

# Copyright ©

---

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift 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 Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

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.

## Zytologische Methoden zur Untersuchung von Phytoplanktonpopulationen in ihrem natürlichen Lebensraum<sup>1)2)</sup>

VON JENS B. DERENBACH

**Zusammenfassung:** Aus der Literatur und einer eigenen Arbeit leitet sich die Annahme dafür ab, daß noch homogen sich ausnehmende Planktonpopulationen bezüglich des physiologischen Zustandes einzelner Organismen eine starke Variabilität besitzen. Daraus entstehen Schwierigkeiten für jede produktionsbiologische Analyse, zumal bislang ausschließlich summarische Untersuchungsmethoden Anwendung finden. Diese Differenz zwischen den erhaltenen Meßwerten und ihrer postulierten Prägnanz erfährt noch eine erhebliche Zunahme, wenn die Untersuchung auf normalerweise inhomogene natürliche Planktongemeinschaften ausgedehnt wird. Eine Kombination summarischer und zytologischer Methoden kann solchen Schwierigkeiten wirksam begegnen, ohne den Arbeitsaufwand unangemessen zu steigern.

Gesucht wird nach adäquaten zytologischen Methoden. Ihrer hohen Empfindlichkeit und einfachen Handhabung zufolge erscheinen fluorometrische Nachweise besonders geeignet. Hier wird die Primärfluoreszenz des Chlorophylls und die durch Berberinsulfat und Primulin induzierte Sekundärfluoreszenz ausgewertet. Damit gelingt eine visuelle Einteilung der Phytoplanktonorganismen in Kategorien je nach Chlorophyllgehalt, Nukleinsäuregehalt und Lebendzustand.

Zusammenfassend wird über Aussagemöglichkeiten fluorometrischer Analysen im Bereich der Planktonkunde berichtet. Außerdem wird ihre hierfür notwendige, mechanisierte Durchführung projiziert.

**Cytological methods for studying phytoplankton populations in natural environments (Summary):** Relevant literature and the author's own research support the assumption that apparently homogeneous plankton communities are subject to marked variability with regard to the physiological condition of individual organisms. This gives rise to difficulties when conducting analyses for productivity, as only integrating methods have hitherto been in use. The difference between the obtained values and their postulated precision becomes even greater when the investigation is extended to include normally heterogeneous natural plankton communities. A combination of integrating and cytological methods can effectively overcome such difficulties without involving an unreasonably greater expenditure of time and labour.

Adequate cytological methods are searched for. By reason of their high sensitivity and convenience, fluorometric methods are particularly suitable. Here the primary fluorescence of chlorophyll and the secondary fluorescence induced by berberine sulphate and primulin are employed. Thus a visual separation of phytoplankton organisms into categories according to chlorophyll content, nucleic acid content and living state becomes feasible.

The possibilities opened by more quantitative fluorometric analyses are shortly summarized. Moreover, a mechanisation of these analysis methods, so essential to planktology, is projected.

### Einleitung

Das Anwenden zytologischer Methoden in dem ohnehin wenig einheitlichen Arbeitsbereich der Planktonkunde stützt sich nicht auf den Glauben, mit der Übernahme bislang fremder Arbeitsweisen sei schon zwangsläufig eine Präzisierung der Ergebnisse verbunden. Vielmehr glaubt der Verfasser nachweisen zu können, daß zytologische Methoden für ein exaktes Auswerten des Probenmaterials unerläßlich sind.

---

<sup>1)</sup> Teil einer Dissertation.

<sup>2)</sup> Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

## 1. Bestandsanalyse an gemischten Planktonpopulationen

Die erste Überlegung, Phytoplanktonuntersuchungen bis auf den zytochemisch definierten Zustand der einzelnen Zellen auszudehnen, leitet sich aus der mangelnden Prägnanz summarisch-chemisch bestimmter Parameter ab. Diese Unzulänglichkeit wird besonders augenfällig dann, wenn summarisch-chemische Analysen dazu benutzt werden, eine Planktonpopulation — bestehend aus mehreren Phytoplanktonarten oder bestehend aus Phytoplankton und Zooplankton — eindeutig zu beschreiben.

Wie über die chemische Zusammensetzung einiger Phytoplanktonarten bekannt ist, variieren die einzelnen Komponenten bei einem Vergleich der Arten untereinander in erheblichem Maße (PARSONS, STEPHENS, STRICKLAND 1961; PARSONS 1961; LEWIN, GUILLARD 1963; KATES 1966; MADGWICK 1966; EPPLEY, HOLMES, PAASCHE 1967; RILEY, WILSON 1967). Dieser artbedingte, unterschiedliche chemische Aufbau gilt in gleichem Maße auch für das Zooplankton (BEERS 1966). Zusätzlich berücksichtigt werden müssen bei der Auswertung der Analysen alle jene Faktoren, die die Zusammensetzung außerdem bestimmen: das Alter der Population und der im Entwicklungszyklus der Individuen erreichte Abschnitt (IWAMURA et al. 1955; KORNMANN 1955; SOEDER 1965; BROWN 1966; JAMES 1966; SCHMIDT 1966; FRENCH 1967); die Tageszeit, die Intensität und spektrale Zusammensetzung der gebotenen Beleuchtung (DOTY, OGURI 1957; WANKA 1962; ANSELL et al. 1963; PIRSON, KOWALLIK 1964; KOWALLIK 1965; BROWN 1966; EPPLEY, COATSWORTH 1966; SENGER, BISHOP 1966; SCHMIDT 1966; DEIMLING, MOHR 1967; WANKA 1967); die Beschaffenheit des Mediums (MCALLISTER et al. 1961; MENZEL, RYTHER 1961; STEELE, BAIRD 1962; ANTIA et al. 1963; MENZEL et al. 1963; LEWIN, GUILLARD 1963; GOLDMAN 1965; WERNER 1966; EPPLEY 1968; HAYWARD 1968; DERENBACH 1969; SCHÖNE 1969; STRICKLAND et al. 1969). Aufgrund der üblicherweise durchgeführten summarisch-chemischen Analysen allein scheint deshalb eine exakte Aussage nur über die produktionsbiologische Basis, den Bestand, kaum mehr zulässig zu sein.

Die beschriebenen Schwierigkeiten werden bei Kulturexperimenten durch die Arbeit mit Monokulturen weitgehend vermieden. Bei Untersuchungen im natürlichen Lebensraum des Planktons dagegen lassen sie sich nur mit Hilfe geeigneter Methoden vermindern. Einige Möglichkeiten seien kurz betrachtet.

Fraktionierendes Aussieben: Nur im ersten Augenblick mag es scheinen, als ließen sich so gleiche Ausgangsbedingungen für die Analysen erreichen wie in Monokulturen. Offensichtliche Nachteile dieser Methode sind die möglichen Größendifferenzen innerhalb einer Art und die im Vergleich dazu oft nur geringen Größendifferenzen der Planktonarten untereinander. Das bedeutet geringe Aussicht auf quantitative Resultate; ferner die mit der Zahl der Fraktionen zu multiplizierende Analysenzahl und vor allem die meist geringen zur Verfügung stehenden Planktonmengen, sofern nicht für quantitative Arbeiten an dem gesamten Planktonbestand die ohnehin wenig geeigneten Netzfänge verwendet werden. Auch ein chromatographisches Trennen der Zellen liefert kein befriedigendes Ergebnis (KOROZUMI, ITOH, SHIBATA 1965). Das heißt, die benötigten produktionsbiologischen Meßwerte müssen aus Wasserproben mit Mischplankton direkt gewonnen werden. — Diesen Wasserproben für den vorliegenden Zweck praktisch gleichzusetzen, ist die aus der Probe herausfiltrierte partikuläre Substanz.

Auch ein Vervielfachen der zu messenden chemischen Komponenten ermöglicht noch keine detaillierte Aussage über produktionsbiologische Verhältnisse in Mischpopulationen. Abgesehen von dem damit verbundenen starken Anwachsen der durchzuführenden Analysen, sind keine für Art und Zustand spezifischen chemischen Parameter bekannt. Zwar trägt die heutzutage gebräuchliche kombinierte Planktonanalyse — Erfassen von Zellzahlen und einigen chemischen Komponenten — zur weiteren Präzi-

sierung der Resultate bei; dennoch gestattet sie nur einen indirekten Schluß (DERENBACH 1969) auf den physiologisch zu kennzeichnenden Bestand, sofern die einzelnen vorkommenden Arten berücksichtigt werden sollen.

Das angestrebte Ziel der differenzierenden Analyse an Mischpopulationen wäre dann erreicht, wenn die Unsicherheit des indirekten Schlusses weitgehend durch die Sicherheit einer direkten Bestimmung ersetzt werden könnte. Eine solche Bestimmung durchzuführen, ist durch das Auswerten des gemessenen zytochemischen Zustandes der einzelnen Zellen möglich. Allerdings, alle nur auf zytologische Methoden sich stützenden Untersuchungen würden einen so umfangreichen Arbeitseinsatz zur Voraussetzung haben, daß schließlich eine Kombination zytologischer Methoden mit der herkömmlichen Arbeitsweise (Zellzählungen und Messen summarisch-chemischer Komponenten) als Lösung sich anbietet.

## 2. Indirekte, aber spezifizierte Produktionsmessung

Die Einwände gegen summarische Bestandsaufnahmen gelten in analoger Weise auch für gleichermaßen angelegte Produktionsmessungen, also für Isotopentechniken oder direkte Registrierungen energetischer Parameter im Probenwasser. Doch ist für die Produktion bislang kein Ausweg sichtbar, der wie für den Bestand auch hier zuverlässig über eine summarische Bestimmung hinausführt; denn weder erlaubt die Empfindlichkeit bekannter Methoden eine Untersuchung einzelner Zellen, noch bietet sich durch den stereotypen Ablauf energetischer Umsetzungen in den Organismen bisher irgend ein Differenzierungsmerkmal an. Parallel zu herkömmlichen Produktionsmessungen ist deshalb mit der nötigen Behutsamkeit der Interpretation vielleicht ein indirekter Maßstab für die ins einzelne gehende Produktionsanalyse anwendbar, nämlich der an Hand zytologischer Kriterien festgestellte physiologische Zustand einzelner Organismen. Unter Berücksichtigung der Umweltfaktoren erscheint auch so der Schluß auf die Produktion zulässig; dies mit um so größerer Berechtigung, da von bestimmten zytologischen Kriterien sogar Aufschluß über das Produktionspotential erwartet werden darf.

Noch ein weiterer Grund spricht für diese indirekte Bestimmung: Die bei direkter Produktionsmessung methodisch bedingte Milieuänderung führt in der Probe einer natürlichen Population zu nicht unerheblichen Änderungen von den am natürlichen Standort gegebenen Meßwerten, denn es wird ja eine Reaktion der Organismen auf bestimmte Umwelteinflüsse registriert. Möglicherweise ist auch deshalb das Erfassen des zytochemischen Zustandes einzelner Zellen derselben Probe geeignete Basis für die Produktionsbestimmung, da sich ein Großteil der chemisch meßbaren Komponenten vermutlich nur langsam den veränderten Umwelteinflüssen anpaßt. Dem Einwand, der Schluß von chemisch gemessenen Komponenten auf eine Reaktion der Organismen sei aus eben diesem Grunde nicht zulässig, kann entgegengehalten werden, daß als Regel in situ die Konstitution der Organismen mit der Mehrzahl ihrer Reaktionen als korreliert angenommen werden darf.

## 3. Physiologische Patchiness

Nach der bisher unternommenen Rechtfertigung zytologischer Methoden im Zusammenhang mit herkömmlichen Untersuchungstechniken soll kurz zusammengefaßt werden, welchen Differenzierungsgrad zytologische Analysen an Planktonpopulationen erreichen können und, obwohl solche Analysen in erster Linie auf den Bestand zielen, welche Beziehungen zur Produktion damit erstmals messend verfolgt werden können.

Werden beispielsweise Ergebnisse von Fütterungsexperimenten auf das freie Wasser übertragen, dann verursacht die unregelmäßige Verteilung der Organismen in ihrem natürlichen Lebensraum eine erhebliche Unsicherheit bei der Berechnung der Verhältnisse zwischen Produzenten und Konsumenten. Diese Unsicherheit jeder Produktionsanalyse durch Phänomene der Patchiness wurde auf dem „Symposium on marine food chains“ im Juli 1968 in Aarhus (Dänemark) deutlich (z. B. DICKIE und PALOHEIMO; PARSONS und LEBRASSEUR); Professor Hempel formulierte im Verlaufe der Abschlußbesprechung den Wunsch zu Kontrollen über die Einflüsse der Patchiness. Wie von TAUB und DOLLAR (1968) als Ergebnis von Kulturexperimenten aufgeführt, müßte ferner — das ist auch in Aarhus weitgehend unberücksichtigt geblieben — der physiologische Zustand der von den Konsumenten verwerteten Organismen in die produktionsbiologische Betrachtung einbezogen werden. Das gilt in besonderem Maße für Produktionsanalysen im freien Wasser; denn daß sich der physiologische Zustand der Primärproduzenten in ihrer Gesamtheit beispielsweise mit der Beschaffenheit des Mediums und dem Alter der Population ändert, dafür lassen sich unschwer noch mehr als die eingangs angeführten Zitate herbeischaffen. Hingegen liegt noch keine Information vor über den Zustand oder die Zustandsänderung einzelner Individuen im Rahmen ihrer Gesellschaft und im Verlaufe ihres Auftretens. Wenn sich aber Heterogenität und Variabilität im natürlichen Lebensraum des Planktons in einer unregelmäßigen Verteilung der Organismen manifestieren, dann darf auch eine Ungleichförmigkeit ihres physiologischen Zustandes als nicht unbegründet vermutet werden (man vergleiche DERENBACH 1969).

Da sich das Wort Patchiness zur Kennzeichnung für die Unregelmäßigkeit in der Verteilung der Planktonorganismen eingebürgert hat, sollte dieser Begriff auch auf die Unregelmäßigkeit im physiologischen Zustand Anwendung finden; handelt es sich doch um ein Phänomen vermutlich gleicher Ursache. Bevor der Begriff Patchiness aber hierfür benutzbar wird, bedarf seine Definition einer Präzisierung. Bisher wurde die Patchiness ausschließlich verstanden als Beschreibung für die unregelmäßige Verteilung der Organismen im Raum. Stattdessen soll zwischen zwei grundsätzlich verschiedenen Formen der Patchiness unterschieden werden:

- a) einer Patchiness, die sich nur auf Anzahl und Verteilung der Individuen bezieht (numerische Patchiness) und
- b) einer Patchiness, die allein die Verschiedenartigkeit im physiologischen Zustand der Organismen in Bezug auf ihre räumliche Anordnung betrifft (physiologische Patchiness).

Die Frage, wieweit beide Formen der Patchiness einander bedingen, kann erst das Resultat zytologischer Untersuchungen an Planktonpopulationen beantworten. Aber die Antwort darf erwartet werden mit der gleichen Sicherheit, wie diese Form der Untersuchung auch den Begriff physiologische Patchiness mit konkretem Inhalt zu füllen vermag; das bedeutet z. B. differenzierenden Einblick in die Populationsdynamik freilebender Planktonorganismen oder in die Schmutzwassereinflüsse auf Planktongemeinschaften in natürlichen inhomogenen Medien.

#### 4. Aufgabenstellung und Arbeitsgerät

Für die Diagnose des physiologischen Zustandes einzelner Planktonorganismen, hier Phytoplanktonzellen, scheinen aus der Vielzahl zytologischer Techniken die fluoreszenzmikroskopischen Methoden besonders geeignet zu sein. Sie gestatten empfindliche Analysen auch größerer Probenmengen in relativ kurzer Zeit. Berücksichtigt werden soll

die Primärfluoreszenz, außerdem die durch Fluorochrome induzierte Sekundärfluoreszenz. Ziel der Untersuchung ist das Verbessern und Entwickeln geeigneter Methoden.

Das zur Verfügung stehende Arbeitsgerät war ein zum Fluoreszenzmikroskop umgerüstetes Standard-WL-Mikroskop (Fa. Zeiss) mit Neofluaren und einem Kondensor der numerischen Apertur 1,3. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200<sup>1)</sup>.

## Ergebnisse und Diskussion

### 1. Untersuchungsmethode auf Grund der Primärfluoreszenz des Chlorophylls

Die Primärfluoreszenz assimilierender Organismen bezieht sich im wesentlichen auf die der Chloroplasten. Die fluoreszierende Substanz ist das Chlorophyll. Diese Eigenschaft des Chlorophylls ist praktisch seit Beginn der Fluoreszenzmikroskopie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (zusammenfassende Darstellung bei HAITINGER 1959, STRUGGER 1949, PRICE und SCHWARZ 1956). In neuerer Zeit haben WOOD (1956), WOOD und OPPENHEIMER (1962) und WOOD (1962) auf einige Möglichkeiten hingewiesen, die Primärfluoreszenz des Chlorophylls für mikroskopische Beobachtungen am Phytoplankton heranzuziehen. ODUM (1968) übernimmt diese Methoden zur Untersuchung des Mageninhaltes von Phytoplankton fressenden Fischen. Schließlich ebenfalls auf der Fluoreszenz des Chlorophylls und seiner Abbauprodukte beruhen empfindliche summarische Chlorophyllbestimmungsmethoden (YENTSCH, MENZEL 1963; HOLM-HANSEN et al. 1965; LORENZEN 1965; YENTSCH 1965a).

Für die Fluoreszenz der Chlorophylle liegt die optimale Wellenlänge des dafür benötigten Erregerlichtes zwischen 390 und 470 nm, das Maximum des emittierten Lichtes zwischen 650 und 670 nm (YENTSCH, MENZEL 1963; SAJO, NISHIZAWA 1969). Im Mikroskop bemerkbare Abweichungen bei der Betrachtung lebender Organismen von diesen an Azetonlösungen gefundenen Werten sind nicht zu erwarten (FRENCH 1960; THOMAS, FLIGHT 1964).

Aus dem Spektrum der Quecksilber-Höchstdrucklampe werden deshalb die bei 365, 405 und 435 nm liegenden Maxima genutzt (Erregerfilter BG 38, BG 12 und Sperrfilter 53 und 44). Dem Betrachter der Planktonprobe zeigt sich dabei folgendes Bild: Von einem tiefolivengrünen Untergrund heben sich deutlich ab die leuchtend rot fluoreszierenden Chloroplasten der Phytoplankter. Bei genauer Analyse läßt sich außerdem an den gleichen Objekten manchmal eine geringe, von den Chloroplasten beinahe gänzlich überstrahlte Grünfluoreszenz des Plasmas entdecken (Zelltyp I). Auffallend sichtbar werden kann diese Grünfluoreszenz bei Zooplanktern. Neben diesen beiden leuchtintensiven Bildern finden sich mit Übergängen noch zwei weitere, weniger farbkräftige. Zunächst Phytoplankter mit anscheinend unverändertem Zellinhalt und auch in Form und Anordnung annähernd normal lokalisierten Chloroplasten; jedoch ist bei ihnen die Fluoreszenz des Chlorophylls oft bis auf einen tiefweinroten Schimmer der Grünfluoreszenz des Plasmas gewichen (Zelltyp II). Ferner lassen sich Phytoplankter erkennen, deren Zellinhalte stark geschrumpft, flockig oder klumpig sind; ihre Fluoreszenzfarbe ist grünlich bis bräunlich (ebenfalls die Fluoreszenzfarbe schon länger abgetöteter Zooplankter), häufig mit einem geringen, oft wenig abgegrenzten Weinrot oder Orange (Zelltyp III).

Nach Versuchen mit fixiertem Phytoplankton, bei dem spätestens 24 Stunden nach unterschiedlicher Behandlung keine Fluoreszenz des Chlorophylls mehr zu beobachten

<sup>1)</sup> Das Gerät wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt.

war, schlugen WOOD und OPPENHEIMER (1962) vor, die Primärfluoreszenz des Chlorophylls als Kriterium für den Lebenszustand des Phytoplanktons zu verwenden. So einfach die Methode für eine solche Differenzierung in der Handhabung wäre, den natürlichen Gegebenheiten wird sie kaum gerecht. Selbst unter der Annahme, die Fluoreszenzintensität des Chlorophylls wäre seiner Konzentration direkt proportional (Zusammenfassung der diesbezüglich existierenden Auffassungen bei FRENCH 1960; man vergleiche auch STRICKLAND 1968), ist keine Einordnung der oft zu beobachtenden Zellen mit vergleichsweise mäßiger Chlorophyllfluoreszenz möglich: Handelt es sich dabei um lebende Zellen mit geringem Pigmentgehalt oder um tote Zellen mit teilweise abgebauten Pigment? Diese Frage ist um so eher berechtigt, da als nachgewiesen gelten darf, daß der Chlorophyllgehalt vermutlich lebender Phytoplankter erheblich (YENTSCH, SCAGEL 1958; STEELE, BAIRD 1962; ANTIA et al. 1963; CASTELVI 1963; McALLISTER et al. 1964; MATTERNE 1968; DERENBACH 1969), bis um das Mehrfache seines Betrages (YENTSCH, RYTHER 1957; HUMPHREY 1963) schwanken kann. Außerdem scheint es fraglich zu sein, ob der Abbau des Chlorophylls bis zum nicht fluoreszierenden Baustein in situ wirklich so schnell vonstatten geht; denn entgegen den erwähnten Beobachtungen von WOOD und OPPENHEIMER konnte eine deutliche Chlorophyllfluoreszenz an fixiertem Phytoplankton über mehrere Tage hindurch festgestellt werden:

Das mit einem 56  $\mu$ -Netz in der Kieler Förde gesammelte Phytoplankton (*Skeletonema costatum* GREV.; *Ceratium tripos* MÜLLER; *Ceratium fusus* EHR.; *Thalassiotrix nitzioides* GRUN. *Nitzschia seriata* CLEVE) wurde in einigen Millilitern Ostseewasser resuspendiert und in drei gleiche Teile geteilt. Anschließend wurde das Plankton der Suspensionen auf verschiedene Weise fixiert:

- a) durch Erhitzen auf ca. 95° C über eine Minute.
- b) durch Zugabe von Formaldehyd (Herstellen einer 5%-iger Lösung).
- c) durch zweimaliges Ausfrieren bei Temperaturen um — 10° C.

Von jeder der drei Suspensionen wurden daraufhin in vier Zentrifugengläser jeweils wenige Millimeter abgefüllt. In zwei Zentrifugengläsern wurden die Suspensionen dabei mit SÖRENSEN-Phosphatpuffer auf pH 7 gepuffert und in je einem der mit gepufferten oder ungepufferten Suspension gefüllten Zentrifugengläser wurden mögliche Bakterieneinflüsse durch Penicillingaben (1000 u. i. per ml; man vergleiche MATTERNE 1968) unterbunden. Dieser Arbeitsgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, so daß schließlich drei gleichartige Sätze unterschiedlich vorbehandelter Plankton suspension zur Verfügung standen, die von einander abweichenden Hälterungsbedingungen ausgesetzt werden konnten. Diese waren:

- a) Beleuchtung mit einer 100 Watt-Osram-Glühbirne vom Typ D bei Temperaturen um 20° C.
- b) dämmerige Zimmerbeleuchtung bei Temperaturen um 20° C.
- c) Lichtabschluß bei Temperaturen um 6° C.

Der Chlorophyllabbau in den einzelnen Proben wurde an Hand der mikroskopisch beobachteten Chlorophyllfluoreszenz kleiner Teilproben in Zeitabständen von einem bis zu mehreren Tagen untersucht. Die Beobachtungsergebnisse sind in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführt. Zur Erläuterung ist dabei vorzuschicken:

1. Erwartungsgemäß beeinflusst das Fixieren die Bindung des Chlorophylls. Die Hitze-fixation bewirkt eine diffus in der ganzen Zelle verteilte Chlorophyllfluoreszenz; die Farbe besitzt eine orange getönte Komponente, die im weiteren Verlauf des Versuchs

Tabelle 1  
 Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz fixierter Phytoplankter  
 (Hälterung bei andauernder Beleuchtung und Temperaturen um 20° C)

Art der Fixierung	Behandlung des Mediums	Mikroskopisch beobachtete Fluoreszenz nach				
		1	2	3	4	6 Tagen
Hitze	Puffer	sehr schwach	sehr schwach	—	—	—
Hitze	Puffer, Penic.	sehr schwach	sehr schwach	—	—	—
Hitze	—	sehr schwach	—	—	—	—
Hitze	Penicillin	sehr schwach	—	—	—	—
Formalin	Puffer	schwach	—	—	—	—
Formalin	Puffer, Penic.	schwach	—	—	—	—
Formalin	—	mäßig	schwach	sehr schwach	—	—
Formalin	Penicillin	mäßig	schwach	sehr schwach	—	—
Kälte	Puffer	mäßig	schwach	sehr schwach	sehr schwach	—
Kälte	Puffer, Penic.	schwach	schwach	sehr schwach	sehr schwach	—
Kälte	—	mäßig	mäßig	schwach	sehr schwach	—
Kälte	Penicillin	sehr schwach	sehr schwach	—	—	—

Tabelle 2  
 Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz fixierter Phytoplankter  
 (Hälterung bei dämmeriger Zimmerbeleuchtung und Temperaturen um 20° C)

Art der Fixierung	Behandlung des Mediums	Mikroskopisch beobachtete Fluoreszenz nach				
		1	3	6	9	15 Tagen
Hitze	Puffer	stark	schwach	sehr schwach	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	Puffer, Penic.	stark	mäßig	sehr schwach	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	—	stark	schwach	sehr schwach	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	Penicillin	mäßig	mäßig	schwach	sehr schwach	sehr schwach
Formalin	Puffer	mäßig	mäßig	schwach	schwach	schwach
Formalin	Puffer, Penic.	mäßig	schwach	schwach	schwach	schwach
Formalin	—	stark	stark	stark	mäßig	mäßig
Formalin	Penicillin	stark	schwach	schwach	schwach	schwach
Kälte	Puffer	mäßig	mäßig	schwach	schwach	sehr schwach
Kälte	Puffer, Penic.	mäßig	mäßig	schwach	schwach	sehr schwach
Kälte	—	stark	stark	schwach	schwach	sehr schwach
Kälte	Penicillin	stark	stark	schwach	schwach	sehr schwach

Tabelle 3  
 Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz fixierter Phytoplankter  
 (Hälterung unter Lichtabschluß und Temperaturen um 6° C)

Art der Fixierung	Behandlung des Mediums	Mikroskopisch beobachtete Fluoreszenz nach				
		1	3	6	9	15 Tagen
Hitze	Puffer	stark	mäßig	schwach	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	Puffer, Penic.	stark	mäßig	mäßig	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	—	stark	mäßig	schwach	sehr schwach	sehr schwach
Hitze	Penicillin	mäßig	mäßig	mäßig	schwach	sehr schwach
Formalin	Puffer	stark	mäßig	schwach	schwach	schwach
Formalin	Puffer, Penic.	stark	schwach	schwach	schwach	schwach
Formalin	—	stark	stark	stark	mäßig	mäßig
Formalin	Penicillin	stark	stark	stark	stark	stark
Kälte	Puffer	mäßig	mäßig	schwach	schwach	sehr schwach
Kälte	Puffer, Penic.	mäßig	mäßig	schwach	schwach	sehr schwach
Kälte	—	stark	stark	mäßig	mäßig	sehr schwach
Kälte	Penicillin	stark	stark	mäßig	mäßig	mäßig



zunehmend dominiert. Bei kältefixierten Zellen ist die Chlorophyllfluoreszenz zu Beginn des Versuchs in der Hauptsache auf die Chloroplasten beschränkt und ändert sich in der Farbe später gegen ein tiefes Weinrot. Nur in formaldehydfixierten Zellen bleibt die Chlorophyllfluoreszenz streng in den Chloroplasten lokalisiert und wird kaum einer Farbtonänderung unterworfen.

2. In Lösungen mit höheren osmotischen Werten, wie sie durch den Phosphatpuffer oder den Penicillinzusatz verursacht werden, kann ein Chlorophyllabbau durch das Austreten des Chlorophylls in das umgebende Medium vorgetäuscht werden (deutliche Chlorophyllfluoreszenz, d. h. Chlorophylladsorption durch die wenigen vorhandenen Copepoden).

3. Der pH-Wert in den gepufferten Suspensionen betrug 7,0 und in den ungepufferten Suspensionen für die Gesamtdauer der Versuche 5,4.

4. Die beobachtete Chlorophyllfluoreszenz der Ceratien ist immer deutlich stärker als diejenige der Diatomeen. Von den Ceratien zeigt bei fortschreitender Versuchsdauer *Ceratium fusus* in der Regel das kräftigere Fluoreszenzbild.

5. Die Kältefixierung scheint nicht für alle untersuchten Organismen gleichermaßen vollständig zu sein.

Zusammenfassend lautet das Ergebnis der Hälterungsversuche: Entscheidenden Einfluß auf die Chlorophyllfluoreszenz besitzen weder die Temperatur, der pH-Wert, noch die Bakterien. Hierfür ist vor allen anderen Bedingungen die Beleuchtungsstärke verantwortlich. Aus diesem Grunde darf die Chlorophyllfluoreszenz als Indiz für den Lebendzustand kaum verwendet werden. Zwar lassen sich aus Ergebnissen von YENTSCH (1965 b), der Tiefenproben über einige Tage auf ihre <sup>14</sup>C-Aufnahme untersucht hat, Abbauezeiten für das Phäophytin (Phäophytin besitzt ebenfalls die Eigenschaft zu einer kräftigen Rotfluoreszenz) von rund 20 bis 30 Stunden entnehmen, doch kann diese hohe Abbaugeschwindigkeit ebenfalls auf eine Lichtschädigung des Pigments zurückzuführen sein (über die Abnahme des Fluoreszenzlichtes der Chlorophylle unter Bestrahlung vergleiche FRENCH 1960; sie ist innerhalb einiger Minuten auch unter dem UV-Mikroskop zu beobachten). Im anderen Falle wären die hohen Phäophytinhalte in größeren Wassertiefen (YENTSCH 1965 a; LORENZEN 1967 a) nur schwer erklärlich.

Abgesehen von der recht groben Differenzierung zwischen stark und schwächer fluoreszierender Phytoplankter scheint es nicht möglich zu sein, die spektralen Unterschiede im Fluoreszenzlicht zwischen dem Chlorophyll und seinen verschiedenen Abbauprodukten direkt zu einer visuellen mikroskopischen Analyse heranzuziehen. Wird beispielsweise das Chlorophyll in den oben als Typ I beschriebenen Zellen durch Ansäuern mit HCl phäophytinisiert, so tritt eine deutliche Helligkeitsminderung des Fluoreszenzlichtes ein (das Zellplasma zeigt hierbei das unter Typ III beschriebene Fluoreszenzbild). Nach YENTSCH und MENZEL (1963) beträgt das Verhältnis der Intensitäten des Fluoreszenzlichtes vor und nach Ansäuern für das in Aceton gelöste Chlorophyll a rund 1,7. HOLM-HANSEN et al. (1965) finden unter derselben Fragestellung für ebenfalls in Aceton gelöste gewichtsgleiche Mengen Chlorophyll und Phäophytin folgende Werte: Chlorophyll a zu Phäophytin a gleich 2,5; Chlorophyll c zu Phäophytin c gleich 6,3. Dieser Intensitätsabfall ist vermutlich in erster Linie für die nach dem Ansäuern im Mikroskop zu beobachtende schwach weinrote Farbe der Chloroplasten verantwortlich und weniger die geringe mit der Phäophytinisierung verbundene spektrale Verschiebung des Fluoreszenzlichtes in den längerwelligen Bereich.

Werden in einem umgekehrten Fall die leuchtend rot fluoreszierenden Chloroplasten (Typ I) mit NaOH behandelt, wobei sich das Chlorophyll in Phytol, Methanol und

Chlorophyllin spaltet, dann schlägt die Rotfluoreszenz ohne starken Intensitätsabfall in Orange um (das Zellplasma zeigt wiederum das unter Typ III beschriebene Fluoreszenzbild). Auch das Phäophorbid (erhältlich durch Ansäuern der chlorophyllinhaltigen Zellen) fluoresziert orangefarben. Schließlich sind bei der Untersuchung natürlicher Phytoplanktongesellschaften nur selten Zellen zu finden, die mikroskopisch eindeutig dem allein phäophytinhaltigen oder dem allein chlorophyllinhaltigen, beziehungsweise phäophorbidhaltigen Typ zuzuordnen wären. — Auf dem Wege der Extraktion fanden dagegen PATTERSON und PARSONS (1963) bei zwei Wochen alten Kulturen der Diatomee *Skeletonema costatum*, daß Chlorophyllin a 90% des gesamten Pigments ausmachte.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist deshalb ein exaktes Erfassen der Pigmentverhältnisse nur in einer über die visuelle Beobachtung hinausgehende Analyse der Fluoreszenzspektren möglich. GOEDHER (1964) fand — in einer prinzipiell auch für Mikroskopphotometer zulässigen Versuchsanordnung — bei einigen Phytoplanktern eine vom Kulturalter abhängige Verschiebung der Emissionsspektren. — Auch an Hand der nachlassenden Intensität des Fluoreszenzlichtes unter andauernder UV-Bestrahlung (man vergleiche hierzu FRENCH 1960) ließ sich keine Methode finden, die mikroskopisch einfach zu handhaben gewesen wäre.

So bleibt die auf der Primärfluoreszenz der Chlorophylle sich begründende mikroskopische Aussage weitgehend begrenzt. Die drei beschriebenen Zelltypen werden hinsichtlich ihres physiologischen Zustandes folgendermaßen charakterisiert:

Typ I. Normale, ungeschädigte Zellen leuchtend rote Fluoreszenz der Chloroplasten, die praktisch jede andere in der Zelle vorhandene Fluoreszenz überstrahlt).

Typ II. Chlorophyllarme, möglicherweise phäophytinhaltige Zellen (stärker grünlich fluoreszierender, aber bezüglich der Form und Anordnung der Chloroplasten normal erscheinender Zellinhalt mit mäßiger, oft auf das Zentrum der Chloroplasten beschränkter weinroter Fluoreszenz).

Typ III. Abgestorbene, auch Abbauprodukte der Chlorophylle enthaltende Zellen (grünlich-bräunlich-rötlich fluoreszierender, geklumpter, flockiger oder geschrumpfter Zellinhalt).

Auswerten der Probenmengen im einzelnen: Das auf Filtern, die niemals ganz trocken gesaugt werden dürfen, gesammelte Material wird durch gründliches Abspülen mit filtriertem Seewasser derselben Probe nahezu quantitativ resuspendiert. Dies gelingt ohne Schwierigkeiten um so leichter, wenn die Filteroberfläche vor Filtrationsbeginn mit einem feinen, die Untersuchung nicht beeinträchtigenden Pulver bestreut worden ist. Bei Untersuchungen bezüglich der Chlorophyllfluoreszenz einzelner Zellen kann beispielsweise das auch für die summarische Chlorophyllanalysen hierfür gebräuchliche  $MgCO_3$  Verwendung finden. Über den möglichen Verbleib einzelner Zellen auf dem Filter informiert eine kurze UV-mikroskopische Kontrolle. Diese restlichen Zellen lassen sich in der Regel durch Schütteln des Filters in Seewasser ablösen.

Die resuspendierten Zellen werden anschließend durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 3000 g) auf wenige Milliliter eingeeengt; hieraus erfolgt dann das mikroskopische Auszählen der Zellen ohne Zählkammer. Wenn ein Auflichtmikroskop zur Verfügung steht, ist sein Benutzen zur direkten Auswertung der Filter vor allem bei größeren Probenmengen entschieden vorteilhafter. In beiden Fällen beschränkt sich die Zählung normalerweise auf die den Hauptanteil der Probe ausmachenden Phytoplanktonarten; sie wird unter Berücksichtigung der oben genannten Klassifizierung durchgeführt. Aus den so gefundenen Verhältniszahlen läßt sich dann die ökologische Dominanz und die tatsächliche Anzahl der verschiedenen Zelltypen pro untersuchter Art und Liter Meerwasser mit Hilfe der Werte aus gleichzeitig durchgeführten UTERMÖHL-ZÄHLUNGEN

(UTERMÖHL 1958; BRAARUD 1958; GILLERICH 1962) errechnen. Zusammenhänge mit anderen Daten, die gleichen Proben entstammen, ergeben sich wie z. B. bei DERENBACH (1969) beschrieben.

Das Ausbleiben der Chlorophyllfluoreszenz unter dem Einfluß anhaltender Bestrahlung mit Erregerlicht kann bei dem rasch durchgeführten Auszählen in seiner Auswirkung auf das Ergebnis unberücksichtigt bleiben, zumal mit der Sehfeldblende die Ausleuchtung immer nur auf das jeweils auszuzählende Arreal beschränkt wird. Außerdem ist darauf zu achten, daß die Proben möglichst wenig dem vollen Tageslicht ausgesetzt werden (HAITINGER, LINSBAUER 1933; HAITINGER 1935).

## 2. Untersuchungsmethoden auf Grund der Sekundärfluoreszenz

Nachdem sich gezeigt hat, daß die Primärfluoreszenz nur in engem Rahmen zu Aussagen über den physiologischen Zustand des Phytoplanktons befähigt, mußten Methoden gefunden werden, die mit Hilfe der durch Fluorochrome induzierten Sekundärfluoreszenz genauere Analysen zulassen (zusammenfassende Darstellungen über Fluorochrome und ihre Anwendung von HAITINGER 1959; STRUGGER 1949; PRICE, SCHWARTZ 1956; STOCKINGER 1964). Die gesuchten Methoden sollten eindeutig eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Phytoplanktern erlauben. Außerdem sollte wenigstens eine in summarischen Analysen bestimmte und als brauchbar bei der Kennzeichnung einer Population erkannte chemische Komponente erfaßt werden.

Mit dieser Zielsetzung wurden folgende Fluorochrome bei variierenden Salzgehalten, pH-Werten und Farbstoffkonzentrationen in ihrer differenzierenden Färbewirksamkeit auf das Phytoplankton untersucht: Acridinorange (Fa. Merck); Acriflavin (Fa. Chroma); Aminoterephthalsäure (Fa. Chroma); Auramin (Fa. Merck); Berberinsulfat (Fa. Chroma); Kaliumfluorescein (Fa. Bayer); Primulin (Fa. Chroma); Rhodamin B (Fa. Merck). Zwei Fluorochrome wurden hiervon als geeignet ausgewählt: Primulin zur Unterscheidung zwischen lebendem und totem Phytoplankton und Berberinsulfat zur Anfärbung der Nucleinsäuren.

### 2a. Primulin — Fluorochromierung

Primulin ist ein als Direktfärbemittel bekannter Thiazolfarbstoff. Seine bläulich-weißgelbliche Fluoreszenz ist mehrfach beschrieben worden. Bei der Durchmusterung einiger Fluorochrome auf ihre Färbewirksamkeit für pflanzliche Objekte wird sie von HAITINGER und LINSBAUER (1933; 1935) als bläulich-weiß, grünlich-weiß oder gelb bezeichnet. HAGEMANN (1937 a, b) entdeckte „eine neue Sichtbarmachung filtrierbarer Viruskörperchen“ mit Primulin; die fixierten Viren fluoreszieren weiß bis bläulich-weiß. BISHOP und SMILES (1957) stellten mit Primulin bei einigen Säugetieren die Diagnose auf tote Spermatozoen; diese fluoreszieren hellblau, lebende bleiben im Fluoreszenzbild unsichtbar.

Wegen des zu erwartenden blauen Fluoreszenzlichtes wird bei der Primulinfärbung zur optimalen Erregung (möglichst energiearmes Licht, um ein UV-Schädigung der Objekte gering zu halten) aus dem Emissionsspektrum der Quecksilber-Höchstdrucklampe vor allem das bei 365 nm liegende Maximum ausgenutzt (Erregerfilter BG 38 und UG 1; Sperrfilter 41 oder 44 und 65). Dem Betrachter einer angefärbten Planktonprobe bietet sich dabei ein Bild, worin auf einem blauen, mit abfallender Farbkonzentration zunehmend dunkler werdenden Untergrund drei Zelltypen deutlich zu unterscheiden sind:

- a) Dunkelblau fluoreszierende Zellen (mit möglicherweise etwas hellerer Zellwand), die sich bei stärker primulinhaltigem Medium nicht oder nur wenig vom Unterabheben (Typ I).

- b) Ganz von einer weißlich-bläulichen Fluoreszenz erfüllte Zellen. Bei längerer UV-Bestrahlung wandeln sich die als Typ I beschriebenen Zellen in ihrer Fluoreszenzfarbe in den hier als Typ II zu bezeichnenden Zelltyp um.
- c) Zellen mit geklumpten, grünlich-gelblich fluoreszierenden Zellinhalt (Typ III).

Auf Grund dieser mit Primulin möglichen Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen wurden mit dem Farbstoff weitere Untersuchungen durchgeführt. Zunächst war die Frage zu beantworten, ob die unter anhaltender UV-Bestrahlung zu verfolgende Umwandlung des Zelltyps I in den Zelltyp II auf einer Farbstoff- oder einer Plasmaänderung beruht. Die obige Versuchsanordnung deutet bereits auf eine Plasmaänderung hin, eine Vermutung, die zwei Experimente bestätigen:

- a) Werden die mit Primulin angefärbten Zellen mehrfach gewaschen, dann ist die beschriebene Änderung des Typs I nicht mehr zu beobachten; vielmehr verdunkelt sich die für diesen Typ charakteristische Blaufluoreszenz bei anhaltender Bestrahlung.
- b) Wird eine Phytoplanktonprobe kurzzeitig erhitzt, daraufhin gefärbt und gewaschen, so zeigt ein leicht geflockter Zellinhalt nur die den Typ II kennzeichnende Fluoreszenz. Wird die Färbung der abgetöteten Phytoplankter nach einigen Stunden wiederholt, dann findet man das für den Typ III charakteristische Fluoreszenzbild.

Als mögliche Ursachen dieser Plasmaänderung kommen photodynamische und toxische Eigenschaften des Primulins und außerdem die Wirkungen der UV-Bestrahlung in Frage. Wieweit die für den Typ I beobachtete Zustandsänderung der Zellen im Färbegrad bei anhaltender Bestrahlung auf die Eigenschaften des Farbstoffs zurückgeführt werden kann, darüber gibt eine Arbeit von VAN DUJIN (1961) Auskunft: Mit photoelektrischen Methoden wurde die quantitative Beziehung zwischen der toxischen, der photodynamischen und der reinen Lichtwirkung registriert. Die einzelnen Wirkkomponenten wurden indirekt durch Motilitätsänderungen von Rinderspermien gemessen. Aus der Reihe der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe stellten sich dabei Rhodamin B und Primulin als diejenigen mit sehr geringer photosensibilisierender Wirkung heraus. Auch die toxische Wirkung des Primulins war sehr gering. .... Deshalb scheint der Schluß zulässig zu sein, daß die beobachtete Änderung in der Fluoreszenzfärbung weder durch eine Farbstoffersetzung noch durch die photosensibilisierende oder toxische Wirkung des Primulins verursacht wird, sondern vielmehr auf einer direkten UV-Schädigung der Zelle beruht.

Abgesehen von der Beantwortung der obigen Frage liefern diese Befunde den ersten Ansatzpunkt zu einer Methode, mit Hilfe der Primulinfärbung lebende und tote Protoplasten von einander zu unterscheiden. Der Beweis für diese Verwendungsmöglichkeit des Primulins wurde analog zu den Versuchen von STRUGGER (1940; 1949) an der Epidermis der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* durchgeführt. An diesem Objekt bewies STRUGGER in seinen Versuchen die Brauchbarkeit des Fluorochroms Acridinorange zur Unterscheidung lebender von toten Protoplasten.

In parallellaufenden Färbereihen werden kurzzeitig erhitzte und unbeschädigte Epidermisstücke mit Primulin oder mit Acridinorange eingefärbt. Anhand der von STRUGGER gefundenen Kriterien für die zwei verschiedenen mit der Acridinorangegefärbung sich ergebenden Fluoreszenzbilder und aufgrund der Tatsache, daß die Plasmolyse bei entsprechenden Versuchen mit Primulin immer nur bei den dunkelblau fluoreszierenden Zellen zu beobachten war (bei partiell bläulich-weiß fluoreszierenden Protoplasten war

nur der dunkelblau fluoreszierende, niemals der bläulich-weiße Teil zur Plasmolyse befähigt), lassen sich die beschriebenen Zelltypen folgendermaßen charakterisieren:

Typ I, lebende Zellen.

Typ II, abgetötete Zellen.

Typ III, schon länger tote Zellen.

Für die Richtigkeit dieser Einteilung kann außerdem angeführt werden, daß die häufig im Plankton umherschwimmenden nackten Flagellaten nur die dem Typ I eigentümliche Fluoreszenz aufwiesen. Schließlich stehen die Befunde in keinem Widerspruch zu den eingangs erwähnten Beobachtungen von HAITINGER und LINSBAUER, HAGEMANN, BISHOP und SMILES, vielmehr finden deren Beobachtungen eine erste Erklärung, die im folgenden ergänzt wird.

Den von STRUGGER (1940) erstmals beschriebenen, konzentrationsabhängigen, metachromatischen Effekt (KÖLBEL 1947; ZANKER 1952; ZANKER et al. 1959; LOESER et al. 1960; BEERS 1964) des Acridinorange selber zur Diagnose des Lebenszustandes am Phytoplankton heranzuziehen, scheint nur schwer möglich zu sein, weil sich höchstens die vergleichsweise wenig intensive Grünfluoreszenz, niemals aber die Rotfluoreszenz des Acridinorange von der leuchtenden Chlorophyllfluoreszenz visuell trennen läßt (WOOD 1962).

Nach den Experimenten mit Epidermisstücken von *Allium cepa* wurde die Primulinmethode auf ihre Anwendbarkeit für das Phytoplankton untersucht. Dabei stellte sich heraus: Weder die Konzentration der Farblösung noch die Färbezeit (Suspensionen des Planktons in Lösungen abgestufter Konzentration über verschiedene Zeiträume bis zu 24 Stunden, bei ca. 6° C und unter Lichtabschluß) besitzen einen zu berücksichtigenden Einfluß auf das Verhältnis der Zellen des Typs I zu denen des Typs II und III. Nur bei langer Färbezeit verschiebt sich, wie bereits erwähnt, die Fluoreszenzfarbe des Typs II in einen deutlich gelben Bereich. Ferner wirkt sich die Hälderung gefärbter und danach gewaschener Phytoplankter über 24 Stunden unter Lichtabschluß und bei ca. 6° C nur unerheblich auf die Auszählung aus. Auch der Salzgehalt des Mediums bleibt in weiten Bereichen ohne Einfluß auf das Ergebnis (deutlich unterscheidbares Anfärben aller drei Typen bei Phytoplankton aus Kulturen mit verschiedensten Salzkonzentrationen). Schließlich geht aus einer Arbeit von DENZLER (1942) über die pH-verursachte Fluoreszenzänderung gebräuchlicher Fluorochrome hervor, daß bei den im Meerwasser zu erwartenden pH-Änderungen (in nicht stagnierendem Ostseewasser schwanken die Werte zwischen 7,2 und 8,4; persönliche Mitteilung von Dr. GIESKES; FONSELIUS 1967) keine mikroskopisch sichtbare Fluoreszenzänderung des Primulins zu erwarten ist.

Eine Erklärung der Fluoreszenzfarben an dem mit Primulin behandelten Phytoplankton läßt sich aus Beobachtungen von STRUGGER (1949) und den Regeln der additiven Farbenmischung ableiten. Strugger beschrieb Primulin als ein kolloiddisperses Fluorochrom. Beim Eindiffundieren in eine 10%-ige Gelatinesäule trat nämlich eine deutliche Phasentrennung auf, wobei eine schnell diffundierende, dunkelblau fluoreszierende Komponente einer langsameren, gelb fluoreszierenden voraus eilte. Diese Polydispersität wurde in ihrer Bedeutung für die Fluorochromierung erkannt: feinporige Systeme lassen sich mit Primulin nur dunkelblau, grobporige dagegen auch gelb fluorochromieren. Demnach sind hier lebende Protoplasten als feinporige Systeme und tote Protoplasten als mehr oder weniger grobporige Systeme aufzufassen.

Aussagen bezüglich der unterschiedlichen Wegsamkeit toter Protoplasten für die gelbe Komponente des Primulins gestatten die Regeln der additiven Farbenmischung:

Über die Mischung zweier im Spektrum weiter auseinanderliegender Farben ist bekannt, daß zwar eine lückenlose Folge von Zwischenfarben herstellbar ist, die Mischfarben im mittleren Teil dieser Folge aber weißlicher, weniger gesättigt erscheinen als die reinen Spektralfarben. Es existiert ferner zu jeder reinen Spektralfarbe — den Bereich zwischen 490 und 570 nm ausgenommen — eine bestimmte zweite reine Spektralfarbe (Komplementärfarbe), mit der zusammen sie reines Weiß ergibt. Die blau und gelb fluoreszierenden Komponenten des Primulins bilden annähernd ein solches Farbenpaar, wobei die gelbt Komponente die bei weitem stärkere Intensität besitzt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzfarben der drei beschriebenen Zelltypen finden deshalb zusammenfassend folgende Erklärung:

Typ I mit einer tiefblauen Fluoreszenzfarbe; nur durchlässig für die blau fluoreszierende Komponente des Primulins.

Typ II mit einer weißlichen Fluoreszenzfarbe; durchlässig für die blau fluoreszierende und bedingt durchlässig für gelb fluoreszierende Komponenten des Primulins.

Typ III mit einer gelblichen Fluoreszenzfarbe; gleichermaßen durchlässig für alle Komponenten des Primulins (Grünanteile in der beobachteten gelben Farbe können durch die Tönung des Untergrundes verursacht werden; man vergleiche dazu den Abschnitt Berberinsulfat-Fluorochromierung).

Über die Brauchbarkeit der Primulinmethode hinsichtlich ihrer Anwendung auf die Unterscheidung zwischen lebendigem und totem Phytoplankton — das gilt vermutlich auch für viele andere pflanzliche Objekte, dagegen nicht in gleichem Umfange für tierische Organismen wegen der häufigen undurchlässigen Ektoskelette — läßt sich feststellen: Im Gegensatz zu der auf chlorophyllhaltige Zellen nur bedingt anwendbaren Acridinorangefärbung, deren konzentrationsmetachromatische Wirkung stark pH- und auch salzempfindlich ist oder der O<sub>2</sub>-abhängigen Prune-Färbung (FRITZ 1951) bietet die auf der Permeabilität des Plasmas beruhende Primulinmethode entscheidende Vorteile. Sie ist ohne Schwierigkeiten bei chlorophyllhaltigen Organismen durchzuführen und in weiten Grenzen pH-, salzkonzentrations- und färbezeitunabhängig, außerdem wenig photosensibilisierend oder toxisch. Ihre Nachteile — relativ geringe Beständigkeit der Farbstofflösung, UV-Schädigung der bestrahlten Zellen — werden durch die Art ihrer Anwendung aufgehoben. Sogar nach Ausbleichen der Fluoreszenzfarbe bei gefärbten und gewaschenen Organismen unter längerer UV-Beleuchtung ist noch ein klares Differenzieren zwischen den verschiedenen Zelltypen möglich.

Beim Auswerten kleiner Probemengen ist im einzelnen folgendermaßen zu verfahren: Das auf Filtern gesammelte, resuspendierte Material wird auf ca. 2 ml eingeengt (wie oben beschrieben). Hierzu kommen ca. 1 ml einer gesättigten, zentrifugierten (10 Minuten bei 5000 g) Primulinlösung, die mit dem filtrierten Seewasser der Probe angesetzt wird. Nach einer Färbezeit von ca. 5 Minuten wird mit demselben Seewasser aufgefüllt, danach zentrifugiert (5 Minuten bei 3000 g) und der Überstand bis auf wenige Milliliter dekantiert. Dieser Waschvorgang soll möglichst drei- bis siebenmal wiederholt werden. Das Auszählen wird wie bei der mikroskopischen Chlorophyllanalyse beschrieben vorgenommen. Sind größere Probenserien auszuwerten, dann verbleibt das Analysenmaterial bei analoger Behandlung auf dem Filter und wird erst — falls notwendig — zur Auszählung resuspendiert. Es ist günstig, die Proben möglichst wenig dem vollen Tageslicht auszusetzen.

## 2b. Berberinsulfat — Fluorochromierung

Berberinsulfat, ein Derivat des Isochinolins, ist ein Salz des Alkalooids Berberin, das natürlicherweise in *Berberis*-Arten und *Hydrastis canadensis* gefunden werden kann. In

wässriger Lösung zeigt Berberinsulfat in allen Konzentrationsabstufungen bei UV-Be-  
strahlung nur ein sehr schwaches Fluoreszenzlicht. Wie viele andere Alkaloide fluores-  
ziert auch Berberinsulfat erst kräftig in adsorbiertem Zustand (DANCKWORTT, PFAU  
1927; REICH, HAITINGER 1928; KAUTSKY 1931, 1932).

Erste Versuche mit Berberinsulfat als Fluorochrom für botanische Präparate unter-  
nahmen HAITINGER (1935) und HAITINGER und LINSBAUER (1935). Eine gründliche  
Untersuchung über die Speicherung des Berberinsulfats in lebenden Pflanzen stammt  
von STRUGGER (1939). BOSSHARD (1964) benutzt die Berberinsulfat-Fluorochromierung  
zur mikroskopphotometrischen Bestimmung des DNS-Gehaltes an Kernen fixierter  
Zellen. Dieser Bestimmungsmethode geht ein mit dem Fluorometer erbrachter Nachweis  
voraus, daß diese DNS-Fluorochromierung quantitativ, die gemessene Fluoreszenzinten-  
sität der vorgegebenen DNS-Menge direkt proportional ist.

Aber nicht nur DNS besitzt die Eigenschaft, Berberinsulfat zu adsorbieren. Auch  
andere Säuren, vornehmlich RNS werden durch Berberinsulfat quantitativ fluorochro-  
miert (BOSSHARD). In der erwähnten Arbeit wird die selektive DNS-Fluochromierung  
dadurch erreicht, daß die zu untersuchenden Schnitte zunächst mit RNase vorbehandelt  
werden. Da schon bei dieser mikroskop-photometrischen Bestimmung der DNS die  
Fluorochromierung aller anderen Substanzen unberücksichtigt bleiben konnte — die  
RNS ausgenommen und unbeschadet des möglichen Vorhandenseins der DNS außerhalb  
des Zellkerns — deshalb schien diese Art der Bestimmung auch für die beabsichtigte  
visuelle, fluoreszenzmikroskopische RNS-Analyse hinreichend zu sein.

Bereits die ersten Färbeversuche am Phytoplankton ergaben, daß eine Vitalfluoro-  
chromierung nicht möglich ist; denn der Farbstoff löst sich nur unzureichend im Meer-  
wasser. Deshalb mußte mit fixiertem Material gearbeitet werden. Die dafür als einfachste  
Möglichkeit sich anbietende und unter anderm auch von BOSSHARD verwendete Formol-  
fixierung wurde jedoch nicht benutzt. Einmal ist diese Art der Fixierung der Unter-  
suchung nukleinsäurehaltiger Strukturen wenig angemessen (ROMEIS 1948); ferner kann  
sich nach dieser Fixierung sowohl die Eigenfluoreszenz des Chloroplasten als auch die  
des Chlorophylls je nach Wellenlänge des Erregerlichtes verfälschend bemerkbar machen.  
Solche Nachteile lassen sich mit einer für FEULGEN-Färbungen gebräuchlichen (BAUER  
1932; SPANHOF 1964) Fixierung weitgehend vermeiden. Gearbeitet wurde mit einer  
Kaliumdichromat-Formol-Lösung in Anlehnung an REGAUD und POLICARD (1913).  
Nach gründlichem Waschen in Leitungswasser erfolgt dann die Berberinsulfat-Fluoro-  
chromierung ebenfalls in Leitungswasser.

Langwellige UV-Bestrahlung verursacht an vorbehandeltem Phytoplankton dieses  
Fluoreszenzbild: Neben strahlend gelben Volutingranula, sogenannten BÜTSCHLI-schen  
Kugeln (falls vorhanden) fluoresziert der gesamte Protoplast zwar in derselben Farbe,  
doch je nach RNS-Gehalt mit unterschiedlicher Intensität.

Daß tatsächlich der RNS-Gehalt der Protoplasten für die beobachtete Fluoreszenz-  
farbe verantwortlich ist, ergaben mehrfach durchgeführte Experimente mit Phytoplank-  
tern natürlicher Populationen, wenn nämlich der Fixation und der Fluorochromierung  
eine RNS-Hydrolyse vorgeschaltet wurde:

- a) RNase-Behandlung bei 45° C; die Konzentration betrug 1 mg RNase (Fa. Serva)  
in 2 ml 30%-igem Äthanol; oder
- b) Perchlorsäure-Behandlung bei 45° C; die Normalität betrug 0,5.

Die Wirkung der beiden Hydrolyseformen auf das Phytoplankton waren annähernd  
gleich. Das Ergebnis der Versuche läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Die  
Protoplasten aller Phytoplankter weisen mit zunehmender Hydrolysedauer einen Abfall  
in der beobachtbaren Fluoreszenzintensität auf. Gleichzeitig wird der von der Plasma-

fluoreszenz bis dahin meist verdeckte Zellkern sichtbar. Dieser Intensitätsabfall ist bereits nach ein bis zwei Stunden deutlich; nach ca. vier Stunden wird es praktisch unmöglich, die Protoplasten zu fluorochromieren.

Bei der Untersuchung des Phytoplanktons nach vorausgegangener Fluorochromierung mit Berberinsulfat liegt die Schwierigkeit für den Beobachter vor allem darin, aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der Protoplasten annähernd exakt und ohne weitere Indizien zwischen den verschiedenen RNS-Gehalten der Zellen zu differenzieren. Zur Erleichterung dieser Bestimmung wurde zunächst eine Gegenfärbung mit den oben aufgeführten Fluorochromen versucht, die aber nicht gelang. Es blieb die Möglichkeit einer optischen Gegenfärbung durch Tönung des Untergrundes.

Die zu der Fluoreszenzfarbe Gelb am stärksten kontrastierenden Mischfarben lassen sich sowohl mit einer langwelligen als auch mit einer kurzwelligen anderen Grundfarbe erzielen. Als Kontrastfarbe wurde im vorliegenden Falle Blau gewählt, weil die zu erwartende Mischfarbe im Maximum der spektralen Empfindlichkeit des menschlichen Auges (ca. 555 nm) liegt. Bei der gebotenen Fluoreszenzintensität kann in diesem spektralen Bereich außerdem die als PURKINJE-Phänomen — Verschiebung der spektralen Empfindlichkeit mit der Lichtintensität — bekannte Wahrnehmungsänderung unberücksichtigt bleiben.

Das Verwenden der Erregerfilter BG 38, BG 12 und UG 5 (Ausnutzen der bei 365 nm liegenden Maximums aus dem Spektrum der Quecksilber-Höchstdrucklampe) und der Sperrfilter 44 und 65 ermöglicht auf strahlend blauem Untergrund ein Fluoreszenzbild, wonach sich die Phytoplanktonzellen hinsichtlich ihres RNS-Gehaltes folgendermaßen unterscheiden lassen:

- a) Protoplasten mit einer kräftig gelben bis grünlich-gelben Fluoreszenz; RNS-reicher Typ I.
- b) Protoplasten mit einer deutlich schwächeren, nur grünlichen Fluoreszenz; RNS-ärmer Typ II.
- c) Protoplasten mit einer geringen, weißlichen bis graufarbenen Fluoreszenz; sehr RNS-ärmer Typ III.

Diese Einteilung ist aber nicht in strengem Sinn auf alle Phytoplanktonarten gleichermaßen anwendbar, denn mit der Größe der Zellen ändert sich auch ihr Nukleinsäuregehalt pro betrachteter Körperoberfläche; damit ändert sich die Intensität des durch Berberinsulfat induzierten Fluoreszenzlichtes und somit auch die durch die Untergründtönung hervorgerufene Mischfarbe. Außerdem können je nach Größenverhältnis verschiedener Zellorganellen zu dem gesamten Protoplasten sowohl die leuchtend gelb fluoreszierenden Volutingranula als auch die deutlich gelb fluoreszierenden Zellkerne den Gesamteindruck der Zellfluoreszenz beeinflussen. Entsprechendes gilt schließlich für die mögliche Einlagerung des Farbstoffes in kräftig ausgebildete Zellwände.

Beim Auswerten der Proben ist im einzelnen zu verfahren: Das auf Filtern gesammelte, resuspendierte Material wird eingengt (nach obiger Beschreibung) und anderthalb Stunden in einer Kaliumdichromat-Formol-Lösung fixiert (80 ml 3%-ige Kaliumdichromatlösung und 20 ml ca. 40%-ige Formaldehydlösung; täglich frisch anzusetzen). Nach gründlichem vier- bis fünfmaligen Waschen in Leitungswasser erfolgt das Färben mit einer ca. 2%-igen Berberinsulfatlösung über wenigstens 10 Minuten. Die mikroskopische Analyse wird in der nicht merkbar fluoreszierenden Farbstofflösung vorgenommen; die Auswertung entspricht dabei der für die mikroskopische Chlorophyll- und Primulinmethode beschriebenen Form.



### 3. Fluorometrische und mechanisierte Form der zytologischen Planktonanalyse

Natürlich, der Plan einer differenzierenden Analyse an Planktonpopulationen ist mit den beschriebenen drei fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungen nur in engem Rahmen zu verwirklichen. Schon die Zahl der quantitativ-zytologischen Methoden, die für den hier vertretenen Untersuchungszweck direkt geeignet wären, reicht bislang nur geringfügig über das Angegebene hinaus. So ist noch keine Proteinmessung möglich. Kein Nachweis erfaßt die Eiweißkörper in ihrer Gesamtheit. Dargestellt werden können lediglich einzelne Aminosäuren, z. B. Arginin (NOTENBOOM, VEERDONK, KAMER 1967) oder das Decarboxylierungsprodukt des Histidins, Histamin (EHINGER, THUNBERG 1967), bzw. einzelne in den Proteinen vorkommenden Gruppen (SCHIEBLER 1961; GOSLAR 1965). Die quantitative Fluorochromierung der meisten Enzyme ist bislang ebensowenig gelungen. Doch sollten als Anfang den gebräuchlichen summarisch-chemischen Bestimmungen erst einmal entsprechende zytologische Methoden an die Seite gestellt werden. Das ist gegeben für Chlorophyll und RNS (eine spezifische DNS-Fluorochromierung mit 2,5-Bis (4'-aminophenyl-1') — 1, 3, 4, — oxdiazol (RUCH 1965) blieb unberücksichtigt). Außerdem ist durch die einfach zu handhabende Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen ein direktes Erfassen des Detritus möglich, über den zuvor nur auf sehr indirektem Wege Rückschlüsse gezogen werden konnten. Mit dem Detritus eng verknüpfte Probleme erscheinen damit einer Lösung näher gerückt, wie z. B. allgemein, die Frage nach seinem Anteil am Gesamtplankton unter den verschiedenen Bedingungen oder speziell, Kenntnisse über die Lebensfähigkeit des Phytoplanktons in größeren Tiefen, beim Vermischen einander fremder Wasserkörper, in und auf sich bildenden Sedimenten.

Die beiden Hauptgründe jedoch für den weiten Abstand bis zu aussagekräftigen, quantitativen und differenzierenden Analysen geben sich als Eigenschaften der beschriebenen mikroskopischen Verfahren selber zu erkennen. Einmal erreicht die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Planktons bei ausschließlich visueller Kontrolle mit der schematischen Einteilung des Probenmaterials in Kategorien sehr früh ihre Grenze in der quantitativen Aussage. Jede weiterreichend detaillierte Information über zytologische, das sind zytochemische und zytophysikalische Gegebenheiten, läßt sich nur mit Hilfe fluorometrischer Methoden erschließen. Analog zu den im chemischen und physikalischen Bereich gebräuchlichen Fluorometern sind Angaben entsprechender Apparaturen für verschiedene mikroskopische Zwecke wiederholt publiziert worden: OLSON 1960; RUCH, ROSSHARD 1933; HOVNANIAN, BRENNAN, BOTAN 1964; RUNGE 1966; GOLDMAN 1967. Von den im Handel vertriebenen Geräten seien genannt das MPH und das UMSP I (beide Fa. Zeiss).

Die zweite Ursache für die Unzulänglichkeit der visuellen Methoden folgt aus dem Zwang zur Bearbeitung umfangreicher Probenreihen — denn nur dadurch werden für die großen Areale abgesicherte Aussagen möglich — und der daraus resultierenden Notwendigkeit zur Automation. Über diese Notwendigkeit in der Analytik des Meerwassers wird sich kaum ernsthaft mehr streiten lassen (GRASSHOFF 1965, 1967). Dafür ins Feld gebrachte Argumente treffen auf die partikuläre Substanz gleichermaßen zu. Es sind dies außerdem Genauigkeitsforderungen an den Probenreihen, die durch beengte Verhältnisse an Bord, kontinuierliche Tag- und Nachtarbeit, d. h. durch das Überhandnehmen subjektiver und objektiver Fehler auf anderem Wege kaum erfüllt werden können.

Die aufgezählten Schwierigkeiten auszuräumen, muß folgende Aufgabe gelöst werden: Wie können in weitgehend mechanisierter Form von den zu untersuchenden Organismen Angaben über deren Anzahl, Größe, Fluoreszenzintensität und spektrale Zusammensetzung des Fluoreszenzlichtes in Erfahrung gebracht werden? Obwohl der Entwicklung eines entsprechenden Gerätes grundsätzlich keine technischen Hindernisse entgegenstehen (Auskunft der Fa. Zeiss), soll das Bestimmen der spektralen Zusammensetzung des Fluoreszenzlichtes als Spezialfall fluorometrischer Analyse ausgeklammert bleiben. In der Regel wird ein Wiederholen des Meßvorganges, beispielsweise unter Verwendung anderer Filter oder Photodioden, diesem Zweck genügen. Zum Bestimmen der verbleibenden Parameter bieten sich „scanning“-Verfahren an. Das sind Arbeitsweisen, die ein direktes Abtasten oder mäanderförmiges Absuchen des Analysenmaterials beinhalten. Prinzipiell solche Untersuchungen gestattet das erwähnte UMSP I. Eine der ersten Veröffentlichungen über „scanning“-Verfahren in der mikroskopischen Fluorometrie stammt von OLSON (1960). Über ein „two colour, automatic fluorescent particle scanning and counting system“ publizierten MANSBERG und KUSNETZ (1966).

Bei der mechanisierten Form der fluorometrischen Bestimmung entfällt als Regel das vorherige Sammeln des Analysenausgangsmaterials aus dem Meerwasser. Die Unterschiede möglicher Analysendurchführung bestehen darin, die Organismen entweder direkt auf Filter (Filterstreifen) aufzutragen, jedoch angenähert in Reihenform, die das Hintereinander sicherstellt, ohne das Nebeneinander oder Überlagern der Organismen wahrscheinlich zu machen; oder als zweite Möglichkeit, wenn aus dem weiten Spektrum der partikulären Substanz keine genauen Angaben über Organismen außerhalb der mittleren Größenbereiche verlangt sind, dann kann auch das Messen an Durchlaufkuvetten Anwendung finden, sofern nur die Konstanz der Durchlaufgeschwindigkeit gewährleistet ist. Eine kontinuierliche Fluorochromierung — falls die Sekundärfluoreszenz analysiert werden soll — wird in beiden Fällen notwendig.

Gleichgültig ob die Auswertung im Auflicht- oder Durchlichtverfahren vorgenommen wird, die Konzeption des Meßgerätes bleibt davon unberührt: Als Antrieb für das „scanning“, resp. für die Bewegung des Analysenmaterials dient ein Schrittmotor. Bei der somit gewährleisteten Konstanz der Bewegung sind aus den Meßgrößen Impulshäufigkeit (Fluoreszenzhäufigkeit) und Impulsdauer (Fluoreszenzdauer) die gesuchten Parameter Partikelzahl und Partikelgröße herzuleiten. In der Reihenfolge ihrer Funktion sind im Meßgerät hierfür notwendig die Elemente Photodetektor, SCHMITT-Trigger mit Ableitung der Start-Stop-Impulse, elektronisches Tor mit Impulsgenerator, Binärzähler, Speicher, Lochstreifenstanzer. Die außerdem benötigte Information über die Substanzmenge ist aus den Meßgrößen Impulsdauer (Fluoreszenzdauer) und Impulsstärke (Fluoreszenzintensität) zu gewinnen. Deshalb ist parallel zu dem beschriebenen digitalen ein analoger Prozeß durchzuführen. Hierbei gelangen die Signale des Photodetektors auf einen Integrator, dem ein Analog-Digital-Wandler (A/D) und diesem wiederum ein Stanzer angeschlossen sind. Zur Konstanthaltung der mechanischen Bewegung beim Messen — denn nur selten (vor allem an Bord) steht ein hinreichend stabilisiertes Netz zur Verfügung — ist es schließlich ratsam, die Einzählfrequenz für das elektronische Tor starr mit der Geschwindigkeit, d. h. den Einzahlgenerator mit dem Schrittmotor zu koppeln.

Behutsame und väterliche Hilfe hat mir Herr Professor KREY zuteil werden lassen. Dafür weiß ich mich sehr verpflichtet. Alles Institutsangehörigen und meinem Bruder Till danke ich für freundlich gewährte Unterstützung und Anregungen.

## Literaturverzeichnis

- ANSELL, A. D., J. COUGHLAN, K. F. LANDER, F. A. LOOSMORE (1963): Studies on the mass culture of phacodactylum. IV. Production and nutrient utilization in outdoor mass culture. *Limn. Ocean.*, 9, 334—342. — ANTIA, N. J., C. D. McALLISTER, T. R. PARSONS, K. STEPHENS, J. D. H. STRICKLAND (1963): Further measurement of primary production using a large-volume plastic sphere. *Limn. Ocean.*, 9, 166—183. — BAUER, H. (1932): Zitiert nach Romeis 1948. — BEERS, R. F. (1964): Acridine orange binding by *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bacteriol.*, 88, 1249—1256. — BEERS, J. R. (1966): Studies on the chemical composition of the major zooplankton groups in the Sargasso Sea off Bermuda. *Limnol. Ocean.*, 11, 520—528. — BISHOP, M. W. H., J. SMILES (1957): Differentiation between living and dead spermatozoa by fluorescence microscopy. *Nature*, 179, 308. — BOSSHARD, U. (1964): Fluoreszenzmikroskopische Messung des DNS-Gehaltes von Zellkernen. *Z. wiss. Mikroskopie mikroskop. Technik*, 65, 391—408. — BRAARUD, T. (1958): Counting methods for determination of the standing crop of phytoplankton. *Rapp. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 144, 17—19. — BROWN, J. S. (1966): The fluorescence emission spectra of chlorophyll a forms from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta*, 120, 305—307. — BROWN, J. S. (1967): Fluorometric evidence for the participation of chlorophyll a-695 in system 2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 143, 391—398. — CASTELVI, J., (1963): Pigmentos de la diatomea *Skeletonema costatum* en su dependencia de los factores ambientales y de la dinamica de las poblaciones. *Inv. Pesq. Barcelona*, 24, 129—137. — DANCKWORTT, P. W., PFAU (1927): Zitiert nach Strugger 1939. — DEIMLING, A. v., H. MOHR (1967): Eine Analyse der durch Blaulicht bewirkten Steigerung der Proteinsynthese bei Farnvorkeimen auf der Ebene der Aminosäuren. *Planta*, 76, 269—284. — DENZLER, E. (1942): Beiträge zur Analyse der Fluorochromierung von Bakterien. pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzfarben. *Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover*. — DERENBACH, J., (1969): Partikuläre Substanz und Plankton an Hand chemischer und biologischer Daten gemessen in den oberen Wasserschichten des Gotland-Tief im Mai 1968. *Kieler Meeresf.*, XXVI, im Druck. — DICKIE, L. M., J. E. PALOHEIMO (1968): Production and food supply. *Symp. on marine food chains, Aarhus*. — DOTY, M. S., M. OGURI (1957): Evidence for a photosynthetic daily periodicity. *Limnol. Ocean.*, 2, 37—40. — DUIJN, C. VAN (1961): Effects of light and photosensitization by some vital stains and fluorochromes on living bull spermatozoa. *Proc. IV. Int. Congress on Animal Reproduction, The Hague (Holland)*, 1—8. — EHINGER, B., R. THUNBERG (1967): Induction of fluorescence in histamin containing cells. *Exp. Cell Res.*, 47, 116—122. — EPPLEY, R. W., J. L. COATSWORTH (1966): Culture on the marine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta*, with light-dark cycles. *Arch. Mikrobiol.*, 55, 66—80. — EPPLEY, R. W., R. W. HOLMES, E. PAASCHE (1967): Periodicity in cell division and physiological behavior of *Ditylum brightwellii*, a marine planktonic diatom. *Arch. Mikrobiol.*, 56, 305—323. — EPPLEY, R. W. (1968): An incubation method for estimating the carbon content of phytoplankton in natural samples. *Limnol. Ocean.*, 13, 574—582. — FONSELIUS, S. H. (1967): Hydrography of the baltic deep basin II. *Fish. Bd. Sweden, Ser. Hydrogr.*, 20, 31 pages. — FRENCH, C. S. (1960). The chlorophylls in vivo and in vitro. *Handbuch der Pfl.-Physiol.*, Ed. Ruhland et al., Band V, 252—298. — FRENCH, C. S. (1967): Changes with age in the absorption spectrum of chlorophyll a in a diatom. *Arch. Mikrobiol.*, 59, 93—103. — FRITZ, A. (1951): Veränderungen von Plasmaeigenschaften durch Vitalfarbstoffe. I. Prune pure. *Österr. Akad. Wiss. Sitzungsber., Abt. I. Bd.* 160, 789—828. — GILLBRICHT, M. (1962): Über das Auszählen von Planktonschöpfproben. *Helgol. wiss. Meeresunters.*, 8, 203—218. — GOEDHEER, J. C. (1964): Fluorescence bands and chlorophyll a forms. *Biochim. Biophys. Acta*, 88, 304—317. — GOEDHEER, J. C. (1969): Energy transfer from carotenoids to chlorophyll in blue green, red and green algae and greening bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, 172, 252—265. — GOLDMAN, C. R. (1965): Micronutrient limiting factors and their detection in natural phytoplankton populations. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 18 suppl., 121—135. — GOLDMAN, M. (1967): An improved microfluorimeter for measuring brightness of fluorescent antibody reactions. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 38—45. — GOSLAR, H. G. (1965): Möglichkeiten quantitativer Färbereaktionen für Proteine. *Acta Histochem., Suppl. VI*, 317—330. — GRASSHOFF, K. (1965): Automatische Methoden zur Bestimmung von Fluorid, gelöstem Phosphat und Silikat im Meerwasser. *Autom. Analyt. Chemie*, 44—52. — GRASSHOFF, K. (1967): Results and possibilities of automated analysis of nutrients in seawater. *Autom. Analyt. Chemistry*, 573—579. — HAGEMANN, P. K. H. (1937a): Virusfluoreszenzmikroskopie. *Münchn. med. Wochenschrift*, 84, 761—765. — HAGEMANN, P. K. H. (1937b): Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus und andere Mikroben. *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskr., Abt. I, Originale, Beiheft, Bd.* 140, 184—187. — HAITINGER, M., L. LINSBAUER (1933): Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und ihre Anwendung in der Botanik. *Beihefte Bot. Zentralbl., Abt. I, Bd.* 50, 432—444. — HAITINGER, M. (1935): Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie. II. Wirkung der Fluorochrome auf pflanzliche Zellen. *Beihefte Bot. Zentralbl., Abt. A, Bd.* 53, 378—386. — HAITINGER, M., L. LINSBAUER (1935): Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie. III. Darstellung organisierter Zelleinschlüsse. *Beihefte Bot. Zentralbl., Abt. A, Bd.* 53, 387 bis 397. — HAITINGER, M. (1959): Fluoreszenzmikroskopie. 168 Seiten. — HAYWARD, J. (1968):

Studies on the growth of *Phaeddactylum tricorutum*. III. The effect of iron on growth. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **48**, 295—302. — HOLM-HANSEN, O., C. J. LORENZEN, R. W. HOLMES, J. D. H. STRICKLAND (1965): Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Cons.*, **30**, 3—15. — HOVNANIAN, H. P., T. A. BRENNAN, E. A. BOTAN (1964): Quantitative rapid immunofluorescence microscopy. I. Instrumentation. Zit. nach Goldman 1967. — HUMPHREY, G. F. (1963): Chlorophyll a and c in cultures of marine algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, **14**, 148—154. — IWAMURA, T., E. HASE, Y. MORIMURA, H. TAMIYA (1955): Life cycle of the green chlorella with special reference to the protein and nucleic acid contents of cells in successive formative stages. *Anales Acad. Scient. Fennicae, Ser. A II* **60**, 89—103. — JAMES, T. W. (1966): Cell synchrony, a prologue to discovery. *Cell Synchrony*, eds. I. L. Cameron, G. M. Padilla, pages 1—13. — KATES, M. (1966): Lipid components of diatoms. *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 264—278. — KAUTSKY, H. (1931 und 1932): Zitiert nach Strugger 1939. — KÖLBEL, H. (1947): Untersuchungen über die quantitative Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Zellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der lebenden und toten Plasma-Eiweißkörper. Diss. TH Hannover, 52 Seiten — KORNMANN, P. (1955): Beobachtungen an Phaeocystis-Kulturen. *Helgol. wiss. Meeresunters.*, **5**, 218—233. — KORUZUMI, T., M. ITOH, K. SHIBATA (1965): Chromatographic separation of different species of cells with ion exchange resin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 241—247. — KOWALLIK, W. (1965): Die Proteinproduktion von Chlorella im Licht verschiedener Wellenlängen. *Planta*, **64**, 191—200. — LEWIN, J. C., R. R. L. GUILLARD (1963): Diatoms. *A Rev. Microbiol.*, **17**, 373—414. — LOESER, C. N., S. S. WEST, M. D. SCHOENBERG (1960): Absorption and fluorescence studies on biological systems: nucleic acid-dye complexes. *Anat. Rec.*, **138**, 163—178. — LORENZEN, C. J. (1965): A note on the chlorophyll and phaeophytin content of the chlorophyll maximum. *Limnol. Ocean.*, **10**, 482—483. — LORENZEN, C. J. (1967a): Vertical distribution of chlorophyll and phaeopigments: Baja California. *Deep-Sea Res.*, **14**, 735—745. — MADGWICK, J. C. (1966): Chromatographic determinations of chlorophylls in algal cultures and phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, **13**, 459—466. — MANSBERG, W. P., J. KUSNETZ (1966): Quantitative fluorescent microscopy: fluorescent antibody automatic scanning techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 260—273. — MATTERNE, M. (1968): Kulturversuche zur Primärproduktion mariner Planktonorganismen. Diss. Univ. Kiel, **84** Seiten. — McALLISTER, C. D., T. R. PARSONS, K. STEPHENS, J. D. H. STRICKLAND (1961): Measurements of primary production in coastal sea water using a large-volume plastic sphere. *Limnol. Ocean.*, **6**, 237—258. — McALLISTER, C. D., N. SHAH, J. D. H. STRICKLAND (1964): Marine phytoplankton photosynthesis as a function of light intensity, a comparison of methods. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **21**, 159—181. — MENZEL, D. W., J. H. RYTHER (1961): Nutrients limiting the production of phytoplankton in the Sargasso Sea, with special reference to iron. *Deep-Sea Res.*, **7**, 276—281. — MENZEL, D. W., E. M. HULBURT, J. H. RYTHER (1963): The effects of enriching Sargasso sea water on the production and species composition of the phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, **10**, 209—219. — NOTENBOOM, C. D., F. C. G. VAN DE VEERDONK, J. C. KAMER (1967): A fluorescent modification of the Sakaguchi-reaktion on arginin. *Histochem.*, **9**, 117—121. — ODUM, W. E. (1968): Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the striped mullet *Mugil cephalus*. Symposium on marine food chains, Aarhus, Denmark. — OLSON, R. A. (1960): Rapid scanning microspectrofluorimeter. Zitiert nach Goldman 1967. — PARSONS, T. R., K. STEPHENS, J. D. H. STRICKLAND (1961): On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **18**, 1017—1025. — PARSONS, T. R. (1961): On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **18**, 1017—1025. — PARSONS, T. R., R. J. LEBRASSEUR (1968): The availability of food to different trophic levels in the marine food chain. Symp. on marine food chains. Aarhus, Denmark. — PATTERSON, J., T. R. PARSONS (1963): Distribution of chlorophyll a and degradation products in various marine materials. *Limnol. Ocean.*, **8**, 355—356. — PIRSON, A., W. KOWALLIK (1964): Spectral responses to light by unicellular plants. *Photochem. Photobiol.*, **3**, 489—497. — PRICE, G. R., S. SCHWARTZ (1956): Fluorescence microscopy. Physical techniques in biological research, Vol. III, 91—139. — REGAUD, C., A. POLICARD (1913): Zitiert nach Romeis (1948). — REICH, V., M. HAITINGER (1928): Über die Änderung der Fluoreszenz im ultravioletten Licht. Zitiert nach Strugger 1939. — RILEY, J. P., T. R. S. WILSON (1967): The pigments of some marine phytoplankton species. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **47**, 351—362. — ROMEIS, B. (1948): Mikroskopische Technik. 695 Seiten. — RUCH, F., U. BOSSHARD (1963): Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop. *Z. wiss. Mikroskopie wiss. Techn.*, **65**, 335—342. — RUCH, F. (1965): Fluoreszenzphotometrie. *Acta Histochem., Suppl. VI*, 117—121. — RUNGE, W. J. A. (1966): A recording microfluorospectrophotometer. Zitiert nach Goldman 1967. — SAJO, Y., S. NISHIZAWA (1969): Excitation spectra in the fluorometric determination of chlorophyll-a and phaeophytin-a. *Marine Biol.*, **2**, 135—136. — SCHIEBLER, T. H. (1961): Die Anwendung von chemischen Agentien in der histochemischen Methodik zum Nachweis von Proteinen. *Acta Histochem., Suppl. II*, 87—109. — SCHÖNE, H. (1969): Untersuchungen zur ökologischen Bedeutung des Seeganges für das Plankton mit besonderer Berücksichtigung mariner Kieselalgen. Diss. Univ. Kiel, 133 Seiten. — SCHMIDT, R. R. (1966): Intracellular control of enzyme synthesis and activity during synchronous

growth of *Chlorella*. Cell Synchrony, eds. I. L. Cameron, G. M. Padilla, pages 189—235. — SENGER, H., N. I. BISHOP (1966): The light dependent formation of nucleic acids in cultures of synchronized *Chlorella*. Plant Cell Physiol., 7, 441—455. — SOEDER, C. J. (1965): Some aspects of phytoplankton growth and activity. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 18, suppl., 47—59. — SPANNHOF, L. (1964): Einführung in die Praxis der Histochemie, 150 Seiten. — STEELE, J. H., I. E. BAIRD (1962): Carbon-chlorophyll relations in cultures. Limnol. Ocean., 7, 101—102. — STOCKINGER, L. (1964): Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen. Protoplasmalogia (Handbuch der Protoplasmaforschung), Bd. II, D 1, 96 Seiten. — STRICKLAND, J. D. H. (1968): Continuous measurement of in vivo chlorophyll; a precautionary note. Deep-Sea Res., 15, 225—227. — STRICKLAND, J. D. H., O. HOLM-HANSEN, R. W. EPPLEY, R. J. LINN (1969): The use of a deep tank in plankton ecology. I. Studies of the growth and composition of the phytoplankton crops at low nutrient levels. Limnol. Ocean., 14, 23—34. — STRUGGER, S. (1939): Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 2. Die Eigenschaften des Berberinsulfates und seine Speicherung durch lebende Zellen. Biol. Zentralbl., 59, 274—288. — STRUGGER, S. (1940): Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Zitiert nach Kölbel 1947. — STRUGGER, S. (1949): Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. 194 Seiten. — TAUB, F. B., A. M. DOLLAR (1968): The nutritional inadequacy of *Chlorella* and *Chlamydomonas* as food for *Daphnia pulex*. Limnol. Ocean., 13, 607—617. — THOMAS, J. B., W. F. G. FLIGHT (1964): Fluorescence responses of chlorophyll in vivo to treatment with acetone. Biochim. Biophys. Acta, 79, 500—510. — UTERMÖHL, H. (1958): Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktontechnik. Mitt. int. Verein. theor. angew. Limn., 9, 1—38. — WANKA, F. (1962): Über den Einfluß des Lichts auf die Nukleinsäuresynthese bei Synchronkulturen von *Chlorella pyrenoidosa*. Ber. dtsh. bot. Ges., 75, 457—446. — WANKA, F. (1962): Über den Einfluß des Lichts auf die Nukleinsäuresynthese bei Synchronkulturen von *Chlorella pyrenoidosa*. Ber. dtsh. bot. Ges., 75, 457—446. — WANKA, F. (1967): The effect of light on DNA synthesis and related processes in synchronous cultures of *Chlorella*. Arch. Mikrobiol., 58, 257—269. — WERNER, D. (1966): Die Kieselsäure im Stoffwechsel von *Cyclotella cryptica*. Arch. Mikrobiol., 55, 278—308. — WOOD, E. J. F. (1956): Fluorescent microscopy in marine microbiology. J. Cons. perm. int. Expl. Mer, 21, 6—7. — WOOD, E. J. F. (1962): A method for phytoplankton study. Limnol. Ocean., 7, 32—35. — WOOD, E. J. F., C. H. OPPENHEIMER (1962): Note on fluorescence microscopy in marine microbiology. Z. allgem. Mikrobiol., 2, 164—165. — YENTSCH, C. S., J. H. RYTHER (1957): Short-term variations in phytoplankton chlorophyll and their significance. Limnol. Ocean., 2, 140—142. — YENTSCH, C. S., R. F. SCAGEL (1958): Diurnal study of phytoplankton pigments (an situ study in East Sound, Wash.). J. Marine Res., 17, 567—583. — YENTSCH, C. S., D. W. MENZEL (1963): A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep-Sea Res., 10, 221—231. — YENTSCH, C. S. (1965a): Distribution of chlorophyll and phaeophytin in the open ocean. Deep-Sea Res., 12, 653—666. — YENTSCH, C. S. (1965b): The relationship between chlorophyll and photosynthetic carbon production with reference to the measurement of decomposition products of chloroplastic pigments. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 18, suppl., 323—346. — ZANKER, V. (1952): Über den Nachweis definierter reversibler Assoziates des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässrigen Lösungen. Z. physik. Chemie, 199, 225—258. — ZANKER, V., M. HELD, H. RAMMENSEE (1959): Neuere Ergebnisse der Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenz-Polarisationsgrad-Messungen am Acridinorange-Kation, ein weiterer Beitrag zum Problem dieses Vitalfärbstoffs. Z. Naturf., 14b, 789—801.