

**Aminosäuren und Huminstoffe
im Stickstoffkreislauf polarer Meere**

**Amino acids and humic substances
in the nitrogen cycle of polar oceans**

Ulrike Hubberten

**Ber. Polarforsch. 153 (1994)
ISSN 0176 - 5027**

Ulrike Hubberten

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Columbusstraße, 27568 Bremerhaven, Bundesrepublik Deutschland

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer Dissertation, die im Juli 1994 dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen vorgelegt wurde.

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|---|-------|
| Zusammenfassung | IV |
| Summary | VIII |
| Verzeichnis der Abkürzungen | 1 |
| Danksagung | 3 |
| 1 Einleitung | 4 |
| 2 Fragestellung | 14 |
| 3 Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Untersuchung von Seewasserproben | 15 |
| 3.1.1 Die Untersuchungsgebiete | 15 |
| 3.1.2 Probennahme und Lagerung | 18 |
| 3.1.3 Bestimmung von DIN | 18 |
| 3.1.4 Bestimmung von DON | 19 |
| 3.1.5 Fraktionierung von DOM über XAD-2 | 19 |
| 3.1.6 Hydrolyse der gebundenen Aminosäuren | 21 |
| 3.1.7 Bestimmung freier Aminosäuren | 22 |
| 3.1.7.1 Geräte und Analysenbedingungen | 22 |
| 3.1.7.2 Eichung und Konzentrationsberechnung | 26 |
| 3.1.8 Aufarbeitungsschema für Seewasserproben | |
| - Bezeichnung der Fraktionen und Komponenten | 26 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 3.2 | Untersuchung der Proben der Algenkultur | 28 |
| 3.2.1 | Algenmaterial und Kulturbedingungen | 28 |
| 3.2.2 | Probennahme und Aufarbeitungsschema | 29 |
| 3.2.2.1 | Fraktionierung des partikulären Materials | 31 |
| 4 | Methodische Untersuchungen | 33 |
| 4.1 | Bestimmung von DON | 33 |
| 4.2. | Bestimmung der freien Aminosäuren | 34 |
| 4.2.1 | Vorsäulenderivatisierung mit OPA | 35 |
| 4.2.2 | Vorsäulenderivatisierung mit FMOC-Cl | 37 |
| 4.2.2.1 | Optimierung der Methode | 39 |
| 4.3 | Hydrolyse von gebundenen Aminosäuren in unterschiedlichen Matrices | 46 |
| 4.3.1 | Quantitative Bestimmung | 47 |
| 4.4 | Fraktionierung von DOM an XAD-2 | 50 |
| 4.4.1 | Adsorption von freien Aminosäuren an XAD-2 | 51 |
| 4.4.2 | Adsorption von phytoplanktonspezifischen Proteinen | 53 |
| 5 | Ergebnisse | 55 |
| 5.1 | Untersuchung der Seewasserproben | 55 |
| 5.1.1 | Charakterisierung der Probengebiete | 55 |
| 5.1.2 | Konzentrationen von DON und ihre Beziehung zu DIN | 56 |
| 5.1.3 | Anteil der Huminstofffraktionen am DON | 58 |
| 5.1.4 | Konzentration der Aminosäuren im Seewasser, in den Huminstofffraktionen und im partikulären Material | 61 |
| 5.1.4.1 | Beziehung zwischen TDAA und DON | 63 |
| 5.1.4.2 | Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration im Seewasser und in den Huminstofffraktionen von der biologischen | |

| | | |
|------------|---|------------|
| | Aktivität | 64 |
| 5.1.4.3 | Tiefenverteilung der Aminosäuren | 69 |
| 5.1.4.4 | Vergleich des Aminosäuremusters in POM und DOM | 71 |
| 5.2 | Veränderungen der partikulären und gelösten organischen Substanz in einer Phytoplanktonkultur | 75 |
| 5.2.1 | Allgemeine Charakterisierung der Biomassendynamik | 75 |
| 5.2.2 | Veränderungen des DON und der DON-Fractionen in Bezug zur Biomasse | 78 |
| 5.2.2.1 | Wachstumsphase | 78 |
| 5.2.2.2 | Stationäre Phase | 80 |
| 5.2.2.3 | Abbauphase | 81 |
| 5.2.2.4 | Freie Aminosäuren | 81 |
| 5.2.3 | Beziehung zwischen gelöstem und partikulärem gebundenen Stickstoff | 83 |
| 5.2.3.1 | Massenbilanz | 83 |
| 5.2.3.2 | AA-Verteilung im partikulären und im gelösten Material | 84 |
| 5.2.3.3 | Aminosäurekonzentration und -verteilung in den Fraktionen des partikulären Materials nach der Extraktion mit TCA und NaOH | 86 |
| 6 | Diskussion | 92 |
| 6.1 | Dynamik des Stickstoffs im Kulturversuch | 92 |
| 6.2 | Rolle des Stickstoffs im natürlichen System polarer Meere | 102 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 114 |

Zusammenfassung

Die Veränderungen von gelösten und partikulären Substanzen im marinen Kreislauf und deren Mechanismen sowie die Stabilität unterschiedlicher XAD-2-Fractionen des DOM hinsichtlich eines Abbaus wurden in der Arktis (Polarstern-Expedition ARK VIII/1) und in der Antarktis (ANT XI/1b) sowie in einer Phytoplanktonkultur untersucht.

Die Proben der Grönlandsee zeigten eine hoch signifikante inverse Korrelation zwischen DIN und DON. Die Steigung der Regressionsgeraden war ähnlich der, die Maita & Yanada (1990) in gemäßigten Regionen des Nordpazifiks gefunden haben. Diese Beobachtung könnte für das Verständnis der Umwandlung von anorganischen in organische Stickstoffformen von Bedeutung sein, falls sie in anderen Gebieten mit anderen Bedingungen von autotropher und heterotropher Aktivität bestätigt werden. Trotz sehr unterschiedlicher DIN-Konzentrationen waren die mittleren DON-Werte für die Antarktis und die Arktis sehr ähnlich (ungefähr 3 - 4 mM N).

Der Anteil der Huminstofffraktionen war mit 44% vom DON in der Arktis und 35% in der Antarktis relativ konstant. Im Mittel waren 60% des DON nicht mit den Huminstofffraktionen assoziiert. Die mittlere Konzentration von DON-HbA war in beiden Gebieten mit ungefähr 0,7 mM sehr ähnlich, während DON-HbN mit ungefähr 1 mM in der Arktis ca. doppelt so hoch war wie in der Antarktis. HbN und HbA waren gleichmäßig über die Wassersäule verteilt ohne jegliche sichtbare Beziehung zu anderen Parametern wie Nährstoffkonzentration, Tiefe und Temperatur. Das Auftreten einer in Konzentration und Zusammensetzung relativ konstanten DON-Fraktion steht in Einklang mit der Hypothese einer inerten DOM-Fraktion, die innerhalb des Ozeans vielfältigen langsamen Umwandlungs-

prozessen ausgesetzt ist (Williams & Druffel, 1987). Jackson & Williams (1985) nehmen an, daß im Ozean eine DON-"Background"-Konzentration von 1,3 mM N entsprechend 30 % des DON in der Tiefsee vorhanden ist. Es ist nicht klar, zu welchem Anteil und in welcher Phase des ozeanischen Stoffkreislaufs sich die in der HbN und in der HbA-Fraktion enthaltenen Substanzen labil oder biologisch resistent verhalten.

TDAA lieferte einen Beitrag von rund 11% zum DON in beiden Regionen, und es bestand eine hoch signifikante Korrelation zwischen beiden Variablen. Die mittlere Konzentration der Aminosäuren in den Huminstofffraktionen war mit ca. 200 nM für beide Regionen annähernd gleich, ihre Verteilung über die Wassersäule war weitgehend einheitlich. An der Oberfläche waren rund 60% der Aminosäuren mit Huminstoffen assoziiert, in Wassertiefen von 1000-1500 m gehörten nahezu 100 % der TDAA den Huminstofffraktionen an. Obwohl TDAA im Seewasser für beide Regionen signifikant mit chl a korrelierte, konnte für die Aminosäuren in den Huminstofffraktionen weder hinsichtlich ihrer Konzentration, noch ihres Verteilungsmusters eine Korrelation mit chl a gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aminosäuren in den hydrophoben Fraktionen in schwer abbaubaren Molekülen vorliegen und daß eine Hintergrundaminosäurekonzentration von ca. 200 nM N in resistenten Komponenten für die polaren Ozeane angenommen werden kann. Dies stimmt mit der von anderen Autoren vorgeschlagenen Bildung von aminosäurehaltigen, schwer abbaubaren Makromolekülen innerhalb des DOM-Kreislaufs im marinen Milieu überein.

TDAA war im Mittel in HbN rund fünfmal höher als in HbA. Der Anteil von Aminosäuren am DON der HbN-Fraktion (35%) war relativ konstant und deutlich höher als in HbA (7%). Die signifikante Korrelation zwischen Aminosäuren und DON in HbN deutet auf eine verhältnismäßig einheitliche Zusammensetzung dieser

Fraktion hin. Aus diesen Gründen wurden die Betrachtungen des Aminosäureeinbaus bei der Humifizierung hauptsächlich auf die HbN-Fraktion ausgerichtet.

Die Aminosäurezusammensetzung der partikulären, organischen Substanz war für beide Regionen nahezu identisch. Gly, asp, glu, ala und ser machten rund 50 % von PAA aus. Dieselben AA dominierten mit 70-80% in unfiltriertem Seewasser und in den hydrophoben Fraktionen. Alle gelösten Fraktionen waren verglichen mit dem partikulären Material an hydrophoben Aminosäuren verarmt. Die unterschiedliche Aminosäureverteilung im partikulären Material und in den XAD-Fractionen des Seewassers deuten auf den selektiven Abbau bestimmter Aminosäuren hin. Eine selektive Anreicherung von gly war im partikulären Material mit zunehmender Tiefe zu beobachten. Gly machte im Durchschnitt 8% von PAA aus, während es mit einem Anteil von im Mittel 27% an TDAA und 40% an AA-HbN in der gelösten Phase dominierte. Während gly in den hydrophoben Fraktionen angereichert war, wurde in der Arktis eine Anreicherung von asp in der hydrophilen Fraktion des DOM beobachtet.

Um den Einbau von frisch produzierten Stickstoffverbindungen in die Huminstoffe besser nachzuvollziehen, wurde ein Kulturversuch durchgeführt, in dem die Veränderungen in POM und DOM während des Wachstums, der stationären und der Abbauphase einer Diatomeenpopulation verfolgt wurden. Unter den verschiedenen Autoren herrscht keine Übereinstimmung welche ökologische Bedeutung den Substanzen der HbN-Fraktion zukommt. Anhand der Felddaten wurde gezeigt, daß die Stickstoffverbindungen in HbN quantitativ wichtig sind und schwer abbaubar zu sein scheinen. Im Kulturversuch wurde andererseits gezeigt, daß "frische" hydrophobe N-Verbindungen cytoplasmatischen Ursprungs, die ebenfalls von XAD-2 adsorbiert wurden, einem schnellen Abbau unterliegen. Da

sie sich im Medium nicht akkumulieren konnten, ist es unwahrscheinlich, daß sie langfristig einen direkten Einfluß auf die Zusammensetzung der hydrophoben Fraktionen haben. Während des Abbaus von partikulärem Material wurde innerhalb kurzer Zeit PAA in überwiegend hydrophiles DON umgewandelt, das nicht geeignet zu sein schien das bakterielle Wachstum zu unterhalten und sich im Medium akkumulierte. Diese Beobachtung deckt sich mit dem direkten Bezug von DON-HI zum phytoplanktonischen Ausgangsmaterial, der in den Felddaten nachgewiesen wurde und deutet darauf hin, daß die Humifizierung in der hydrophilen Fraktion beginnt. Wie die geringe Abnahme von PAA zeigte, befand sich der Abbau nur in der Anfangsphase und deshalb war die Entstehung von stabilem hydrophoben DON lediglich in eingeschränktem Maße zu beobachten. Innerhalb des partikulären Materials wurde eine schwerlösliche Fraktion gebildet, deren Aminosäurezusammensetzung mit fortschreitendem Abbau zunehmende Übereinstimmung mit derjenigen der HbN-Fraktion der Feldproben zeigte.

Die vorliegende Arbeit führt zu dem Schluß, daß eine Kombination der Modelle, wie sie von Ishiwatari (1992) und Smith et al. (1992) für den Übergang von POM in DOM vorgeschlagen wird, zusammen mit der selektiven Erhaltung den bevorzugten Einbau bestimmter Aminosäuren in die Huminstoffe erklärt und für die Hauptmerkmale der im marinen DOM beobachteten Aminosäureverteilung verantwortlich ist.

Summary

Changes of particulate and dissolved organic substances within the marine cycle were studied in the Arctic (Polarstern ARK VIII/I), the Antarctic (Polarstern ANT XI/1b) and in a phytoplankton culture experiment. The mechanisms and lability of the different XAD-2-resin-fractions of DOM towards degradation were investigated.

Samples from the Greenland Sea showed a highly significant inverse correlation for dissolved inorganic (DIN) and dissolved organic nitrogen (DON). The slope of the regression equation was quite similar to that obtained by Maita & Yanada (1990) for samples from temperate regions of the North Pacific Ocean. These findings might be important for the appraisal of the interconversion between inorganic and organic forms of nitrogen in the ocean, if they can be verified in other regions with different conditions for heterotrophic and autotrophic activity. Despite very different concentrations of DIN, the average DON concentrations were quite similar (ca. 3-4 mM N) in the Arctic and in the Antarctic.

Humic fractions contributed 44% and 35% to DON in Arctic and Antarctic respectively. On average, 60% of DON was not associated with humic fractions. The mean concentration of DON-HbA of ca. 0,7 mM was similar for both regions, whereas the mean concentration of DON-HbN in the Arctic (ca. 1 mM N) was nearly twice as high as in the Antarctic. HbN and HbA were homogeneously distributed in the water column without any visible correlation with other parameters such as nutrient concentration, depth or temperature. This relative uniformity in DON fractions is in accordance with the hypothesis of an inert fraction of DOM, undergoing a multiple slow recycling in the ocean (Williams & Druffel, 1987). Jackson & Williams (1985) suggest the existence of a background DON concentration of 1,3 mM N, representing 30% of DON in deep-ocean waters. It is

not yet clear to what extent, and in which phase of the ocean's nutrient cycle the compounds of the HbN- and HbA-fractions are labile or biologically resistant.

In both sampling regions TDAA was about 11% of DON with a highly significant correlation for both variables. The average amino acid concentration in the humic fractions of about 200 nM was nearly identical for both regions, and the amino acid distribution in the water column was almost homogenous. At the surface about 60% of the amino acids were associated with humic substances, at depth of 1000-1500 m almost 100% of TDAA appeared in the humic fractions. Although TDAA correlated significantly with chl a in both regions, there was no similar correlation for concentration or distribution of chl a and amino acids in the humic fractions. These results suggest, that the amino acids in the humic fractions exist in refractory molecules and a background amino acid concentration of about 200 nM N is assumed to be present in the world's polar oceans as part of refractory molecules. This is in accordance with the formation of amino acid containing refractory macromolecules in the marine environment as suggested by other authors.

TDAA in the HbN-fraction was on average about five times the concentration in the HbA-fraction. The average contribution of the AA to DON in HbN (35%) was relatively constant and considerably higher than in HbA. The significant correlation for amino acids and DON in HbN suggests a relatively uniform composition of this fraction. For these reasons the investigation on the incorporation of amino acids during humification were concentrated on the HbN-fraction.

The amino acid composition of the particulate organic matter was nearly identical for both regions. Gly, asp, glu, ala and ser made up 50% of PAA. The same amino acids dominated in unfiltered seawater and in the hydrophobic fractions with a relative contribution of 70-80%. In comparison with particulate material all

dissolved fractions contained less hydrophobic amino acids. The different amino acid composition pattern of particulate material and dissolved XAD-fractions in seawater implies the selective degradation of certain amino acids. There was a selective enrichment of gly in the particulate material with increasing depth. Gly on average represented 8% of PAA, while in the dissolved material it was predominant with a mean contribution of 27% to TDAA and 40% to AA-HbN. While gly was enriched in the hydrophobic fraction, in the Arctic an enrichment of asp in the hydrophilic fraction was observed.

For a deeper insight into the dynamics of incorporation of freshly produced nitrogen compounds into humic substances a culture experiment was performed. Changes in POM and DOM were followed during growth, stationary and degradation phases of a diatom population. At present there is no agreement on the ecological relevance of substances appearing in the HbN-fraction. Field data show that nitrogen compounds of HbN are quantitatively significant and seem to be refractory. In the culture experiment freshly produced nitrogen compounds of cytoplasmatic origin, which were adsorbed on XAD-2, suffered rapid degradation. However, as these substances did not accumulate in the medium it seems most unlikely that on long term scale they would directly influence the composition of the hydrophobic fractions. During degradation phase part of PAA was transformed quickly to mostly hydrophilic DON, which did not seem adequate to sustain bacterial growth. This findings support the direct correlation of DON-HI with the phytoplanktonic source material as found in the field data, and suggest that a first stage of humification possibly takes place in the hydrophilic fraction of the dissolved material. As seen by the small decrease of PAA, only the initial phase of the degradation was observed and consequently only first symptoms of a formation of refractory hydrophobic DON were recorded. During degradation within the particulate material insoluble amino

acid compounds were formed. The amino acid composition of this fraction of PAA showed increasing similarity with that of the HbN-fraction in the field data.

The results presented here lead to the conclusion that a combination of the pathways from POM to DOM as proposed by Ishiwatari (1992) and Smith et al. (1992) together with the selective preservation of certain amino acids explain their incorporation into humic substances. These processes are responsible for the main features of the observed amino acid composition of marine DOM.

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---|---|
| AA | (Amino Acids) Aminosäuren |
| AA-HbA | Aminosäuren in der HbA-Fraktion |
| AA-HbN | Aminosäuren in der HbN-Fraktion |
| AA-HI | Aminosäuren in der HI-Fraktion |
| ADAM | Adamantanamin |
| AE | Aminoethanol |
| chl a | Chlorophyll a |
| DCAA | (Dissolved Combined AA) gelöste gebundene Aminosäuren |
| DFAA | (Dissolved Free AA) gelöste freie Aminosäuren |
| DIN | (Dissolved Inorganic Nitrogen) gelöster anorganischer Stickstoff |
| DOC | (Dissolved Organic Carbon) gelöster organischer Kohlenstoff |
| DOCH | Natriumdeoxycholat-Lösung |
| DOM | (Dissolved Organic Material) gelöstes organisches Material |
| DON | (Dissolved Organic Nitrogen) gelöster organischer Stickstoff |
| DON-HbA | DON in der HbA-Fraktion |
| DON-HbN | DON in der HbN-Fraktion |
| DON-HI | DON in der HI-Fraktion |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FAA | (Free AA) freie Aminosäuren |
| FMOC-Cl | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-chlorid |
| HbA | hydrophobe, saure Fraktion |
| HbN | hydrophobe, neutrale Fraktion |
| HI | hydrophile Fraktion |
| HPLC | (High Performance Liquid Chromatography) Hochleistungsflüssigchromatographie |
| $\text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ | Beleuchtungseinheit: Millieinstein pro m^2 pro s |
| MPP-Fraktion | Monomer-Peptid-Protein-Fraktion |
| OPA | ortho-Phthaldialdehyd |
| PAA | (Particulate AA) partikuläre Aminosäuren |
| POM | (Particulate Organic Matter) partikuläres organisches Material |
| tau | Taurin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TDAA | (Total Dissolved AA) gesamte gelöste Aminosäuren |

Aminosäuren

| | | | |
|---------------|----------------------------|-----|--------------|
| α -aba | α -Aminobuttersäure | leu | Leucin |
| ala | Alanin | lys | Lysin |
| arg | Arginin | met | Methionin |
| asn | Asparagin | orn | Ornithin |
| asp | Asparaginsäure | phe | Phenylalanin |
| gln | Glutamin | pro | Prolin |
| glu | Glutaminsäure | ser | Serin |
| gly | Glycin | thr | Threonin |
| his | Histidin | tyr | Tyrosin |
| hypro | Hydroxyprolin | val | Valin |
| ile | Isoleucin | | |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Ernst für die Begutachtung der Arbeit und die Gewährung ausgezeichnete Arbeitsbedingungen.

Herrn P.D. Dr. G. Kattner danke ich für die Vergabe des Themas und die Übernahme des Koreferats. Durch seine Unterstützung während meiner Doktorandenzeit und nicht zuletzt durch viele Anregungen beim Verfassen des Manuskripts hat er mir sehr geholfen.

Herrn Dr. R.J. Lara danke ich ganz besonders für sein großes Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit während der letzten 3 Jahre. In zahllosen, lehrreichen Diskussionen hat er viel Geduld bewiesen. Vielen Dank, Rubén.

Frau M. Stürcken-Rodewald, Herrn K.-U. Richter und Frau H. Wierhake-Kattner danke ich für die Nährstoffbestimmungen.

Frau B. Hohlmann danke ich ihre Hilfe im Labor und nicht zuletzt für ihre große Geduld und Umsicht beim Spülen.

Frau S. Unverricht, Herrn T. Bluszcs und den anderen Mitarbeitern der Sektion Chemie danke ich für Ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen technischen und organisatorischen Problemen.

Herrn Dr. D. Thomas, Herrn Dr. M. Baumann und Frau Schwarz von der Sektion Biologie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Kulturversuchs.

Herrn Dr. H.-J. Hirche danke ich für die Überlassung von Chlorophylldaten.

Der Crew der FS "Polarstern" danke ich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung an Bord.

Den Kollegen von der Forschungsstelle Potsdam danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die mir das Zusammenschreiben der Arbeit sehr erleichtert hat.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann und meinen Kindern, die mir sowohl durch ihre große Selbstständigkeit als auch durch ständige Aufmunterung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

1 Einleitung

Biochemische Prozesse sind für eine große Zahl von Stofftransportvorgängen und Materialakkumulationen auf der Erde verantwortlich. Die Leistung der Lebewesen liegt dabei in der reversiblen Erzeugung von organischer Substanz aus Kohlendioxid mit Hilfe der Energie des Sonnenlichts (Photosynthese). Die so gebildete organische Substanz besteht aus einer Vielzahl von Verbindungen mit fein abgestuften Energieinhalten und Reduktionsvermögen. Pflanzen, die aufgrund ihres Chlorophyllgehalts zur Photosynthese befähigt sind, sind die Produzenten, während alle anderen Organismen in die Gruppe der Konsumenten fallen, die unter Ausnutzung der gespeicherten Energie über Oxidations- und Austauschvorgänge schließlich das Kohlendioxid- und Nährstoffreservoir wieder auffüllen. Der Kohlenstoffkreislauf der Ozeane ist allerdings nicht geschlossen, da ein Teil des organischen Materials in Form von Detritus Sedimentationsvorgängen unterliegt und in die ozeanischen geochemischen Kreisläufe eingeht (Cauwet, 1981). Der vertikale Transport von organischem Material durch physikalische, geochemische oder biologische Prozesse, sowie alle Umwandlungsprozesse, die zur Bildung von biologisch schwer abbaubaren Verbindungen führen, sind im Hinblick auf die globalen Stoffbilanzen von Bedeutung, da sie Senken darstellen können, die einen Teil der in der organischen Substanz gebundenen Elemente aus dem aktiven Zyklus der Ozeane entfernen. Ungefähr 21-26% des globalen CO₂-Bedarfs für die Primärproduktion wird im ozeanischen Oberflächenwasser umgesetzt (Moore & Bolin, 1986). In einigen Modellen wird angenommen, daß ein signifikanter Anteil der historischen Veränderungen im atmosphärischen CO₂ durch Variationen der Primärproduktivität verursacht wurden (Mix, 1989). Der Hauptanteil des durch Primärproduktion fixierten Kohlenstoffs verbleibt infolge der Dynamik der Nahrungskette und schneller Umsetzungs- und Remineralisierungsprozesse in den Oberflächenschichten der Ozeane (Pomeroy, 1974; Williams,

1981; Azam et al., 1983; Gray et al., 1984; Newell & Turley, 1987). Es wird angenommen, daß höchstens ca. 10% der Primärproduktion aus der Oberflächenschicht in tiefere Wassermassen absinkt (Angel, 1984; Fowler & Knauer, 1986). Dieser Anteil des Kohlenstoffpools ist es, der eine Verringerung des CO₂-Partialdrucks in Oberflächenwässern und, infolge der Remineralisierung von absinkenden Partikeln, seine Erhöhung in tieferen Wasserschichten verursacht. Diese "biologische Pumpe" führt zu einem Übergang von atmosphärischem CO₂ in die Oberflächenwässer der Weltmeere (Turley & Lochte, 1990). Ein erhöhter Fluß von partikulärem Material durch die Thermocline könnte ein entscheidender Faktor für die Abnahme des atmosphärischen CO₂ während der Eiszeit gewesen sein (Sarnthein et al., 1988). Abschätzungen über die in den Ozeanen gespeicherte Kohlenstoffmenge ergeben einen Wert von $4 \cdot 10^{15}$ g C für die Phytoplanktonbiomasse, während der fünffache Betrag im Detritus vorliegt. Am größten, mit $2 \cdot 10^{17}$ g C, ist der Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs (Dissolved Organic Carbon, DOC) (Cauwet, 1978).

Innerhalb der Ozeane können 3 Zonen unterschieden werden, in denen unterschiedliche Prozesse ablaufen (Cauwet, 1981):

1. Die euphotische Schicht (0-50 m), wo die lebenden Organismen den größten Anteil des organischen Materials synthetisieren und wo der größte Anteil von Detritus umgesetzt wird.
2. Tiefenwasser, wo die Biota hauptsächlich aus Mikroorganismen besteht. In diesem Bereich sind besonders die Austauschvorgänge zwischen partikulärem und gelöstem Material von Bedeutung. Während des Absinkens der Partikel können sich Sorptions- und Desorptionsvorgänge abspielen. Durch langsame Mineralisierung des organischen Materials verändern Mikroorganismen die Zusammensetzung der Partikel, wobei eine Vielzahl von Verbindungen in die gelöste Phase übergeht.

3. Die Sediment-Wasser-Grenzfläche, wo sich das organische Material langsam absetzt und weitere Umwandlungen erfährt.

Durch die Abhängigkeit der für die Primärproduktion verantwortlichen pflanzlichen Lebewesen von der Energie des Sonnenlichts ist ihr Lebensraum auf die obersten lichtdurchfluteten Wasserschichten beschränkt. Die Abhängigkeit vom Tageslicht und die Forderung nach einer möglichst starken Ausnutzung der Strahlung führt zu dem Bestreben der Pflanzen nach einer großen Oberfläche. Da der Lebensraum der Landpflanzen ein zusammenhängendes tragfähiges Gerüst verlangt, können sie großflächige Assimilationsorgane - die Blätter - ausbilden. Die Meerespflanzen erzielen in ihrer überwiegenden Zahl den gleichen Effekt durch hohe spezifische Oberflächen in extrem kleinen Einzelzellen bzw. Zellverbänden des Phytoplanktons, dem wichtigsten Primärproduzenten von marinem organischen Kohlenstoff (Gagosian & Lee, 1981). Eine Folge ihres unterschiedlichen Bauplans ist, daß Gerüstsubstanzen terrestrischer Pflanzen, wie z.B. Lignin, das einen wesentlichen Bestandteil des Holzes darstellt, in Phytoplankton nicht vorkommen. Damit ist auch mit unterschiedlichen Abbauprodukten für aquatische und terrestrische Pflanzen zu rechnen .

Ein weiterer Faktor, der neben der Energiebeschaffung die Lebensbedingungen des Phytoplanktons wesentlich beeinflusst, ist die Abhängigkeit vom Nährstoffangebot. Erreicht eines der Elemente, die die Algen für ihren Metabolismus benötigen, im Meerwasser ein Minimum, so wird ihre Weiterentwicklung begrenzt, auch wenn die anderen Elemente in optimalen Konzentrationen vorhanden sind. Bezüglich einer Nährstofflimitierung sind im Meerwasser vor allem die Elemente Phosphor, Stickstoff und Silicium von Bedeutung, die als Silicate, Phosphate, Nitrate, Nitrite und Ammoniumsalze in

anorganischer Bindung vorliegen; daneben existieren auch organische Phosphor- und Stickstoffverbindungen.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Heterotrophen, die in Bezug auf ihre Nahrung primär auf die von den Autotrophen erzeugte organische Substanz angewiesen sind. Ihr Lebensraum unterliegt keinen entsprechenden Beschränkungen, zumal aus den organismenreichen Oberflächenregionen der Meere ständig abgestorbene Organismen auch in tiefere ozeanische Schichten absinken. Die lebenden und toten Organismen der Gewässer geben ständig Stoffwechsel- oder Zersetzungsprodukte an das umgebende Wasser ab. Die in den Ozeanen gelöste organische Substanz (Dissolved Organic Material, DOM) enthält mehr Kohlenstoff als die terrestrische Biosphäre und ist somit ein wichtiges Reservoir im globalen Kohlenstoffkreislauf (Hunt, 1972; Menzel, 1974). Viele der im Seewasser auftretenden Substanzklassen kommen auch in den Organismen vor und haben dort wichtige biologische Funktionen. Damit ist die Frage naheliegend, welche spezifischen Verbindungen von den marinen Organismen gebildet werden. Aminosäuren (Amino Acids, AA) sind die Grundbausteine von Proteinen, den wichtigsten Strukturkomponenten des lebenden Gewebes. Außerdem haben Proteine vielfältige biologische Funktionen; sie treten z.B. als Enzyme, Antikörper, Stoffwechselregulatoren usw. auf (Mahler & Cordes, 1971). Sowohl Phytoplankton, als auch Zooplankton geben freie (FAA) und gebundene Aminosäuren (Combined AA, CAA) in das Seewasser ab. Kohlenhydrate sind die wichtigsten Energielieferanten; ihre Grundbausteine sind die Zucker. Kohlenhydrate sind die Hauptkomponenten phytoplanktischer Ausscheidungsprodukte (Hellebust, 1965; Sieburth, 1969). Als Strukturbausteine von Pflanzen, Tieren und Bakterien sind Proteine, Kohlenhydrate, Mucopolysaccharide und Glykoproteine die wichtigsten Verbindungen von organischem Kohlenstoff sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Pflanzen (Gagosian & Lee, 1981). Weitere biologisch wichtige

Verbindungsklassen, wie Fettsäuren, Sterole, Alkene, photosynthetische Pigmente, Nukleinsäuren etc. werden nicht in vergleichbar großen Mengen wie Proteine und Kohlenhydrate produziert. Weniger als 30% der im Meerwasser gelösten organischen Verbindungen sind jedoch Substanzen, die in gleicher Form auch in lebenden Organismen vorkommen (Hedges, 1987) und die Zusammensetzung des ozeanischen Pools von DOM und seiner Hauptkomponenten - gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und gelöster organischer Stickstoff (DON) - ist nur unvollständig bekannt

Jackson & Williams (1985) fanden Minimalkonzentrationen von DOC und DON von 30 bzw. 1,3 μM im Meerwasser und schrieben diese resistenten Verbindungen zu. DOC aus der Tiefsee hat aufgrund der ^{14}C -Werte ein mittleres Alter von 6000 Jahren (Williams & Druffel, 1987). Hohe Konzentrationen von relativ altem DOC in tieferen Schichten der Meere deuten darauf hin, daß eine Fraktion von bakteriell schwer abbaubaren "inerten" Komponenten im DOM vorhanden ist (Barber, 1968), die nur sehr langsamen Austauschvorgängen innerhalb der Wassersäule und an den Phasengrenzen zum Sediment bzw. zur Atmosphäre unterliegt. Es ist unklar, welcher Anteil des DOM und speziell von DOC und DON, einer "labilen" und welcher Anteil einer "inerten" Fraktion zukommt. Im allgemeinen werden die schwer abbaubaren Verbindungen in der Meeresforschung mit Huminstoffen gleichgesetzt, die als letzte, mehr oder weniger inerte Abbauprodukte des organischen Materials betrachtet werden (Skopintsev, 1981). Die Charakterisierung der marinen Huminstoffe erfolgt traditionsgemäß über ihre makromolekulare Struktur, ihre Farbe und ihre chemische Löslichkeit in Laugen, Säuren und Alkoholen. Diese Begriffe sind aus der Bodenkunde übernommen und beziehen sich hauptsächlich auf die Methoden, die zur Extraktion der Huminstoffe aus dem Boden verwendet werden. Für marine Huminstoffe wäre eine Definition aufgrund der Verfahren adäquater, die zu ihrer Extraktion aus dem Seewasser verwendet werden. Die Anreicherung von

Huminstofffraktionen aus aquatischem DOM wird überwiegend mit Harzen des XAD-Typs durchgeführt (Aiken, 1988), neuerdings auch mit C18-SEP-PAK-Kartuschen (Amador et al., 1990). Die Menge und Zusammensetzung der durch die Extraktion erhaltenen Huminstofffraktionen wird durch die jeweiligen Extraktions- und Elutionsmethoden beeinflusst, dadurch wird eine eindeutige Charakterisierung erschwert. Inwieweit die ökologische Definition der marinen Huminstoffe als biologisch schwer abbaubare Verbindungen mit einem Konzept auf der Basis der Extraktionsverfahren in Einklang gebracht werden kann, ist eine offene Frage.

Da die Bildung der Huminstoffe nicht auf der Reaktion einer stöchiometrisch genau definierten Menge bestimmter Verbindungen beruht, ist ihre Struktur nicht im Einzelnen definierbar. Ein Vergleich von terrestrischen und marinen Huminstoffen zeigt, daß die Hauptunterschiede im Ausgangsmaterial begründet sind. Im Gegensatz zu den vaskulären Pflanzen, bei denen Lignin typischer Ausgangsstoff für Huminstoffbildung ist, enthält Phytoplankton, die Ausgangssubstanz für marine Huminstoffe, kaum aromatische Strukturen. Entsprechend sind marine Huminstoffe weniger aromatisch, weniger kondensiert, enthalten weniger phenolische Gruppen, aber mehr Stickstoff, Schwefel, Wasserstoff, Carbonyl- und Carboxylgruppen als terrestrische Huminstoffe.

Die Verwendung des Begriffs "Humifizierung" für die Polymerisation oder Kondensation von Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, bei der Substanzen gebildet werden, die in der marinen Umgebung stabiler sind als die Ausgangsstoffe, ist allgemein akzeptiert (Dawson & Duursma, 1981). Für die Humifizierung im marinen Milieu gibt es im wesentlichen zwei Modelle, wobei das eine abiotische Kondensationsreaktionen und das andere Abbaureaktionen von Biopolymeren für die Huminstoffbildung verantwortlich macht. Das "abiotische Kondensations" - Modell nimmt an, daß Biopolymere zuerst zu kleinen Molekülen

abgebaut werden, die dann polymerisieren und Huminstoffe bilden. Die Melanoidin-Hypothese (Hedges, 1978) schließt die Kondensation von Aminosäuren und Zuckern ein, ist aber wegen der geringen Konzentrationen dieser Stoffe im Meerwasser unwahrscheinlich. Ein von Harvey et al. (1983) vorgeschlagener Bildungsmechanismus, der auf Kondensationsreaktionen infolge von Autooxidation innerhalb der mehrfach ungesättigten Fettsäurereste von Triacylglyceriden beruht, erklärt viele Eigenschaften mariner Huminstoffe, betrachtet allerdings die anwesenden Stickstoffgruppen nicht als essentielle Bestandteile der Grundstruktur. Das "Biopolymerenabbau"-Modell nimmt an, daß stabile Biopolymere von Algen und Bakterien selektiv erhalten bleiben und das Quellenmaterial darstellen, aus dem während seines partiellen Abbaus die Huminstoffe entstehen (Tegelaar et al., 1989). Die geringe Konzentrationen der organischen Substanz im Meerwasser macht Kondensationsreaktionen, die eine intermolekulare Kollision erfordern, von vornherein unwahrscheinlich. Es gibt jedoch viele Prozesse im Meer, die zu hohen lokalen Konzentrationen von DOM führen, wie sie z.B. in zerfallenden Zellen, Oberflächenfilmen oder Aggregationen von oberflächenaktivem Material gefunden werden. In diesen Fällen sind die Abstände zwischen den Molekülen so gering, daß intermolekulare Reaktionen möglich sind (Gagosian & Lee, 1981). Huminstoffe, die unter solchen Bedingungen gebildet würden, könnten ihrerseits wieder Zentren für Aggregationen und Kondensationsreaktionen darstellen, bzw. lassen eine weitere Vernetzung oder intramolekulare Reaktion der dann in unmittelbarer Nähe voneinander angeordneten funktionellen Gruppen wahrscheinlich werden. Yamamoto & Ishiwatari (1989) kombinieren Ansätze beider Modelle, indem sie davon ausgehen, daß alle biochemisch relevanten Moleküle, die in lebenden Zellen vorhanden sind, an der Bildung der Huminstoffe beteiligt sind. Während des bakteriellen Angriffs führen Maillard-Reaktionen (Amino-Carbonyl-Reaktionen) zwischen vorhandenen stabilen Biopolymeren, abgebauten Biopolymeren und neu gebildeten Molekülen

zur Bildung der Huminstoffe. Diese Bildungsreaktion beginnt bereits in den absterbenden Zellen von Phytoplankton und Bakterien in der Wassersäule und setzt sich auch im Sediment fort. Huminstoffe werden von den im Abbau befindlichen Zellen an das Wasser abgegeben. Smith et al. (1992) nehmen an, daß schwer abbaubares DOM, wie es z.B. bei der Glukosilierung von Proteinen gebildet wird, durch Kondensationsreaktionen innerhalb absterbender Zellaggregate entsteht, da hier durch die bakterielle Hydrolyse von Biopolymeren hohe lokale Konzentrationen einer chemisch sehr differenzierten Mischung von gelösten Polymeren, Oligomeren und Monomeren vorliegen. Andere Prozesse, durch die sich ursprünglich labile und biologisch leicht abbaubare Verbindungen in resistente, schlecht charakterisierbare Stoffe umwandeln könnten, werden von mehreren Autoren vorgeschlagen (Degens, 1970; Gagosian & Lee, 1981, Keil & Kirchman, 1994). So wurde zum Beispiel die bakterielle Umwandlung von Monomeren in andere Verbindungen mit höherem Molekulargewicht, die anschließend gegenüber einem weiteren bakteriellen Angriff wesentlich resistenter sind als das Ausgangsmaterial, im Seewasser nachgewiesen (Brophy & Carlson, 1989).

Über die Rolle der Huminstoffe innerhalb der dynamischen Prozesse des DOM in Seewasser und einen möglichen regulativen Einfluß auf die atmosphärische CO₂-Konzentration ist wenig bekannt. Rashid (1985) nimmt an, daß die bei der Humifizierung entstandenen Makromoleküle mit Partikeln in Wechselwirkung treten, Aggregate bilden und so aus der euphotischen Schicht in tiefere Regionen transportiert werden. Labile und inerte Komponenten treten im Oberflächenwasser parallel auf, während in tieferen Schichten die schwer abbaubaren Komponenten dominieren (Williams & Druffel, 1987; Benner et al., 1992). Große, schnell absinkende Aggregate sind wichtige Komponenten für den Kohlenstofftransport von der Oberfläche in tiefere Wasserschichten. Die Verteilung des organischen

Materials im Seewasser wird allerdings besser durch Simulationsmodelle auf der Basis von DOM als durch solche auf der Basis von partikulärem organischen Material (POM) vorhergesagt. Ein großer Teil des Materialflusses in die Tiefe erfolgt deshalb eher in Form von langsam abbaubarem DOM als durch absinkende Partikel (Smith et al., 1992). Da DOM damit eine Schlüsselstellung im Verständnis des Kohlenstoffflusses im Ozean zukommt, ist es von besonderer Wichtigkeit die Mechanismen zu finden, die den Übergang von POM in DOM bestimmen.

Gelöste marine Huminstoffe sind nicht nur in den globalen Kohlenstoffkreislauf eingebunden, sondern auch eng mit der Stickstoffbilanz verknüpft, da sie einen signifikanten Teil des DON-Pools darstellen (Lara et al., 1993), der wiederum eng mit dem Kreislauf der gelösten anorganischen Nährstoffe verbunden ist. Allgemeine Informationen über DON und besonders im Hinblick auf den mit Huminstoffen verbundenen Anteil sind rar. Indirekte Abschätzungen des Huminstoffanteils für marines DON aus gemäßigten Regionen auf der Basis des C/N-Verhältnisses (Walsh, 1989) und der Huminstoffkonzentration im DOM, ergaben einen Konzentrationsbereich von 0,7-6,4 $\mu\text{M N}$ (Stuermer & Harvey, 1977; Harvey et al., 1983). Diese Ergebnisse lassen sich nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im offenen Ozean in höheren Breiten extrapolieren, da durch unterschiedliche Sonneneinstrahlung und andere Nährstoffkonzentrationen völlig verschiedene Lebensbedingungen für die Primärproduzenten gegeben sind. Es ist daher von besonderem Interesse zu untersuchen, wie die Zusammensetzung des DON-Pools in Abhängigkeit von der Planktonsituation variiert.

Verschiedene Autoren fanden eine Assoziation zwischen gebundenen Aminosäuren und schwer abbaubaren Verbindungen wie den Huminstoffen in unterschiedlichem Milieu (De Haan & de Boer, 1979; Lytle & Perdue, 1981; Fox, 1981; McKnight et al., 1991). Obwohl einerseits Huminstoffe und andererseits

gebundene Aminosäuren entscheidend zum DON-Pool im Ozean beitragen, gibt es nur wenige Informationen über eine Assoziation zwischen Huminstoffen und Aminosäuren im Meerwasser (Gagosian & Stuermer, 1977; Malcolm, 1990). Aminosäuren bilden als Grundbausteine der Proteine das größte Stickstoffreservoir vieler Organismen (Montani & Okaichi, 1985). Aminosäuren sind auch im DON, teilweise in freier und überwiegend in gebundener Form, vorhanden (Kattner & Becker, 1991). Es ist demzufolge gut möglich, daß ihnen bei der Bildung der Huminstoffe eine Schlüsselrolle zukommt. Im Hinblick darauf, daß die traditionellen Modelle für die Huminstoffbildung in Seewasser keine befriedigende Erklärung für das Vorhandensein von signifikanten Stickstoffkonzentrationen geben, läßt die Klärung der Frage, ob und inwieweit Aminosäuren in Huminstoffe eingebunden sind, Einblicke in den Bildungsprozeß der Huminstoffe insgesamt erwarten.

2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Welcher Anteil der gelösten Aminosäuren ist mit den Huminstofffraktionen des DON assoziiert?
- Wird die Aminosäurekonzentration in den Huminstofffraktionen durch unterschiedliche autotrophe und heterotrophe Aktivität, sowie unterschiedliche Nährstoffsituationen in den Untersuchungsgebieten beeinflusst?
- Lassen sich aus dem Vergleich von Aminosäurekonzentrationen und -mustern des partikulären und des gelösten Pools der organischen Substanz Rückschlüsse auf Umwandlungsprozesse beim Übergang von der partikulären in die gelöste Phase ziehen?
- Kann die Bildung von schwer abbaubaren Verbindungen in Fraktionen des DON beim Abbau von Algenkulturen in in-vitro-Versuchen nachvollzogen werden?
- Ist die Bestimmung von Aminosäuren in verschiedenen Fraktionen des DON ein geeignetes Mittel, um Bildungs- und Abbauvorgänge direkt nachzuvollziehen?
- Inwieweit erlaubt der Vergleich der Daten von natürlichen Proben mit den Ergebnissen von Kulturversuchen eine Interpretation der unter natürlichen Bedingungen ablaufenden Vorgänge?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchung von Seewasserproben

3.1.1 Die Untersuchungsgebiete

Die Probennahme erfolgte von Bord FS "Polarstern" während der Expeditionen ARK VIII/1 (Juni 1991) und ANT X/1b (Dezember 1991).

Während ARK VIII/1 wurden verschiedene Wassermassen der Grönlandsee beprobt (Abb.1), wobei an 10 Stationen Proben aus 5 verschiedenen Tiefen genommen wurden, im allgemeinen 4 Proben aus den oberen 100 m und eine Probe nahe dem Boden. Der Wassertiefenbereich der Stationen erstreckte sich von 3650 m (Station 001) bis 102 m (Station 023).

Während ANT X/1b wurden 5 Stationen in der Drake Passage, der Bransfield Straße und im Weddell Meer beprobt (Abb.2). Hierbei wurden jeweils zwei Proben aus der euphotischen Zone, zwei Proben aus mittleren Tiefen und eine Probe nahe dem Boden genommen. Der Wassertiefenbereich der Stationen erstreckte sich von 200 m bis 3000 m.

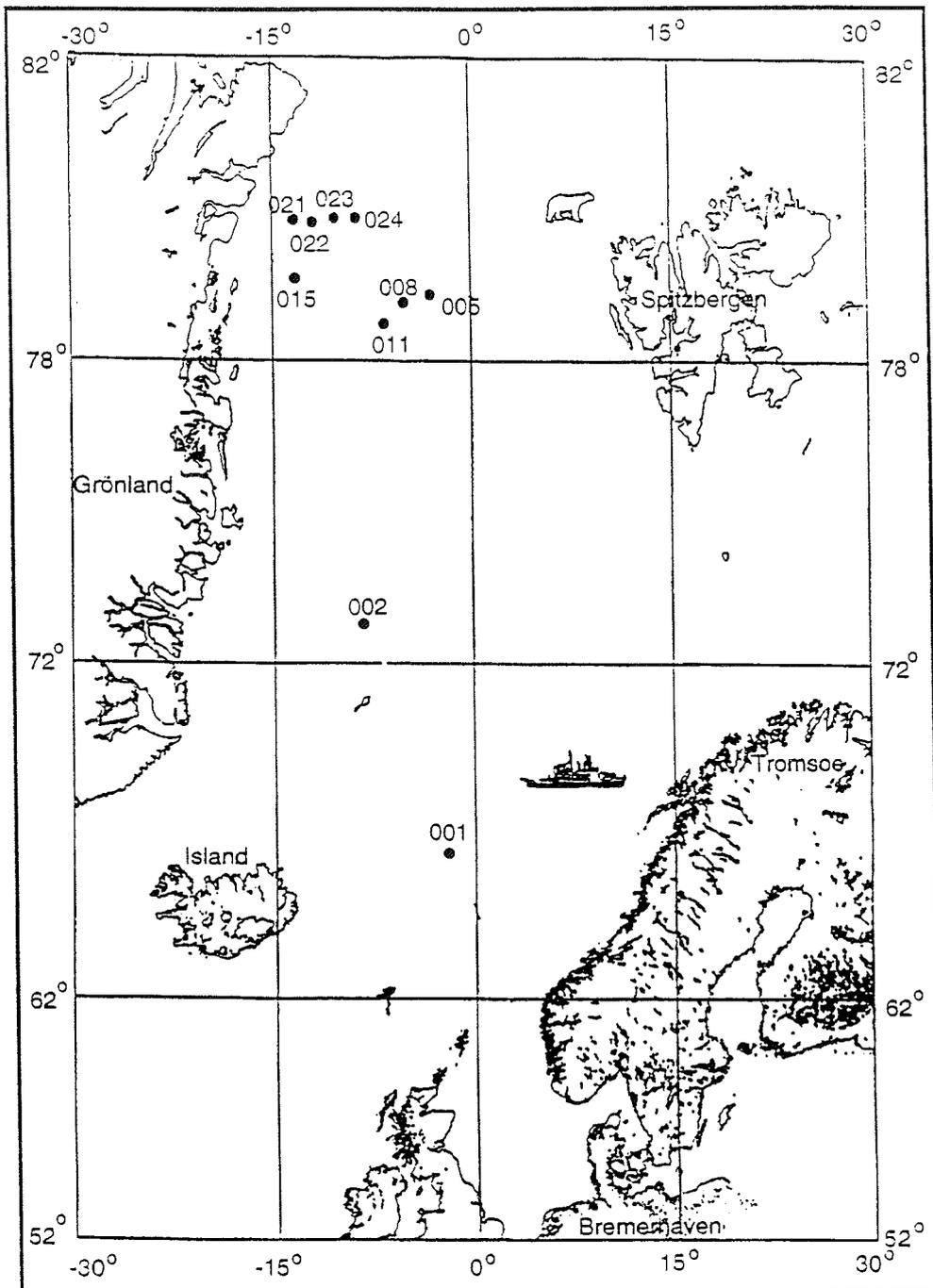


Abb.1: Probennahmestationen in der Grönlandsee während der Polarsternexpedition ARK VIII/1 im Juni 1991

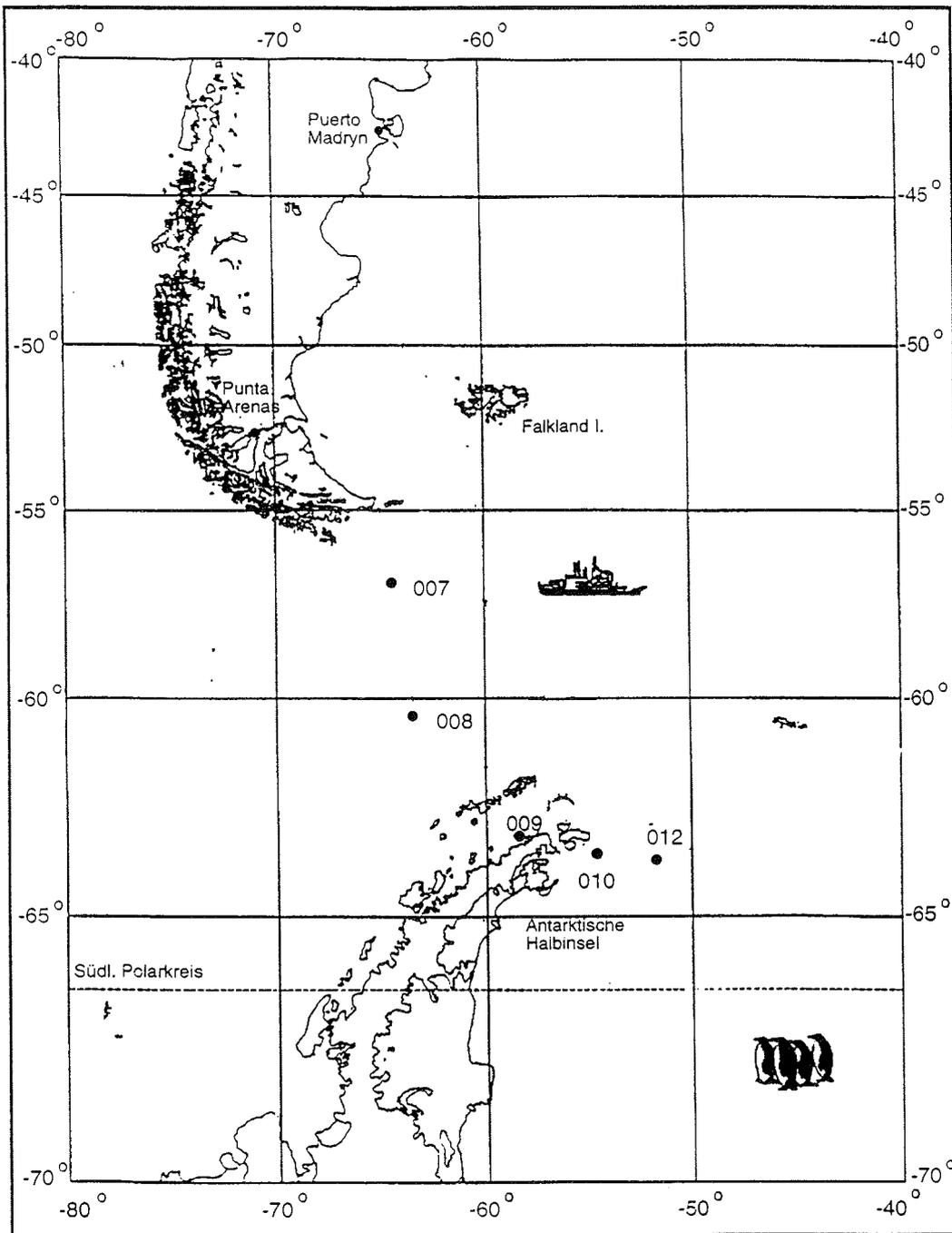


Abb.2: Probennahmestationen in der Drake Passage, der Bransfield Straße und im Weddell Meer während der Polarsternexpedition ANT X/1b im Dezember 1991

3.1.2 Probennahme und Lagerung

Zur Probennahme wurde ein Rosettenschöpfer mit CTD-Sonde verwendet. Direkt nach der Probennahme wurden alle Proben an Bord weiterverarbeitet. Die Proben wurden über Glasfaserfilter, GF/C (1,1 µm Rückhaltevermögen) (Whatman International, UK), die bei 450°C 5 Stunden lang gegläht worden waren, filtriert. Nach der Filtration wurde das Filtrat mit 3,5%iger HgCl₂-Lösung (3 mL/L Probe) fixiert und sofort der Fraktionierungsprozedur unterzogen. Die Filter mit partikulärem Material wurden in Ampullen unter N₂ eingeschmolzen und bis zur weiteren Aufarbeitung an Land bei -27°C gelagert.

Sämtliches Arbeitsmaterial wurde, soweit möglich, nach der Reinigung bei 450°C 5 Stunden im Muffelofen gegläht oder mit Methanol, Natronlauge und Milli-Q-Wasser mehrmals gespült und bis zur Verwendung verschlossen aufbewahrt. Während der Probennahme und der Aufarbeitung wurde darauf geachtet, jegliche Kontamination der Proben zu vermeiden; unter anderem wurde grundsätzlich nur mit Handschuhen gearbeitet. Alle Chemikalien waren von der besten verfügbaren Qualität (p.a. oder höher; Lösungsmittel: Lichrosolv Merck).

3.1.3 Bestimmung von DIN

Die Bestimmung der anorganischen Nährsalze (Nitrat, Nitrit, Ammonium) erfolgte direkt nach der Probennahme mit einem Technicon Autoanalyzer II System. Nitrit und Nitrat wurden nach Armstrong et al. (1967) und Ammonium nach Koroleff (1969) bestimmt.

3.1.4 Bestimmung von DON

Für die Bestimmung von DON wurde die Naßoxidationsmethode nach Koroleff (1977, 1983) verwendet. 20 mL Probe, die - wenn nötig - zuvor mit Puffer auf pH 8-8,5 eingestellt worden war, wurden zusammen mit 3 mL Aufschlußreagenz (25 g Kalium-Peroxodisulfat, 7,5 g Natriumhydroxidplättchen und 15 g Borsäure in 500 mL Milli-Q-Wasser) in Teflongefäße gegeben und 2 Stunden bei 120°C autoklaviert. DIN wurde in aufgeschlossenen und nicht aufgeschlossenen Proben bestimmt und DON als Differenz beider Werte berechnet. Regelmäßig wurden die entsprechenden Blindwerte von Puffer und Aufschlußreagenz gemessen und in der Berechnung berücksichtigt.

3.1.5 Fraktionierung von DOM über XAD-2

Die Anreicherung der hydrophoben Komponenten aus den filtrierten Seewasserproben erfolgte säulenchromatographisch mit XAD-2-Harz (Serva, Heidelberg) mit einer Partikelgröße von 0,3 - 1,0 mm. Der Versuchsaufbau war so konzipiert, daß Probe und Lösungsmittel ausschließlich mit Glas und Teflon in Berührung kamen. Die chromatographischen Säulen hatten eine Länge von 30 cm und einen Innendurchmesser von 1 cm. 15 mL XAD-2 wurden (in Methanol aufgeschlämmt) in jede Säule eingebracht. Zur Vorreinigung wurde das Harz mit Dichlormethan, Methanol, 0,2 M NaOH und 0,01 M HCl mehrmals in dieser Reihenfolge, sowohl vor als auch nach dem Befüllen der Säulen, gespült. Vor der Probenaufgabe wurden die Säulen mit 0,1 N HCl konditioniert. Um eine Verzögerung bei der Probenaufarbeitung zu umgehen, wurden jeweils 5 Säulen (eine für jede der 5 Tiefen pro Probennahme) parallel betrieben.

1000 mL des filtrierten Seewassers wurden auf pH 2 mit HCl angesäuert. Davon wurden 500 mL zur Bestimmung der Ausgangsparameter verwendet, die restlichen 500 mL passierten mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,35 Bettvolumen/min die XAD-2-Säule (Mantoura & Riley, 1975; Stuermer & Harvey, 1977; Thurman & Malcolm, 1981). Nach Durchgang der Probe wurde das Harz zum Entfernen von Salzresten mit 100 mL 0,01 M HCl gespült. Die adsorbierten Substanzen wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,07 Bettvolumen/min (Thurman & Malcolm, 1981) zunächst mit 100 mL 0,2 M NaOH und anschließend mit 100 mL Methanol eluiert. Die beiden Fraktionen wurden getrennt aufgefangen. Nach der Elution und vor Aufgabe der nächsten Probe wurde das Harz mit jeweils 100 mL der folgenden Lösungsmitteln in der angegebenen Reihenfolge gereinigt: Methanol, Dichlormethan, Methanol, 0,2 M NaOH und 0,01 M HCl.

Die angesäuerte Probe, die HI-Fraktion (0,01 M HCl) und die basische HbA-Fraktion (0,2 M NaOH) wurden für die nachfolgenden Bestimmungen neutralisiert. Für 1 L Pufferlösung, die zur Neutralisation der sauren Lösungen verwendet wurde, wurden 6,6 g Borsäure (p.a.; Merck) und 5,0 mL NaOH (p.a. 32%, zur Stickstoffbestimmung; Merck) in Milli-Q-Wasser gelöst. 1 L Pufferlösung zur Neutralisation der basischen Eluate enthielt 32,1 g Borsäure (p.a.; Merck) und 89,5 mL HCl (suprapur 30%; Merck) in Milli-Q-Wasser. Durch die Zugabe von 20 mL Pufferlösung zu jeweils 100 mL Lösung wurde der pH-Wert von 8-8,5 erreicht. Durch das Arbeiten mit identischen Puffervolumina für alle Proben wurde die Erfassung der Blindwerte und die Auswertung vereinheitlicht. Die HbA-Fraktion wurde mit 300 µL 3,5 %iger HgCl₂-Lösung pro 100 mL Probe versetzt.

Die DON-Bestimmungen des filtrierten Seewassers, der HI- und der HbA-Fraktion erfolgten direkt an Bord. Der verbleibende Rest der mit HgCl₂ konservierten Proben wurde zur Bestimmung der Aminosäuren an Land bei 4°C aufbewahrt. Die

HbN-Fraktion wurde unter N₂ in 100 mL Glasampullen eingeschmolzen und zur späteren Verarbeitung ebenfalls bei 4°C gelagert. Vor der Durchführung weiterer Bestimmungen wurde das Volumen der Methanoleluate am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40°C bis auf 200-300 µL reduziert. Dieser Rest wurde mit 100 mL 0,2 M NaOH aufgenommen und, wie für die NaOH-Eluate beschrieben, weiter verarbeitet.

Von allen Prozessschritten wurden Blindwerte bestimmt, die anschließend zur Korrektur der entsprechenden DON- und Aminosäurekonzentrationen verwendet wurden. Die Konzentrationen in den Extrakten wurden auf die Gehalte im Seewasser umgerechnet.

Im Rahmen der Polarsternexpedition ARK VIII/1 wurden parallel zur normalen Probennahme und -aufarbeitung an einigen Stationen große Volumina (20 L) Seewasser über XAD-2 (in entsprechend dimensionierten Säulen) fraktioniert, wobei ein Anreicherungsfaktor von 40:1 erreicht wurde. Das viskose, gelbbraune Konzentrat des Methanoleluats wurde in einem kleinen Volumen NaOH (0,2 M) aufgenommen und zur Fällung der Proteine mit 10 %-iger TCA-Lösung gekocht (Smucker & Dawson, 1986).

3.1.6 Hydrolyse der gebundenen Aminosäuren

Zur Hydrolyse des partikulären Materials wurden die aufgetauten Filter in vorgeglühten Ampullen mit jeweils 10 mL Milli-Q-Wasser versetzt und im weiteren wie die Proben des gelösten Materials behandelt.

10 mL Probe (Seewasser oder Eluat) wurden mit 10 mL HCl (30%, suprapur, Merck) versetzt. Um dem Verlust von Aminosäuren infolge oxidativen Abbaus durch

Nitrat vorzubeugen, wurden 100 µL einer 11,36 mM Ascorbinsäurelösung zugesetzt (Robertson et al., 1987). Die Ampullen wurden mit N₂ gespült und abgeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgte bei 110°C innerhalb von 24 h. Nach dem Abkühlen wurden die Hydrolysate durch Zugabe von 8,9 mL einer Lösung von 30,91 g Borsäure (p.a., Merck, Darmstadt) in 1 L NaOH (p.a. 32%, zur Stickstoffbestimmung; Merck) annähernd neutralisiert. Zur exakten Einstellung von pH 8,50 wurden bei Bedarf 50-100 µL konzentrierte HCl oder NaOH zugegeben. Die pH-Messung erfolgte mit einer sehr dünnen pH-Elektrode direkt in den Ampullen. Die so erhaltenen gepufferten Lösungen wurden direkt zur Bestimmung der Aminosäuren eingesetzt. Nach demselben Verfahren wurden Blindwerte für Filter und Reagenzien bestimmt.

3.1.7 Bestimmung freier Aminosäuren

3.1.7.1 Geräte und Analysenbedingungen

Die Proben aus der Arktis (ARK VIII/I) wurden in einer älteren Apparatur (Beckmann, USA) mit manueller Derivatisierung und Probenaufgabe, sowie mit einem Hochdruckgradientensystem mit unabhängiger Förderung der beiden Eluenten durch getrennte Hochdruckpumpen und hochdruckseitiger Vermischung, bearbeitet. Die restlichen Proben wurden mit einem HPLC-System (Merck, Darmstadt) mit vollautomatischem Probengeber und Niederdruckgradientenpumpe (Abb.3) analysiert.

Die Vorteile des vollautomatischen Systems bestehen vor allem in der Möglichkeit eines höheren Probendurchsatzes und der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, besonders im Hinblick auf die Dosierung der Reagenzien und die Einhaltung der Reaktionszeit innerhalb der Derivatisierungsreaktion.

Alle Eluenten wurden mit Helium begast. Die Derivatisierung für beide Derivatisierungsmethoden (OPA und FMOC-CI) erfolgte vollautomatisch im Autosampler. Da die Durchmischung der Probe mit den Reagenzien hierbei in einem separaten Derivatisierungsgefäß durch wiederholtes Ansaugen und Ausstoßen der Mischung erfolgte, war die Derivatisierung nicht auf Volumina im Bereich weniger μL beschränkt, wie bei anderen Probengebern, bei denen die Reaktion im Ansaugschlauch erfolgt und so auf die Grenzfläche zwischen den Phasen beschränkt ist. Zum Spülen des Autosamplers wurde ein Gemisch von Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1 verwendet, das zuvor im Ultraschallbad entgast wurde.

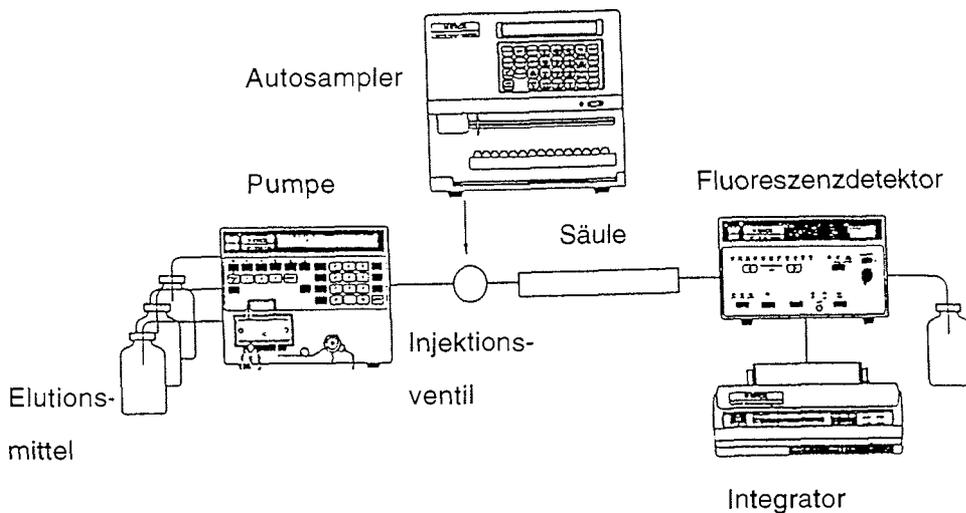


Abb.3: HPLC-System (Merck, Darmstadt) bestehend aus folgenden Modulen: Niederdruckgradientenpumpe, Säulenthermostat, Roboterautosampler, Fluoreszenzdetektor, Integrator (Abb. aus Beinert et al., 1992)

Die Bestimmung der Aminosäuren nach der OPA- und der FMOC-CI-Methode erfolgte unter den in Tabelle 1 bzw. 2 angegebenen Analysenbedingungen. Die Konzentrationen von Seewasserproben und angereicherten Eluaten lagen im allgemeinen im Meßbereich. Hydrolysate partikulärer Proben, in denen höhere Konzentrationen auftraten, wurden entsprechend verdünnt.

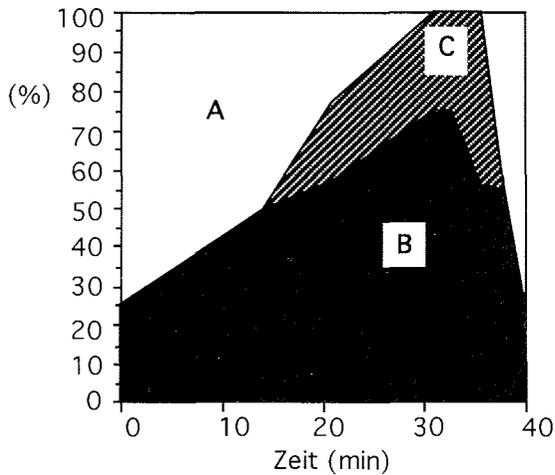
Tab.1: Analysenbedingungen für die OPA (ortho-Phthaldialdehyd)-Methode

Probe: Die auf pH 8,5 eingestellte (am besten gepufferte) Probe sollte 10 - 200 nM von jeder Aminosäure enthalten.

Derivatisierungsreagenzien: OPA-Reagenz "Fluoraldehyde reagent solution" (0,8 mg OPA/mL; Pierce)

Injektionsvolumen: 200 µL
 Säule: Lichrospher 100 RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm (Merck)
 Vorsäule: Lichrospher 100 RP-18, 5 µm, 4x4 mm (Merck)
 Säulentemperatur: 38°C
 Detektion: Fluoreszenz: Ex 340 nm/ Em 455 nm
 Eluenten: A = 0.1 M Phosphatpuffer mit 1,25% THF; pH 6.8
 B = Methanol
 C = Milli-Q-Wasser
 Flußrate: 0.8 mL/min

Gradient:



| Zeit (min) | B (%) | C (%) |
|------------|-------|-------|
| 0 | 0 | 0 |
| 14 | 49 | 0 |
| 21 | 57 | 20 |
| 31 | 75 | 25 |
| 33 | 75 | 25 |
| 36 | 56 | 44 |
| 38 | 55 | 0 |
| 40 | 25 | 0 |

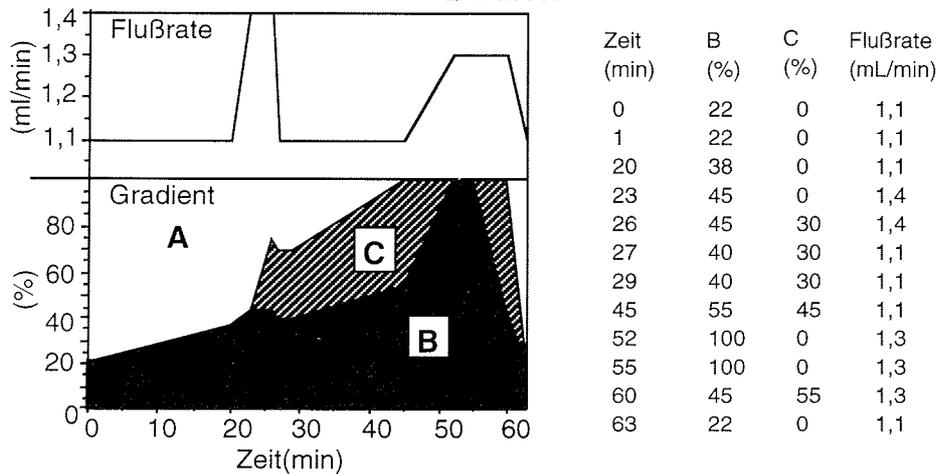
Tab.2: Analysenbedingungen für die FMOC-Cl
(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-chlorid)-Methode

Probe: Die auf pH 8.5 eingestellte Probe (unbedingt gepuffert) sollte 100 - 1000 nM Aminosäuren enthalten.

Derivatisierungsreagenzien: 0,5 M Boratpuffer pH 8,5
0,075 mM FMOC-Cl (9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid, Merck) in Aceton
30 mM ADAM (Adamantanamin, Merck) in Aceton/Wasser (3/1)

Injektionsvolumen: 200 µL
Säule: Superspher 60 RP-8, 4 µm, 250 x 4 mm (Merck)
Vorsäule: Lichrospher 100 RP-8, 5 µm, 4x4 mm (Merck)
Säulentemperatur: 45°C
Detektion: Fluoreszenz: Ex 263 nm/ Em 313 nm

Eluenten: A = 100 mM Acetat pH 4,4 oder 3,9
B = Acetonitril
C = Milli-Q-Wasser



Um eine konstante Konzentration des FMOC-Cl-Reagenzes zu gewährleisten, wurde das Reagenz für jede Probe in einem separaten, geschlossenen Gefäß in den Probengeber gestellt.

3.1.7.2 Eichung und Konzentrationsberechnung

Bei den unterschiedlichen Probenmatrizes (Salzwasser, gepufferte Hydrolysatlösung verschiedener Proben, etc.) erwies sich eine matrixabhängige Kalibrierung als unerlässlich, d.h. die Standards wurden in einer der jeweiligen Probenserie vergleichbaren Matrix angesetzt und denselben Derivatisierungs- und Verdünnungsschritten unterworfen.

Es wurde am Anfang und am Ende jeder Meßreihe eine Verdünnungsreihe der Standards von 2-20 pmol je AA/200 µL Injektionsvolumen gemessen. Spätestens nach jeder 10. Probe wurde ein Standard entsprechend dem Konzentrationsbereich der Proben gemessen. Zur Eichung wurden alle innerhalb einer Probenserie gemessenen Standards verwendet. Für alle Proben wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.1.8 Aufarbeitungsschema für Seewasserproben - Bezeichnung der Fraktionen und Komponenten

In Abb.4 ist die Reihenfolge der einzelnen Schritte bei der Aufarbeitung der Proben sowie die Benennung der Fraktionen und Komponenten angegeben.

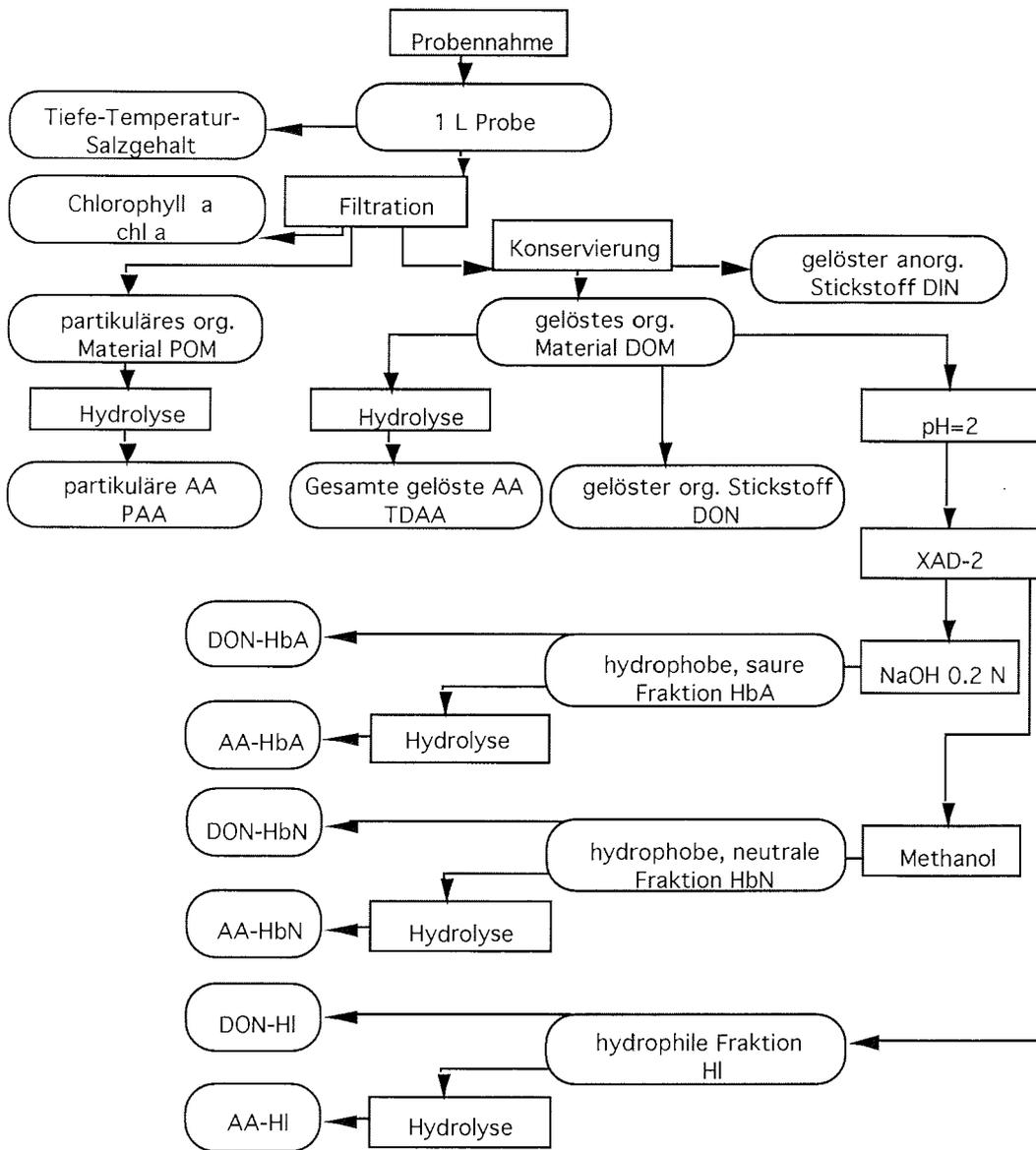


Abb.4: Aufarbeitungsschema für Seewasserproben

3.2 Untersuchung der Proben der Algenkultur

3.2.1 Algenmaterial und Kulturbedingungen

Die Diatomeenart *Thalassiosira antarctica* (SK 1) stammte von der Expedition ANT IX/2 (1992) und wurde bei Position S 63°15';W 58°20' von Dr. M. Baumann (Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven) isoliert. Für die Versuche wurde die Impfkultur in einem Kühlkontainer bei einer Temperatur von 0°C und einer Beleuchtung von ca. 100 mE·m⁻²·s⁻¹ in einer Nährlösung nach Stosch & Drebes (1964) gehältert, bis ein deutlicher Anstieg der Biomasse zu beobachten war. Im Anschluß wurde die Impfkultur mit dem Kulturmedium mehrmals gewaschen, um den Anteil der mit EDTA versetzten Nährlösung so gering wie möglich zu halten.

Beim Ansetzen des Kulturmediums wurde darauf geachtet, keine künstlichen Substanzen zuzusetzen, die die Huminstoffbildung beeinflussen konnten (z.B. wie EDTA durch Komplexbildung). Antarktisches "Brauneis", dessen braune Farbe auf einem großen Anteil von eingeschlossenem Algenmaterial beruht, wurde im Kühlschrank bei 5°C aufgetaut und anschließend über 0,22 µm Zelluloseacetatfilter (Sartorius) mit Unterdruck filtriert. Ein Teil des Filtrats und der Filter wurde, ebenso wie die Proben, die im Verlauf des Versuchs aus der Kultur entnommen wurden, fraktioniert und analysiert. Als Kulturmedium dienten 18 L gealtertes, antarktisches Tiefenwasser (filtriert) von der Polarstern-Expedition ANT IX/2, das in einer 20 L Glasflasche mit 2 L "Brauneisfiltrat" vereinigt wurde und vor dem Beimpfen mit der Algenkultur mehrere Tage bei den späteren "Start"-Bedingungen (0±1°C, Dauerbeleuchtung) aufbewahrt wurde.

3.2.2 Probennahme und Aufarbeitungsschema

Während einer 19 Tage andauernden "Wachstums"-Phase mit permanenter Beleuchtung erfolgte die Probennahme von ca. 250 mL Probenlösung an jedem 2. Tag. Um das Wachstum der Zellen nicht zu beeinflussen, wurde im allgemeinen auf ein Bewegen der Lösung verzichtet, lediglich vor jeder Probennahme wurde das Medium mechanisch durchmischt. Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Kultur ab dem 19. Tag im Dunkeln gehältert. Im Anschluß erfolgten zunächst zwei Probennahmen im Abstand von 6 Stunden, anschließend wurden die Intervalle zwischen den Probennahmen allmählich auf bis zu 3 Wochen erhöht. Der Versuch wurde am 85. Tag abgebrochen, die verbliebene Probe auf 8 Erlenmeyerkolben verteilt und das Verhalten der Zellen nach Zugabe verschiedener Nährstofflösungen und erneutem Einschalten des Lichts beobachtet.

Ca. 30 mL der Probenlösung wurden zur Bestimmung der Bakterienzahl in ein steriles Gefäß überführt. Weitere 30 mL wurden zum Auszählen der Diatomeenzellzahl entnommen und zur Konservierung mit 1,5 mL 20%iger (mit Hexamin gepufferter) Formalinlösung versetzt. Im Anschluß wurden ca. 250 mL Probe entnommen und entsprechend dem nachfolgenden Schema weiterverarbeitet:

200-250 mL Probe wurden filtriert. Die Filter wurden nach jeweils 50 oder 100 mL Probe (s.u.) gewechselt, das Filtrat wurde im Filtrationsgefäß gesammelt.

Es wurden folgende Bestimmung durchgeführt:

- Am Rückstand:

Filter von 50 mL Probe : Bestimmung der PAA

Filter von 50 mL Probe : Fraktionierung des partikulären Materials

Filter von 100 mL Probe: Bestimmung des chl a

- Am Filtrat:

10 mL Filtrat: Bestimmung der FAA

10 mL Filtrat: Bestimmung der TDAA

10 mL Filtrat: Bestimmung des DIN

10 mL Filtrat: Bestimmung des DON

100 mL Filtrat: Fraktionierung des DOM über XAD-2

Im Gegensatz zu den Methoden der Feldproben wurden für die XAD-2-Fraktionierung von DOM, für die Extraktion der Fraktionen sowie für die DON-Bestimmungen die Volumina verkleinert: in die Säulen wurden 5 mL XAD-2 eingebracht; die Fließgeschwindigkeiten von Probe und Eluenten blieben unverändert. Zur Fraktionierung wurden 100 mL Probe (mit pH = 2) auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte zuerst mit 25 mL NaOH (0,2 M) und anschließend mit 25 mL Methanol. Das NaOH-Eluat wurde mit 5 mL Boratpuffer neutralisiert; das Methanoleluat wurde auf wenige μL eingengt, mit 25 mL NaOH aufgenommen und ebenfalls mit 5 mL Boratpuffer neutralisiert. Die DON-Bestimmung erfolgte mit 5 mL Probe und 1,25 mL Aufschlußreagenz.

Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte durch Ansetzen von Bakterienkulturen auf Agarnährböden und anschließendem Auszählen der Kolonien. Mit dieser Methode wird die Zahl der lebenden aktiven Bakterien bestimmt, die auf Agar wachsen, und die somit Trends im Zustand und der Aktivität der Heterotrophen widerspiegelt (K. Lochte, pers. Mitteilung). Allerdings wird lediglich ein Teil der vorhandenen Bakterienbiomasse erfaßt.

3.2.2.1 Fraktionierung des partikulären Materials

Nach der Probennahme wurden die zur Fraktionierung bestimmten Filter bis zur Aufarbeitung in Glasröhrchen bei -20°C gelagert. Zur Trennung der "Monomeren/Peptid"-Fraktion von der "Protein"-Fraktion und einer NaOH-unlöslichen Fraktion wurden die Filter zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren unterzogen. Abb.5 zeigt das Aufarbeitungsschema und erläutert gleichzeitig die Bezeichnung der einzelnen Fraktionen.

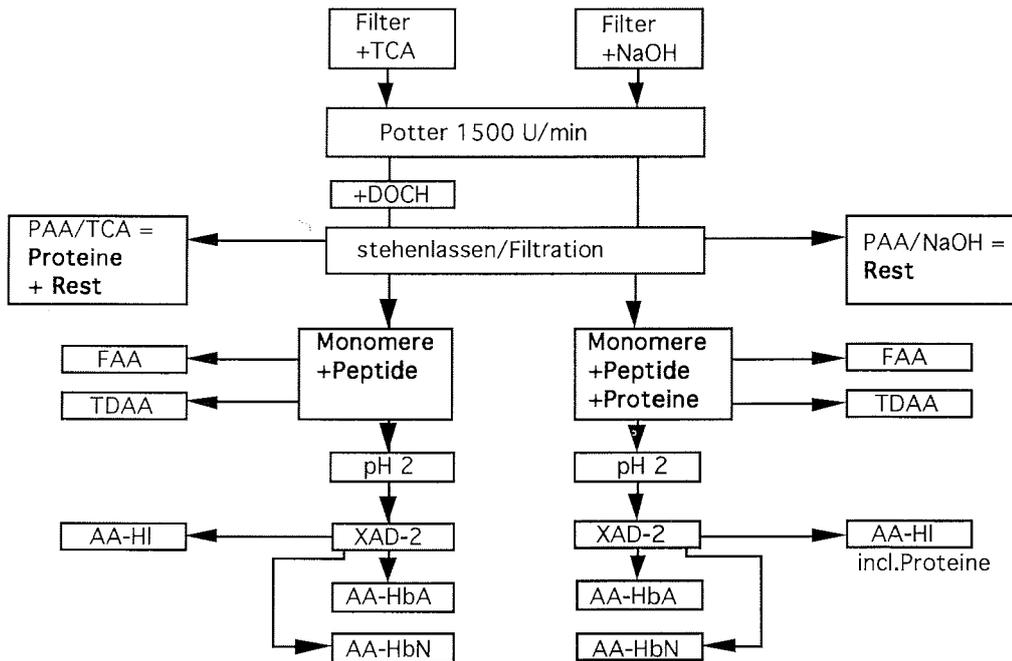


Abb.5: Schema zur Aufarbeitung des partikulären Materials

Um mit dem vorhandenen Material beide Extraktionsverfahren durchführen zu können, wurden Filter aus zeitlich aufeinanderfolgenden Probennahmen jeweils alternierend mit TCA und NaOH extrahiert.

Zur Extraktion wurde der aufgetaute Filter mit dem partikulären Material zusammen mit 10 mL kalter TCA (10%) in ein Potterröhrchen gegeben und 5 min homogenisiert (1500 U/min). Zur Fällung kleiner Proteinmengen wurde anschließend 1 mL Natriumdeoxycholat-Lösung (DOCH, 0,15% w/v) zugegeben (Bensadoun & Weinstein, 1976; Clayton et al., 1988). Alternativ wurde der aufgetaute Filter mit 10 mL NaOH (0,025 M) in ein Potterröhrchen gegeben und 5 min homogenisiert (1500 U/min). Vor der Filtration über GF/C-Filter wurden die Homogenate beider Extraktionsmethoden einige Stunden stehengelassen. In den Rückständen wurden PAA bestimmt. Das Filtrat wurde mit Milli-Q-Wasser auf 100 mL aufgefüllt. In dieser Lösung wurden FAA und TDAA bestimmt. 80 mL des Filtrats wurden auf pH 2 eingestellt und über XAD-2 fraktioniert. AA-HbN und AA-HbA wurden bestimmt.

Die Konzentrationsberechnung für die einzelnen löslichen Fraktionen der Aminosäuren im partikulären Material erfolgte sowohl aus den gelösten als auch aus den unlöslichen Anteilen nach der Fraktionierung.

4 Methodische Untersuchungen

4.1 Bestimmung von DON

Für die Bestimmung von DON stehen grundsätzlich entweder die Oxidation bei hohen Temperaturen (High Temperature Catalytic Oxidation, HTCO: 680°C mit Katalysator; High Temperature Combustion, HTC: 1110°C ohne Katalysator), die UV-Aufschlußmethode oder die Naßoxidationsmethode mit Peroxodisulfat zur Verfügung. Es gibt unterschiedliche Meinungen darüber, welche analytischen Bedingungen die beste Wiederfindungsrate für Stickstoff aus organischer Substanz liefert (Williams & Druffel, 1988; Sugimura & Suzuki, 1988). Maita & Yanada (1990) fanden in Seewasserproben, Huminstoffen und verschiedenen organischen Substanzen übereinstimmende Ergebnisse mit HTCO-Methode und Peroxodisulfat-Oxidation. Walsh (1989) fand, daß für natürliches Seewasser HTC-, UV- und Naßoxidation zum selben Ergebnis führen.

Die Effektivität der Peroxodisulfat-Methode für marine gelöste Huminstoffe wurde in dieser Arbeit an aus der Deutschen Bucht extrahierten Huminstoffen untersucht. An einem konzentrierten HS-Extrakt wurde Gesamtstickstoff in einem CN-Elementaranalysator (Carlo-Erba 1500, Carlo Erba Strumentazione, Mailand, Italien) durch Verbrennung eines definierten Probenvolumens bei 1700°C bestimmt. Mit demselben Extrakt wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und mit der Peroxodisulfat-Oxidation analysiert. Die Ergebnisse der Naßoxidation lagen in einem Bereich von $\pm 10\%$ der im CN-Analysator ermittelten N-Konzentrationen und zeigten somit eine für die vorliegende Untersuchung befriedigende Übereinstimmung.

4.2. Bestimmung der freien Aminosäuren

Zur Bestimmung von Aminosäuren werden sowohl gaschromatographische als auch flüssigchromatographische Methoden angewandt. In Seewasserproben ist die Flüssigchromatographie der Gaschromatographie überlegen, da die Probenvorbereitung weniger aufwendig ist. Zur Detektion müssen die Aminosäuren, die nur in wenigen Fällen UV-absorbierende Chromophore enthalten, derivatisiert werden. Die Nachsäulenderivatisierung ist zum einen mit einer Peakverbreiterung verbunden und zum anderen sind die Auswahlmöglichkeiten für die Derivatisierungsreagenzien begrenzt, da sie mit den Elutionspuffern verträglich sein müssen. Diese Probleme können durch Vorsäulenderivatisierung umgangen werden, die im wesentlichen folgende Vorteile bietet:

- Die Detektionsempfindlichkeit kann durch spezifische Reaktion mit einem fluoreszierenden Markierungsreagenz erheblich gesteigert werden (Beinert et al., 1992).
- Die Markierungssubstanzen enthalten aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme, die durch die Reaktion mit Aminosäuren nicht nur deren optische, sondern auch chemische Eigenschaften, insbesondere die Polarität verändern: Underivatisierte Aminosäuren sind relativ hydrophil, unterscheiden sich in Basizität und Polarität jedoch teilweise erheblich voneinander. Durch ein für alle Aminosäuren gleiches und relativ zu ihrer Molekülgröße bedeutendes Markermolekül werden die Aminosäurederivate im Vergleich zu den Aminosäuren in Bezug auf ihre Eigenschaften untereinander ähnlicher. Damit können die Analysenzeiten verkürzt werden, und erhebliche Änderungen der Elutionsmittel werden überflüssig.
- Der Einfluß des Elutionspuffers auf die Derivatisierungsreaktion fällt weg und Peakverbreiterungen, wie bei der Nachsäulenderivatisierung, werden vermieden.

Durch die Umsetzung mit OPA/2-Mercaptoethanol (ortho-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol) oder FMOC-Cl (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-chlorid) als Derivatisierungsreagenz werden die polaren Aminosäuren hydrophober und können auf einer Umkehrphasen-Säule (C 18 bzw. C 8) getrennt und fluorimetrisch quantifiziert werden. Die Trennung erfolgt somit vorwiegend aufgrund lipophiler Wechselwirkungen zwischen Aminosäurederivaten und hydrophobem Trägermaterial. Aufgrund der hohen Anforderungen an das Trennsystem bei der Analyse komplexer Aminosäuregemische hat sich die Aminosäurebestimmung in HPLC- (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)-Systemen mit Vorsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion durchgesetzt.

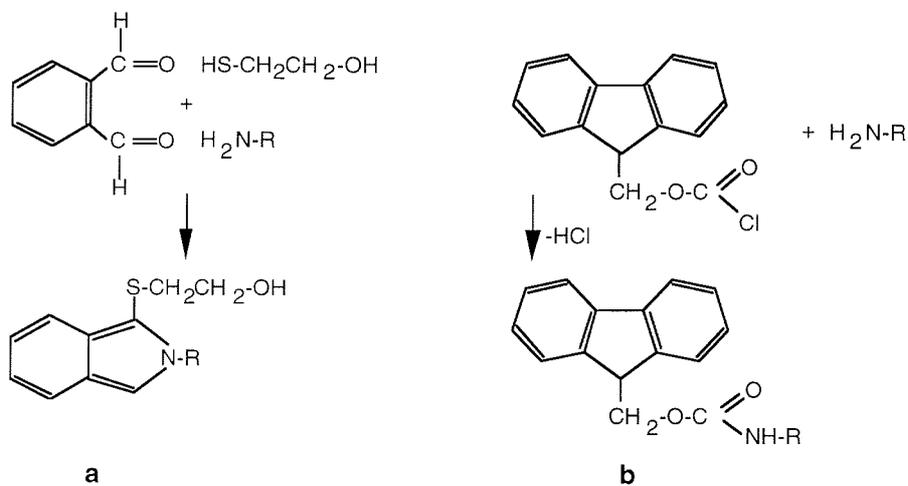


Abb.6: Reaktionsschema für die Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA/2-Mercaptoethanol (a) und FMOC-Cl (b)

4.2.1 Vorsäulenderivatisierung mit OPA

Der selbst nicht fluoreszierende ortho-Phthaldialdehyd bildet mit primären Aminen in Gegenwart einer Thiolverbindung bei alkalischem pH-Wert ein fluoreszierendes

Isoindolringsystem (Abb.6a). Bei der Reaktion wird der Aminostickstoff in Pyrrolstickstoff umgewandelt, bei dem beide vorher freien Funktionen und auch das freie Elektronenpaar im heteroaromatischen Ringsystem integriert sind. Daraus ergibt sich, daß OPA nicht mit sekundären Aminosäuren wie z.B. Prolin oder Hydroxyprolin reagiert. Als Thiolkomponente für die Bestimmung von Aminosäuren in Seewasser und entsprechenden Hydrolysaten hat sich 2-Mercaptoethanol bewährt.

Die Bestimmung der Aminosäuren mit OPA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die von Lindroth & Mopper (1979) und Mopper & Lindroth (1982) entwickelte Methode zur Bestimmung von Aminosäuren in Seewasserproben. Eine wesentliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurde durch den Einsatz eines OPA-Fertigreagenzes erreicht. Dieses Reagenz wurde nach dem Öffnen der Originalflasche in 2 mL-Ampullen unter N₂ portionsweise eingeschmolzen und bis zu seiner Verwendung im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt. Es zeigte so noch nach mehreren Monaten unveränderte Reaktivität.

Die Derivatisierung mit OPA zeigt folgende Nachteile:

- Die Fluoreszenzausbeute der Derivate von Cystein und Cystin ist sehr gering.
- Die Reaktion verläuft zwar schnell, aber die Derivate sind relativ instabil, so daß eine genau festgelegte Reaktionszeit eingehalten werden muß. Die dadurch entstehenden Nachteile im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit können jedoch durch automatische Derivatisierung umgangen werden.
- Sekundäre Aminosäuren wie z.B. pro und hypro bilden keine OPA-Derivate.
- Die Peaks von gly und thr bzw. tyr und ala waren häufig schlecht zu trennen (Abb.7). Besonders dann, wenn gly oder ala verglichen mit thr und tyr in relativ hohen Konzentrationen vorlagen, wurden die kleineren Peaks unvollständig aufgelöst oder ganz überdeckt. In den Seewasserproben gehörten gly und ala zu

den häufigsten Aminosäuren. Thr und tyr waren in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vorhanden (was auch durch Parallelmessungen mit der FMOC-Cl-Methode bestätigt wurde).

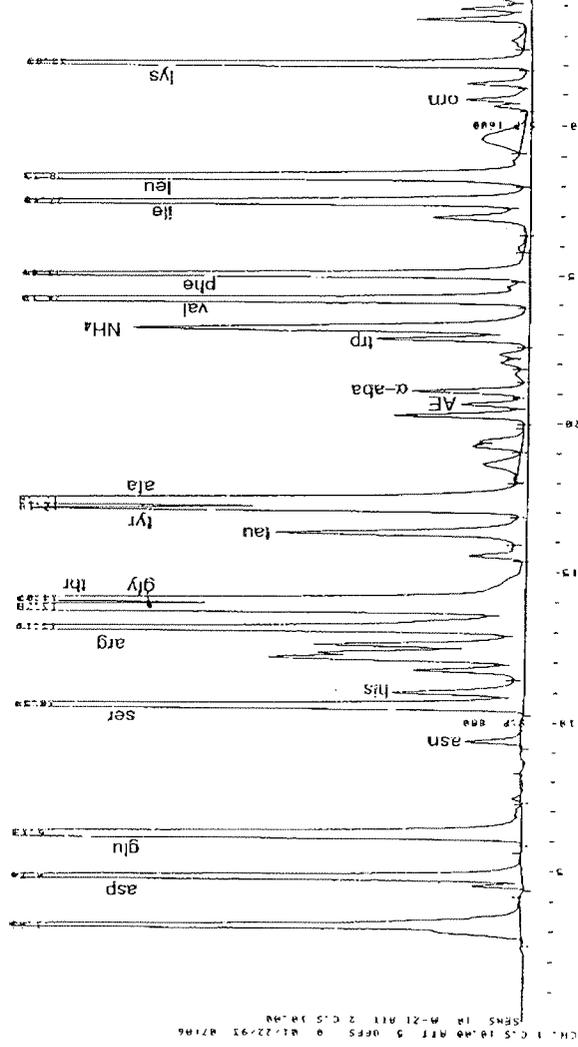


Abb.7: HPLC-Diagramm des partikulären Materials aus dem Algenkulturversuch (vom 10. Versuchstag) nach Hydrolyse und Derivatisierung mit OPA/Mercaptoethanol

4.2.2 Vorsäulenderivatisierung mit FMOC-Cl

FMOC-Cl reagiert schnell und quantitativ mit Aminen zu fluoreszierenden 9-Fluorenyl-Methyl-Carbamaten (Abb.6b). Sowohl primäre als auch sekundäre Amine sind mit FMOC-Cl derivatisierbar, und die Derivate zeichnen sich durch hohe Stabilität aus. Das sind zwei Vorteile der FMOC-Cl- gegenüber der OPA-Methode. Das Hauptproblem der Derivatisierung mit FMOC-Cl ist, daß das Reagenz selbst fluoresziert und als breiter Peak im Elutionsbereich der Aminosäurederivate auftaucht.

Von den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Entfernung des Überschusses an Reagenz aus der Reaktionsmischung schien der Zusatz eines unpolarenamins (z.B. Adamantanamin (ADAM) (Bétner & Földi, 1988)) am ehesten auch für die Bestimmung kleiner Aminosäurekonzentrationen geeignet zu sein. Nach erfolgter Reaktion mit den Aminen der Probe reagiert überschüssiges FMOC-Cl mit dem unpolaren Amin. Der Reagenzpeak wird auf diese Weise aus dem Elutionsbereich der FMOC-Aminosäuren an das Ende des Chromatogramms verschoben. Durch Wasser hydrolysiertes FMOC-Reagenz erscheint allerdings immer noch als Peak im Chromatogramm.

Im Vergleich mit der OPA-Methode zeigt diese Derivatisierung folgende Nachteile:

- Ein zusätzlicher Schritt in der Derivatisierung ist notwendig um überschüssiges Reagenz zu entfernen.
- Ein Reagenzpeak im Elutionsbereich der Aminosäuren ist unvermeidlich.
- Mit zunehmender Alterung der Säule kommt es, besonders beim Arginin, schnell zu Verschiebungen der Retentionszeit.
- Die Derivatisierung insgesamt und die Elution sind in hohem Umfang konzentrations-, matrix- und pH-abhängig. Die Derivatisierung verläuft am besten im Alkalischen (>pH 8,5), während die Elution im Sauren (pH ungefähr 4) erfolgt. Eine optimale pH-Einstellung macht somit die Zugabe von größeren Volumina Puffer und den Einbau mehrerer Verdünnungsschritte erforderlich, bevor die Probe auf die Säule gegeben werden kann.

Die in der Literatur angegebenen Analysenbedingungen zur Aminosäurebestimmung mit FMOC-Cl sind in der Regel auf biologische Proben ausgerichtet, bei denen kleine Volumina mit relativ hohen Konzentrationen zur Verfügung stehen. Bei den Seewasserproben waren dagegen im allgemeinen sehr niedrige

Konzentrationen einzelner Aminosäuren (häufig < 20 nM) vorhanden. Die Analysenbedingungen mußten daher abgewandelt werden, um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen. Die von Beinert et al. (1992) angegebenen Bedingungen führen zu einer Nachweisgrenze von 100 nM je AA in der Probe und einem linearen Bereich von 1 µM - 100 µM je AA. Das heißt, zur Messung der Seewasserproben mußte die Empfindlichkeit um mindestens einen Faktor 100 erhöht werden. Es mußte also innerhalb der Probenbehandlung nach Möglichkeit auf eine Verdünnung verzichtet und gleichzeitig versucht werden, den störenden Hydrolysepeak zu minimieren.

Nachdem sich die OPA-Methode im Rahmen ihrer Möglichkeiten für die vorhandenen Proben als unproblematisch und zuverlässig erwiesen hatte, wurde sie im wesentlichen zur Aminosäurebestimmung verwendet. Ziel der Messung mit der FMOC-Cl-Methode war eine Ergänzung der mit OPA erhaltenen Ergebnisse im Hinblick auf die Trennung von gly/thr und ala/tyr, sowie auf die Möglichkeit der Bestimmung von ökologisch relevanten sekundären Aminosäuren, insbesondere Prolin.

4.2.2.1 Optimierung der Methode

Als Grundlage für die nachfolgend beschriebene Optimierung wurden die von Bétner & Földi (1988) angegebenen Analysenbedingungen verwendet.

Optimierung des Reagenzüberschusses: Eine Aminosäurestandardlösung, die zuvor mit Boratpuffer auf pH 8,5 eingestellt worden war, wurde mit FMOC-Cl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration derivatisiert und unter sonst gleichen Bedingungen gemessen. Beginnend bei kleinem FMOC-Cl-Überschuß nahm die Peakfläche der Aminosäuren zunächst proportional zum FMOC-Cl-Überschuß zu.

Bei ca. 30-fachem Überschuß war die Reaktion annähernd vollständig. Parallel zum zunehmenden FMOC-Cl-Überschuß nahm die Peakfläche des in der Mitte des Chromatogramms erscheinenden Hydrolysepeaks ebenfalls zu (Abb.8).

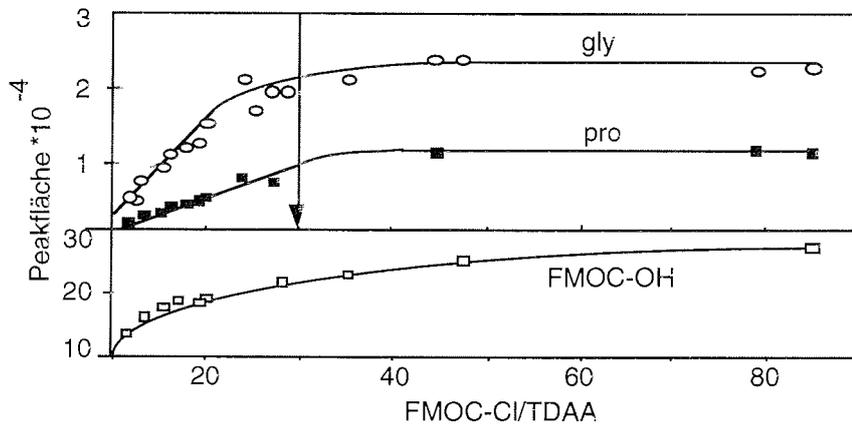


Abb.8: Peakflächen von FMOC-OH, pro und gly in Abhängigkeit vom Molmengenverhältnis FMOC-Cl/TDAA

Das zugegebene Volumen des Derivatisierungsreagenzes sollte einerseits möglichst klein gehalten werden, um die Probe möglichst wenig zu verdünnen und Löslichkeitsprobleme der hochkonzentrierten Puffersalze bei Zugabe des organischen Lösungsmittels Aceton zu umgehen, andererseits sollte ein Mindestvolumen, das eine effektive Durchmischung von Probe und Derivatisierungsreagenz garantiert, nicht unterschritten werden. Ein Volumenverhältnis von Probe zu FMOC-Cl von 10:1 erwies sich in dieser Hinsicht als ausreichend.

Voraussetzung für die quantitative fluorimetrische Bestimmung einer Verbindung ist das Vorhandensein einer stabilen proportionalen Beziehung zwischen Konzentration und Intensität des Fluoreszenzsignals. Deshalb wurde zur Überprüfung der ermittelten Reagenzmengen eine Verdünnungsreihe eines

Aminosäuren-Standards (17 AA in äquimolaren Konzentrationen) im Gesamtkonzentrationsbereich zwischen 100-3400 nM AA gemessen. Zur Berechnung der bei einem FMOC-Cl-Überschuß von 30:1 notwendigen Reagenzmenge wurde eine maximale Konzentration von 400 nM TDAA in Lösung angenommen. In Abb.9 sind als Beispiel die Peakflächen für einige Aminosäuren in Abhängigkeit von TDAA dargestellt. Es zeigt sich ein linearer Verlauf von 100 bis ca. 1200 nM TDAA im Standard. Die unterschiedlichen Steigungen der Geraden zeigen, daß sich die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen FMOC-AA-Derivate unterscheiden. Die relative Fluoreszenzausbeute, bezogen auf gly, ergab nur für pro, tau, ser Werte um 1, während die anderen Aminosäuren deutlich niedrigere Werte zeigten.

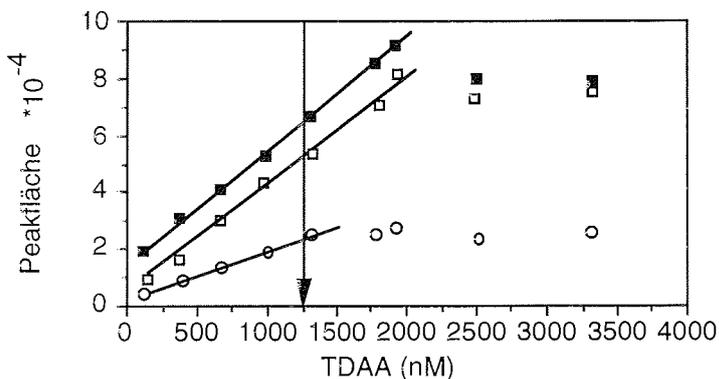


Abb.9: Verdünnungsreihe eines Standards, der 17 Aminosäuren in äquimolaren Konzentrationen enthielt. Als Beispiel sind die Peakflächen von tyr (○), pro (◻) und gly (◼) in Abhängigkeit von TDAA abgebildet.

Optimierung des Verhältnisses FMOC-Cl/ADAM: Eine ADAM-Konzentration von 30 mM, gelöst in Aceton - Wasser im Verhältnis 3 : 1 wurde gewählt. Von dieser Lösung wurden ansteigende Volumina zur derivatisierten Probe zugegeben. Bei einer Retentionszeit von ca. 26 min erschien zusammen mit dem FMOC-Hydrolysepeak bei kleinen ADAM-Volumina noch der Peak des nicht umgesetzten

Reagenzes selbst (FMOC-Cl). Seine Fläche reduziert sich jedoch schnell mit steigender ADAM-Menge (Abb.10)

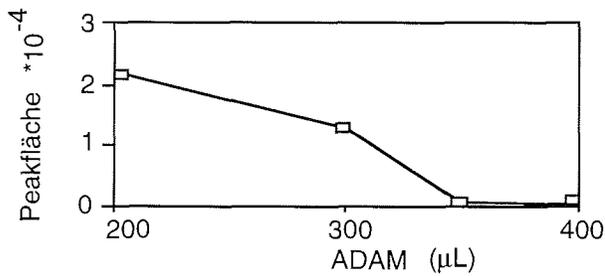


Abb.10: Fläche des Reagenzpeaks in Abhängigkeit von der ADAM-Menge

Optimierung der Reaktionszeiten: Nach dem Mischen von Probe und FMOC-Cl führte eine Reaktionszeit von ca. 45 s zu annähernd vollständigem Umsatz. Ab 30 s begann mit steigender Reaktionszeit eine deutliche Verbreiterung des Hydrolysepeaks (Abb.11).

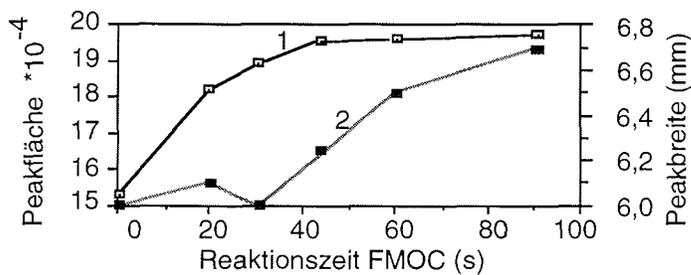


Abb.11.: Peakfläche von pro+gly (1), Peakbreite von FMOC-OH (2) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit FMOC-Cl

Für Reaktionszeiten von ADAM zwischen 120 und 600 s wurde die Basislinie und die Breite des Hydrolysepeaks vermessen. Durch längere Reaktionszeiten ließ sich ein Basislinienanstieg nach dem FMOC-OH-Peak vermeiden. Die Zeitspanne, die

zur vollständigen Equilibrierung der Säule vor einem Neustart notwendig war, konnte für die Reaktion mit ADAM ausgenutzt werden.

Optimierung des pH-Werts der Probe: Die Reaktion verlief umso vollständiger, je höher der pH-Wert in der Lösung war. Dies ist am Beispiel der mit steigendem pH-Wert zunehmenden Peakfläche von pro in Abb.12 dargestellt. Bei hohem pH-Wert war allerdings die Hydrolyse von FMOC-Cl beschleunigt und damit der Elutionspeak verbreitert. Außerdem sollte bei Seewasserproben ein pH-Wert von 8,5 nicht überschritten werden, da sonst die Erdalkalihydroxide ausfallen können. Bei der Bestimmung der gebundenen Aminosäuren wurde zur Neutralisation der Proben nach der Hydrolyse hochkonzentrierte Pufferlösung verwendet und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Auf diese Weise konnte ein zusätzliches Verdünnen während der Derivatisierung vermieden werden.

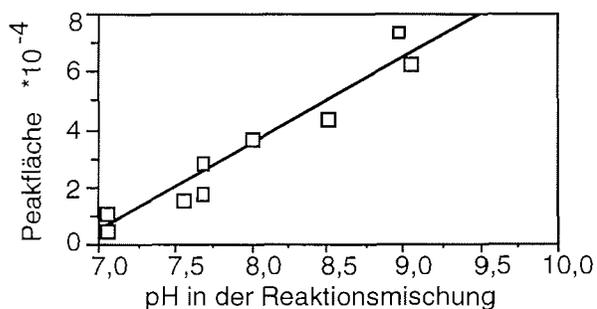


Abb.12: Peakfläche von pro in Abhängigkeit vom pH-Wert der Probe

Optimierung des Mischungsverhältnisses Aceton/Wasser: Die starken Polaritätsunterschiede zwischen wäßriger Probenlösung und lipophilen Derivatisierungsreagenzien machten eine Anpassung des Mischungsverhältnisses von organischer und wäßriger Phase an die gegebenen Bedingungen notwendig. Da der Puffer relativ konzentriert war, führte die Zugabe großer Mengen eines organischen Lösungsmittels zur Ausfällung; ADAM und FMOC-Cl hingegen waren

in Aceton besser löslich als in Wasser. In der Regel wurde ein Mischungsverhältnis von Wasser : Aceton von 1: 0,85 verwendet. Wenn bei diesem Verhältnis eine Ausfällung auftrat, wurde der Reaktionsmischung Wasser zugesetzt.

Optimierung von pH-Wert im Eluenten: Die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäurepeaks zeigten im Gegensatz zum FMOC-Hydrolysepeak eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten (Abb.13). Nur bei hohem pH-Wert im Eluenten wurde der letzte Aminosäureelutionspeak vor dem Hydrolysepeak des Reagenzes eluiert. Ein solches Elutionssystem führte jedoch nicht zu einer befriedigenden Gesamttrennung eines komplexeren Aminosäuregemischs. Der pH-Wert mußte dem jeweiligen Analysenziel angepaßt werden: Bei pH 3,88 wurde die beste Auflösung im Bereich der Peaks von thr, gly, arg, ala, tyr erhalten; bei pH 4,47 war die Gesamtzahl der Peaks vor dem Hydrolysepeak am größten. Die Peakfläche von FMOC-OH wurde auch stark vom Gradienten beeinflusst. Als geeignet hat sich der in Tab.2 dargestellte Gradient erwiesen.

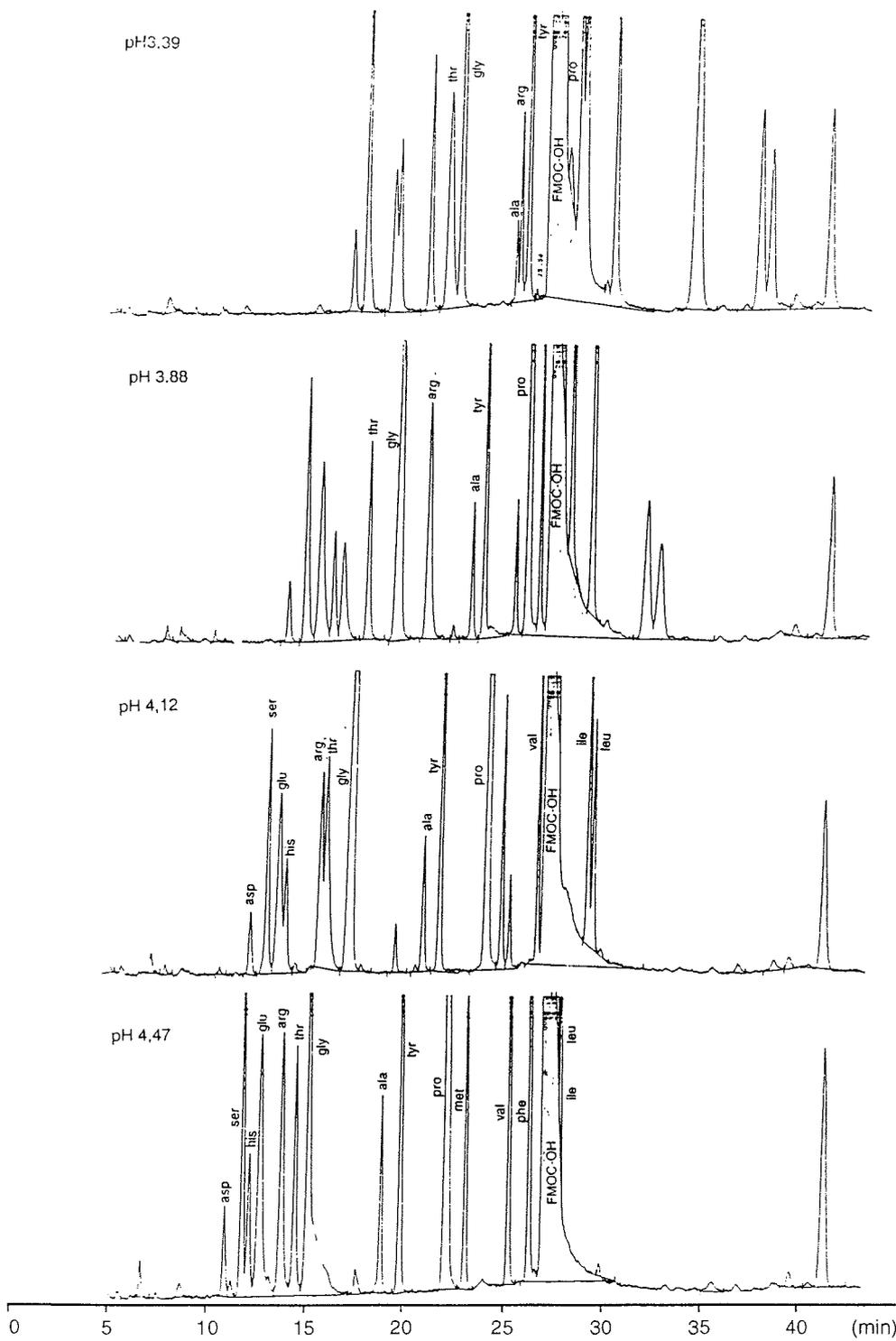


Abb.13: Vorsäulenderivatisierung mit Fmoc-Cl/ADAM. Chromatogramme eines Aminosäurestandards (100 nM je AA) bei unterschiedlichen pH-Werten des Elutionspuffers.

Die optimierte FMOC-Cl-Methode erlaubte die Bestimmung von pro in Lösungen mit sehr niedrigen Aminosäurekonzentrationen. Außerdem ermöglichte sie die Quantifizierung von Aminosäuren, deren Peaks mittels der OPA-Methode nur unvollständig getrennt werden konnten (gly/thr; ala/tyr). Es war in Anbetracht der teilweise sehr niedrigen Konzentrationen nicht möglich, in allen Proben alle Aminosäuren quantitativ zu bestimmen. Um eine befriedigende Trennung der Aminosäuren mit niedrigen Retentionszeiten zu erreichen, mußte auf die Bestimmung der Aminosäuren mit hohen Retentionszeiten verzichtet werden.

In den Hydrolysaten der partikulären Proben, die im allgemeinen höher konzentriert waren, wurde asp, ser, thr, gly, tyr, ala, pro, tau nach der Derivatisierung mit FMOC-Cl bestimmt. Die partikulären Proben, die sowohl mit OPA als auch mit FMOC-Cl gemessen wurden, zeigten sehr gute Übereinstimmung. Die Retentionszeiten von hypro und ser waren sehr ähnlich. In wenigen Proben des partikulären Materials, in denen beide Peaks getrennt wurden, zeigte sich, daß hypro in sehr niedriger Konzentration vorlag. Auf seine Bestimmung wurde deshalb verzichtet. In den Hydrolysaten von Seewasserproben und Eluaten wurde die Bestimmung auf gly/thr und ala/tyr, sowie auf pro konzentriert. Die Peaks von gly/thr und ala/tyr konnten gut getrennt werden, so daß die mit der OPA-Methode ermittelten Werte ergänzt werden konnten.

4.3 Hydrolyse von gebundenen Aminosäuren in unterschiedlichen Matrices

Die Bestimmung der gebundenen Aminosäuren erfordert ihre Überführung in die freie Form. Ein Standardverfahren ist die Hydrolyse in 6 M Salzsäure bei 110°C über 24 Stunden unter Stickstoffatmosphäre. Durch die saure Hydrolyse werden peptidische Bindungen gespalten und die Aminosäuren in die Hydrochloride

überführt. Nach der Neutralisation der Hydrolysate mit Lauge können die freien Aminosäuren derivatisiert und gemessen werden. Die so bestimmten Aminosäuren (Total Dissolved AA, TDAA) sind die Summe aus freien (FAA) und gebundenen Aminosäuren (CAA). CAA berechnet sich als Differenz der vor und nach der Hydrolyse gemessenen Aminosäuren ($CAA = TDAA - FAA$). Dieses Verfahren der Hydrolyse und Neutralisation führte, wie sich bei der Mehrfachbestimmung von Proben und Standards gezeigt hat, zu einer guten Reproduzierbarkeit für partikuläre und gelöste Proben. Entgegen der Annahme von Mintrop (1991) bereiteten die hohen Salzkonzentrationen in der Lösung keine Probleme bei der anschließenden Bestimmung der Aminosäuren. Ein weiterer Faktor für die Auswahl dieser Hydrolysemethode war, daß sie einen hohen Probendurchsatz ermöglichte.

In marinen und biologischen Proben liegen Aminosäuren in den unterschiedlichsten Substanzklassen und Verbindungsformen vor. Inwieweit diese gebundenen Aminosäuren durch die saure Hydrolyse freigesetzt werden, konnte in Ermangelung definierter Vergleichssubstanzen nicht geklärt werden. Riffaldi & Schnitzer (1973) fanden bei der Hydrolyse von verschiedenen terrestrischen Huminsäuren nach obigem Verfahren eine starke Abnahme des N-Gehalts, die sie auf die weitgehende Abspaltung des Aminostickstoffs zurückführten.

4.3.1 Quantitative Bestimmung

Einige freie Aminosäuren werden bei der sauren Hydrolyse vollständig, andere teilweise, abgebaut. So ist z.B. trp nach der Hydrolyse nicht mehr meßbar, während die Säureamide asn und gln in die entsprechenden Säuren asp und glu überführt und als solche gemessen werden ($asx = asn + asp$; $glx = gln + glu$) (Keil & Kirchmann, 1991). Die Hydrolyse von Verdünnungsreihen eines Aminosäure-Mischstandards (20 AA; 100 - 400 nM je AA) in verschiedenen Matrices, wie sie in den zu

messenden Proben auftraten (Milli-Q-Wasser, Seewasser, 0,2 M NaOH/Puffer), ergab, daß der Grad des Abbaus zwar einerseits von der Matrix abhing, andererseits aber für die einzelnen Aminosäuren bei gegebener Matrix konstant war, und somit über einen Korrekturfaktor in der Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden konnte. Im Mittel war der Abbau am stärksten im NaOH/Puffer-Gemisch, während die Seewassermatrix einen eher stabilisierenden Einfluß auf die Aminosäuren hatte. Die verschiedenen Wiederfindungsraten nach der Hydrolyse wurden für die einzelnen Aminosäuren ermittelt, indem die Steigungen der Eichgeraden für hydrolysierte Standards auf die für die nicht hydrolysierten Standards ermittelte Steigung (100% Wiederfindung) bezogen wurden. Auf diese Weise wurden vom y-Achsenabschnitt unabhängige Werte erhalten. Die Geraden, die die Grundlage der Berechnung bilden, sind für ala als Beispiel in Abb.14 wiedergegeben. Die hohen Korrelationskoeffizienten zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Methode.

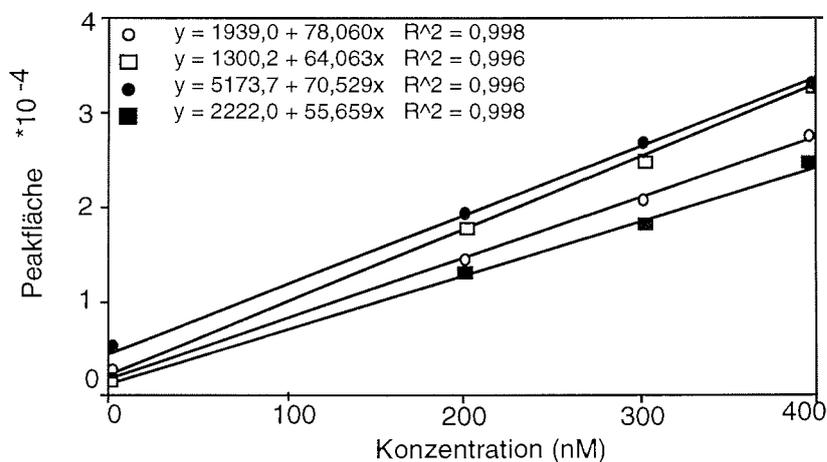


Abb.14: Steigungen der Eichgeraden für ala zur Berechnung der Wiederfindungsrate; ohne Hydrolyse (o) und nach der Hydrolyse: Standards in Milli-Q (□), in Seewasser (●) und in NaOH/Puffer (■)

Tabelle 3: Wiederfindungsraten nach der Hydrolyse in 6 M HCl (110°C, 24 h) in unterschiedlichen Matrices

| Verbindung | Wiederfindung in Milli-Q-Wasser (%) | Wiederfindung in Seewasser (%) | Wiederfindung in NaOH/Puffer (%) |
|--------------|---|--------------------------------------|--|
| asp | 102 | 107 | 90 |
| glu | 118 | 109 | 99 |
| ser | 81 | 98 | 70 |
| arg | 74 | 24 | 72 |
| his | 119 | 105 | 76 |
| gly | 95 | 82 | 102 |
| thr | 78 | 73 | 69 |
| tau | 97 | 94 | 100 |
| tyr | 85 | 100 | 73 |
| ala | 82 | 90 | 71 |
| gaba | 86 | 102 | 82 |
| val | 79 | 91 | 70 |
| phe | 93 | 103 | 86 |
| ile | 75 | 90 | 71 |
| leu | 83 | 92 | 78 |
| orn | 79 | 105 | 98 |
| lys | 98 | 103 | 103 |
| pro | 94 | 90 | 96 |
| hypro | 101 | 96 | 100 |
| Aminoethanol | 91 | 91 | 97 |

4.4 Fraktionierung von DOM an XAD-2

Die Adsorption von gelösten marinen Huminstoffen auf XAD-2 ist seit den ersten detaillierten Untersuchungen von Mantoura & Riley (1975) über das Adsorptions-Desorptionsverhalten zur Standardmethode für ihre Isolierung geworden (Aiken, 1988 und Literaturzitate darin). Bei den Harzen, die unter dem Namen Amberlite XAD auf dem Markt sind, handelt es sich um mit Divinylbenzen vernetzte Polystyrene (XAD-1,2,4) oder Polyacrylester (XAD 7,8). In dieser Arbeit wurde zur Fraktionierung von DOM XAD-2 verwendet. Dieses Harz gibt, verglichen mit XAD-8, weniger organische Verunreinigungen ab (Aiken, 1988), ist aber für die Extraktion von Huminstoffen aus Seewasser entsprechend effektiv (Fu & Pocklington, 1983; Thurman et al., 1988). Vorversuche haben gezeigt, daß die Stickstoff-Blindwerte für XAD-2 vernachlässigbar waren und auch für den Stickstoffgehalt der verwendeten Reagenzien nur geringfügige Korrekturen notwendig waren. DIN wurde nicht vom Harz adsorbiert und Blindwerte, die innerhalb der normalen Reinigungsprozedur bestimmt wurden, zeigten, daß die Elution vollständig war: Massenbilanzen, in denen Gesamt-DON der Proben vor Aufgabe auf die Säule mit der Summe der DON-Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen verglichen wurden, zeigten Wiederfindungen von 90 bis 110%. Diese Bedingungen erlaubten die Verwendung kleiner Seewasservolumina (500 ml) und eine sofortige Probenbearbeitung an Bord, die wichtig war, um einer möglichen Veränderung der Proben bei längerer Lagerung vorzubeugen.

In Vorversuchen mit Seewasserproben aus der Arktis wurde zunächst mit 0,2 N NaOH und im Anschluß mit Methanol eluiert. Es zeigte sich, daß die Methanolfraktion vergleichbare Mengen von DON enthielt wie die NaOH-Fraktion. Aus diesem Grund wurde innerhalb der vorgestellten Untersuchungen zunächst mit NaOH und anschließend mit Methanol eluiert. Entsprechend den sorptiven

Eigenschaften des DOM und seiner Wechselwirkung mit dem Harz wurde, in Übereinstimmung mit Kukkonen et al. (1990), die mit NaOH eluierte Fraktion hydrophob sauer (hydrophobic acid, HbA) und die mit Methanol eluierte Fraktion hydrophob neutral (hydrophobic neutral, HbN) genannt. Die Fraktion des DOM, die aus der angesäuerten Lösung nicht auf XAD-2 adsorbiert wurde, wurde als hydrophil (HI) bezeichnet.

4.4.1 Adsorption von freien Aminosäuren an XAD-2

Um das Adsorptionsverhalten der einzelnen Aminosäuren unter den für die Extraktion von Seewasserproben gebräuchlichen Bedingungen zu überprüfen, wurde ein Aminosäurestandard (100 nM pro AA) in unterschiedlichen Matrices (Milli-Q-Wasser pH2, Seewasser pH2) angesetzt und die Aminosäurekonzentration vor und nach Durchgang durch eine XAD-2-Säule bestimmt. Als Maß für die Effektivität der Adsorption ist der prozentuale Anteil der Aminosäuren, der von der Säule adsorbiert wird, in Abb.15 wiedergegeben. Diese Anteile wurden den freien Energien, die mit dem Übergang Ethanol oder Dioxan/Wasser verbunden sind und somit ein direktes Maß für die Lipophilie darstellen (Eriksson, 1989), gegenübergestellt. Es ist zu berücksichtigen, daß die Adsorption an XAD-2 aus saurer Lösung erfolgt, wo die Moleküle stärker protoniert vorliegen, als in neutraler Lösung. Ein wichtiger Faktor für die Adsorption insgesamt ist die Veränderung der Polarität des Lösungsmittels z.B. durch Zugabe von unterschiedlichen Salzen. Durch die (verglichen mit Milli-Q-Wasser) erhöhte Oberflächenspannung der Salzlösung werden die hydrophoben Aminosäuren stärker aus der Lösung verdrängt und die Adsorption am Harz nimmt zu.

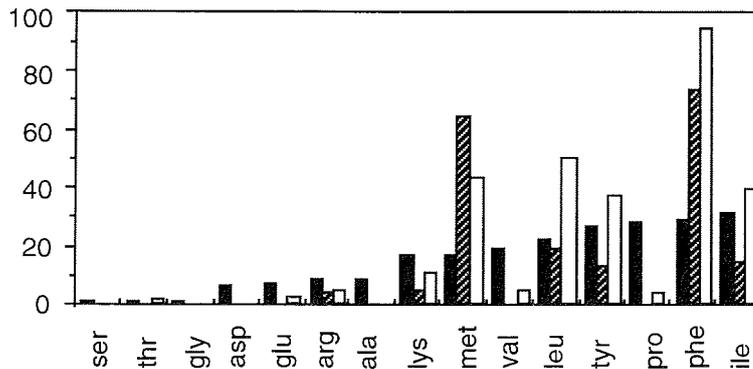


Abb.15: Lipophilie (■) (wiedergegeben durch die freie Energie (in 0,1 kcal/mol) für den Übergang Ethanol/Wasser (Eriksson, 1989)); prozentualer Anteil der Aminosäuren, der aus Milli-Q-Wasser ▨ bzw. Seewasser □ bei pH 2 auf XAD-2 adsorbiert wurden

Bei Betrachtung des Verhaltens der einzelnen Aminosäuren zeigte sich, daß die Effektivität der Adsorption von ihrer Lipophilie abhing, wobei allerdings keine direkte Beziehung zwischen den als Bezugsgrößen gewählten Variablen bestand. Hydrophile Aminosäuren wurden nicht oder nur wenig adsorbiert, während hydrophobe Aminosäuren umso stärker adsorbiert wurden, je hydrophober ihre Seitenkette war, was an der geringen Adsorption von ala und val (mit relativ kurzen Seitenketten) und der starken Adsorption von phe (mit aromatischem Rest) deutlich wurde. Pro wurde trotz seines lipophilen Charakters kaum adsorbiert. Der Einfluß des niedrigen pH-Werts der Lösung wurde deutlich bei den basischen Aminosäuren, die relativ lipophil sind und dennoch vergleichsweise wenig adsorbiert wurden, da sie durch stärkere Protonierung der zusätzlichen N-Gruppen in saurer Lösung hydrophiler wurden. Wie erwartet, war aus der Seewassermatrix die Adsorption der hydrophoben Aminosäuren (Ausnahme: met) relativ zur wäßrigen Lösung ohne Salzzusatz verstärkt.

4.4.2 Adsorption von phytoplanktonspezifischen Proteinen

Die gebundenen Aminosäuren, die in den Hydrolysaten der hydrophoben XAD-Fractionen auftraten, konnten nach ihrer Herkunft entweder "huminstoff-assoziiert" sein oder möglicherweise zu Verbindungen wie z.B. Proteinen gehören.

Um abschätzen zu können, welcher Anteil der Aminosäuren der hydrophoben XAD-2-Fractionen von natürlichen Seewasserproben in Proteinen vorlagen, wurde einerseits die Adsorption von phytoplanktonspezifischen Proteinen an XAD-2 betrachtet und zum anderen wurde versucht, Proteine in konzentrierten HbN-Eluaten nachzuweisen.

Standardmethoden zur spezifischen Bestimmung von Proteinen in Lösung beruhen auf der Abtrennung der Proteine durch Fällung mit 5 bzw. 10%iger heißer Trichloressigsäure (TCA) (Li & Dickie, 1985; Hitchcock, 1986). Die Homogenisierung von Planktonzellen mit TCA führt einerseits zur kompletten Zerstörung der Zellwände und andererseits zu einer effektiven Trennung von Proteinen und Monomeren bzw. Peptiden, wobei die TCA-unlöslichen Proteine im Rückstand und die TCA-löslichen freien und gebundenen Aminosäuren im Filtrat bestimmt werden können (Clayton et al., 1988). Bei der Homogenisierung von Planktonzellen in verdünnter NaOH dagegen geht ein Großteil der in der Zelle vorhandenen Proteine in Lösung (Rausch, 1981).

Eine Diatomeenkultur wurde in regelmäßigen Zeitabständen beprobt und das partikuläre Material mit TCA bzw. mit NaOH extrahiert. Die Filtrate (pH=2) wurden über XAD-2 fraktioniert und nach der Hydrolyse die Konzentration der Aminosäuren im Filtrat selbst, sowie in allen Fraktionen bestimmt. TDAA in den Filtraten nach Extraktion mit NaOH, sowie in den entsprechenden HI-Fractionen,

war immer höher als in den TCA-Filtraten und den zugehörigen HI-Fractionen. Die Differenz wurde den in Proteinen gebundenen "nicht-huminstoffassoziierten" Aminosäuren zugeschrieben. Für die Konzentration der hydrophoben Fraktionen ergab sich keine Änderung in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren (Abb.16). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, daß zellspezifische Proteine nach der Fraktionierung über XAD-2 überwiegend in der hydrophilen Fraktion zu finden waren.

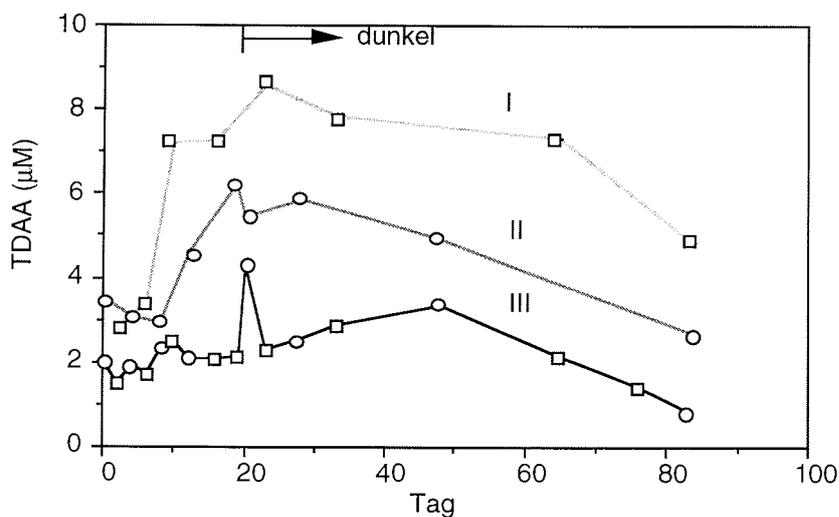


Abb.16 : TDAA im Filtrat der Zellextrakte bei Behandlung mit NaOH (I) und mit TCA (II); TDAA in den hydrophoben Fraktionen der Zellextrakte (III)

Konzentrierte HbN-Fractionen (Anreicherung gegenüber Seewasser 40:1) der natürlichen Seewasserproben aus der Arktis wurden zur Fällung der Proteine mit 10%iger TCA gekocht. Da ca. 95 % von TDAA in der Lösung gefunden wurden und nur ein sehr kleiner Anteil im Niederschlag, war auch dieser Versuch ein Indiz dafür, daß der überwiegende Teil der Aminosäuren in der HbN-Fraktion nicht in Proteinen, sondern innerhalb der Moleküle anderer Substanzklassen gebunden ist.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Seewasserproben

5.1.1 Charakterisierung der Probengebiete

Zur allgemeinen Charakterisierung der Proben wurden DIN, Salzgehalt und Temperatur an allen Stationen gemessen. Soweit nicht anders vermerkt, sind die Konzentrationen in $\mu\text{M N}$ und die Salzgehalte in PSU (Practical Salinity Units) angegeben.

Von Station 005 in Richtung auf die nordöstliche Küste Grönlands zur Station 024 (ARK VIII/I) hatte das polare Wasser eine Temperatur um $-1,5^{\circ}\text{C}$ und Salzgehalte von 32-32,5 an der Oberfläche und 32-33,8 in den oberen 50-100 m. DIN lag im Bereich von 1,5 - 7,5 $\mu\text{M N}$. In den tieferen Schichten und bei Station 001 und 002 lagen die Salzgehalte zwischen 34 und 35, DIN erstreckte sich über einen Bereich von 7,5-16 $\mu\text{M N}$ und die Wassertemperatur erreichte bei Station 001 5°C . Insgesamt lagen die DIN-Werte in einem Bereich zwischen 1,5 und 16 $\mu\text{M N}$ und zeigten ansteigende Tendenz mit zunehmender Tiefe; der Mittelwert für alle Proben betrug $7,4 \pm 4,1 \mu\text{M N}$.

Die antarktischen Gewässer (ANT X/1b) zeigten eine völlig andere Nährstoff-situation als die Grönlandsee. Nitrat und die anderen Nährsalze waren normalerweise im Überschuß vorhanden, so daß die Nährsalzabnahme im allgemeinen keinen limitierenden Faktor für die Primärproduktion darstellte. Die Wassertemperatur lag zwischen $+2,2^{\circ}\text{C}$ und $-1,7^{\circ}\text{C}$. Die antarktischen Proben hatten Salzgehalte im Bereich von 34-35.

Die größten Unterschiede zwischen beiden Gebieten zeigten sich in den DIN-Konzentrationen, die mit Werten von 17 - 35 $\mu\text{M N}$ in der Antarktis deutlich höher lagen als in der Arktis. Sowohl in den arktischen, als auch in den antarktischen Proben bestand DIN überwiegend aus Nitrat, während die Konzentrationen von Nitrit und Ammonium mit Werten von 0-0,4 $\mu\text{M N}$ sehr niedrig waren.

5.1.2 Konzentrationen von DON und ihre Beziehung zu DIN

Die Daten für DON sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die mittlere Konzentration von DON war für beide Regionen ähnlich. Beispiele für die Verteilung des gelösten Stickstoffs auf die organischen und anorganischen Fraktionen in der Grönlandsee und im Weddellmeer an der Oberfläche und in tieferen Schichten, sind in Abb.17 dargestellt. In der Arktis (Station 008) war in der Oberfläche ungefähr die Hälfte des gelösten Stickstoffs in anorganischen und die andere Hälfte in organischen Substanzen gebunden. Bei 1500 m betrug der organische Anteil nur 15%, der Rest des gelösten Stickstoffs war überwiegend Nitrat. In der Antarktis war DIN deutlich höher als in der Arktis. Der Anteil von DON am gelösten Stickstoff machte dort deshalb an der Oberfläche (Station 012) nur 26% und in der Tiefe ca. 8% aus.

Als allgemeine Tendenz zeigte sich eine Zunahme von DIN und eine Abnahme von DON mit steigender Wassertiefe. In der Arktis wurde ein Konzentrationsgradient von DON zwischen Oberfläche und Tiefe an nahezu allen Stationen beobachtet. In der Antarktis wurde ein entsprechender Trend nur an Station 012 deutlich, wo niedrige Nitratkonzentrationen und hohe Chl a-Werte an der Oberfläche auf erhöhte Phytoplanktonaktivität hindeuteten.

Im einzelnen nahmen die DON-Konzentrationen in der Arktis von Station 001 bis Station 011 von 5 $\mu\text{M N}$ an der Oberfläche auf rund 3 $\mu\text{M N}$ bei 150-200 m ab und

blieben dann mit zunehmender Wassertiefe relativ konstant. In den nahe der grönländischen Küste und in der Nordostwasser-Polynja gelegenen Stationen mit geringeren Wassertiefen (015, 021 bis 024) war die DON-Verteilung in der Wassersäule homogen. Die mittlere DON-Konzentration betrug dort $4,33 \pm 0,86 \mu\text{M N}$.

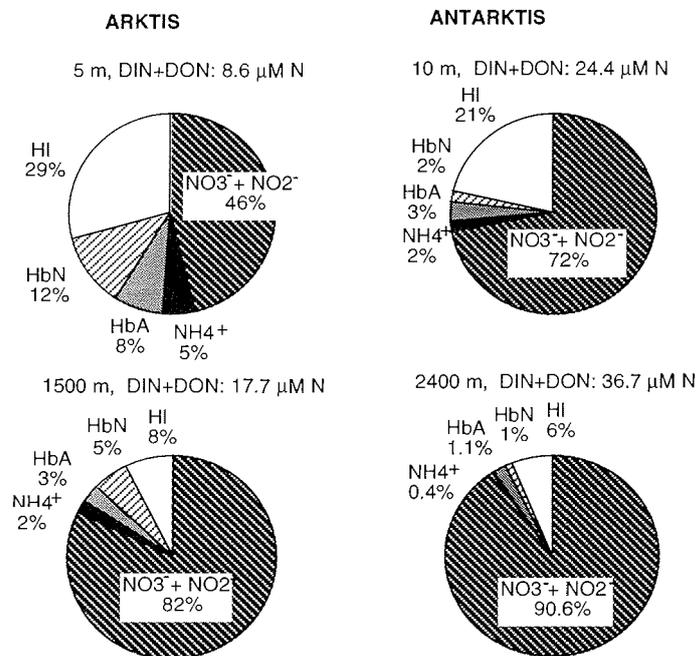


Abb.17: Prozentuale Verteilung der gelösten Stickstoffverbindungen in der Arktis (Grönlandsee, Station 008) und in der Antarktis (Weddellmeer, Station 012) in der euphotischen Zone und in der Tiefe.

Eine lineare Regression, die für die DON- und DIN-Werte sämtlicher Proben jeder Region durchgeführt wurde, ergab eine signifikante inverse Korrelation für die Arktisproben ($r=0,75$; $n=39$; $p<0,001$) mit der Gleichung $\text{DIN}=22,8-3,6\text{DON}$. In der Antarktis ergab sich eine signifikante inverse Korrelation bei separater Betrachtung der Proben von Station 012 ($r=0,96$; $n=7$; $p<0,001$; $\text{DIN}=46,7-4,6\text{DON}$) (Abb.18).

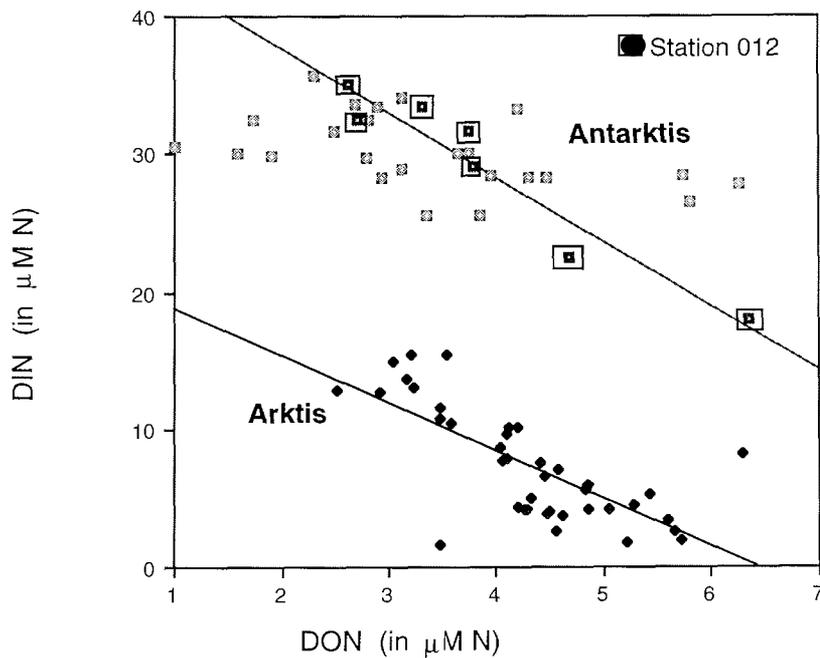


Abb.18: Beziehung zwischen DON und DIN in den Seewasserproben aus der Arktis und der Antarktis. Die Regressionsgeraden wurden für sämtliche Proben aus der Arktis bzw. für die Proben von Station 012 aus der Antarktis ermittelt.

5.1.3 Anteil der Huminstofffraktionen am DON

Eine detailliertere Charakterisierung des DON lieferte seine Fraktionierung durch spezifische Adsorption der hydrophoben Anteile an XAD-2. Die Ergebnisse der Fraktionierung sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab.4: DON in Seewasser und in den hydrophoben XAD-Fractionen. Die Daten sind nach Wassertiefen in zwei Gruppen aufgeteilt: <100 m und ≥100 m. (): Zahl der Proben

| Gebiet | DON (in nM) | DON-HbA (in nM) | DON-HbN (in nM) |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| ANT<100 m | 3910±1330 (16) | 670±120 (9) | 450± 90 (6) |
| ANT≥100 m | 2960±1140 (14) | 690±100 (11) | 410±190 (9) |
| ARK<100 m | 4560± 600 (27) | 830±170 (23) | 1050±203 (24) |
| ARK≥100 m | 3500± 790 (10) | 650±115 (8) | 860±200 (11) |
| ANT+ARK Mittelwert | 3900±1100 (67) | 740±160 (51) | 810±340 (50) |

Die Konzentration der Huminstofffraktionen war in der Wassersäule relativ konstant. In der Antarktis hatte DON-HbA eine mittlere Konzentration von $0,69 \pm 0,12 \mu\text{M N}$, was 20% vom DON entsprach. Diese Werte stimmten gut mit den entsprechenden Werten aus der Grönlandsee überein ($0,77 \pm 0,18 \mu\text{M N}$, ca. 19% vom DON). In der Antarktis war DON-HbN im Mittel niedriger als in der Arktis; die Mittelwerte waren $0,43 \pm 0,29 \mu\text{M N}$ (12% von DON) bzw. $1,00 \pm 0,24 \mu\text{M N}$ (25% von DON). Die mittlere Konzentration der "Nichthuminstoff"-Fraktion HI war $2,32 \pm 1,10 \mu\text{M N}$ (67% vom DON) in der Antarktis und $2,28 \pm 0,74 \mu\text{M N}$ (56% vom DON) in der Arktis.

Die Ergebnisse der HbN- und HbA-Fraktion wurden zum einen für beide Fraktionen separat ausgewertet und zum anderen addiert und so behandelt, als würden sie von einer einheitlichen hydrophoben Fraktion stammen. Die lineare Regression zwischen DON in der Probe und der Summe des DON in beiden hydrophoben Fraktionen lieferte keine eindeutige Aussage über die Beziehung zwischen beiden Größen (ARK: $r = 0,33$; $n = 29$; $p < 0,1$; ANT: $r = 0,31$; $n = 22$; $p < 0,2$). Die getrennte Betrachtung beider hydrophober Fraktionen ergab eine signifikante

Korrelation zwischen DON und DON-HbA ($r = 0,598$; $n = 31$; $p < 0,01$) (Abb.19) nur für die Proben aus der Arktis. Zwischen DON-HbN und DON-HbA bestand in keinem der beiden Gebiete eine signifikante Korrelation.

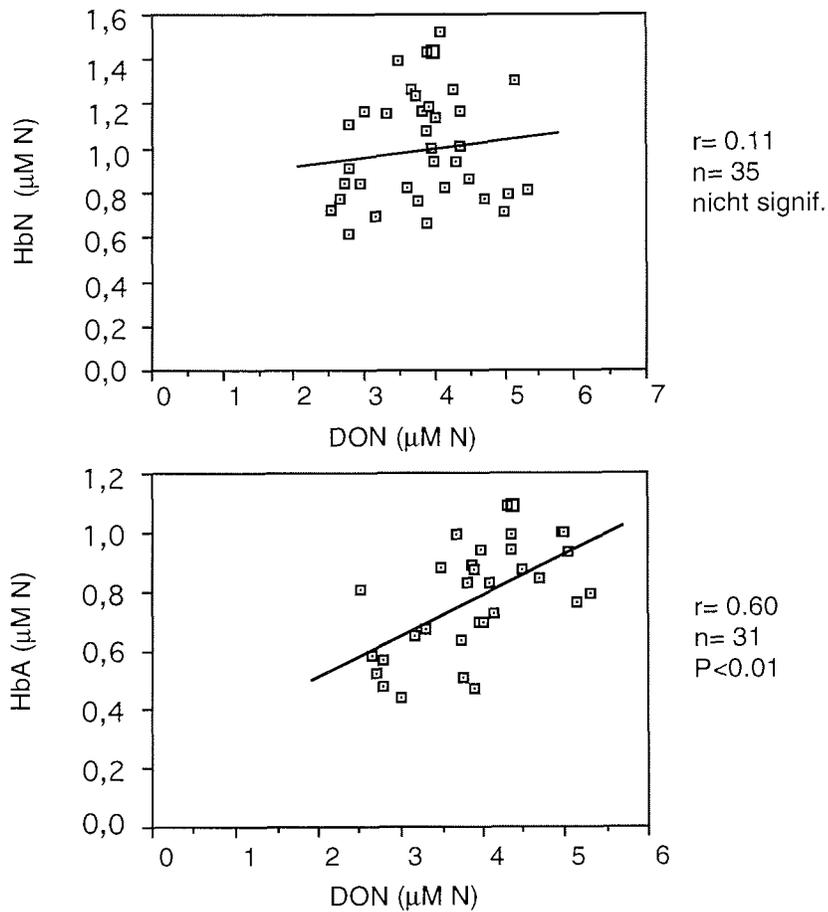


Abb.19: Beziehung zwischen DON in der unfractionierten Probe und DON in der HbN-Fraktion (I) und der HbA-Fraktion (II) für die Proben von ARK VIII/1.

Weder für DON-HbA noch für DON-HbN wurde eine direkte Beziehung mit anderen Variablen, wie geographische Lage, Nährsalzkonzentration oder Wassertiefe gefunden.

5.1.4 Konzentration der Aminosäuren im Seewasser, in den Huminstofffraktionen und im partikulären Material

Die Tabellen 5a und 5b fassen die Daten aus beiden Untersuchungsgebieten zusammen, wobei jeweils die Ergebnisse aus beiden Regionen, sowohl einzeln für Tiefen <100 m und ≥100 m als auch gemeinsam, gemittelt wurden. Um den Vergleich mit den DON-Daten zu vereinfachen, ist die Konzentration der Aminosäuren in nM N angegeben. Die Mittelwerte der Aminosäurekonzentrationen in den "Huminstoff"-Fraktionen unterschieden sich für die beiden Regionen nicht signifikant. Im Gesamtmittel lag AA-HbA bei 51 nM N und stellte einen mittleren prozentualen Beitrag zum DON in dieser Fraktion von 7 %. AA-HbN war mit einem Mittelwert von 235 nM N 4-5 mal höher als in HbA. Der mittlere relative Anteil von AA-HbN an DON-HbN war in der Antarktis doppelt so hoch wie in der Arktis. Dies war jedoch lediglich die Folge der niedrigeren DON-HbN-Werte in der Antarktis, da AA-HbN in beiden Regionen bemerkenswert einheitlich war. AA-HI lag im Mittel in der Arktis bei 148 nM N (entsprechend 7% von DON-HI) und in der Antarktis bei 89 nM N (entsprechend 4% von DON-HI).

Tab.5a: Konzentration der Aminosäuren in Seewasser, XAD-2-Fraktionen und partikulärem Material. Die Daten (Mittelwert ± Standardabweichung) sind nach Wassertiefen in zwei Gruppen aufgeteilt: <100 m und ≥100 m. (): Zahl der Proben; * hoher Wert wegen geringer Zahl von Proben bei größeren Tiefen.

| Gebiet | TDAA (in nM) | AA-HbA (in nM) | AA-HbN (in nM) | PAA (in nM) |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| ANT<100 m | 440±160 (9) | 73±25 (7) | 230±70 (6) | 750±600 (15) |
| ANT≥100 m | 275± 40 (10) | 64±10 (8) | 220±30 (11) | *300±200 (5) |
| ARK<100 m | 500±140 (21) | 42±30 (21) | 250±80 (22) | 570±610 (23) |
| ARK≥100 m | 280±170 (11) | 38±25 (7) | 200±60 (9) | 60± 40 (9) |
| ANT+ARK Mittelwert | 400±170 (51) | 51±29 (43) | 235±67 (48) | |

Tab.5b: Prozentualer Anteil der Aminosäuren am DON im Seewasser und in den hydrophoben Fraktionen. Die Daten (Mittelwert \pm Standardabweichung) sind nach Wassertiefen in zwei Gruppen aufgeteilt: <100 m und \geq 100 m. (): Zahl der Proben.

| Gebiet | in Seewasser (in %) | in HbA (in %) | in HbN (in%) |
|-----------------------|------------------------|------------------|------------------|
| ANT<100 m | 12 \pm 3 (9) | 11 \pm 3 (7) | 55 \pm 20 (6) |
| ANT \geq 100 m | 11 \pm 3 (14) | 9 \pm 3 (6) | 59 \pm 27 (8) |
| ARK<100 m | 11 \pm 3 (27) | 5 \pm 4 (18) | 25 \pm 4 (20) |
| ARK \geq 100 m | 8 \pm 3 (11) | 5 \pm 3 (4) | 25 \pm 4 (9) |
| ANT+ARK Mittelwert | 11 \pm 4 (51) | 7 \pm 4 (35) | 35 \pm 21 (43) |

Die mittlere Zusammensetzung des DON-Pools für beide Regionen ist in Abb.20 dargestellt. Der Beitrag der Aminosäuren zum DON war in beiden Gebieten mit 10-11% sehr ähnlich, der Unterschied lag beim Nicht-AA-DON, wo der Anteil von HbN in der Arktis und der Anteil von HI in der Antarktis größer war.

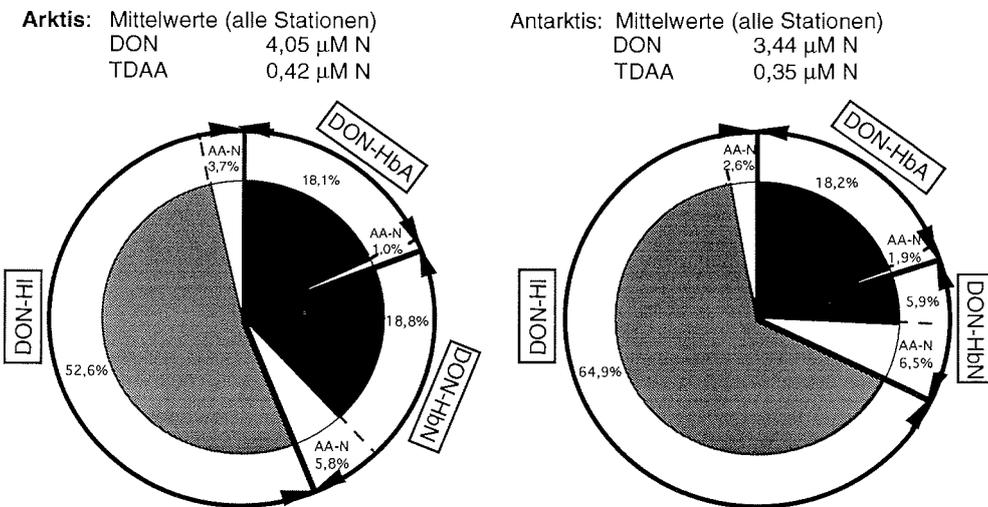


Abb.20: Mittlere Zusammensetzung des DON-Pools in der Arktis und in der Antarktis

5.1.4.1 Beziehung zwischen TDAA und DON

Obwohl TDAA mit im Mittel 11% nur einen niedrigen Beitrag zum DON lieferte, korrelierten beide Variablen signifikant. Die Regressionsgleichung für die Daten aus beiden Gebieten war: $TDAA=21+0,1DON$; $r=0,63$, $n=53$, $p<0,001$ (Abb.21).

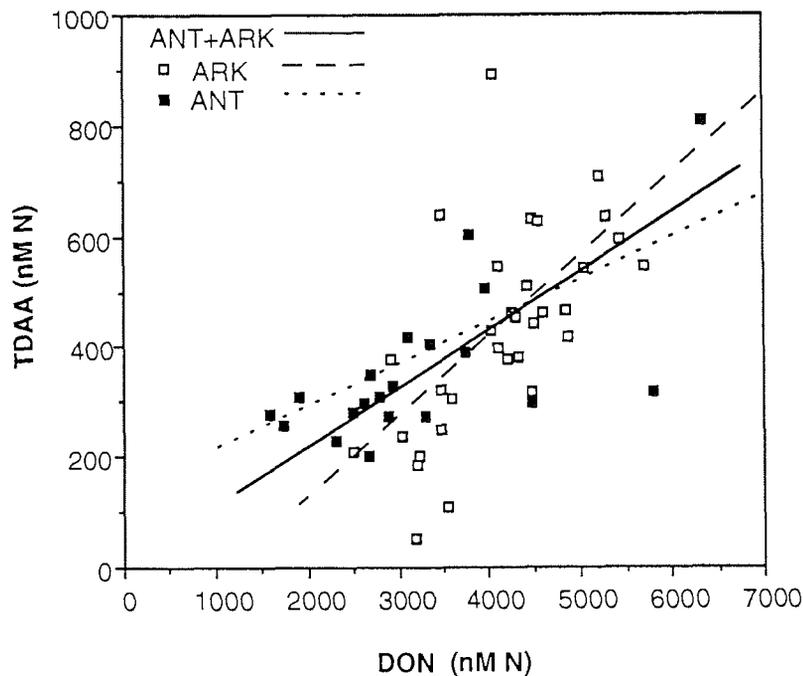


Abb.21: Beziehung zwischen DON und TDAA für die Proben aus der Arktis (□) und der Antarktis (■)

Die Aminosäuren machten in HbA rund 7 % vom DON dieser Fraktion aus. AA-HbA korrelierte in keinem der beiden Gebiete mit DON-HbA. In der Arktis und in der Antarktis korrelierten DON-HbN und AA-HbN signifikant (ARK: $r=0,87$; $n=29$; $p<0,001$; $DON-HbN=196+3,3AA-HbN$; ANT: $r=0,86$; $n=18$; $p<0,001$; $DON-HbN=72+1,7AA-HbN$) (Abb.22).

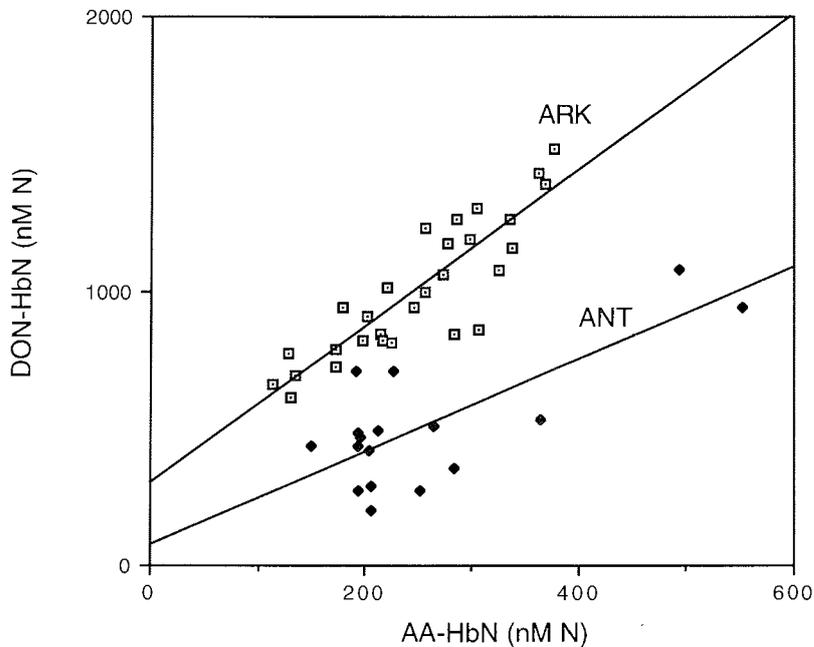


Abb.22: Beziehung zwischen DON und Aminosäurestickstoff in HbN in der Arktis und in der Antarktis.

5.1.4.2 Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration im Seewasser und in den Huminstofffraktionen von der biologischen Aktivität

Die Konzentration von Chlorophyll a (chl a) ist ein guter Indikator für die Phytoplanktonbiomasse. Der Anteil des Aminostickstoffs am DON wurde in Abhängigkeit von der Phytoplanktonbiomasse untersucht. Zu diesem Zweck wurde AA mit DON in der Probe und in den Fraktionen korreliert und die Werte für chl a > 0,5 (Gruppe I) mit denen für chl a < 0,5 (Gruppe II) verglichen. Wegen der höheren Zahl und der homogeneren Tiefenverteilung wurden die Proben aus der

Arktis ausgewählt. Für Gruppe I machte der Aminostickstoff im Mittel 16 % vom Gesamt-DON aus, während sein Anteil in Gruppe II mit 9% deutlich niedriger war.

Da die hydrophoben Fraktionen möglicherweise einen älteren "humifizierten" Anteil des DOM-Pools darstellen, wurde ihre Beziehung zu chl a untersucht. Abb. 23 zeigt die lineare Regression zwischen chl a und der Konzentration der Aminosäuren in der Probe und den Fraktionen.

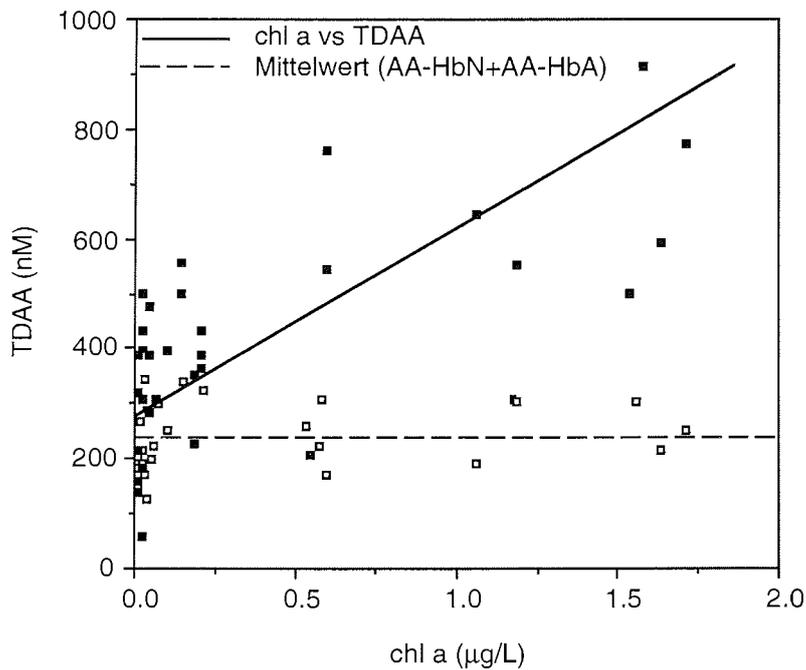


Abb.23: Beziehung zwischen Chlorophyll a (chl a) und den Aminosäuren in Seewasser (TDAA ■) und in den hydrophoben Fraktionen (AA-HbA+AA-HbN □) für die Proben von ARK VIII/1

In Wasserkörpern mit geringer biologischer Aktivität ist die Konzentration von labilen Verbindungen gering, und TDAA zeigte unter solchen Bedingungen im Seewasser und in den Huminstofffraktionen ähnliche Werte. Die Beziehung zwischen chl a und TDAA wurde durch die Gleichung $TDAA=280+343chl\ a$

beschrieben, wobei eine signifikante positive Korrelation ($r=0,63$; $n=33$; $p<0,001$) zwischen beiden Größen bestand. Der y-Achsenabschnitt war signifikant unterschiedlich von Null und lag mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% bei 280 ± 54 nM N, allerdings war die Streuung der Werte für niedriges chl a groß. Im Unterschied zum Seewasser, zeigte keine der beiden hydrophoben Fraktionen, weder einzeln noch als Summe betrachtet, eine signifikante Beziehung mit chl a. Bei Station 001 (1000 m) und Station 005 (1500 m), wo chl a annähernd Null war, wurden praktisch 100% der Aminosäuren in den hydrophoben Fraktionen gefunden (90% in HbN und 10% in HbA), und die mittlere Konzentration an diesen tiefen Stationen betrug 186 nM N. Dieser Wert lag innerhalb der Schwankungen des Mittelwerts der Aminosäurekonzentration in den hydrophoben Fraktionen (233 ± 66 nM N).

In der Antarktis bestand ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen TDAA und chl a ($r = 0,85$, $n = 21$, $p < 0,001$). Wie bei den Proben aus der Arktis bestand auch hier keine entsprechende Beziehung für die hydrophoben Fraktionen.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit jeder einzelnen Aminosäure von unterschiedlichen chl a-Konzentrationen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Proben in zwei Gruppen entsprechend chl a $> 0,5$ $\mu\text{g/L}$ (Gruppe I) bzw. chl a $< 0,5$ $\mu\text{g/L}$ (Gruppe II) eingeteilt und die Mittelwerte innerhalb beider Gruppen (für jede einzelne Aminosäure) mit statistischen Methoden verglichen (t-Test und Mann-Whitney-Test). Es ergab sich, daß in unfraktioniertem Seewasser die Konzentrationen aller Aminosäuren (außer gly, tau, orn) für hohe chl a-Werte (Gruppe I) signifikant höher waren, als für niedrige chl a-Werte (Gruppe II) (Abb.24). In HbN und HbA dagegen wurden keine signifikanten Unterschiede für die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren in beiden Gruppen gefunden.

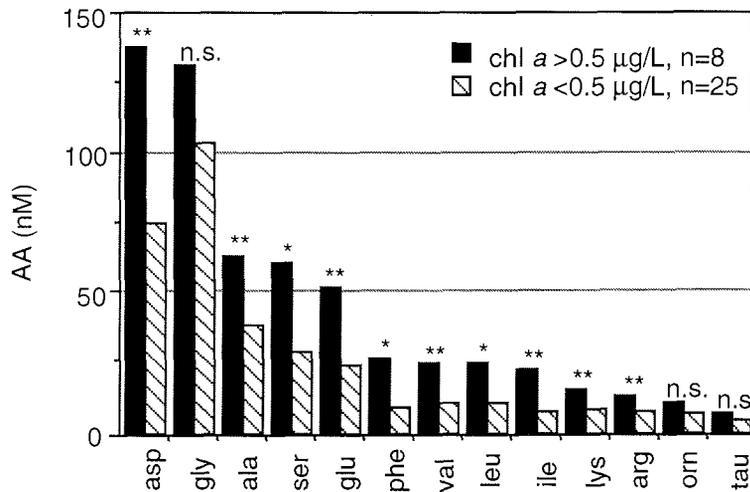


Abb.24: Mittlere Konzentration der einzelnen Aminosäuren in Seewasser bei hohen (Gruppe I: chl a > 0,5 µg/L) und niedrigen (Gruppe II: chl a < 0,5 µg/L) Chlorophyll-a-Konzentrationen. Signifikanz des Unterschieds zwischen den Mittelwerten in beiden Gruppen: ** =p<0,001; * = p<0,05; n.s.=nicht signifikant

Um diese Betrachtung zu verallgemeinern, wurden nach entsprechendem Verfahren die Mittelwerte von TDAA für Gruppe I und II in Seewasser und in den Fraktionen verglichen (Abb.25): Die Unterschiede in der Gesamtaminosäurekonzentration der Proben wurden im wesentlichen durch die unterschiedlichen Werte von AA-HI bei "hohen" und "niedrigen" Werten von chl a verursacht. Für chl a >0,5 µg/L machten die Aminosäuren in HI mit einer mittleren Konzentration von 322 nM N 56% der Aminosäuren der Probe aus, während sie bei chl a < 0,5 µg/L AA-HI mit einem Mittelwert von 116 nM N nur 33% von TDAA der Probe repräsentierten. Im Gegensatz dazu änderten sich die Mittelwerte von AA-HbN und AA-HbA nicht in Abhängigkeit von chl a. AA-HbN war mit ca. 200 nM im Mittel fünfmal höher als AA-HbA mit ca. 40 nM.

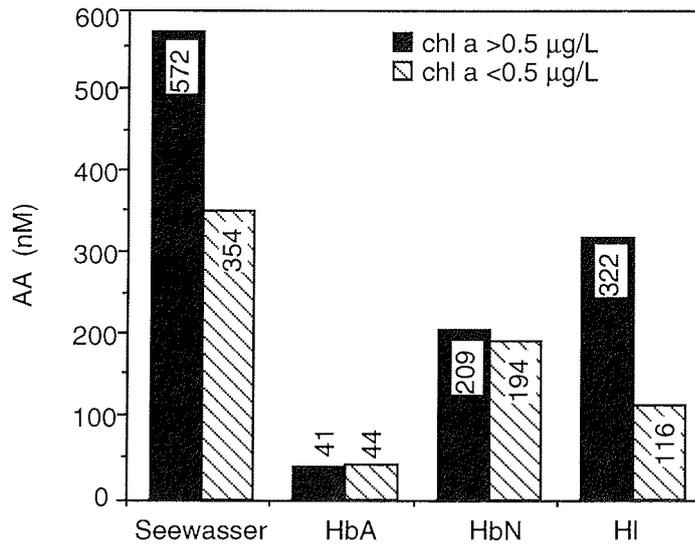


Abb.25: Gegenüberstellung der Mittelwerte für TDAA, AA-HI, AA-HbN, AA-HbA bei hohen (chl a > 0,5 µg/L) und niedrigen (chl a < 0,5 µg/L) Konzentrationen von Chlorophyll a.

Um festzustellen, ob eine relative Anreicherung bestimmter Aminosäuren in den einzelnen Fraktionen stattfand und ob ein solches Verhalten durch die phytoplanktonische Aktivität beeinflusst wird, wurden die Mittelwerte von AA-HbN und AA-HbA (Gruppe I und II getrennt betrachtet) für die einzelnen Aminosäuren auf die entsprechenden Mittelwerte von TDAA (100%) bezogen und die Ergebnisse beider Gruppen verglichen. Als "in den hydrophoben Fraktionen angereichert" wurden diejenigen Aminosäuren bezeichnet, für die mehr als 50% ihrer Gesamtkonzentration in der Probe in den Hb-Fraktionen gefunden wurden, und umgekehrt galten als "in der hydrophilen Fraktion angereichert", die Aminosäuren, bei denen die Konzentration in Hb weniger als 50 % des Wertes der Probe ausmachte (Abb.26). Für die Proben mit chl a < 0,5 µg/l waren alle Aminosäuren, außer ser, tau, asp, in den hydrophoben Fraktionen angereichert, für

chl a > 0,5 µg/l dagegen nur ala, gly und die basischen Aminosäuren arg, orn und lys.

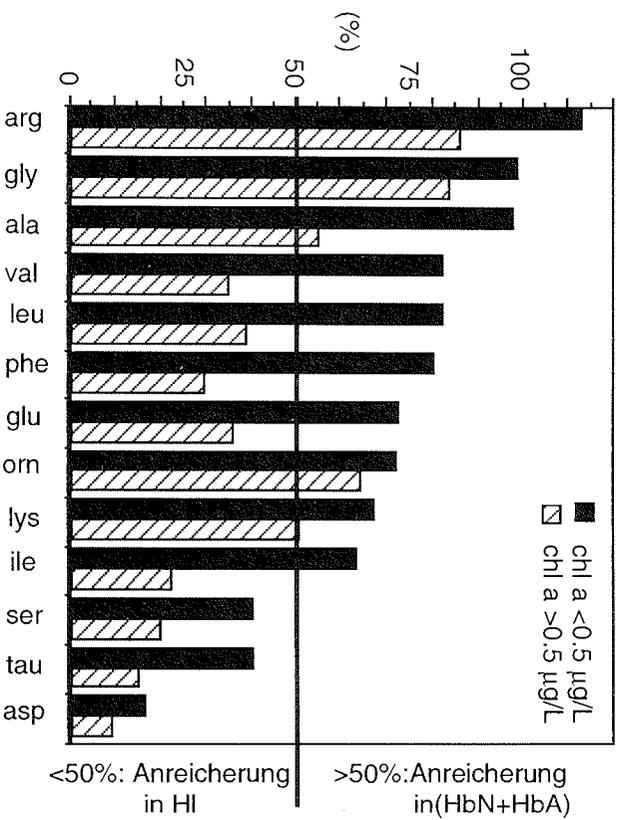


Abb. 26: Verteilung der Aminosäuren zwischen der hydrophilen (HI) Fraktion und den hydrophoben (HbA+HbN) Fraktionen bei hohen ($chl\ a > 0,5\ \mu g/L$) und niedrigen ($chl\ a < 0,5\ \mu g/L$) Konzentrationen von Chlorophyll a, wiedergegeben durch den prozentualen Anteil von TDAA, der in den hydrophoben Fraktionen gefunden wurde.

5.1.4.3 Tiefenverteilung der Aminosäuren

Die Verteilung der Aminosäuren über die Wassersäule ist für unfraktioniertes Seewasser und für die Summe der hydrophoben Fraktionen in Abb.27 dargestellt. Hierbei wurden die Daten beider Untersuchungsgebiete gemeinsam betrachtet und in folgende Gruppen entsprechend der Wassertiefe eingeteilt: 0-10 m, 20-30 m, 40-50 m, 75-200 m und 500-3000 m.

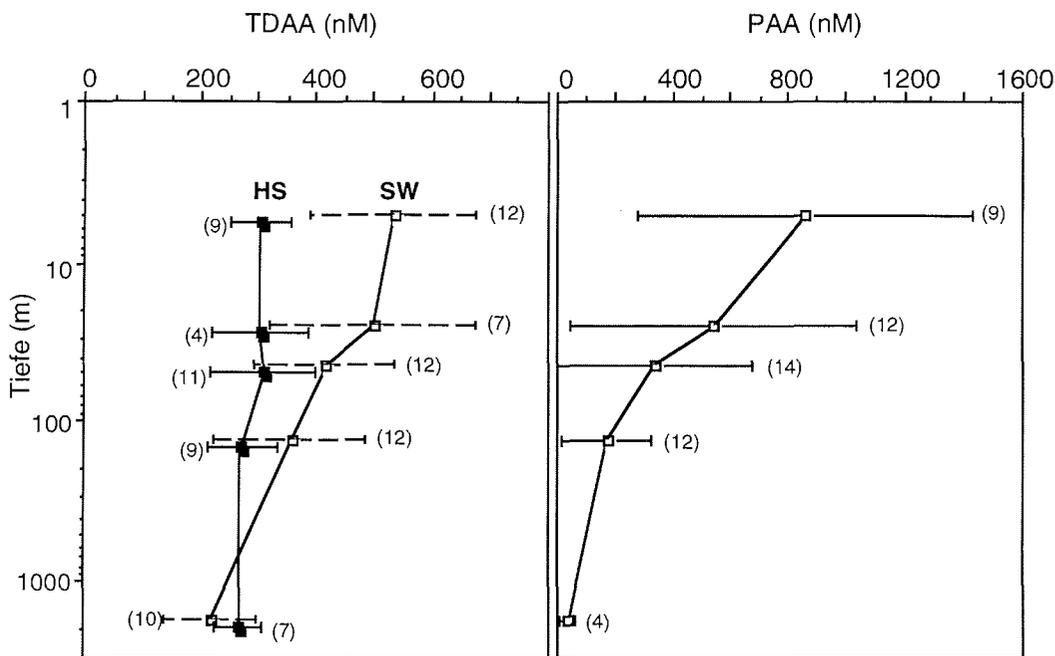


Abb.27: Mittlere Tiefenverteilung der Aminosäuren (in nM AA) in unfraktioniertem Seewasser (SW), in der Summe der hydrophoben Fraktionen (HS) und im partikulären Material. Die Daten aus ANT und ARK sind vereinigt und in Tiefenklassen entsprechend folgender Bereiche eingeteilt: 0-10 m, 20-30 m, 40-50 m, 75-200 m, 500-3000 m. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichungen) der Konzentrationen sind bei der mittleren Tiefe des jeweiligen Bereichs aufgetragen. (n= Zahl der Proben, Tiefe in logarithmischer Skala)

TDAA in den unfraktionierten Proben nahm von der euphotischen Zone in Richtung tieferer Schichten ab. Dies steht in Einklang mit der signifikanten Korrelation zwischen chl a und TDAA. Im Gegensatz zur filtrierten Probe war HbN+HbA in der Wassersäule nahezu konstant und korrelierte nicht mit chl a. Leichte Unterschiede zwischen Oberfläche (Daten von ANT und ARK gemeinsam: 0-45 m) und tieferen Schichten waren nicht signifikant ($\alpha=0,05$, Mann-Whitney-Test). An der Oberfläche gehörten rund 60%, bei Tiefen von mehr als 500 m nahezu 100% aller Aminosäuren zu den hydrophoben Fraktionen. Die Konzentration von PAA war in den Oberflächenschichten am größten und nahm mit zunehmender Tiefe in der Wassersäule ab.

5.1.4.4 Vergleich des Aminosäuremusters in POM und DOM

Mit einem Anteil von 70 bis 80% an der Gesamtaminosäurekonzentration waren gly, ala, glu, asp und ser sowohl im filtrierten Seewasser als auch in den Huminstofffraktionen die wichtigsten Aminosäuren. Im partikulären Material dagegen machten dieselben Aminosäuren nur rund 50% von PAA aus. Der mittlere prozentuale Anteil der einzelnen AA im partikulären Material war innerhalb der verschiedenen Proben verhältnismäßig konstant und für beide Regionen sehr ähnlich (Abb.28).

Bemerkenswert war der unterschiedliche Anteil von gly am gelösten und am partikulären Material: während gly mit 27 mol% im Seewasser dominant war, betrug sein mittlerer Anteil an PAA nur ca. 8%. Gly war in den hydrophoben Fraktionen und besonders in HbN mit 45 mol% (Arktis) bzw. 33 mol% (Antarktis) angereichert. In der Antarktis zeigten Seewasser und HbN mit ungefähr 8% sehr ähnliche Prozentanteile von asp. In den Proben aus der Arktis dagegen war asp im Seewasser (22%) verglichen mit POM (12%) und HbN (4%) signifikant

angereichert. Die Absolutkonzentration von gly betrug im Mittel in der Arktis 111 nM im unfraktionierten Seewasser und 105 nM in den hydrophoben Fraktionen, während einer mittleren Konzentration von asp von 89 nM im unfraktionierten Seewasser nur 12 nM in den hydrophoben Fraktionen entsprachen. Dieser Vergleich zeigt, daß die hohen prozentualen Anteile von gly in den hydrophoben Fraktionen und von asp in der hydrophilen Fraktion real waren und sich nicht nur als Folge der niedrigeren Konzentrationen aller anderen AA ergaben.

In PAA erfolgte eine Zunahme des relativen Anteils von gly mit steigender Tiefe in der Wassersäule. An der Oberfläche war der Anteil von gly an PAA ca. 7 Mol% und nahm kontinuierlich mit der Tiefe auf ca. 11 Mol% bei 500 m zu (der Unterschied war hochsignifikant; Mann-Whitney-Test, $p < 0,001$) (Abb.29). Der prozentuale Anteil von gly war für alle Tiefen in der gelösten Phase höher als im partikulären Material. In der Arktis war eine ansteigende Tendenz des gly-Anteils in HbN mit zunehmender Tiefe zu beobachten. Der Anteil von asp in PAA, in Seewasser und in HbN war unabhängig von der Tiefe.

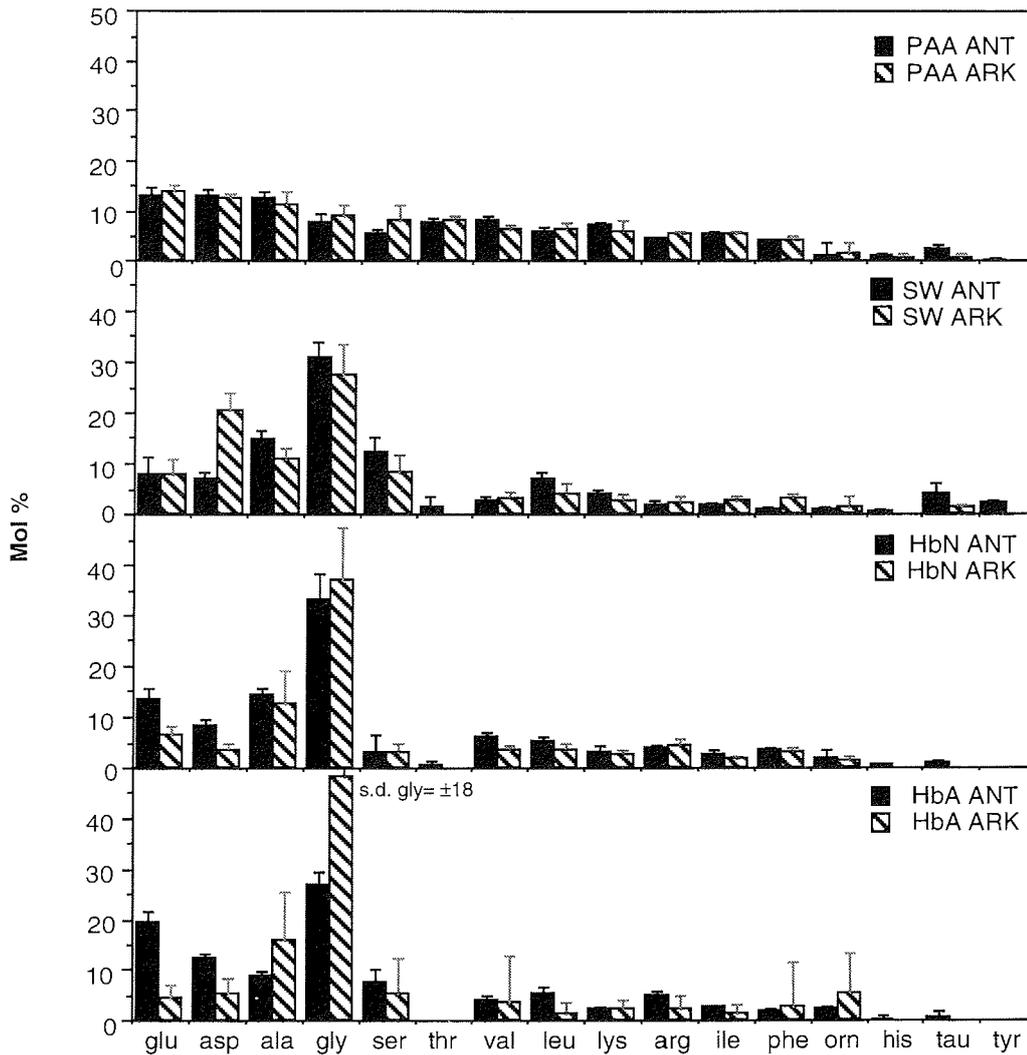


Abb.28: Die einzelnen Aminosäuren im partikulären Material (PAA), in der filtrierten Seewasserprobe (SW), in HbN und HbA für ARK (■) und ANT (▨) dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (s.d.) der Mol%.

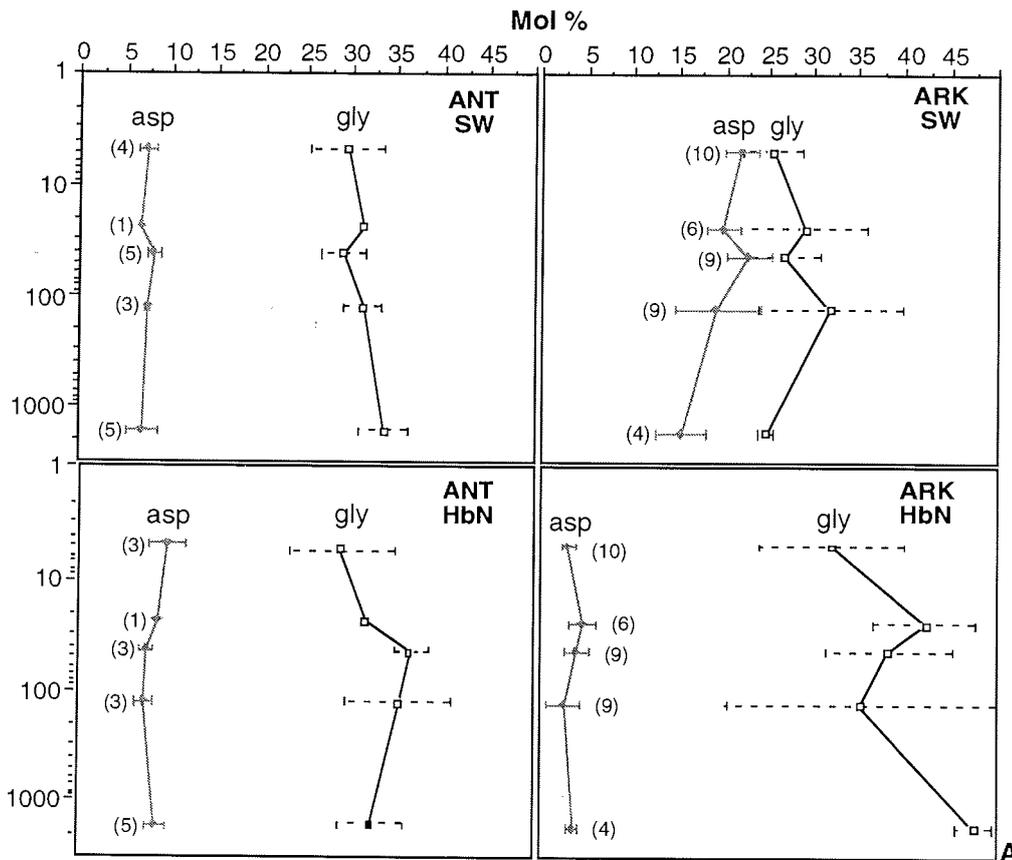
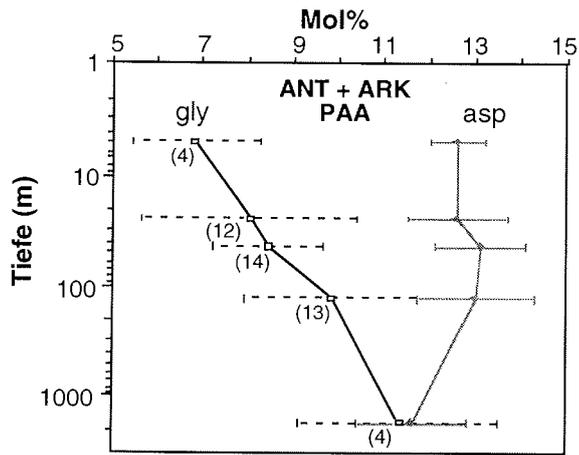


Abb.29: gly und asp in partikulärem Material (PAA), unfraktioniertem Seewasser (SW) und in HbN in der Arktis und Antarktis. Mittlere Tiefenverteilung in Mol%. Tiefengruppierung wie in Abb.27

5.2 Veränderungen der partikulären und gelösten organischen Substanz in einer Phytoplanktonkultur

Um die Prozesse, die frisch produziertes Algenmaterial mit gelösten marinen Huminstoffen verbinden, besser zu verstehen, wurde ein Langzeit-Kulturversuch mit der zentrischen Diatomeenart *Thalassiosira antarctica* durchgeführt. Die an den Feldproben aus den polaren Regionen ebenfalls untersuchten Parameter wurden während der Wachstumsphase der Diatomeenzellen, in der stationären Phase des Algenwachstums und beim bakteriellen Abbau der Zellen im Dunkeln verfolgt. Um die Bedingungen in der Kultur nicht durch Substanzen zu beeinflussen, die im Meerwasser normalerweise nicht vorkommen, wurde als Nährlösung geschmolzenes, filtriertes Brauneis verwendet. Innerhalb der Kultur wurde bewußt auf die gleichzeitige Anwesenheit von Phytoplankton und Bakterioplankton Wert gelegt, da Versuche mit isolierten Teilsysteme sehr schwer auf natürliche Verhältnisse übertragbar sind.

5.2.1 Allgemeine Charakterisierung der Biomassendynamik

Die Phytoplanktonbiomasse wurde charakterisiert durch die Diatomeenzellzahl und die Konzentration von Chlorophyll a. Die Bakterienbiomasse wurde anhand der Bakterienzahl dargestellt. Der gelöste Stickstoffpool bestand aus den anorganischen Verbindungen (DIN) Nitrat, Nitrit und Ammonium, sowie den gelösten organischen Verbindungen (DON) (Abb.30).

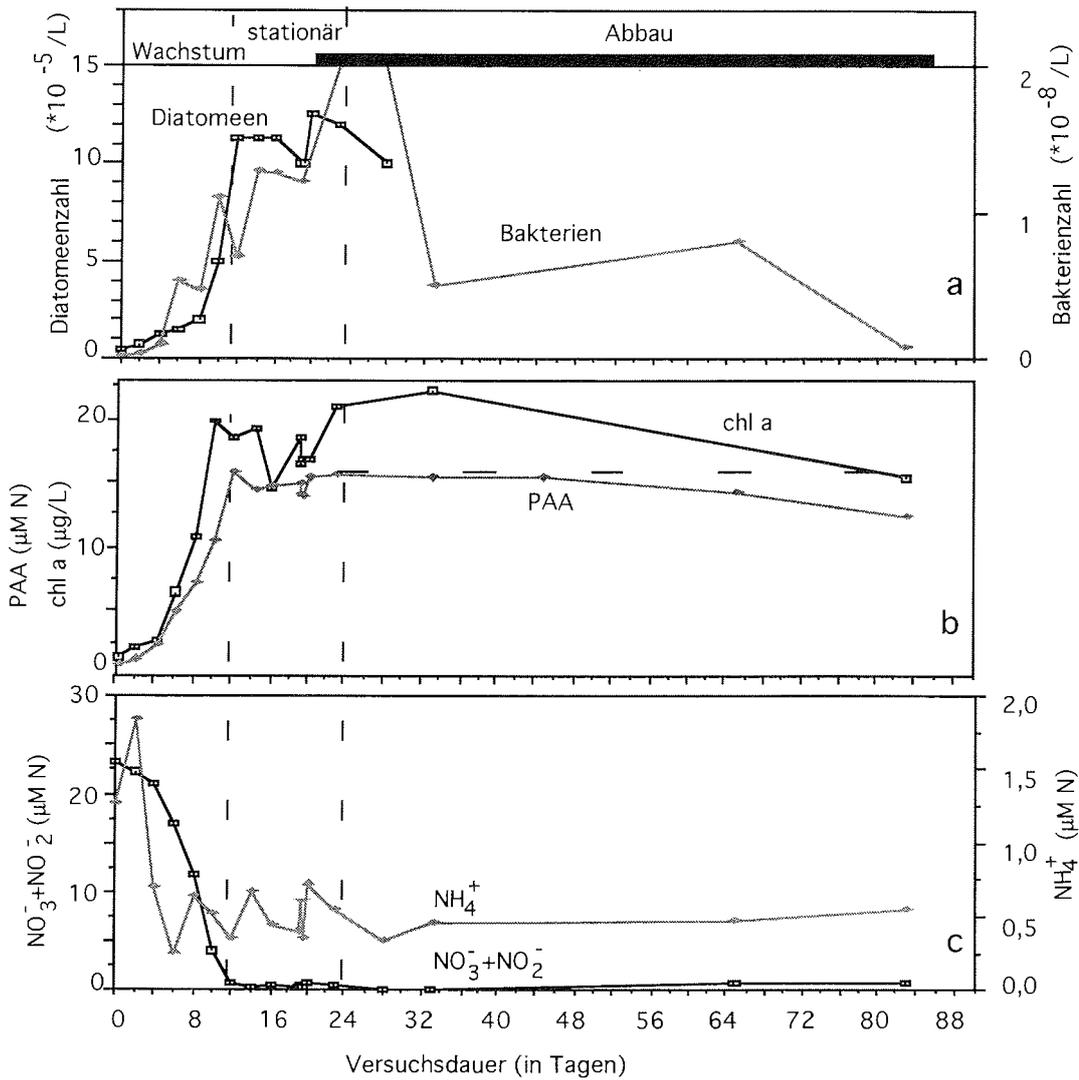


Abb.30: Diatomeen- und Bakterienzahl (a); PAA (Mittelwert der Messungen mit OPA- und FMOC-Methode), chl a (b); DIN: $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ und NH_4^+ (c) ████████ Dunkelheit vom 19. bis 84. Tag

Anhand der Entwicklung der Zellzahl der Algen, chl a und PAA wurde der Versuch entsprechend dem jeweiligen Zustand der Algen in drei Phasen - Wachstum, stationär und Abbau - eingeteilt.

Während der Wachstumsphase des Phytoplanktons (Tag 0-12) erfolgte ein exponentieller Anstieg von chl a, Algenzellzahl und PAA. Im gesamten Zeitraum, in dem das Phytoplanktonwachstum exponentiell verlief, nahm $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ stark ab. Am 12. Tag war DIN vollständig verbraucht, wobei NH_4^+ schon am 6. Tag ein Minimum erreicht hatte. Während bereits am 10. Tag das Maximum von chl a erreicht war, setzten sich Zellteilung und Proteinsynthese noch bis zum 12. Tag fort.

Am 12. Tag war DIN verbraucht, und das Phytoplanktonwachstum ging in die stationäre Phase über. Die Algenzellzahl war vom 12. bis 28. Tag annähernd konstant, und trotz Nährstofflimitierung änderte sich das äußere Erscheinungsbild der Zellen nicht. Chl a nahm bis zum 16. Tag ab und zeigte anschließend erneut eine leichte Zunahme. PAA nahm zwischen dem 12. und 14. Tag zunächst leicht ab und erreichte am 24. Tag wieder den Wert des 12. Tages. Ab dem 24. Tag begann sehr langsam die Abnahme von PAA. Die Abbauphase des Phytoplanktons (Tag 24-84) begann ungefähr nach einwöchigem Aufenthalt der Zellen im Dunkeln. Chl a erreichte ungefähr am 33. Tag ein Maximum und nahm dann ab. Ab dem 85. Tag wurden die Algen unter Zugabe von Nährstoffen in verschiedener Form wieder dem Licht ausgesetzt. Innerhalb einer Woche erfolgte unter optimalen Bedingungen eine Verdopplung der Zellzahl.

Wenn auch zeitlich leicht verschoben, so machen die Bakterien innerhalb des Versuchs unterschiedliche Zustände - Wachstum, quasi-stationär, Abnahme - durch. Während der Wachstumsphase zeigte sich vom 0. bis zum 6. Tag ein schneller Anstieg der Bakterienzahl. Der Zeitraum zwischen 6. und 28. Tag entsprach einer Phase mit langsamem Bakterienwachstum in der sich Perioden der Zunahme und Stagnation abwechselten. Zwischen dem 24. und 28. Tag traten maximale Bakterienzahlen auf und danach, in der Dunkelphase ab dem 28. Tag, ergab sich eine insgesamt rückläufige Tendenz.

5.2.2 Veränderungen des DON und der DON-Fraktionen in Bezug zur Biomasse

In DON spiegelten sich ebenfalls die beobachteten drei Phasen wieder. Während DON in der Wachstumsphase bis zum 8. Tag stark anstieg, nahm es in der stationären Phase mit zunehmender Geschwindigkeit ab und erreichte am 24. Tag ein Minimum. In der Abbauphase ab dem 24. Tag nahm DON deutlich zu. In Abb.31 ist sowohl für die filtrierte Probe als auch für die einzelnen Fraktionen die Konzentration von DON und den hydrolysierbaren AA dargestellt.

5.2.2.1 Wachstumsphase

Die XAD-Fraktionierung des Seewassers zeigte, daß die zu Versuchsbeginn vorhandenen Stickstoffverbindungen überwiegend hydrophober Natur waren. Der Anteil der AA am DON machte ca. 40% aus. DON in HbN war zu Versuchsbeginn rund dreimal höher als in HbA, wobei die Konzentration der AA in HbN ungefähr zehnmal höher war als in HbA. In den Tagen 0 bis 6 nahm TDAA ab, obwohl DON eine Nettozunahme zeigte. Diese Abnahme in TDAA entsprach numerisch ungefähr der Abnahme von AA-HbN. AA-HbA blieb unverändert niedrig. Bezüglich DON wurde die Abnahme in DON-HbN, die überwiegend durch die Abnahme der AA verursacht wurde, durch die starke Zunahme in DON-HI überdeckt, wobei für AA-HI keine signifikante Nettoänderung sichtbar wurde. Der innerhalb des DON bevorzugte Verbrauch von AA durch die Bakterien spiegelte sich auch in der Abnahme des relativen Anteils der AA am DON auf weniger als 20 % wider.

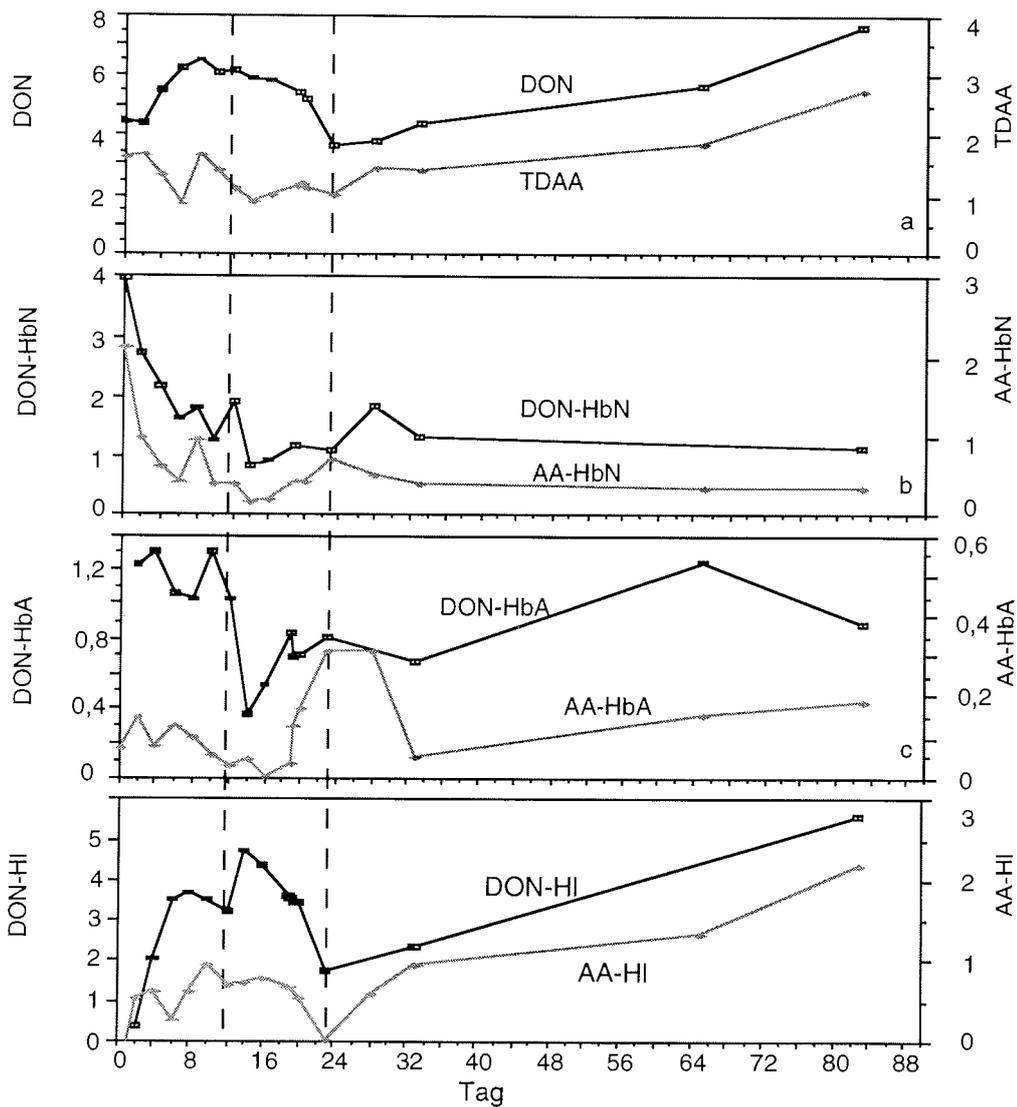


Abb.31: Änderungen von DON und TDA (a); DON-HbN und AA-HbN (b); DON-HbA und AA-HbA (c); DON-HI und AA-HI (d); in $\mu\text{M N}$

Am 8. Tag erreichte DON ein Maximum. Zwischen dem 6. und 8. Tag machten die Bakterien eine Wachstumspause, d.h. sie nahmen weniger AA auf, wodurch die Ausscheidung durch die Algen sichtbar wurde. Die Konzentration der Aminosäuren in HI und in HbN nahm zwischen dem 6. und 8. Tag zu. Ab dem 8. Tag begann

allmählich die Nettoabnahme der Gesamt-DON-Konzentration durch leichte Abnahme in DON-HI; DON der hydrophoben Fraktionen zeigte in dieser Zeit geringe Konzentrationsschwankungen, die einem höheren Verbrauch der Bakterien bei schnellerem Wachstum und einer Nettozunahme durch Ausscheidungen der Algen bei gleichbleibender Bakterienzahl entsprachen. TDAA und die Konzentration der Aminosäuren in den hydrophoben Fraktionen nahmen zwischen dem 8. und dem 14. Tag ab, während AA-HI bis zu Beginn der Dunkelphase relativ konstant war.

5.2.2.2 Stationäre Phase

Zwischen den Tagen 12/14 und 24 erfolgte eine starke Netto-DON-Abnahme und ein hoher DON-Umsatz. Ab dem 14. Tag begann der relative Anteil der AA am DON zuzunehmen, bis am 28. Tag der Anfangswert von 40% erneut erreicht war. Obwohl DON am 12. Tag hydrophobe und hydrophile Verbindungen ungefähr im Verhältnis 1:1 enthielt, wurden zunächst die hydrophoben Verbindungen verbraucht. DON-HI zeigte eine Zunahme in der gleichen Größenordnung, wodurch quasi keine Netto-Änderung in Gesamt-DON sichtbar wurde. Am 14. Tag war mit 1150 nM N in DON und 200 nM N in AA der hydrophoben Fraktionen ein Minimum erreicht, das während des Versuchs nicht mehr unterschritten wurde.

Parallel zur Abnahme in DON-HI zwischen 14. und 24. Tag nahmen DON und AA in den hydrophoben Fraktionen ab dem 14. Tag wieder langsam zu. TDAA änderte sich im Gegensatz zu DON in der stationären Phase nicht: die Abnahme von AA-HI wurde numerisch durch die Zunahme der AA in den hydrophoben Fraktionen ausgeglichen. Die Bakterienzahl und die Konzentration in den hydrophoben Fraktionen erreichen gleichzeitig ein Maximum. Die gebildeten Verbindungen wurden allerdings direkt im Anschluß wieder verbraucht. Bemerkenswert war im

Hinblick auf den Konzentrationsanstieg in HI ab dem 24. Tag, daß das in der Wachstums- bzw. stationären Phase von den Algen ausgeschiedene DON-HI weitgehend abgebaut wurde und ab dem 14. Tag, an dem sowohl DON der hydrophoben Fraktionen, wie auch Ammonium bis auf eine Minimalkonzentration reduziert waren, den Bakterien als einziges Substrat diente.

5.2.2.3 Abbauphase

Ab dem 24. Tag nahmen DON und TDAA der unfraktionierten Probe zu. Die Bakterien nahmen, nachdem ihre Zahl zwischen Tag 24 und 28 ein Maximum erreicht hatte, gleichzeitig mit einer Abnahme in AA und DON der hydrophoben Fraktionen ab. Ab dem 33. Tag, nach rund zwei Wochen Dunkelheit, waren Veränderungen in der gelösten Phase vorwiegend durch heterotrophe Vorgänge bedingt. Es erfolgte ein deutlicher Anstieg in Gesamt-DON und Gesamt-TDAA, der einer Abnahme in PAA entsprach. Während des Abbaus enthielten die überwiegend hydrophilen Substanzen des DON-Pools einen konstanten, hohen AA-Anteil von rund 40%. DON-HbN und AA-HbN blieben während des Abbaus unverändert, DON-HbA und AA-HbA zeigten insgesamt eine leicht zunehmende Tendenz.

5.2.2.4 Freie Aminosäuren

Die Betrachtung der freien AA in PAA und im Medium, während der drei diskutierten Phasen, vermittelt weitere Einblicke in das System. Am 8. Tag erreichte FAA in den Algenzellen ein Maximum (Abb.32a). Im Medium zeigte DFAA bis zu diesem Zeitpunkt trotz bakteriellen Wachstums eine leicht zunehmende Tendenz, wobei die Konzentration der freien relativ zu den gebundenen AA bis zum 6. Tag zunahm (Abb.32b). Zwischen dem 8. und 12. Tag, als auch DIN eine starke

Abnahme zeigte, wurde FAA in der Zelle auf etwa ein Zehntel des Wertes in den N-gesättigten Zellen reduziert. Der am 12. Tag erreichte Wert entsprach offenbar einer Minimalkonzentration in den N-limitierten Zellen und blieb bis zum Ende des Versuchs nahezu konstant. Entsprechend verhielt sich DFAA. Lediglich am 19. Tag schieden die Zellen, offenbar als Folge der Lichtlimitierung, kurzfristig FAA aus, was sich in einem vorübergehenden Anstieg von DFAA bemerkbar machte. Während des Abbaus wurden bevorzugt gebundene AA in Lösung gebracht, was sich im Verhältnis von freien zu gebundenen Aminosäuren im Medium widerspiegelte, das bis zum 45. Tag auf einen Wert nahe Null abnahm.

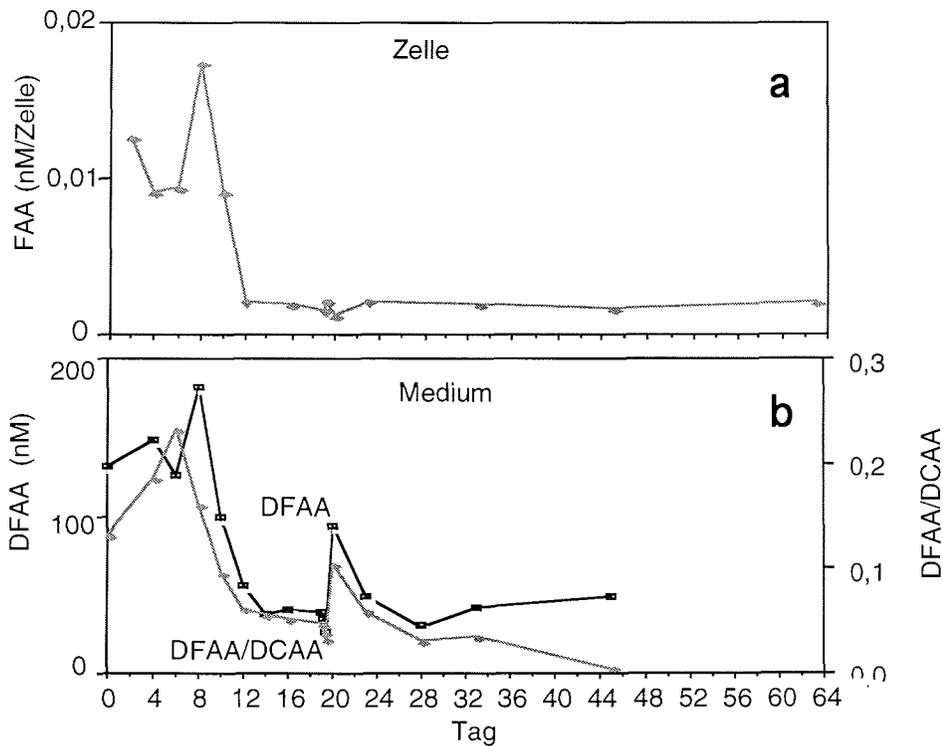


Abb.32: Konzentration der FAA im intrazellulären Pool bezogen auf die Zellzahl (a); DFAA und Verhältnis von freien zu gebundenen Aminosäuren im Medium (b)

5.2.3 Beziehung zwischen gelöstem und partikulärem gebundenen Stickstoff

5.2.3.1 Massenbilanz

Die Grundlage für die Bilanzierung ist die Voraussetzung, daß die Summe aus gelöstem anorganischen, organischen und partikulärem Stickstoff während des Versuchs konstant ist.

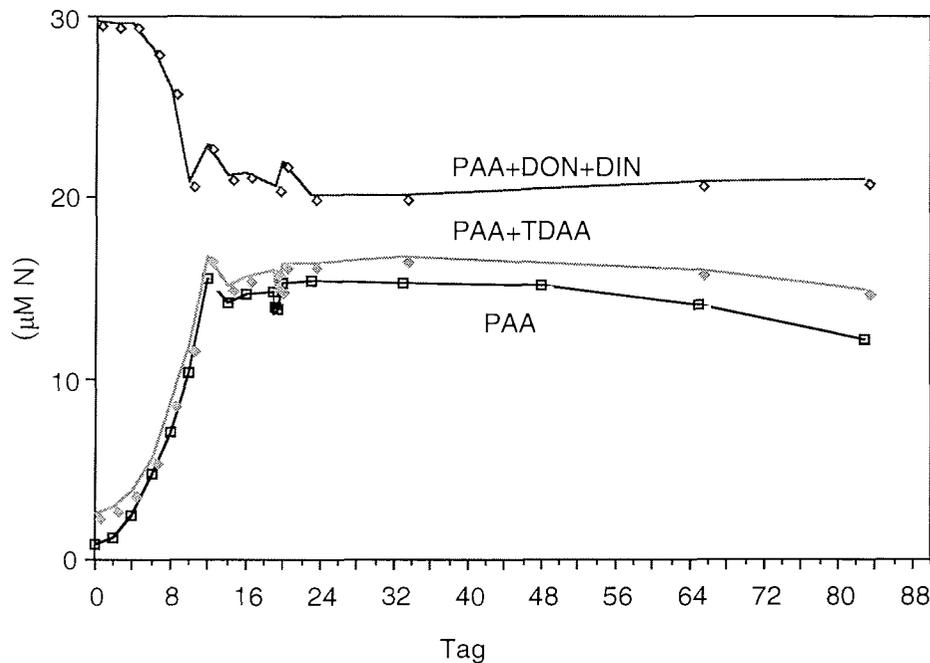


Abb.33: Massenbilanz für die partikulären und gelösten Stickstoffverbindungen: PAA; PAA+TDAA; PAA+DON+DIN

Die Zunahme von PAA während der Wachstumsphase bis zum 12. Tag betrug 14,7 $\mu\text{M N}$, die Zunahme von DON 1,7 $\mu\text{M N}$. Dem stand eine Abnahme von DIN von 23,2 $\mu\text{M N}$ gegenüber. 68% des gesamten ins partikuläre Material eingebauten Stickstoffs waren demzufolge Aminosäuren. Während des Abbaus nahm PAA um

3,2 μM N bzw. ca. 20% ab, während TDAA auf 260 % seines Wertes am 23. Tag anstieg. Die Abnahme von PAA während des Abbaus wurde nur zu 42% durch den parallelen Anstieg von TDAA (1323 nM N) kompensiert. Die Zunahme von DON (Zunahme: 3256 nM N) und DIN (Zunahme: 780 nM N) machte zusammen 128% des Verlusts von PAA während der ersten 65 Tage der Dunkelphase aus.

5.2.3.2 AA-Verteilung im partikulären und im gelösten Material

Die AA-Zusammensetzung des partikulären Materials blieb während des Abbaus weitgehend konstant (Abb.34a): Den größten Anteil mit jeweils etwas mehr als 10 % hatten ala, gly, asx, glx, den kleinsten mit weniger als je 5 % die AA mit basischen (arg, his) und aromatischen (phe, tyr) Seitengruppen. Im Vergleich mit dem Muster des gelösten Materials (Abb.34b) fiel der hohe Anteil von gly (ungefähr 23%) und der niedrige Anteil von thr (1%) in TDAA auf. Bemerkenswert war außerdem die Zunahme des ser-Anteils in TDAA während des Abbaus. Für die Abnahme in PAA waren in erster Linie gly (16% der Abnahme in PAA) gefolgt von glu und ala (je ca. 10%) verantwortlich, während asp mit 6% einen relativ kleinen Anteil ausmachte (Abb.34c/e). Verhältnismäßig groß war die Abnahme für val, thr, ile, arg. Allerdings spiegelte sich die hohe Abnahme in PAA für diese AA nicht wie für gly in einer entsprechenden Zunahme in TDAA wider (Abb.34d/f). Die Gegenüberstellung der Konzentrationsabnahme in PAA mit der Zunahme in TDAA zeigte eine Diskrepanz (Abb.34g), die darauf hindeutete, daß diese AA zu einem besonders hohen Anteil in andere N-Verbindungen umgewandelt wurden. Es resultierte eine Gruppe von AA, die mehr als 10% zur Zunahme von TDAA beitrugen (gly (25%), asp, glu, ala, ser (10-15%)) und eine andere Gruppe, die einen wesentlich geringeren Anteil ausmachte (<6%).

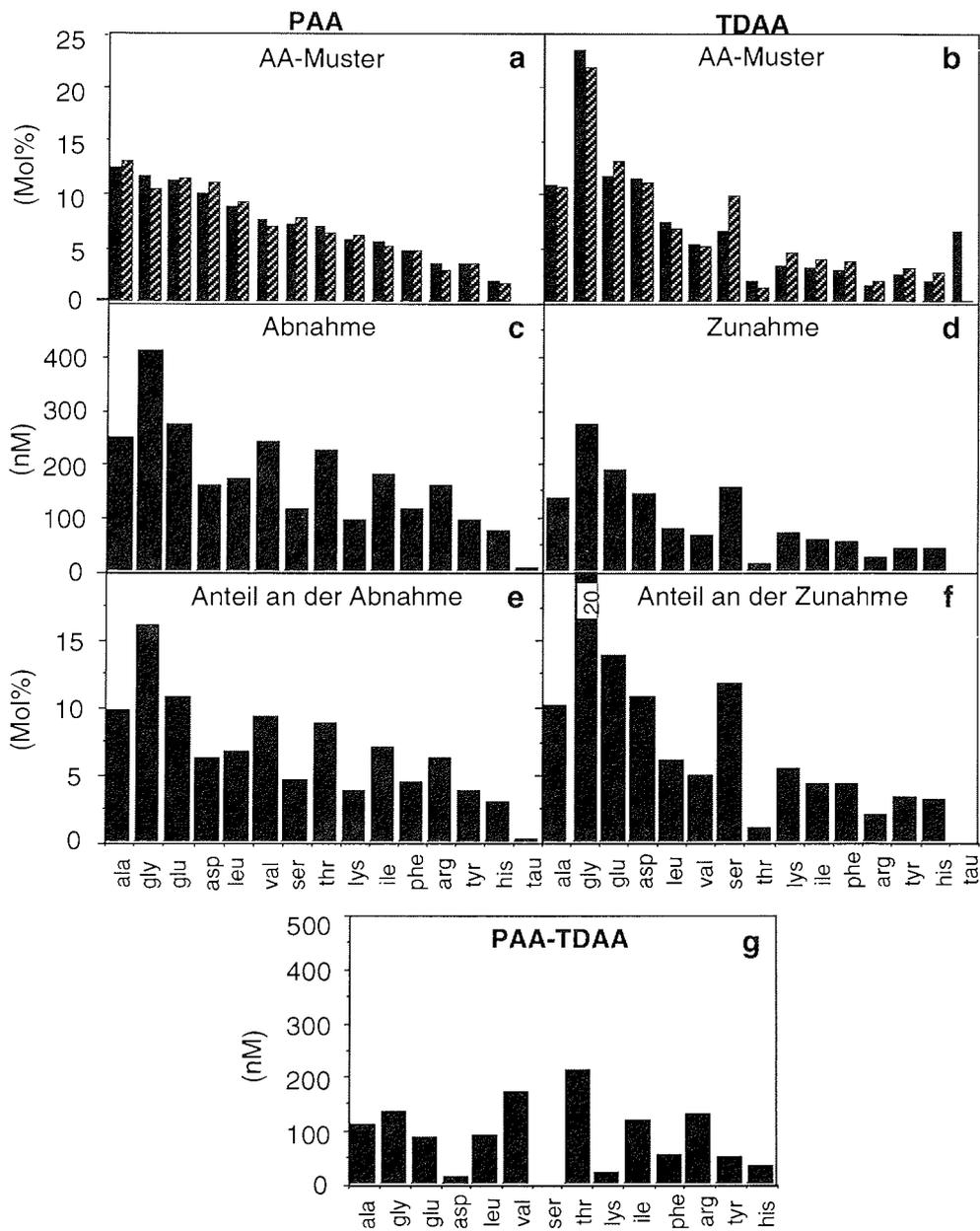


Abb.34: Prozentualer Anteil der einzelnen AA im partikulären Material (a) und in Seewasser (b) am 23. (■) und am 84. (▨) Tag; Abnahme von PAA (c) und Zunahme von TDAA (d) zwischen 23. und 84. Tag; Anteil der einzelnen AA an der Abnahme in PAA (e) und an der Zunahme in TDAA (f). Differenz zwischen der Abnahme in PAA und der Zunahme in TDAA (g).

5.2.3.3 Aminosäurekonzentration und -verteilung in den Fraktionen des partikulären Materials nach der Extraktion mit TCA und NaOH

Die Extraktion des partikulären Materials ergab eine lösliche Fraktion mit Monomeren, Peptiden und Proteinen (MPP-Fraktion) und einen "Rest", der alle Aminosäureverbindungen enthält, die bei der Extraktion des partikulären Materials mit NaOH nicht gelöst wurden. Die Veränderungen im partikulären AA-Pool während des Abbaus sind in Abb.35 dargestellt. Ca. 10-14 Tage nach Beginn der Dunkelphase begann eine Abnahme der Peptide und eine parallele Zunahme des "Rests", die bis zum Versuchsende andauerten. Die Konzentration der Proteine nahm bis zum 44. Tag zu und blieb dann bis zum 74. Tag konstant. Nachdem in den ersten Wochen in der Dunkelheit die Konzentration der Peptide in der Zelle stark reduziert wurde, begann ab dem 76. Tag die Konzentration der Proteine ebenfalls abzunehmen. Der "Rest" nahm in diesem Stadium schneller zu. Nach 2-monatigem Abbau hatte die MPP-Fraktion um etwa 50% abgenommen. Wie Abb.32a zeigt, waren die Monomere während des gesamten Abbaus auf einem konstant niedrigen Niveau.

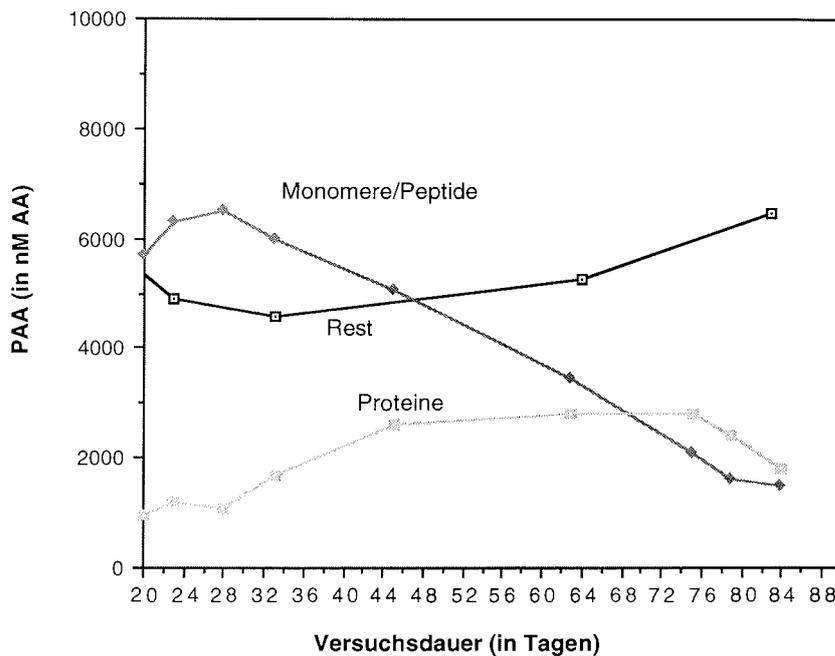


Abb.35: Zusammensetzung des intrazellulären AA-Pools während der Dunkelphase

Am 23. Tag machte die MPP-Fraktion 55 % und der "Rest" 45 % von PAA aus. Am 84. Tag hatte der "Rest" auf 64% von PAA zugenommen, die MPP-Fraktion machte nur noch 35% aus. Die intrazellulären Reaktionen veränderten das AA-Muster der Fraktionen des partikulären Materials deutlich. Es blieb im Gegensatz zur AA-Verteilung im gesamten partikulären Material im Verlauf des Abbaus nicht konstant. Am 23. Tag waren die AA des partikulären Materials relativ gleichmäßig auf beide Fraktionen verteilt. Um mehr als 2% unterschieden sich die relativen Anteile der einzelnen AA in beiden Fraktionen nur für gly, thr, his, deren Anteile in der MPP-Fraktion um 3-7% höher waren und leu, ser, deren Anteile im "Rest" um 3-4% höher waren. Nach dem Abbau waren die Unterschiede in beiden Fraktionen deutlicher. Einen höheren relativen Anteil im "Rest" hatten nun gly, ile, arg, his (je ca. 2,5% mehr); der Anteil von glu und ala war dagegen in der MPP-Fraktion um 8% höher (Abb.36a/b).

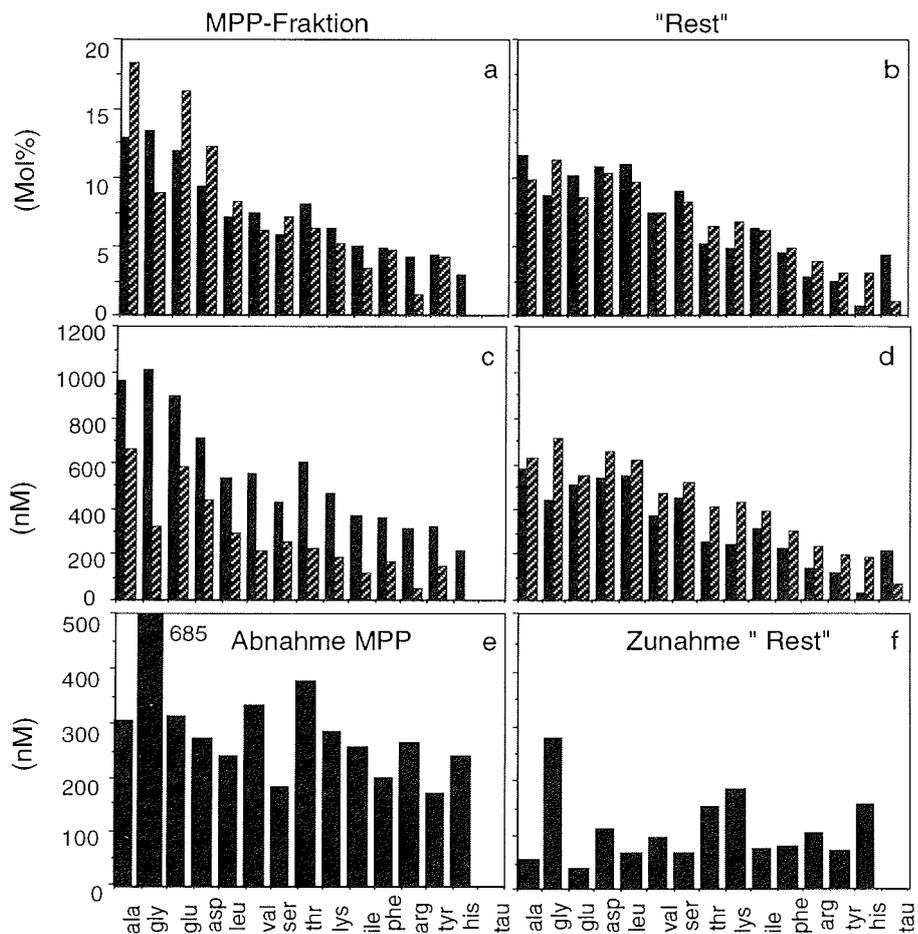


Abb.36: Aminosäuremuster der MPP-Fraktion (a) und des "Rests" (b) (in Mol%), Konzentration der einzelnen AA in der MPP-Fraktion (c) und im "Rest" (d) (in nM) am 23. (■) und am 84. Tag (▨); Abnahme der MPP-Fraktion (e) und Zunahme des "Rests" (f) zwischen 23. und 84. Tag (in nM)

Unabhängig von ihrer Ausgangskonzentration nahm die Konzentration aller Aminosäuren, außer gly, in der MPP-Fraktion während des Abbaus um 270 ± 100 nM AA ab. Gly nahm um 685 nM AA ab (Abb.36c/e). Das bedeutete, daß von den hydrophilen und im Ausgangsmaterial quantitativ wichtigen Aminosäuren (ala, glu, asp) am 84. Tag noch mehr als 60% in der MPP-Fraktion verblieben waren,

während dieser Anteil für gly (32%) und die weniger "wichtigen" hydrophoberen Aminosäuren deutlich geringer war. Für die Zunahme des "Rests" waren vorallem gly, thr und die basischen AA (lys, his, arg) verantwortlich (Abb.36d/f).

Da die MPP-Fraktion am 23. Tag die potentiell hydrolysierbaren AA enthielt, wurde die Verteilung dieser AA auf die verschiedenen anderen Fraktionen im Laufe des Abbaus untersucht. Es gab für jede Aminosäure drei unterschiedliche Möglichkeiten, die zu einer Konzentrationsabnahme in der MPP-Fraktion führen konnten: 1) der unveränderte Übergang ins Medium (d.h. Erhöhung von TDAA), 2) die Reaktion mit anderen Molekülen in der Zellmatrix unter Bildung von schwerlöslichen Verbindungen (d.h. Übergang in den "Rest") und 3) eine Umwandlung in andere N-Verbindungen (Abb. 37). Wie die Massenbilanz gezeigt hat, führte diese dritte Möglichkeit zur Bildung von Nicht-Amino-DON und DIN.

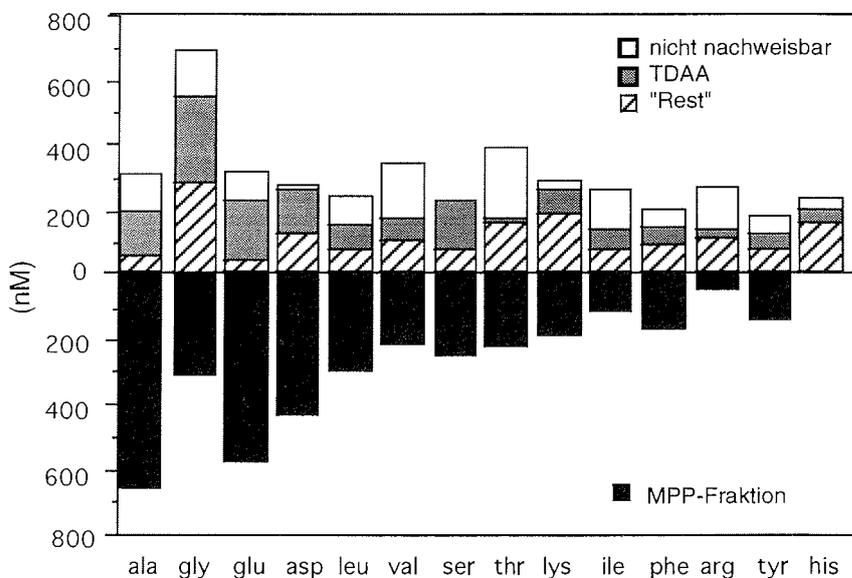


Abb.37: Verteilung der AA, die am 23. Tag in der MPP-Fraktion vorlagen (Gesamt-Balkenlänge) auf die Fraktionen von partikulärem und gelöstem Material infolge der Abbaureaktionen bis zum 84. Tag

Obwohl die Konzentration der AA, die aus der MPP-Fraktion verschwanden, vom Betrag her für alle AA (außer gly) annähernd gleich war, zeigte die Verteilung auf die Fraktionen deutliche Unterschiede, die offenbar bis zu einem gewissen Grad durch die Lipophilie der AA-Moleküle bedingt waren (Abb.38).

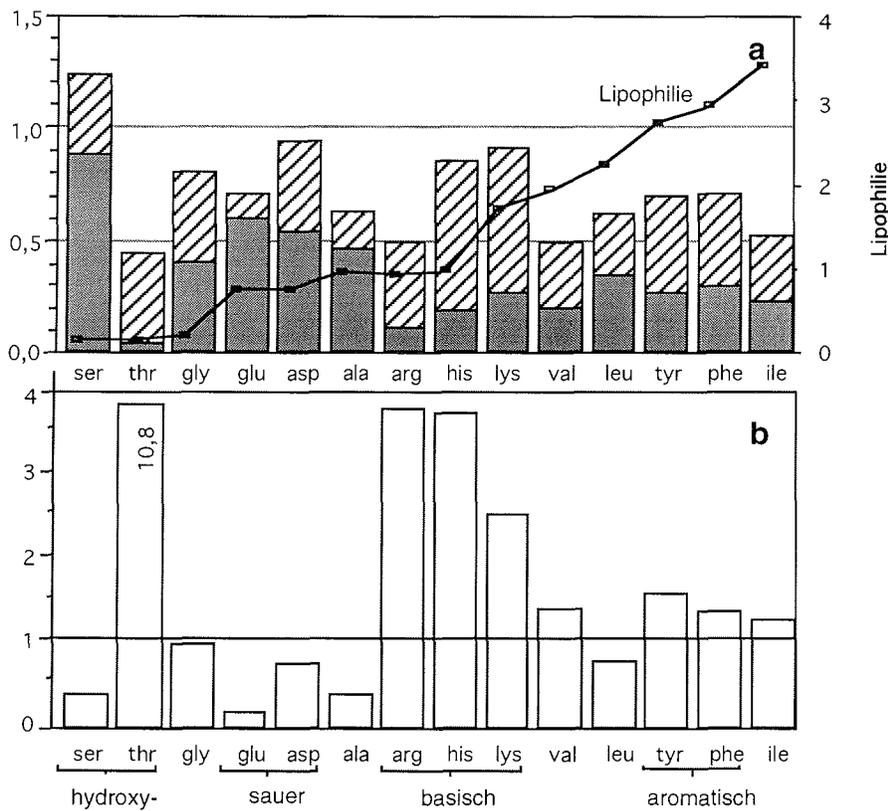


Abb.38: Gegenüberstellung der Lipophilie der einzelnen Aminosäuren mit ihrer Zunahme in TDA (■) bzw. im "Rest" (▨) bezogen auf die Abnahme in der MPP-Fraktion (a); Verhältnis zwischen Zunahme im "Rest" und Zunahme in TDA (Zunahme "Rest"/Zunahme TDA) (b). Die Lipophilie ist dargestellt anhand der freien Energie (in 0,1 kcal/Mol) für den Übergang Ethanol/Wasser (Eriksson, 1989).

In Abb.38a wurde die Zunahme in TDA und im "Rest" für jede einzelne Aminosäure auf die gleichzeitige Abnahme in der MPP-Fraktion bezogen. Der Anteil, der während des Lösungsvorgangs in Nicht-Aminostickstoff umgewandelt

wurde, ergibt sich als Differenz der Summe zu 1. Die Gegenüberstellung der Lipophilie mit dem Anteil der einzelnen Aminosäuren, der in TDAA überging, zeigt, daß die hydrophilen AA zu einem größeren Anteil unverändert in Lösung gingen als die hydrophoben, wobei thr eine deutliche Ausnahme darstellte. Thr zeigte sich gleichzeitig am instabilsten gegen Abbau; 60% gingen verloren. Ser dagegen wurde während des Abbaus offenbar gebildet. Weniger als 20% Verlust zeigten asp, gly, his und lys, dagegen gingen bei arg, val, ile rund 50% verloren. Hinsichtlich des Anteils, der nicht mehr als Aminosäure nachweisbar war, war keine Beziehung zur Polarität der Moleküle zu erkennen. Die basischen Aminosäuren (arg, his, lys) gelangten trotz ihres relativ hydrophilen Charakters nur zu einem geringen Teil unverändert in Lösung. Diese AA nahmen ebenfalls eine Sonderstellung ein, wenn der Zunahme in TDAA die Zunahme im "Rest" gegenübergestellt wurde (Abb.38b): Für die basischen AA waren die Reaktionen innerhalb der Zelle, die zur Zunahme des "Rests" führten, quantitativ wichtiger als der Übergang in TDAA. Von den anderen hydrophileren AA verteilte sich nur gly zu gleichen Teilen auf TDAA und "Rest", während sich asp, ser, ala und glu in TDAA anreicherten. Bei den hydrophoben AA fand dagegen eine Anreicherung im "Rest" statt, lediglich leu ging auch zu einem relativ hohen Anteil in Lösung über.

6 Diskussion

6.1 Dynamik des Stickstoffs im Kulturversuch

Der größte Teil des schwer abbaubaren DOM der Ozeane wird in der Wassersäule gebildet (Keil & Kirchman, 1994). Die Hauptquelle für DOM ist die in-situ Produktion durch planktonische Organismen (Lee & Wakeham, 1988). DOM, das frisch von Phytoplankton ausgeschieden wird, ist labil und wird innerhalb kurzer Zeit von heterotrophen Organismen oxidiert (Azam et al., 1983). Über die Dynamik der Stickstoffverbindungen innerhalb verschiedener Phasen (Wachstum, stationär, Abbau) einer Diatomeenkultur, sollte der Übergang von POM in DOM und die Reaktionswege untersucht werden, die dabei zur Bildung von schwer abbaubarem DOM führen können.

DON zu Versuchsbeginn stammte aus unterschiedlichen Quellen: eine Quelle war das Brauneis, das als "natürliche" Nährlösung zugefügt wurde. Die organischen Substanzen im Eis waren noch relativ "frisch", d.h., sie konnten nach dem Schmelzen des Eises wahrscheinlich als Nährstoffquelle für die Heterotrophen dienen (pers. Mitteilung Lara, 1994). Das antarktische Tiefenwasser, das als Kulturmedium verwendet wurde, enthielt DON, das wahrscheinlich inert war (Lara & Kattner, 1994). Durch die Impflösung selbst wurde eine unbekannte Menge an DON eingebracht. Für die Veränderungen von DON während des Versuchs waren die Algen als DON-Quelle und die Bakterien, die überwiegend als DON-Senke agierten, verantwortlich. Es wird angenommen, daß Ammonium die bevorzugte N-Quelle der meisten Phytoplanktonspezies ist (Antia, 1991). FAA kann als N-Quelle von Phytoplanktonzellen aufgenommen werden, die infolge niedriger DIN-Konzentrationen unter Nährstoffstreß stehen (Flynn & Butler, 1986). Das AA-Transportsystem der Algen kann durch NH_4 -Verarmung aktiviert werden (Flynn &

Syrett, 1985). Die Zeitspanne, die für die Aktivierung notwendig ist, könnte durch die Abnahme des intrazellulären AA-Pools auf einen kritischen Wert bestimmt werden (Flynn & Butler, 1986). Im Versuch war die Aufnahme von Aminosäuren durch die Algen wegen der geringen Konzentration von DFAA unwahrscheinlich.

Der erste Teil der Wachstumsphase bei DIN-Überschuß und Dauerbeleuchtung war innerhalb der Diatomeen gekennzeichnet durch Zellteilung, chl a-Synthese, Proteinsynthese und Aufbau eines intrazellulären Pools von FAA. Vermutlich schieden die Algen bei hoher intrazellulärer FAA-Konzentration, große Mengen von FAA aus, die von den Bakterien direkt verbraucht wurden und daher nur eine geringe Konzentrationsänderung der DFAA ergaben. Daneben wurden andere niedermolekulare, N-reiche Verbindungen in so großer Menge ausgeschieden, daß die DON-Aufnahme durch die schnellwachsenden Bakterien überdeckt wurde und eine Netto-Zunahme von DON erfolgte. Die Aufnahme von DCAA durch die Bakterien war in einer Abnahme in AA-HbN und im abnehmenden relativen Anteil der AA an DON sichtbar.

Im frühen Stadium einer Planktonblüte sowie bei Monokulturen in großen Tanks (Mesocosmen) werden zunehmende DON-Konzentrationen hauptsächlich durch den phytoplanktonischen Stoffwechsel verursacht (Brockmann et al., 1983). Die Tatsache, daß gesunde Phytoplanktonzellen Verbindungen mit hohem N-Gehalt (z.B. Aminosäuren) in hoher Konzentration (3-6% Verlust der Biomasse pro Tag) ausscheiden, ist allgemein akzeptiert (Bjornsen, 1988). Dieser Ausscheidungsmechanismus ist auf Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht beschränkt (Mague et al, 1980; Sondergaard & Schieruf, 1982), während der hochmolekulare Anteil im DOC auf simultan ablaufende andere Mechanismen, wie Autolyse und Ausscheidung von Grazern zurückzuführen ist (Sundh & Bell, 1992). Die Ausscheidung von photosynthetisch produziertem DOM ist nicht auf die Zeiträume

beschränkt, in denen Photosynthese erfolgt, sondern setzt sich auch in Dunkelperioden fort (Sundh & Bell, 1992). Verschiedene Untersuchungen mit radioaktiv markierten Verbindungen zeigten, daß keine Wiederaufnahme durch die Algen selbst erfolgt, sondern daß Bakterien, die die Zelloberfläche besiedeln, für die Aufnahme der gesamten niedermolekularen Verbindungen verantwortlich sind (Itturriaga & Hoppe, 1977; Williams, 1981). Als Mechanismus wird zum einen die aktive Ausscheidung von überschüssigen Photosyntheseprodukten diskutiert, die sich aufkonzentrieren, wenn die C-Fixierung den Einbau in neues Zellmaterial übersteigt (Fogg, 1983) und zum anderen die Ausscheidung durch passive Permeation durch die Zellwand aufgrund des Konzentrationsgefälles zwischen Zellinnerem und umgebender Lösung (Bjornsen, 1988).

Im zweiten Teil der Wachstumsphase reagierten die Algen auf die niedrige Konzentration von Ammonium und die starke Abnahme von Nitrat plus Nitrit mit der Reduktion des intrazellulären FAA-Pools. FAA in den N-limitierten Zellen betrug nur etwa ein Zehntel des Wertes der N-gesättigten Zellen. Parallel zur Abnahme des intrazellulären Pools wurde die Ausscheidung von FAA und offenbar auch von DON geringer: DFAA nahm schnell auf einen sehr niedrigen Wert ab, den es bis zum Versuchsende beibehielt. Lediglich beim Abschalten des Lichts stieg DFAA vorübergehend leicht an. Parallel zur Abnahme von DFAA verlangsamte sich das Bakterienwachstum. Die plötzliche Ausscheidung von FAA durch die Algen unter Lichtstreß war mit einem erneuten Anstieg der Bakterienzahl verbunden. Die reduzierte Ausscheidung von DON durch die Algen machte sich in einer Abnahme von DON im Medium bemerkbar.

Die stationäre Phase war gekennzeichnet durch Stickstofflimitierung: Die beschleunigte Abnahme von DON machte die verminderte Ausscheidung durch die Algen infolge der Umstellung ihres Stoffwechsels sichtbar. Die

vorübergehende Abnahme von PAA deutete auf die Ausscheidung von cytoplasmatischen Substanzen durch geschwächte Zellen hin, während eine Zunahme von chl a die Bildung von Überlebensformen andeutete (du Preez & Bate, 1992). Die Zunahme von DON und AA der hydrophoben Fraktionen spiegelte möglicherweise die Ausscheidungen der Algen unter Licht- und Stickstoffstreß wider. Die in dieser Phase ausgeschiedenen hydrophoben Verbindungen wurden umgehend wieder verbraucht.

Bei N-Limitierung erfolgt eine Verschiebung des phytoplanktonischen Metabolismus. Es werden dann vorwiegend Kohlenhydrate synthetisiert (Myklestad, 1977). Gleichzeitig verändert sich auch das Muster des ausgeschiedenen DOM (Mague et al., 1980). Die Ergebnisse aus der Wachstumsphase und der stationären Phase der Algen zeigten, daß frisch ausgeschiedene Substanzen cytoplasmatischer Herkunft, zu denen auch das im Brauneis vorhandene DON gezählt wurde, unabhängig davon, ob sie hydrophober oder hydrophiler Natur waren, von den Bakterien größtenteils aufgenommen wurden. Das Bakterienwachstum schien bevorzugt durch FAA unterhalten zu werden. Bakterien können ausschließlich Monomere oder Dimere direkt aufnehmen (Azam & Smith, 1991), höhermolekulare Verbindungen müssen vor der Aufnahme enzymatisch hydrolysiert werden. Da DFAA innerhalb von Minuten oder Stunden verbraucht werden (Fuhrmann, 1990), ist ihre Konzentration in Seewasser normalerweise sehr klein. Inwieweit die Aufnahme von Substanzen aus HbN oder HI begünstigt war, konnte im Versuch nicht eindeutig geklärt werden, da die gemessenen Netto-Konzentrationen stets eine Überlagerung von Ausscheidung und Aufnahme darstellten. DCAA war 4-20 mal größer als DFAA. Ein entsprechendes Konzentrationsverhältnis wurde von Keil & Kirchman (1991) im Seewasser gefunden. Die Abbaurate für polymere Verbindungen, wie z.B.

Proteinen, ist 2-10 mal langsamer als die der entsprechenden Monomere (Keil & Kirchman, 1993).

Die Abbauphase unter Stickstoff- und Lichtlimitierung war gekennzeichnet durch die Abnahme von Algenzellzahl und PAA. Die Bakterienzahl reduzierte sich ebenfalls. Die Algen spielten eine weitgehend passive Rolle und heterotrophe Vorgänge bestimmten das System. Auf eine länger andauernde Dunkelphase unter Nährstofflimitierung können einzelne Algenzellen entweder durch die Bildung von Überlebensformen reagieren oder sie sterben ab und unterliegen der Autolyse und dem bakteriellen Abbau (du Preez & Bate, 1992). Es lagen in der Kultur demzufolge gleichzeitig tote, geschwächte und möglicherweise gesunde Algenzellen sowie verschiedene Überlebensformen vor, wobei davon ausgegangen werden konnte, daß der Abbau mit fortschreitender Zeit an Bedeutung zunahm. Die beobachteten Parameter repräsentierten die Summe aller Veränderungen innerhalb dieser Formen.

Während des Abbaus von partikulärem Material wurde innerhalb kurzer Zeit PAA in überwiegend hydrophiles DON umgewandelt. In dieser Phase war die Produktion von gelöstem Material größer als seine Aufnahme. Parallel zu abnehmender Bakterienzahl war ein Anstieg im DON zu beobachten. Die Akkumulation von hydrophilen N-Verbindungen im Medium könnte daraus resultieren, daß die bevorzugte Freisetzung von Aminosäureverbindungen aus dem partikulären Material zu einem vorübergehenden Mangel an Kometaboliten im Medium geführt hatte. In Sinkfallenmaterial wird eine Zunahme des C/N-Verhältnisses mit zunehmender Tiefe beobachtet (Müller et al., 1986). Smith et al. (1992) nehmen als Ursache dafür an, daß der stickstoffreiche PAA-Pool schneller hydrolysiert wird als die kohlenstoffreichen Pools. Sie beobachteten während der ersten Phase des bakteriellen Abbaus von POM eine wesentlich höhere Aktivität von Proteasen als

von Polysaccharidasen und α - und β -Glukosidasen. Die Auflösung von Kohlenhydraten bei fortschreitendem Abbau könnte zu einem erneuten Wachstumspuls der Bakterien und dem Abbau des DON der HI-Fraktion führen. Eine andere Erklärung wäre die abiotische Veränderung von Substanzen, die infolge der Abbaus in die Lösung übergegangen sind. Während die abiotische Kondensation von Monomeren im Seewasser wegen ihrer hohen Abbauraten unwahrscheinlich ist, macht die höhere Konzentration diese Reaktionen z.B. für Peptide oder Proteine wahrscheinlicher. Keil & Kirchmann (1994) beobachteten, daß gelöste Proteine durch künstliche Alterung in Gegenwart von DOM mit fortschreitender Zeit schnell resistenter gegenüber dem bakteriellen Abbau werden. Da sie in Wasser, das frei von organischen Zusätzen war, keinen entsprechenden Prozeß beobachten, führten sie die Bildung von schwerabbaubaren Proteinen auf physikalische Assoziation mit DOM zurück, die, in Analogie zur Adsorption von Proteinen an Oberflächen, ihren bakteriellen Abbau verhindert. Die abiotische Komplexierung von labilen organischen Komponenten könnte somit ganz allgemein einen ersten kritischen Schritt in der Bildung von resistentem organischen Material darstellen, der nicht auf das Medium beschränkt sein muß. Weitere Reaktionen innerhalb der Komplexe könnten zur allmählichen Veränderung der assoziierten Verbindungen und zur Bildung von resistenteren Substanzen führen, die auf molekularem Niveau nicht mehr identifizierbar sind.

In den Wasserproben aus Arktis und Antarktis wurde ein hoher Anteil von DON-HI an Gesamt-DON in der Oberfläche gefunden, der mit der Tiefe abnahm. Außerdem bestand eine stabile Beziehung zwischen dem Ausgangsmaterial (chl a) und den Stickstoffverbindungen der HI-Fraktion. Beide Beobachtungen wären durch den Übergang dieser Substanzen aus dem partikulären Material ins Seewasser während der frühen Phase des Abbaus, verbunden mit einer Akkumulationsphase, erklärbar. Die Abnahme von DON-HI mit der Tiefe und der gleichzeitig

abnehmende AA-Gehalt deuten darauf hin, daß das hydrophile DON in großem Umfang Um- und Abbaureaktionen unterliegt.

Eine Auflösung von stabilen hydrophoben Verbindungen war in der Kultur in der Abbauphase nur in sehr eingeschränktem Maße zu beobachten. Die leicht ansteigende Tendenz in HbA könnte eine Folge der von Brophy & Carlson (1989) beschriebenen Umwandlung von labilen, niedermolekularen in resistenteren, hochmolekulare N-Verbindungen innerhalb des bakteriellen Stoffwechsels sein. Dieser Vorgang konnte sowohl in atlantischem (Carlson et al., 1985) als auch in pazifischem Seewasser (Brophy & Carlson, 1989) nachgewiesen werden. Für einen solchen Mechanismus in Verbindung mit der Bildung von HbA spricht die in der Arktis gefundene signifikante positive Korrelation zwischen Gesamt-DON und DON in HbA. Sie deutet darauf hin, daß die Planktonsituation für die während der ersten Phase der Humifizierung in HbA eingebaute Stickstoffmenge von Bedeutung ist. Der weitere bakterielle Angriff auf dieses relativ "frische" humifizierte Material könnte dann den Stickstoffgehalt verändern.

In DON-HbN und AA-HbN zeigte sich während des Abbaus keine Veränderung. Die hohe und in der Wassersäule konstante Konzentration von aminosäurereichen Verbindungen der HbN-Fraktion in den Feldproben und deren fehlende Beziehung zu chl a und Tiefe wurde auf ihre biologische Stabilität und ihr damit verbundenes Alter zurückgeführt. Diese Ergebnisse könnten mit einer langsamen Bildung von HbN im partikulären Material und einem allmählichem Übergang ins Seewasser bei Auflösung der Zellaggregate erklärt werden. Das partikuläre Material des Kulturversuchs wurde deshalb im Hinblick auf eine Humifizierung untersucht.

70% des anorganischen Stickstoffs wurden in der Wachstumsphase des Phytoplanktons in Aminosäuren eingebaut. Der gleiche Anteil von PON liegt im

suspendierten Material in der euphotischen Zone in Aminosäuren vor (Lee, 1988). 18% des PAA wurden im Versuch abgebaut. Da unter natürlichen Bedingungen 90% der organischen Komponenten des Phytoplanktons abgebaut werden (Ishiwatari, 1992), spiegelten die im Versuch beobachteten Veränderungen nur die erste Phase des Abbaus wieder. Ein Teil der Zellen war nach zweimonatigem Abbau noch intakt und erholte sich unter günstigen Bedingungen relativ schnell. Die Massenbilanz für PAA, TDAA, DON und DIN zeigte, daß in der frühen Phase des Abbaus Aminosäureverbindungen aus dem partikulären Material in Lösung gebracht wurden. Ca. 50% der Abnahme in PAA ließ sich durch eine Zunahme in TDAA erklären. Die in der Bilanz fehlenden Aminosäuren wurden während des Lösungsvorgangs umgewandelt. Dabei entstanden möglicherweise unter anderem bestimmte AA als Zwischenprodukte beim Abbau anderer Aminosäuren, z.B. könnte thr innerhalb des Tricarbonsäurecyclus zu ser abgebaut worden sein. Das könnte den niedrigen Anteil von thr und den gleichzeitig hohen Anteil von ser in TDAA erklären.

Innerhalb der aminosäurehaltigen Verbindungen des partikulären Materials unterlag die Peptidfraktion bevorzugt dem Abbau, während parallel dazu AA durch intrazelluläre Reaktionen in Verbindungen eingebaut wurden, die relativ stabil waren und durch verdünnte Lauge nicht gelöst wurden. Die Konzentration dieses "Rests" im partikulären Material nahm während des Abbaus zu. Gleichzeitig war eine Zunahme von DON und TDAA sichtbar. Am Ende des Versuchs lagen deutlich mehr AA von PAA im "Rest" vor (65 %) als in der MPP-Fraktion (35%). Einer Abnahme in der MPP-Fraktion um 53% stand eine Abnahme von nur 18 % in PAA gegenüber. Es ist anzunehmen, daß ein Teil der Algen während der stationären Phase und der Dunkelphase Überlebensformen gebildet hatte. Möglicherweise war die Zunahme des "Rests" auf Veränderungen in der Zellwand infolge der Sporenbildung zurückzuführen. Monnier et al. (1981) fanden, daß in Zellen mit

hohem Proteingehalt, die nur einen geringen und langsamen Stoffumsatz haben, Umwandlungsreaktionen stattfinden, die zu typischen Browning-Reaktionsprodukten führen. Die Bildung von unlöslichen, relativ stabilen Verbindungen stimmt mit den Ergebnissen von Cronin & Morris (1983) überein, wonach sich aus Diatomeenresten schnell (innerhalb einiger Monate oder weniger) huminstoffähnliche Polymere bilden können.

Die Vorgänge, denen die einzelnen Aminosäuren der Peptidfraktion während des Abbaus unterlagen, waren sehr unterschiedlich. Im frischen partikulären Material waren die Aminosäuren relativ gleichmäßig auf "Rest" und MPP-Fraktion verteilt. Das Aminosäuremuster des "Rests" bis zum 24. Tag unterschied sich signifikant von dem der während des Abbaus gebildeten schwerlöslichen Verbindungen. Der während des Abbaus gebildete Anteil des "Rests" wurde deshalb separat betrachtet und gemeinsam mit der Zunahme in TDAA der Abnahme der Peptidfraktion gegenübergestellt.

Die Konzentrationen aller AA in der MPP-Fraktion nahmen unabhängig vom Ausgangswert während der ersten zwei Monate des Abbaus um ungefähr denselben Betrag ab; lediglich die Abnahme von gly war deutlich höher. Gly scheint eine andere Dynamik als die anderen Aminosäuren zu besitzen. Eventuell ist dieses Phänomen auf seine Größe zurückzuführen. Das kleine gly-Molekül könnte beispielsweise im Rahmen intrazellulärer Reaktionen im Inneren von schwerlöslichen, hydrophoben Polymermolekülen gebunden werden, die an ihrer Oberfläche bevorzugt hydrophobe Moleküle adsorbieren. Die hydrophilen AA, die aus der MPP-Fraktion verschwanden, reicherten sich in der HI-Fraktion des DOM an, die hydrophoben in den Verbindungen des "Rests". Ausnahmen bildeten gly, das trotz seines hydrophilen Charakters gleichmäßig auf TDAA und "Rest" verteilt wurde, sowie thr und die basischen AA (lys, arg, his), die ebenfalls trotz relativ

hoher Polarität zu einem wesentlich höheren Anteil im "Rest" gefunden wurden als in der Lösung. Keil & Kirchman (1993) beobachteten, daß Zucker-Protein-Komplexe langsamer abgebaut wurden als Zucker oder Proteine allein und nahmen an, daß DCAA eine wichtige Rolle bei der Bildung von stabilem DOM spielt, da hier die aktiven N-Zentren für die Komplexbildung der Kohlenhydrate vorhanden sind. Der hohe Anteil der basischen Aminosäuren (arg, his, lys), der innerhalb der intrazellulären Reaktionen in schwerlösliche Verbindungen eingebaut wurde, könnte auf ähnliche Prozesse innerhalb des partikulären Materials hindeuten.

Die Verteilung der AA auf die Fraktionen von partikulärem und gelöstem Material nach Abbau eines großen Teils der Peptide und eines Teils der Proteine beschreibt das Ausgangsmaterial für den weiteren Abbau, der folgendermaßen aussehen könnte: Bei verstärktem Abbau der PAA-Proteine, die unter anderem wichtige Strukturkomponenten sind, werden die Zellwände durchlässiger und die Aminosäuren, die noch in der MPP-Fraktion vorhanden sind (vor allem ala, glu, asp), können zunehmend ungehindert ins Medium übergehen und dort dem bakteriellen Abbau unterliegen oder Ausgangsmaterial für die Huminstoffbildung darstellen. Ein Indiz dafür, daß die während des Abbaus durch intrazelluläre Reaktionen entstandenen Verbindungen bei der Auflösung in die HbN-Fraktion des DOM gelangen könnten, ist die mit fortschreitendem Abbau zunehmende Übereinstimmung zwischen dem Aminosäureverteilungsmusters dieser neugebildeten Verbindungen und dem der Substanzen der HbN-Fraktion der Feldproben.

6.2 Rolle des Stickstoffs im natürlichen System polarer Meere

Die Grönlandsee und der antarktische Ozean sind Regionen in denen Tiefenwasserbildung stattfindet (Aargaard et al., 1985; Rudels, 1987), durch die in der euphotischen Zone gebildetes Material in tiefere Schichten verfrachtet werden kann. Beide Gebiete sind kaum terrigenen und anthropogenen Einflüssen ausgesetzt. Der polare Ozean ist im wesentlichen eisbedeckt und zeigt so eine geringe Primärproduktion, während die Eisrandgebiete in der Grönlandsee Zonen erhöhter Produktion sind (Smith et al., 1985; Spies et al., 1988; Smith & Kattner, 1989). Allerdings sind durch die Dichtestratifizierung innerhalb der Wassersäule Austauschvorgänge behindert, wodurch es relativ schnell zu einer Stickstofflimitierung des Phytoplanktonwachstums kommt. In den antarktischen Gewässern sind Nährsalze normalerweise im Überschuß vorhanden, so daß die Nährsalzabnahme im allgemeinen keinen limitierenden Faktor für die Primärproduktion darstellt. Dennoch wurden in beiden Gebieten sehr ähnliche Mittelwerte für DON gefunden. Während allerdings in der Arktis an fast allen Stationen ein Konzentrationsgradient von DON zwischen der Oberfläche und den tieferen Schichten zu beobachten war und eine signifikante inverse Korrelation zwischen DON und DIN bestand, konnte entsprechendes in der Antarktis nur an einer Station beobachtet werden, an der niedrige Nitrat- und hohe chl a-Werte an der Oberfläche auf erhöhte Phytoplanktonaktivität hindeuteten. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug für diese Station -4,6, für die Proben aus der Arktis -3,6. Da Ammonium und Nitrit nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden waren, hätte die Betrachtung von Nitrat, anstelle von DIN, zum gleichen Ergebnis geführt. Eine ähnliche Steigung der Regressionsgeraden (-4) fanden Maita & Yanada (1990) zwischen DON und Nitrat bei einer Serie von Proben, die aus subtropischen bis subarktischen Breiten (24° – 49°) stammten. Ihre Proben decken, mit DON-Werten von 1-10 $\mu\text{M N}$ und Nitrat-Werten von 1-40 $\mu\text{M N}$,

wesentlich größere Bereiche ab. Die Ähnlichkeit der Steigung ist insoweit interessant, da meine Proben aus wesentlich höheren Breiten mit Wassertemperaturen unter 0°C für nahezu alle Wassertiefen stammten und somit mit großer Wahrscheinlichkeit anderen Bedingungen bezüglich der biologischen Aktivität ausgesetzt waren.

Detailliertere Information über die Rolle und Verteilung von DON konnte durch die Fraktionierung mit XAD-2 erhalten werden. Die Adsorption von organischem Material aus wässriger Lösung an diesem Harz erfolgt vor allem aufgrund hydrophober Bindungskräfte (Mantoura & Riley, 1975). Der hydrophobe Anteil der Moleküle wird selektiv an der Polystyren-Oberfläche adsorbiert, während die funktionellen Gruppen in Richtung der wässrigen Lösung orientiert sind (Zaika, 1970). Bei niedrigen pH-Werten werden schwache, organische Säuren protoniert und am Harz adsorbiert, während sie bei hohem pH-Wert ionisiert und desorbiert werden. Das Adsorptionsverhalten von nicht ionisierbaren Verbindungen wird durch den pH-Wert nicht in vergleichbarem Maße verändert. Daher wird ein Teil der hydrophoben, adsorbierten Verbindungen mit basischen Elutionsmitteln nicht desorbiert.

Da ein Großteil der Verbindungen, die in lebenden Organismen vorkommen, hydrophoben Charakter hat und am Harz adsorbiert wird (Ishiwatari, 1992), werden in den hydrophoben Fraktionen möglicherweise gemeinsam mit den Huminstoffen auch Nicht-Huminstoffe eluiert. Es führt also nicht zu einer eindeutigen Charakterisierung, wenn die Substanzen der hydrophoben XAD-Fractionen generell als Huminstoffe bezeichnet werden. Aiken et al. (1988) schlugen zur Klärung der konfusen Situation die Definition der marinen Huminstoffe auf der Basis der für ihre Isolation verwendeten Extraktionsmethoden vor. Es ist jedoch schwierig, ein einheitliches Kriterium für eine solche "verfahrensmäßige" Definition

zu finden, da unterschiedliche Methoden für die Elution verwendet werden und Konzentration und Zusammensetzung der Fraktionen durch das Verfahren bestimmt werden. Zum Beispiel untersuchten Mantoura & Riley (1975) die Effizienz von Methanol für die Desorption von Huminstoffen, ohne auf einen möglicherweise nicht-huminischen Charakter der eluierten Verbindungen einzugehen, während Stuermer & Harvey (1977) mit NH_4OH -Lösung und Ethanol eluierten und zwischen Huminstofffraktion und alkohollöslicher Fraktion unterschieden. Wenn der Begriff der Huminstoffe einerseits mit dem Konzept der gegenüber bakteriellem Abbau resistenten Verbindungen gleichgesetzt wird, und andererseits nur die Komponenten der baselöslichen Fraktion als Huminstoffe bezeichnet werden, so fallen alle in der alkohollöslichen Fraktion enthaltenen biologisch stabilen Substanzen aus der Bilanzierung heraus. Dies könnte zu einer beachtlichen Unterschätzung des resistenten Anteils des DOM führen. Das Ausmaß und die Zeitspanne, in denen die Substanzen der baselöslichen und alkohollöslichen Fraktionen innerhalb des Kreislaufs von organischem Material in den Ozeanen biologisch labil oder stabil sind, ist nicht geklärt.

Der Anteil der hydrophoben Fraktionen am DON war mit 44% in der Arktis und 35% in der Antarktis relativ konstant. DON-HbA war in beiden Regionen nahezu gleich, ebenso sein Anteil am DON (ungefähr 20%). DON-HbN war im Mittel in der Antarktis niedriger als in der Arktis, ebenso unterschied sich der relative Beitrag dieser Fraktion zum DON. Da keine Beziehung zu anderen Parametern, wie Tiefe, Temperatur und Salzgehalt gefunden wurde, kann daraus geschlossen werden, daß die hydrophoben Fraktionen relativ einheitlich in der Wassersäule verteilt sind. Das konstante Auftreten der DON-Fraktionen steht im Einklang mit der Hypothese einer inerten DOM-Fraktion, die an der Oberfläche gemeinsam mit einer labilen Fraktion existiert, während in tieferen Schichten die stabilen Komponenten dominieren (Williams & Druffel, 1987; Benner et al., 1992). Auf der Basis von Daten,

die sie innerhalb von 16 Jahren von verschiedenen Stationen im Pazifischen Ozean erhielten, vermuten Jackson & Williams (1985), daß eine schwer abbaubare, gelöste organische Komponente homogen im Ozean verteilt ist. Sie wäre verantwortlich für eine DON-"Background"-Konzentration von $1,3 \mu\text{M N}$, die 30% des DON der Tiefsee ausmacht. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß in dem Kulturversuch, der mit Tiefenwasser und Brauneis angesetzt wurde, die Minimalkonzentration von $1,2 \mu\text{M N}$ in den hydrophoben Fraktionen nie unterschritten wurde.

Aus der Beziehung zwischen DON, das sowohl frisches Ausgangsmaterial als auch Huminstoffe enthält, und dem DON der Huminstofffraktionen wurden Hinweise auf die Dynamik der Humifizierungsprozesse erwartet. Da die Expeditionen ARK VIII/1 und ANT X/ 1b im Sommer stattfanden, konnte mit einem erhöhten Eintrag von Ausgangsmaterial für die Huminstoffbildung gerechnet werden. Hinsichtlich ihrer Beziehung zu DON erwies sich die getrennte Betrachtung von HbA und HbN als sinnvoll: Für keines der beiden Gebiete wurde eine signifikante Korrelation zwischen DON und der Summe des DON der hydrophoben Fraktionen gefunden. Dieses Ergebnis war insofern zu erwarten, als grundsätzlich das DON in humifiziertem Material älter sein sollte, als das von Algen und Bakterien frisch produzierte. Im Unterschied zur Antarktis, wo auch bei getrennter Betrachtung der beiden hydrophoben Fraktionen keine Korrelation mit DON sichtbar war, bestand aber in der Arktis eine signifikante Korrelation zwischen DON und DON-HbA. Hedges (1988) nimmt an, daß in Seewasser Fulvinsäuren Zwischenprodukte bei der Huminsäurebildung darstellen können. Das könnte bedeuten, daß die in HbA enthaltenen Fulvinsäuren in engerer Beziehung zum Quellenmaterial stehen und deshalb noch dort auftretende Konzentrationsschwankungen reflektieren. Möglicherweise hängt die Beziehung zwischen DON in Seewasser und DON in den hydrophoben Fraktionen vom Entwicklungszustand der Phytoplankton- und

Bakterienpopulationen ab. Im Kulturversuch war nach zweimonatigem Abbau noch keine Huminstoffbildung in größerem Umfang im Medium sichtbar. Poutanen & Morris (1983) beobachteten die Bildung von sehr instabilen, huminstoffähnlichen Verbindungen innerhalb weniger Tage nach Beginn des anoxischen Abbaus von Algenresten, während Cronin & Morris (1982) bei Abbauxperimenten eine Bildung von hochmolekularen Huminstoffen innerhalb von 1-2 Monaten oder weniger nachweisen konnten.

Der mittlere prozentuale Anteil der Aminosäuren an DON in den unfraktionierten Seewasserproben aus beiden Regionen betrug ca. 11%. Trotz des insgesamt relativ niedrigen Anteils von TDAA am DON zeigte TDAA in beiden Regionen signifikante Korrelationen mit DON; das gleiche gilt auch bei gemeinsamer Betrachtung der Daten aus beiden Gebieten. Diese Beobachtung deckt sich mit der signifikanten Korrelation zwischen TDAA und chl a, die für beide Regionen beobachtet wurde. Im Unterschied dazu korrelierte die Summe von AA-HbA und AA-HbN in beiden Regionen nicht mit chl a und war nahezu konstant über die Wassersäule verteilt. Die große Streuung der Werte von TDAA bei niedrigen chl a-Konzentrationen läßt vermuten, daß Prozesse wie "Grazing" und die bakterielle Aktivität, die zur Umwandlungen innerhalb des partikulären und gelösten Materials führen, von Bedeutung waren. An der Oberfläche wurden rund 60% der Aminosäuren, in tieferen Schichten (>1000m) fast 100% der Aminosäuren in den Huminstofffraktionen gefunden. Die mittlere Aminosäurekonzentration bei den tiefen Stationen betrug 190 nM N. Dieser Wert entspricht in etwa dem Wert der hydrophoben Fraktionen, wenn über alle Tiefen und Stationen gemittelt wird (Arktis: 233 nM N; Antarktis: 246 nM N). Es kann demzufolge angenommen werden, daß eine relativ konstante Menge an Aminosäuren, die in hydrophobe, schwer abbaubare Substanzen eingebunden sind, homogen in der Wassersäule verteilt ist und eine "Background"-Konzentration darstellt. Der Mittelwert von AA-HbN war mit

200 nM N ungefähr fünfmal so groß wie der Mittelwert von AA-HbA, der 40 nM N betrug. Der "Backgroundwert" für die Aminosäurekonzentration der hydrophoben Fraktionen stimmt numerisch mit der Minimalkonzentration der Aminosäuren in den hydrophoben Fraktionen im Kulturversuch überein. Im Gegensatz zu den Hb-Fraktionen steht die HI-Fraktion vermutlich in direkter Beziehung zum frisch erzeugten, organischen Material und reagiert deshalb unmittelbar auf erhöhte Phytoplanktonaktivität. Diese Annahme wird durch die nahezu ausschließliche Akkumulation von hydrophilem DON während des Abbaus im Kulturversuch unterstützt.

Die in der Literatur angegebenen Werte für den Aminostickstoffanteil am DON der verschiedenen Huminstofffraktionen erstrecken sich über einen großen Bereich: Gagosian und Stuermer (1977) fanden nur 1,2% AA-N im DON von marinen Fulvinsäuren und nahmen deshalb an, daß der größte Anteil des organischen Stickstoffs möglicherweise in polyfunktionellen Aminen oder heterocyclischen Verbindungen vorlag. Im Unterschied dazu fand Thurman (1985), daß Aminosäuren mit 15% und 20% am Stickstoff der aquatischen Fulvin- bzw. Huminsäuren beteiligt waren, während nach McKnight et al. (1985) 16% vom DON der Fulvinsäuren von Thoreau's Moor Aminosäurestickstoff war.

In HbA machten die AA rund 7% vom DON aus. Zwischen AA-HbA und DON-HbA wurde keine signifikante Korrelation beobachtet. Die HbN-Fraktion zeigte den höchsten AA-Anteil der Fraktionen an DON, wobei die signifikante Korrelation zwischen DON-HbN und AA-HbN auf ein relativ konstantes Verhältnis von Aminostickstoff zu "Nicht"-Aminostickstoff in dieser Fraktion hindeutet. Dies widerspricht der Behauptung von Harvey et al. (1983), daß die in marinen Huminstoffen enthaltenen N-Gruppen keine festen Bestandteile einer Grundstruktur sind, sondern eher zufällig und an der Peripherie der eigentlichen Huminstoff-

Struktur gebunden auftreten. Ebenso wenig stehen die Ergebnisse von Harvey & Boran (1985), die in marinen Huminstoffen überhaupt keinen Stickstoff in Form von hydrolytisch abspaltbaren Aminosäuren fanden, mit meinen Daten in Einklang.

Das Aminosäurespektrum des partikulären Materials war im Mittel für beide polaren Gebiete nahezu identisch. Da ein Großteil der Proben aus den oberen Wasserschichten stammte, wurde das partikuläre Material wahrscheinlich von cytoplasmatischen Substanzen dominiert, deren Zusammensetzung nicht zellspezifisch ist und speziesspezifische Charakteristika in der Aminosäurezusammensetzung der Zellwände maskiert (Müller et al., 1986; Lee, 1988). Gly, asp, glu, ala, ser machten rund 50% der PAA aus. Dieselben Aminosäuren dominierten mit 70-80% im filtrierten Seewasser und in den hydrophoben Fraktionen. Das Aminosäuremuster des Seewassers stimmte in der Arktis und der Antarktis ebenfalls weitgehend überein. Der Anteil von gly, ala und ser war in der Antarktis höher als in der Arktis, wo asp einen relativ hohen Anteil zu den AA beitrug. Beim Vergleich des Aminosäurespektrums von partikulärem und gelöstem organischen Material fiel die relative Verarmung der gelösten Phase an unpolaren Aminosäuren auf. Darüberhinaus unterschieden sich der gly-Anteile in PAA und TDAA sehr stark: Während gly in PAA 8 Mol% ausmachte, war es mit rund 27 Mol% in TDAA und besonders in HbN stark angereichert, wo im Mittel 45 Mol% gly für die Arktis und 33 Mol% gly für die Antarktis gefunden wurden.

Obwohl die alkohollösliche Fraktion einen signifikanten Teil des DOM im Seewasser ausmacht (Stuermer & Harvey, 1977) ist wenig über ihre chemischen Eigenschaften bekannt. Die hier vorgestellten Untersuchungen liefern die ersten Daten über ihre Aminosäurezusammensetzung. In der baselöslichen Fraktion wird ein relativ hoher Anteil von gly an den Aminosäuren auch von verschiedenen anderen Autoren gefunden: Gagosian & Stuermer (1977) fanden ca. 30% gly in

Fulvinsäuren, die sie aus Oberflächenwasser der Sargasso See isoliert hatten. In Fulvinsäuren vom Thoreau's Moor (McKnight et al., 1985) waren gly, glu und asp die häufigsten Aminosäuren. Thurmann (1985) fand in Huminstoffen, die aus Süßwasser isoliert waren, gly, asp, glu und ala mit einem Anteil von 40 bis 65% als häufigste Aminosäuren. Malcolm (1990) isolierte Huminstoffe aus Boden, Fluß- und Meerwasser und fand, daß gly, glu, asp und ala 50 Mol% ausmachten, wobei gly mit 22 Mol% den höchsten Anteil am TDAA der marinen Fulvinsäuren stellte. Auch in den Fulvinsäuren aus einem hypersalinen See in der Antarktis war gly mit einem Anteil von 37% in den Fulvinsäuren, gefolgt von asp, glu und ala, die häufigste Aminosäure (McKnight et al., 1991).

Der hohe Anteil von Aminosäuren in den Huminstofffraktionen und besonders in HbN, deuten darauf hin, daß die Aminosäuren im Meer Bestandteile schwer abbaubarer Moleküle darstellen können. Möglicherweise gibt die Veränderung des Aminosäuremusters von DOM und POM mit der Tiefe, sowie die Anreicherung einzelner Aminosäuren in bestimmten Fraktionen von DOM oder POM Hinweise auf die Bildungsmechanismen dieser Substanzen. Gly scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Verbindung zu sein, deren Betrachtung das Verständnis dieser Mechanismen vorantreiben könnte.

Die traditionellen Hypothesen zur Bildung von Huminstoffen in der Wassersäule scheinen keine realistischen Reaktionswege für den Einbau von Stickstoffgruppen zu liefern. Das Modell von Harvey et al. (1983), daß auf der Verknüpfung innerhalb ungesättigter Fettsäuren beruht, betrachtet die eingebauten Stickstofffunktionen nicht als Bestandteile der Grundstruktur und die Melanoidin-Hypothese (Maillard-Reaktion) ist angesichts der niedrigen Konzentrationen von Zuckern und AA in Seewasser unwahrscheinlich (Hedges, 1978). Das Modell von Ishiwatari (1992) zur Bildung von Huminstoffen könnte eine plausible Erklärung für meine

Ergebnisse darstellen. Nach dieser Hypothese werden Huminstoffe von den im Abbau befindlichen Zellen ins Wasser abgegeben. Während der bakteriellen Zersetzung des Phytoplanktons würden Maillard-Reaktionen zwischen stabilen Biopolymeren, teilweise abgebauten Biopolymeren und neu gebildeten Molekülen stattfinden und zur Bildung von Huminstoffen führen. Da Proteine und Kohlenhydrate die Hauptkomponenten von Phytoplankton und Bakterien sind, sollten die Huminstoffe, die in diesem frühen Stadium des Abbaus des POM gebildet werden, überwiegend die Zusammensetzung des Quellenmaterials reflektieren. Dieser Mechanismus könnte die signifikanten Mengen von AA in den Huminstoffextrakten erklären. Jedoch scheint die beobachtete Diskrepanz zwischen dem prozentualen Anteil von gly in DOM und besonders in HbN und dem Anteil in Gesamt-POM diese Annahme zunächst zu relativieren. Burdige & Martens (1988) nehmen an, daß Unterschiede in der Löslichkeit, im Metabolismus und bei der Humifizierung von Proteinen den Anstieg von gly mit der Tiefe im Sediment verursachen. Eine Zunahme des relativen Anteils von gly im in der Wassersäule suspendierten POM mit der Tiefe würde mit diesem Mechanismus übereinstimmen und wurde auch in meinen Untersuchungen beobachtet. Unterschiedliche Geschwindigkeiten, mit denen bestimmte AA vom organischen Material abgespalten werden, wären für ihre selektive Erhaltung oder den Verbrauch verantwortlich. Entsprechendes wurde von verschiedenen Autoren für POM in Sedimenten oder in Sedimentfallen beobachtet (Siezen & Mague, 1978; Lee & Cronin, 1984; Lee 1988; Burdige & Martens, 1988; Cowie et al., 1992). Die Remineralisierung und der Abbau von POM scheint zu einer relativen Anreicherung von strukturellen Komponenten (Diatomeenzellwänden, Chitin) in Kotballen und anderen großen Aggregaten zu führen (Müller et al., 1986). Da strukturelle Einheiten (z.B. Zellwände) stabiler gegenüber Remineralisierung und Digestion im Oberflächenwasser sein sollten, sollte das Fallenmaterial eher die Zusammensetzung der Strukturkomponenten aufweisen, als die des

Ausgangsmaterials. Gly, ser und thr sind die einzigen AA, die in den Diatomeenzellwänden verglichen mit dem Zellinhalt signifikant angereichert sind (Hecky et al., 1973; Degens, 1976). Carter & Mitterer (1978) fanden, daß die Aminosäurezusammensetzung des organischen Materials und der Huminstoffe von Nichtcarbonatsedimenten von gly und ala dominiert wird, während in Carbonatsedimenten asp und glu vorherrschen. Hecky et al. (1973) schlugen vor, daß die selektive Erhaltung von gly in POM durch die Anwesenheit von Protein-Silicium-Komplexen in der Zellwand der Diatomeen zustande kommt. Cowie et al. (1992) beobachteten mit zunehmender Tiefe in Fallenmaterial und Sediment neben einer besonders hohen Zunahme des gly-Anteils, eine Zunahme von ser und eine Abnahme von glu und lys. Sie führten diese Ergebnisse ebenfalls auf einen selektiven Abbau innerhalb der Aminosäuren zurück.

Während diese Ergebnisse für die Humifizierung von organischem Material im Sediment wichtig sein mögen, ist unklar, wie ein ähnlicher Mechanismus für die Bildung von Huminstoffen in den oberen Wasserschichten der offenen Ozeane und für die Anreicherung von gly verantwortlich sein könnte. Wenn die Proteine, die mit der Zellwand assoziiert sind, in gewissem Ausmaß gegenüber einem Abbau resistenter sind, dann könnte der größte Teil des gly in Seewasser cytoplasmatischen Ursprungs sein.

In den Huminstofffraktionen war, verglichen mit dem Seewasser und dem partikulären Material, ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils von gly zu beobachten. Die Proben aus der Arktis zeigten nicht nur eine Anreicherung von gly in den hydrophoben Fraktionen, sondern auch eine Anreicherung von asp in der hydrophilen Fraktion. Die Konzentration von asp in Seewasser stieg deutlich mit zunehmendem chl a an, während die Konzentration von gly nicht von chl a abhängig war. Carter & Mitterer (1978) fraktionierten die aus marinen Sedimenten

extrahierbaren Huminstoffe mit Ultrafiltration und fanden einen ansteigenden Gehalt von sauren AA mit abnehmendem Molekulargewicht. Piper und Posner (1968) fanden an einer Huminsäure aus dem Boden, daß asp in der Fraktion mit niedrigem Molekulargewicht ungefähr doppelt so häufig war wie in der Fraktion mit hohem Molekulargewicht. Wenn diese Ergebnisse auch nicht direkt auf gelöste, marine Huminstoffe übertragen werden können, so würde, wenn man annimmt, daß die hydrophoben Fraktionen ein höheres mittleres Molekulargewicht haben als die hydrophile Fraktion, die Anreicherung von asp in letzterer mit diesen Trends übereinstimmen. Die Umwandlung von großen, unlöslicheren Proteinmolekülen in kleinere, geschieht über die Hydrolyse von Peptidbindungen. Die Peptidbindungen von asp sind leichter zu hydrolysieren als die der meisten anderen AA (Partidge & David, 1950; Schulz et al., 1962; Carter & Mitterer, 1978). Deshalb könnten Unterschiede in der heterotrophen Aktivität die Unterschiede der Verteilung von asp in Arktis und Antarktis verursacht haben. Diese Beobachtung stimmt mit dem anhand der Feldproben postulierten, labileren Charakter der HI-Fraktion überein.

Ein Mechanismus, der das Modell von Ishiwatari (1991) und die postulierte selektive Erhaltung von Strukturbio Polymeren in POM verbinden könnte, ist die ungekoppelte, enzymatische Auflösung des POM. Smith et al. (1992) schlugen vor, daß die enzymatische Hydrolyse einen Mechanismus darstellt, über den große Mengen von organischem Material aus absinkenden Partikeln und Aggregaten in die gelöste Phase gelangen können. Sie fanden bei Versuchen mit "marine snow", daß Aggregate im Oberflächenwasser dicht mit Bakterien besiedelt sind, daß die Enzymaktivität hoch ist, und daß der Kohlenstoffbedarf der gebundenen Bakterien so klein ist, daß >97% der Hydrolyseprodukte ins umgebende Wasser abgegeben werden. Es wurde postuliert, daß Aggregate, die mit Hydrolasen durchdrungen werden, Medien darstellen in denen die Produktion von langsam abbaubarem DOM stattfindet. Biogene Aggregate werden möglicherweise von Mischungen von

Strukturbiopolymeren dominiert (z.B. Proteine, Mucopolysaccharide, Chitin und Zellwandpolymere). Sollten durch den hydrolytischen Angriff auf die Partikel, z.B. durch Endohydrolasen, sub-micrometer große Partikel freigesetzt werden, könnten diese zu den etwa 10% des POM gehören, die durch die normalen Filtrationsprozesse nicht zurückgehalten werden und bei der Bilanzierung in DOM eingehen (Smith et al., 1992). Diese Autoren nehmen an, daß in der unmittelbaren Umgebung der Aggregate Kondensationsreaktionen begünstigt sind, wie z.B. die Glukosylierung von Proteinen, die langsam abbaubares DOM produzieren, was mit dem Modell von Ishiwatari (1992) übereinstimmt. Yamamoto & Ishiwatari (1989) fanden bei der Reaktion von Casein mit Glukose, die sie als Modell für die molekulare Verteilung bei der Bildung von Melanoidinpolymeren benutzten, erstens eine schnelle Bildung von unlöslichen Polymeren und zweitens eine Veränderung der Aminosäurezusammensetzung der Fulvinsäure, Huminsäure und huminähnlichen Fraktionen im Laufe der Reaktion, die zur Dominanz der hydrophilen Aminosäuren in der Fulvinsäurefraktion und zur Dominanz der hydrophoben Aminosäuren in der schwerlöslichen Huminstofffraktion führten.

Außerdem könnten andere Mechanismen zur Bildung von schwer abbaubaren AA-haltigen Molekülen führen. Beispiele sind die von Brophy und Carlson (1989) beschriebene Umwandlung von labilen niedermolekularen Verbindungen in resistente hochmolekulare Substanzen innerhalb des bakteriellen Stoffwechsels oder die von Keil und Kirchman (1994) diskutierte abiotische Komplexierung von Proteinen und anderen labilen Polymeren durch vorhandenes DOM, die ebenfalls zur Bildung stabiler Verbindungen führen kann. Die meisten der diskutierten Mechanismen können unter natürlichen Bedingungen gleichzeitig ablaufen, wobei einige während bestimmter Phasen der Planktonentwicklung und Humifizierung dominieren können.

7 Literaturverzeichnis

- Aargaard, K., Swift, J.H., Carmack, E.C. 1985. Thermohaline circulation in the Arctic Mediterranean Seas. *J. Geophys. Res.* 90 4833-4846.
- Aiken, G.R. 1988. A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances. In: Frimmel, F. H., Christman, R.F. *Humic Substances and their Role in the Environment*. J. Wiley, Chichester, 15-28.
- Amador, J.A., Milne, P.J., Moore, C.A., Zika, R.G. 1990. Extraction of chromophoric humic substances from seawater. *Mar.Chem.* 29 1-17.
- Amano, M., Hara, S., Taga, N. 1982. Utilization of dissolved amino acids in seawater by marine bacteria. *Mar. Biol.* 68 31-36.
- Angel, M. V. 1984. Detrital organic fluxes through pelagic ecosystems. In: Fasham, M. J. R. *Flow of Energy and Materials in Marine Ecosystems: Theory and Practice*. Plenum Press, New York, N.Y., 475-516.
- Antia, N. J., Harrison, P.J., Oliveira, L. 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* 30 (1) 1-89.
- Armstrong, F.A.J., Streamers, C.R., Strickland, J.D.H. 1967. The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of a Technicon Autoanalyzer and associated equipment. *Deep Sea Res.* 14 381-389.
- 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.
- Azam, F., Cho, B.C. 1987. Bacterial utilization of organic matter in the sea. In: *Ecology of microbial communities*. Cambridge University Press, 261-281.
- Azam, F., Smith, D.C. 1991. Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view. In: Demers, S. *Particle analysis in oceanography*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 213-235.
- Barber, R.T., 1968. Dissolved organic carbon from deep waters resists microbial oxidation. *Nature* 220 274-275.
- Beinert, W.D., Meisner, A., Fuchs, M., Riedel, E., Lüpke, M., Brückner, H. 1992. OPA oder FMOC? *GI T Fachzeitschrift für das Laboratorium* 10 1018-1027.
- Benner, R., Pakulski, J.D., McCarthy, M., Hedges, J.I., Hatcher, P.G. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* 255 1561-1564.
- Bensadoun, A., Weinstein, D. 1976. Assay of protein in the presence of interfering materials. *Anal.Biochem.* 70 241-250.

- Betnér, I., Földi, P. 1988. The FMOC-ADAM approach to amino acid analysis. *LC GC International* 2 (3) 47-53.
- Bjornsen, P. K. 1988. Phytoplankton exudation of organic matter: Why do healthy cells do it? *Limnol.Oceanogr.* 33 (1) 151-154.
- Brockmann, U. H., Ittekkot, V., Kattner, G., Eberlein, K., Hammer, K.D. 1983. Release of dissolved organic substances in the course of a phytoplankton bloom. In: Sündermann/Lenz North Sea Dynamics. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 530-548.
- Brophy, J. E., Carlson, D.J. 1989. Production of biologically refractory dissolved organic carbon by natural seawater microbial populations. *Deep Sea Res.* 36 (4) 497-507.
- Burdige, D.J., Martens, C.S. 1988. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin: 10. The role of amino acids in sedimentary carbon and nitrogen cycling. *Geochim.Cosmochim.Acta* 52 1571-1584.
- Carlson, D.J., Mayer, L.M., Brann, M.L., Mague, T.H. 1985. Binding of monomeric organic compounds to macromolecular dissolved organic matter in seawater. *Mar.Chem.* 16 141-153.
- Carter, P.W., Mitterer, R.M. 1978. Amino acid composition of organic matter associated with carbonate and non-carbonate sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42 1231-1238.
- Cauwet, G. 1978. Organic chemistry of sea water particulates. Concepts and developments. *Oceanol. Acta* 1 (1) 99-105.
- Cauwet, G. 1981. Non-Living Particulate Matter. In: Duursma, E. K., Dawson, R. Marine Chemistry Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Oxford - New York, 71-89.
- Clayton, J. R., Dortch, Q., Thoresen, S.S., Ahmed, S.I. 1988. Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton samples. *J. of Plankton Research* 10 (3) 341-358.
- Coffin, R.B. 1989. Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters. *Limnol.Oceanogr.* 34 (3) 531-542.
- Cronin, J.R., Morris, R.J. 1983. Rapid formation of humic material from diatom debris. Part A. In: Suess, E., Thiede, J. Coastal Upwelling: its sediment record. Plenum Press, New York, 485-496.
- Dawson, R., Duursma, E.K. 1981. State of the Art. In: Duursma, E.K., Dawson, R. Marine Organic Chemistry Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Oxford - New York 497-512.

- Cowie, G.L., Hedges, J.I., Calvert, S.E. 1992. Sources and relative reactivities of amino acids, neutral sugars, and lignin in an intermittently anoxic environment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 1963-1978.
- De Haan, H., de Boer, T. 1979. A study of the possible interactions between fulvic acids, amino acids and carbohydrates from Tjeukemeer, based on gel filtration at pH 7.0. *Arch. Hydrobiol.* 85 30-40.
- Degens, E.T. 1970. Molecular nature of nitrogenous compounds in sea water and recent marine sediments. In: Hood, D. W. *Organic Matter in Natural Waters*. Inst. Mar. Sci., Occ. Publ., Alaska, 77-106.
- Degens, E.T., 1976. Molecular mechanisms on carbonate, phosphate, and silica deposition in the living cell. *Topics in Current Chemistry*. 64 1-112.
- Eriksson, K.-O. 1989. The hydrophobic interaction chromatography. The hydrophobicity of amino acids and proteins. In: Janson, J.-C., Rydén, L. *Protein Purification*. VCH Publishers, Inc., Weinheim, 208-214.
- Flynn, K. J., Syrett, P.J. 1985. Development of the ability to take up L-lysine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology* 90 151-158.
- Flynn, K. J., Butler, I. 1986. Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34 281-304.
- Fogg, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* 26 3-14.
- Fowler, S.W., Knauer, G.A. 1986. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. *Prog. Oceanogr.* 16 147-194.
- Fox, L.E. 1981. *The geochemistry of humic acid and iron during estuarine mixing*. Univ. Delaware, Newark, De.
- Fu, T., Pocklington, R. 1983. Quantitative adsorption of organic matter from seawater on solid matrices. *Mar. Chem.* 13 255-264.
- Fuhrman, J. 1990. Dissolved free amino acid cycling in an estuarine outflow plume. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 66 197-203.
- Gagosian, R.B., Stuermer, D.H. 1977. The cycling of biogenic compounds and their diagenetically transformed products in seawater. *Mar. Chem.* 5 605-632.
- Gagosian, R.B., Lee, C. 1981. Processes controlling the distribution of biogenic organic compounds in seawater. In: Duursma, E.K., Dawson, R. *Marine Organic Chemistry* Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Oxford - New York, 91-123.
- Gocke, K. 1977. Comparison of methods for determining the turnover times of dissolved organic compounds. *Mar. Biol.* 42 131-141.

- Gray, J.S., Field, J.G., Azam, F., Fenchel, T., Meyer-Reil, L.A., Thingstad, F. 1984. The role of free bacteria and bacterivory. In: Fasham, M. J. R. *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems: Theory and Practice*. Plenum Press, New York, N.Y., 707-723.
- Harvey, G.R., Boran, D.A., Chesal, L.A. & Tokar, J.M. 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Mar.Chem.* 12 119-132.
- Harvey, R.H., Boran, D.A. 1985. Geochemistry of humic substances in seawater. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. *Humic substances in soil, sediment and water*. Wiley, Chichester, 233-247.
- Hecky, R.E., Mopper, K., Kilham, P., Degens, E.T. 1973. The Amino Acid and Sugar Composition of Diatom Cell-Walls. *Mar. Biol.* 19 323-331.
- Hedges, J.I. 1978. The formation of clay mineral reactions of melanoidins. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42 69-76.
- Hedges, J.I., Hare, P.E. 1987. Amino acid adsorption by clay minerals in distilled water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51 255-259.
- Hedges, J.I. 1988. Polymerization of humic substances in natural environments. In: Frimmel, F.H., Christman, R.F. *Humic Substances and their Role in the Environment*. J. Wiley & Sons, Chichester, 45-58.
- Hellebust, J.A. 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 10 192-206.
- Hitchcock, G. L. 1986. Methodological aspects of time-course measurements of ¹⁴C fixation in marine phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 95 233-243.
- Hunt, J.M. 1972. Distribution of carbon in the crust of the earth. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin* 56 2273-2277.
- Ishiwatari, R., Morinaga, S., Yamamoto, S., Machihara, T. 1991. Characteristics of kerogens from recent marine and lacustrine sediments: GC/MS analysis of alkaline permanganate oxidation products. *J. Southeast Asian Earth Sci.* 5 53-60.
- Ishiwatari, R. 1992. Macromolecular material (humic substance) in the water column and sediments. *Mar.Chem.* 39 151-166.
- Itturriaga, R., Hoppe, H.-G. 1977. Observations of heterotrophic activity on photoassimilated matter. *Mar.Biol.* 40 101-108.
- Jackson, G.A., Williams, P.M. 1985. Importance of dissolved organic nitrogen and phosphorus to biological nutrient cycling. *Deep Sea Res.* 32 (2) 223-235.
- Kattner, G., Becker, H. 1991. Nutrients and organic nitrogenous compounds in the marginal ice zone of the Fram Strait. *J.Mar.Syst.* 2 385-394.

- Keil, R. G., Kirchman, D.L. 1991. Contribution of dissolved free amino acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73 1-10.
- Keil, R.G., Hirschman, D.L. 1993. Dissolved combined amino acids in marine waters: chemical form and utilization by heterotrophic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 38 (6) 1256-1270.
- Keil, R.G., Kirchman, D.L. 1994. Abiotic transformation of labile protein to refractory protein in sea water. *Mar.Chem.* 45 187-196.
- Kirchman, D. L., Keil, R.G., Wheeler, P.A. 1989. The effect of amino acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the subarctic Pacific. *Deep-Sea Research* 36 (11) 1763-1776.
- Koroleff, F. 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Coun. Meet. Int. Coun. Explor. Sea C. M.- ICES* 9
- Koroleff, F. 1977. Simultaneous persulphate oxidation of phosphorous and nitrogen compounds in water. In: Grasshoff, K., Kremling, K., Erhardt, M., Osterroth, C. *Report Baltic Intercal. Workshop, Annex. Compiler Kiel*, 29-31.
- Koroleff, F. 1983. Total and organic nitrogen. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. *Methods of Seawater Analysis* Verlag Chemie, Weinheim, 162-173.
- Kukkonen, J., McCarthy, J.F., Oikari, A. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19 551-557.
- Lara, R.J., Hubberten, U., Kattner, G. 1993. Contribution of humic substances to the dissolved nitrogen pool in the Greenland Sea. *Mar.Chem.* 41 327-336.
- Lara, R.J., Kattner, G. 1994. Humic substances in the nitrogen cycle of polar waters. A comparison between Arctic and Antarctic., *Proc. 6th Int. Meet. Humic Substances Soc.* (in press)
- Lee, C., Cronin, C. 1984. Particulate amino acids in the sea: effects of primary productivity and biological decomposition. *J. Mar. Res.* 42 1075-1097.
- Lee, C. 1988. Amino acid and amine biochemistry in marine particulate material and sediments. In: Blackburn, T.H., Sorensen, J. *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments. SCOPE 33* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 125-137.
- Lee, C., Wakeham, S. 1988. Organic matter in sea water: biogeochemical processes. *Chem. Oceanogr.* 9 1-41.
- Li, W.K.W., Dickie, P.M. 1980. Metabolic inhibition of size-fractionated marine plankton radiolabeled with amino acids, glucose, bicarbonate, and phosphate in the light and dark. *Microb.Ecol.* 11 11-24.

- Lindroth, P., Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal.Chem.* 51 (11) 1667-1674.
- Mague, T.H.E., Friberg, D.J., Hughes, D.J., Morris, I. 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: A physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* 25 262-279.
- Mahler, H.R., Cordes, E.H. 1971. *Biological Chemistry*. Harper and Row, New York, N.Y., 1009.
- Maita, Y., Yanada, M. 1990. Vertical distribution of total dissolved nitrogen and dissolved organic nitrogen in seawater. *Geochemical Journal* 24 245-254.
- Malcolm, R. 1990. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta* 232 19-30.
- Mantoura, R.F.C., Riley, J.P. 1975. The analytical concentration of humic substances from natural waters. *Anal. Chim. Acta* 76 97-106.
- McKnight, D.M., Thurman, E.M., Wershaw, R.L. 1985. Biogeochemistry of aquatic humic substances in Thoreau's Bog, Concord, Massachusetts. *Ecology* 66 (4) 1339-1352.
- McKnight, D.M., Aiken, G.R. & Smith, R.L. 1991. Aquatic fulvic acids in microbially based ecosystems: results from two desert lakes in Antarctica. *Limnol.Oceanogr.* 36 (5) 998-1006.
- Menzel, D.W. 1974. Primary productivity, dissolved and particulate organic matter, and the sites of oxidation of organic matter. In: Goldberg, E. *The Sea*. Wiley-Interscience, New York, 659-678.
- Mintrop, L.J. 1990. Aminosäuren im Sediment - Analytische Methodik und Ergebnisse aus der Norwegischen See. *Ber.Sonderforschungsbereich* 313, Univ. Kiel 201-217.
- Mix, A.C. 1989. Influence of productivity variations on long-term atmosphere CO₂. *Nature* 337 541-544.
- Monnier, V.M., Stevens, V.J., Cerami, A. (1981). Maillard reactions involving proteins and carbohydrates in vivo: relevance to diabetes mellitus and aging. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5 315-327.
- Montani, S., Okaichi, T. 1985. Amino acid variations in marine particles during sinking and sedimentation in Harima-Nada, The Seto Inland Sea, Japan. In: Hattori, A. *Marine and Estuarine Geochemistry*. Lewis Publishers Inc., Michigan, U.S.A., 15-27.

- Moore III, B., Bolin, B. 1986/87. The oceans, carbon dioxide and global climate change. *Oceanus* 29 9-15.
- Mopper, K., Lindroth, P. 1982. Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis. *Limnol.Oceanogr.* 27 (2) 336-347.
- Müller, P.J., Suess, E., Ungerer, C.A. 1986. Amino acids and amino sugars of surface particulate and sediment trap material from waters of the Scotia Sea. *Deep-Sea Research* 33 (6) 819-838.
- Mykelstad, S., 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt und *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 29 161-179.
- Newell, R.C., Turley, C.M. 1987. Carbon and nitrogen flow through pelagic microheterotrophic communities. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 5 717-734.
- Partridge, S.M., David, H.F. 1950. Preferential release of aspartic acid during hydrolysis of proteins. *Nature* 165 62.
- Piper, T.J., Posner, A.M. 1968. On the amino acids found in humic acid. *Soil Sci.* 106 188-192.
- Pomeroy, L.R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience* 24 499-504.
- Poutanen, E.L., Morris, R.J. 1983. A study of the formation of high molecular weight compounds during the decomposition of a field diatom population. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 17 189-196.
- Preez, D. R. du, Bate, G.C. 1992. Dark survival of the surf diatom *Anaulus australis* Drebes et Schulz. *Botanica Marina* 35 315-319.
- Rashid, M. A. 1985. *Geochemistry of Marine Humic Compounds*. Springer, New York, 300.
- Rausch, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiology* 78 237-251.
- Riffaldi, R., Schnitzer, M. 1973. Effects of 6 N HCl hydrolysis on the analytical characteristics and chemical structure of humic acids. *Soil Sci.* 115 (5) 349-355.
- Robertson, K.J., Williams, P.M., Bada, J.L. 1987. Acid hydrolysis of dissolved combined amino acids in seawater: a precautionary note. *Limnol. Oceanogr.* 32 (4) 996-997.

- Rudels, B. 1987. On the mass balance of the Polar Ocean, with special emphasis on the Fram Strait. *Nor. Polarinst. Skr.* 188 1-53.
- Sarnheim, M., Winn, K., Duplessy, J.-C., Fontugne, M.R. 1988. Global variations of surface ocean productivity in low and mid latitudes: influence on CO₂ reservoirs of the deep ocean and atmosphere during the last 21000 years. *Paleoceanography* 3 361-399.
- Schimpf, C., Parthier, B. 1987. Modulation of amino acid uptake by *Euglena* cells after preincubation with substrate. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 182 129-141.
- Schultz, J.H., Allison, H., Grice, M. 1962. Specificity of the cleavage of proteins by dilute acid. I. Release of aspartic acid from insulin, ribonuclease and glucagon. *Biochemistry* 1 694-698.
- Siezen, R.J., Mague, T.H. 1978. Amino acids in suspended particulate matter from oceanic and coastal water of the Pacific. *Mar.Chem.* 6 215-231.
- Skopintsev, B. A. 1981. Decomposition of organic matter of plankton, humification and hydrolysis. In: Dawson, E. K., Duursma R. *Marine Organic Chemistry* Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, 125-177.
- Sieburth, J.M. 1969. Studies on algal substances in the sea. III. Production of extracellular matter by littoral marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 3 290-309.
- Smith, W.O., Nelson, D.M. 1985. Phytoplankton bloom produced by a receding ice edge in the Ross Sea: spatial coherence with the density field. *Science* 227 163-166.
- Smith, W.O., Kattner, G. 1989. Inorganic nitrogen uptake by phytoplankton in the marginal ice zone of the Fram Strait. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer* 188 90-97.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359 139-142.
- Smucker, R.A., Dawson, R. 1986. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: chitin in TCA "protein" precipitates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 104 143-152.
- Sondergaard, M., Schierup, H.-H. 1982. Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mosso: molecular weight fractionation. *Freshwater Biology* 12 313-320.
- Spiess, A, Brockmann, U.H., Kattner, G. 1988. Nutrient regimes in the marginal ice zone of the Greenland Sea in summer. *Mar. Ecol. Prog.Ser.* 47 195-204.

- Stosch, H.A., Drebes, G. 1964. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris*, ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. *Helgol. wiss. Meeresunters.*, 11 209-257.
- Stuermer, D.H., Harvey, G.R. 1977. The isolation of humic substances and alcohol-soluble organic matter from seawater. *Deep Sea Res.* 24 303-309.
- Sugimura, Y, Suzuki, Y. 1988. A high temperature catalytic oxidation method of non-volatile organic carbon in seawater by direct injection of liquid sample. *Mar. Chem.* 24 105-131.
- Sundh, I., Bell, R.T. 1992. Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiologia* 229 93-106.
- Tegelaar, E.W., De Leeuw, J.W., Derenne, S., Largeau, C. 1989. A reappraisal of kerogen formation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53 3103-3106.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L. 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *American Chemical Society* 15 (4) 463-466.
- Thurman, E.M. 1985. Organic Geochemistry of Natural Waters. In: *Aquatic Humic Substances*. Nijhoff, Dordrecht, 325-333.
- Thurman, E.M., Aiken, G.R., Ewald, M., Fischer, W.R., Förstner, U., Hack, A.H., Mantoura, R.F.C., Parsons, J.W., Pocklington, R., Stevenson, F.J., Swift, R.S., Szpakowska, B. 1988. Isolation of soil and aquatic humic substances. Group Report. In: *Frimel, F.H., Christman, R.F. Humic Substances and their Role in the Environment*. J. Wiley, Chichester, 31-43.
- Toggweiler, J.R. 1989. Is the downward dissolved organic matter (DOM) flux important in carbon transport? In: *Berger, W.H., Smetacek, V.S., Wefer, G. Productivity of the ocean: Present and past*. John Wiley & Sons Limited, S.Bernhard, Dahlem Konferenzen.
- Turley, C.M., Lochte, K. 1990. Microbial response to the output of fresh detritus to the deep-sea bed. *Palaeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology (Global and Planetary Change Section)* 89 3-23.
- Walsh, T.W. 1989. Total dissolved nitrogen in seawater: a new high-temperature combustion method and a comparison with photo-oxidation. *Mar.Chem.* 26 295-311.
- Williams, P. J. 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the plankton food web. *Kiel. Meeresforsch. Sonderh.* 5 1-28.
- Williams, P.M., Druffel, E.R.M. 1987. Radiocarbon in dissolved organic matter in the central North Pacific Ocean. *Nature* 330 246-248.

- Williams Druffel, P.M., E.R.M. 1988. Dissolved organic matter in the ocean: comments on a controversy. *Oceanogr. Mag.*, 1 14-17.
- Wheeler, P.A., Kirchman, D.L. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanogr.* 31 998-1009.
- Yamamoto, S., Ishiwatari, R. 1989. A study of the formation mechanism of sedimentary humic substances - II. Protein-based melanoidin model. *Org. Geochem.* 14 479-489.
- Zaika, L.L. 1970. Column chromatography on polysterene resin using aqueous systems. *J. of Chromatography* 49 222-229.

Folgende Hefte der Reihe „Berichte zur Polarforschung“ sind bisher erschienen:

- **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR
- Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge
zusammengestellt von Norbert Klages
- Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungsschiffes ‚Meteor‘“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern
- Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982“
by G. Hempel and R. B. Heywood
- * **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen ‚Eiswarte‘)“
zusammengestellt von Gode Gravenhorst
- Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS ‚Polarstern‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei
zusammengestellt von R. Schneppenheim
- Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“
by D. L. Cram and J.-C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmidt, M. Mail, R. Kresse, T. Schwinghammer
- Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass
- Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982
zusammengestellt von Dieter Adellung
- Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski
- Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundscheppnetzfüge und Liste der Probennahme an Robben und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- * **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS ‚Polarbjörn‘ 1982/83“ (Sommerkampagne zur Atka-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS ‚Polarstern‘ (Kapstadt, 20. Januar 1983 – Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrtleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS ‚Polarstern‘ 1982/83“
herausgegeben von Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12.–16. May 1983, edited by S. B. Schnack
- Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV ‚Walther Herwig‘ and RV ‚Meteor‘“ – First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages
- Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein
- Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski
- Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede
- Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht von den Fahrtabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer
- Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht vom Fahrtabschnitt 4, Punta Arenas–Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Kohnen
- Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS ‚Polarstern‘ 1984, mit Beiträgen des FS ‚Valdivia‘ und des Forschungsflugzeuges ‚Falcon 20‘ zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel