): Ecotypic differentiation in the marine diatom *Skeletonema costatum*: influence of light intensity on the photosynthetic apparatus. *Mar. Biol.* 82, 121-134.
- Galvao H.M. (1990): The role of nanoflagellates in the food web of a brackish water environment (Western Baltic). Dissertation, Universität Kiel, 95 Seiten.
- Gieskes W.W., Kraay G.W. (1983): Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic ocean revealed by HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.* 28, 757-766.
- Glibert P.M., Kana T.M., Olson R.J., Kirchman D.L., Alberte R.S. (1986): Clonal comparisons of growth and photosynthetic responses to nitrogen availability in marine *Synechococcus* spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 101, 199-208.
- Glover H.E., Campbell L., Prézelin B.B. (1986a): Contribution of *Synechococcus* ssp. to size-fractionated primary productivity in three water masses in the Northwest Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 91, 193-203.
- Glover H. E., Keller M. D., Guillard R. R. L. (1986b): Light quality and oceanic ultraphytoplankton. *Nature* 319, 142-143.
- Glover H.E., Morris I. (1981): Photosynthetic characteristics of coccoid marine cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 129, 42-46.
- Glover H.E., Phinney D.A., Yentsch C.S. (1985): Photosynthetic characteristics of picoplankton compared with those larger phytoplankton populations in various water masses in the Gulf of Maine. *Biol. Oceanogr.* 3, 223-248.
- Glover H.E., Prézelin B.B., Campbell L., Wyman M. (1988a): Pico- and ultraplankton Sargasso Sea communities: variability and comparative distributions of *Synechococcus* spp. and algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49, 127-139.
- Glover H. E., Prézelin B. B., Campbell L., Wyman M., Garside C. (1988b): A nitrate-dependent *Synechococcus* bloom in surface Sargasso Sea water. *Nature* 331, 161-163.
- Goldberg E.D., Baker M., Fox D.L. (1952): Microfiltration in oceanographic research. I. Marine sampling with the molecular filter. *J. Mar. Res.* 11, 194-204.

- Gradinger R., Lenz J. (1989): Picocyanobacteria in the high Arctic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 52, 99-101.
- Grasshoff K., Erhard M., Kremling K. (1983): *Methods of sea water analysis*, 2. erweiterte, überarbeitete Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 419 Seiten.
- Guillard R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smiths W.L., Chanley M.H. (eds.), *Culture of marine invertebrate animals*, Plenum Press, New York, 29-60.
- Guillard R.R.L., Murphy L.S., Foss P., Liaaen-Jensen S. (1985): *Synechococcus* spp. as likely zeaxanthin-dominant ultraphytoplankton in the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 30, 412-414.
- Haas L.W. (1982): Improved epifluorescence microscopy for observing planktonic microorganisms. *Ann. Inst. oceanogr.* 58, 261-266.
- Hagström A., Azam F., Andersson A., Wikner J., Rassoulzadegan F. (1988): Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49, 171-178.
- Hall J.A., Vincent W.F. (1990): Vertical and horizontal structure in the picoplankton communities of a coastal upwelling system. *Mar. Biol.* 106, 465-471.
- Hamilton R.D., Holm-Hansen O., Strickland J.D.H. (1968): Notes on the occurrence of living microscopic organisms in deep water. *Deep-Sea Res.* 15, 651-656.
- Harding L.W., Jr., Meeson B.W., Tyler M.A. (1983): Photoadaptation and diel periodicity of photosynthesis in the dinoflagellate *Prorocentrum mariae-lebouriae*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13, 73-85.
- Harrison W. G., Wood L. E. J. (1988): Inorganic nitrogen uptake by marine picoplankton: evidence for size partitioning. *Limnol. Oceanogr.* 33, 468-475.
- Herbland A., Le Bouteiller A., Raimbault P. (1985): Size structure of phytoplankton biomass in the equatorial Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 32, 819-836.
- Hewes C.D., Reid F.M.H., Holm-Hansen O. (1984): The quantitative analysis of nanoplankton: a study of methods. *J. Plankton Res.* 6, 601-613.
- Hilmer T., Bate G.C. (1989): Filter types, filtration and post-filtration treatment in phytoplankton production studies. *J. Plankton Res.* 11, 49-63.
- Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S. (1977): Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Env. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- Horan P.K., Muirhead K.A., Slezak S. (1990): Standards and controls in flow cytometry. In: Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L. (eds.), *Flow cytometry and sorting*, Wiley-Liss, New York u.a., 397-414.
- Horan P.K., Wheelless L.L., Jr. (1977): Quantitative single cell analysis and sorting. *Science* 198, 149-157.
- Howard K.M., Joint I.R. (1989): Physiological ecology of picoplankton in the North Sea. *Mar. Biol.* 102, 275-281.

- Huttunen M., Kuparinen J. (1986): Species succession and productivity of ultraphytoplankton in the pelagic off Tvärminne, SW Coast of Finland. *Ophelia* Suppl. 4, 73-83.
- Iturriaga R., Marra J. (1988): Temporal and spatial variability of chroococcoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. specific growth rates and their contribution to primary production in the Sargasso Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 175-181.
- Iturriaga R., Mitchell B.G. (1986): Chroococcoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28, 291-297.
- Jochem F. (1987): Zur Verbreitung und Bedeutung des autotrophen Ultraplanktons in der Kieler Bucht. Diplomarbeit, Universität Kiel, 127 Seiten.
- Jochem F. (1988): On the distribution and importance of cyanobacteria in a boreal inshore area (Kiel Bight, Western Baltic). *J. Plankt. Res.* 10, 1009-1022.
- Jochem F. (1989): Distribution and importance of autotrophic ultraplankton in a boreal inshore area (Kiel Bight, Western Baltic). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 53, 153-168.
- Jochem F. (1990a): Zur Struktur autotropher Ultraplankton-Gemeinschaften in marinen Warmwasser-Ökosystemen. Dissertation, Universität Kiel, 220 Seiten.
- Jochem F. (1990b): On the seasonal occurrence of autotrophic naked nanoflagellates in Kiel Bight, Western Baltic. *Est. Coast. Shelf Science* 31, 189-202.
- Jochem F.J., Pollehne F., Zeitzschel B. (im Druck): Productivity regime and phytoplankton size structure in the Arabian Sea. *Deep-Sea Res.*
- Jochem F.J., Zeitzschel B. (im Druck): Productivity and phytoplankton size structure in the tropical and subtropical North Atlantic in spring 1989. *Deep-Sea Res.*
- Johnson P. W., Sieburth J. McN. (1979): Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.* 24, 928-935.
- Johnson P.W., Sieburth J. McN. (1982): *In-situ* morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J. Phycol.* 18, 318-327.
- Joint I.R. (1986): Physiological ecology of picoplankton in various oceanographic provinces. In: Platt T., Li W.K.W., (eds.), 1986, *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214, 287-309.
- Joint I.R., Owens N.J.P., Pomroy A.J. (1986): Seasonal production of photosynthetic picoplankton and nanoplankton in the Celtic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28, 251-258.
- Joint I.R., Pipe R.K. (1984): An electron microscope study of a natural population of picoplankton from the Celtic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 20, 113-118.
- Joint I. R., Pomroy A. J. (1983): Production of picoplankton and small nanoplankton in the Celtic Sea. *Mar. Biol.* 77, 19-27.
- Kachel V., Messerschmidt R., Hummel P. (1990): Eight-parameter PC-AT based flow cytometric data system. *Cytometry* 11, 805-812.

- Kana T.M., Glibert P.M. (1987a): Effect of irradiance up to $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803- I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep-Sea Res.* 34, 479-495.
- Kana T.M., Glibert P.M. (1987b): Effect of irradiance up to $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803- II. Photosynthetic responses and mechanisms. *Deep-Sea Res.* 34, 497-516.
- Krempin D.W., Sullivan C.W. (1981): The seasonal abundance, vertical distribution, and relative biomass of chroococcoid cyanobacteria at a station in southern California coastal waters. *Can. J. Microbiol.* 27, 1341-1344.
- Kuosa H. (1988): Occurrence of autotrophic picoplankton along an open sea - inner archipelago gradient in the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Ophelia* 28, 85-93.
- Kuparinen J. (1984): Annual and seasonal fluctuation of primary productivity and overall respiration in a pelagic plankton community off Tvärminne, SW Coast of Finland. *Ophelia Suppl.* 3, 111-122.
- Kursar T.A., Swift H., Alberte R.S. (1981): Morphology of a novel cyanobacterium and characterization of light harvesting complexes from it: implications for phycobilliprotein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6888-6892.
- Larsson U., Hagström A. (1982): Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.* 67, 57-70.
- Legendre L., Demers S., Yentsch C.M., Yentsch C.S. (1983): The ^{14}C method: patterns of dark CO_2 fixation and DCMU correction to replace the dark bottle. *Limnol. Oceanogr.* 28, 996-1003.
- Legner M. (1990): Phytoplankton quantity assessment by means of flow cytometry. *Mar. Micr. Food Webs* 4, 161-174.
- Li W.K.W. (1986): Experimental approaches to field measurements: methods and interpretation. In: Platt T., Li W.K.W., (eds.), 1986, *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214, 251-286.
- Li W.K.W. (1989): Shipboard analytical flow cytometry of oceanic ultraphytoplankton. *Cytometry* 10, 564-579.
- Li W. K. W., Subba Rao D. V., Harrison W. G., Smith J. C., Cullen J. J., Irwin B., Platt T. (1983): Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science* 219, 292-295.
- Li W.K.W., Wood A.M. (1988): Vertical distribution of North Atlantic ultraphytoplankton: analysis by flow cytometer and epifluorescence microscopy. *Deep-Sea Res.* 35, 1615-1638.
- Lochte K., Turley C.M. (1988): Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea. *Nature* 333, 67-69.
- Lorenzen C.J. (1981): Chlorophyll *b* in the eastern North Pacific Ocean. *Deep-Sea Res.* 28, 1049-1056.

- Malone T.C. (1971): The relative importance of nanoplankton and netplankton as primary producers in tropical oceanic and neritic phytoplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 16, 633-639.
- Martinussen I., Thingstad T.F. (1991): A simple double staining technique for simultaneous quantification of auto- and heterotrophic nano- and picoplankton. *Mar. Micr. Food Webs* 5, 5-11.
- McCarthy J.J. (1980): Nitrogen. In: Morris I. (ed.), *The physiological ecology of phytoplankton*, Blackwell Scientific, Oxford, 191-233.
- McCarthy J.J., Taylor W.R., Loftus M.E. (1974): Significance of nanoplankton in the Chesapeake Bay Estuary and problems associated with the measurement of nanoplankton productivity. *Mar. Biol.* 24, 7-16.
- Melamed M.R., Mullaney O.L., Shapiro H.M. (1990): An historical review of the development of flow cytometers and sorters. In: Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L. (eds.), *Flow cytometry and sorting*, Wiley-Liss, New York, 1-9.
- Mitsui A., Kumazawa S., Takahashi A., Ikemoto H., Cao S., Arai T. (1986): Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323, 720-722.
- Moigis A.G. (1983): Zur Größenstruktur und Ökologie des Phytoplanktons in der Kieler Bucht unter dem besonderen Aspekt einer möglichen Ölverschmutzung. Dissertation, Universität Kiel, 171 Seiten.
- Moldavan A. (1934): Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 80, 188-189.
- Morris I., Glover H. (1981): Physiology of photosynthesis by marine coccoid cyanobacteria- some ecological implications. *Limnol. Oceanogr.* 26, 957-961.
- Murphy L. S., Haugen E. M. (1985): The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 30, 47-58.
- Olson R.J., Chisholm S.W., Zettler E.R., Altabet M.A., Dusenberry J.A. (1990a): Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 37, 1033-1051.
- Olson R. J., Chisholm S. W., Zettler E. R., Armbrust E. V. (1988): Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep-Sea Res.* 35, 425-440.
- Olson R.J., Chisholm S.W., Zettler E.R., Armbrust E.V. (1990b): Pigment, size, and distribution of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnol. Oceanogr.* 35, 45-58.
- Olson R. J., Frankel S. L., Chisholm S. W., Shapiro H. M. (1983): An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: chlorophyll and DNA distributions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68, 129-144.
- Olson R. J., Vaultot D., Chisholm S.W. (1985): Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res.* 32, 1273-1280.

- Olson R.J., Zettler E.R., Anderson O.K. (1989): Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry* 10, 363-643.
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z., Crissman H.A. (eds.), *Flow Cytometry, Methods in Cell Biology* 33, 105-110.
- Parsons T.R., Takahashi M., Hargrave B. (1984): *Biological oceanographic processes*, 3. Auflage, Pergamon Press, Oxford u. a., 330 Seiten.
- Perry M.J., Talbot M.C., Alberte R.S. (1981): Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar. Biol.* 62, 91-101.
- Phinney D. A., Cucci T. L. (1989): Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry* 10, 511-521.
- Phlips E.J., Zeman C., Hansen P. (1989): Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). *J. Appl. Phycol.* 1, 137-145.
- Platt T. (1989): Flow cytometry in oceanography. *Cytometry* 10, 500.
- Platt T., Subba Rao D.V., Irwin B. (1983a): Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature* 301, 702-704.
- Platt T., Subba Rao D.V., Smith J.C., Irwin B., Horne E.P.W., Sameoto D.D. (1983b): Photosynthetically-competent phytoplankton from the aphotic zone of the deep ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 105-110.
- Porter K. G., Feig Y. S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- Prézelin B.B., Putt M., Glover H.E. (1986): Diurnal patterns in photosynthetic capacity and depth dependent photosynthesis-irradiance relationship in *Synechococcus* spp. and larger phytoplankton in three water masses in the Northwest Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 91, 205-217.
- Reid F.M.H. (1983): Biomass estimation of components of the marine nanoplankton and picoplankton by the Utermöhl settling technique. *J. Plankton Res.* 5, 235-252.
- Rippka R. (1972): Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 87, 93-98.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- Rivkin R.B., Seliger H.H., Swift E., Biggley W.H. (1982): Light-shade adaptation by the oceanic dinoflagellates *Pyrocystis noctiluca* and *P. fusiformes*. *Mar. Biol.* 68, 181-191.
- Scharenberg N. (1991): Zur Bedeutung des autotrophen Ultraplanktons in der sommerlichen Ostsee. Diplomarbeit, Universität Kiel, 104 Seiten.

- Schlegel H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 6. überarbeitete Auflage, 571 Seiten.
- Sen Gupta R. (1972): Photosynthetic production and its regulating factors in the Baltic Sea. *Mar. Biol.* 17, 82-92.
- Sheldon R.W. (1972): Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters. *Limnol. Oceanogr.* 17, 494-498.
- Sheldon R.W., Evelyn T.P.T., Parsons T.R. (1967): On the occurrence and formation of small particles in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 12, 367-375.
- Sheldon R. W., Prakash A., Sutcliffe W. H., Jr. (1972): The size distribution of particles in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 17, 327-340.
- Sheldon R.W., Sutcliffe W.H., Jr. (1969): Retention of marine particles by screens and filters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 441-444.
- Sieburth J. McN., Smetacek V., Lenz J. (1978): Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256-1263.
- Silver M.W., Alldredge A.L. (1981): Bathypelagic marine snow: deep-sea algal and detrital community. *J. Mar. Res.* 39, 501-530.
- Silver M.W., Gowing M.M. (1986): The association of photosynthetic picoplankton and ultraplankton with pelagic detritus through the water column (0-2000 m). In: Platt T., Li W.K.W., (eds.), 1986, *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214, 311-341.
- Smetacek V. (1975): Die Sukzession des Phytoplanktons in der westlichen Kieler Bucht. Dissertation, Universität Kiel, 151 Seiten.
- Smetacek V., Bodungen B.v., Knoppers B., Peinert R., Pollehne F., Stegmann P., Zeitzschel B. (1984): Seasonal stages characterizing the annual cycle of an inshore pelagic system. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.* 183, 117-140.
- Sörensson F., Sahlsten E. (1987): Nitrogen dynamics of a cyanobacteria bloom in the Baltic Sea: new versus regenerated production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37, 277-284.
- Steeman Nielsen E. (1952): The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. int. Explor. Mer.* 18, 117-140.
- Steen H.B. (1990): Characteristics of flow cytometers. In: Melamed M.R., Lindmo T, Mendelsohn M.L. (eds.), *Flow cytometry and sorting*, Wiley-Liss, New York, 11-25.
- Stockner J.G., Antia N.J. (1986): Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 2472-2503.
- Takahashi M., Bienfang P.K. (1983): Size structure of phytoplankton biomass and photosynthesis in subtropical Hawaiian waters. *Mar. Biol.* 76, 203-211.
- Takahashi M., Hori T. (1984): Abundance of picophytoplankton in the subsurface chlorophyll maximum layer in subtropical and tropical waters. *Mar. Biol.* 79, 177-186.

- Takahashi M., Kikuchi K., Hara Y. (1985): Importance of picocyanobacteria biomass (unicellular, blue-green algae) in the phytoplankton population of the coastal waters off Japan. *Mar. Biol.* 89, 63-69.
- Thingstad T. F. (1987): Analyzing the microbial loop. Dissertation, Universität Bergen, 58 Seiten.
- Thronsen J. (1978): Productivity and abundance of ultra- and nanoplankton in Oslofjorden. *Sarsia* 63, 271-284.
- Thronsen J. (1979): The significance of ultraplankton in marine primary production. *Acta Bot. Fennica* 110, 53-56.
- Tsuji T., Yanagita T. (1981): Improved fluorescent microscopy for measuring the standing stock of phytoplankton including fragile components. *Mar. Biol.* 64, 207-211.
- Vaulot D., Courties C., Partensky F. (1989): A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* 10, 629-635.
- Veldhuis M.J.W., Kraay G.W. (1990): Vertical distribution and pigment composition of a picoplanktonic prochlorophyte in the subtropical North Atlantic: a combine study of HPLC-analysis of pigments and flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68, 121-127.
- Venrick E.L. (1978): How many cells to count? In: Sournia A. (ed.) *Phytoplankton Manual, Monographs of oceanographic methodology* 6, 167-180.
- Vierling E., Alberte R.S. (1980): Functional organization and plasticity of the photosynthetic unit of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.* 50, 93-98.
- Waterbury J.B., Watson S.W., Guillard R.R.L., Brand L.E. (1979): Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* 277, 293-294.
- Waterbury J.B., Watson S.W., Valois F.W., Franks D.G. (1986): Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In: Platt T., Li W.K.W. (eds.), 1986, *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214, 71-120.
- Watson S.W., Novitsky T.J., Quinby H.L., Valois F.W. (1977): Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Env. Microbiol.* 33, 940-946.
- Wood A.M. (1985): Adaptation of photosynthetic apparatus of marine ultraphytoplankton to natural light fields. *Nature* 316, 253-255.
- Wyman M., Grgory R. P. F., Carr N.G. (1985): Novel role for phycoerythrin in a marine cyanobacterium. *Science* 230, 818-820.
- Yeh S.W., Ong L., Glazer A.N. (1986): Role of phycoerythrin in marine picoplankton *Synechococcus* spp. *Science* 234, 1422-1423.
- Yentsch C.M., Campbell J.W. (1991): Phytoplankton growth: perspectives gained by flow cytometry. *J. Plankton Res.* 13, 83-108.

Yentsch C.M., Horan P.K. (1989): Cytometry in the aquatic sciences. *Cytometry* 10, 497-499.

Yunev O.A., Saldan N.V., Finenko Z.Z., Zenin V.V., Babich I.I. (1990): Analysis of Black Sea phytoplankton by flow cytometry. *Oceanology* 30, 377-382.

Zimmermann R., Meyer-Reil L.A. (1974): A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforschung* 30, 24-27.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich mit der Einstellung dieser Arbeit in die Fachbibliothek des Biologiezentrums bzw. des Instituts für Meereskunde* an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel einverstanden bin.

Kiel, 02.02.'92

A. Debus

* sowie der Universitätsbibliothek