



Masterarbeit

Bestimmung von lipophilen Algentoxinprofilen im Nordseeraum im Zeitraum 2007 bis 2011 mit speziellem Fokus auf unbekannte Azaspirsäuren

eingereicht von:

Daniela Voß

Hochschule Bremerhaven
Fachbereich 1 „Technologie“
Studiengang Biotechnologie

Januar, 2012

Die vorliegende Masterarbeit wurde in der Abteilung „Ökologische Chemie“ am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven erstellt.



Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Boris Koch
Hochschule Bremerhaven
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

Zweiter Gutachter Dr. Bernd Krock
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Bernd Krock und Prof. Dr. Boris Koch bedanken, die mir bei allen praktischen und theoretischen Fragen immer hilfreich zur Seite standen und die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglichten. Mein Dank gilt auch der kompletten Arbeitsgruppe „Ökologische Chemie“ des Alfred Wegener Instituts. Insbesondere möchte ich mich dabei auch bei Prof. Dr. Allan Cembella bedanken, der mir erst die Möglichkeit gegeben hat mich in dieses Thema einzuarbeiten. Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Wolfgang Drebing und Annegret Müller, die mir bei so vielen „Kleinigkeiten“ immer hilfreich zur Seite standen. Ein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Urban Tillmann für die kleine äußerst interessante Einführung in die diversen „vielen kleinen“ Plankton-Arten der Nordsee. Die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit mit allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe wie auch die wöchentlichen AG Seminare haben mir immer viel Spaß bereitet.

Ein besonderer Dank geht weiterhin an Kapitän Robert Voss wie auch an die Crew des Forschungsschiffes Heincke für deren hilfreiche Unterstützung während der Feldphase. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Prof. Dr. Oliver Zielinski, Dr. Bernhard Schnetger und Dr. Jan Schulz vom ICBM in Oldenburg, Dr. Matthias Witt von der Bruker Daltonik GmbH in Bremen sowie Prof. Dr. Stefan Frickenhaus von der Hochschule Bremerhaven. Abschließend seien besonders Julia Busch und Rohan Henkel hervorgehoben, die immer ein offenes Ohr für alle meine aufkommenden „kleinen Fragen“ hatten und die einem beide mit gutem Rat und toller Unterstützung immer hilfreich zur Seite standen.

ZUSAMMENFASSUNG

Marine Toxine werden durch verschiedene Phytoplankton Spezies produziert und stellen aufgrund der Fähigkeit zur Akkumulation in Schalentieren eine weltweite Bedrohung für den Menschen dar. Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen und der räumlichen Verteilung lipophiler Toxine innerhalb der vier Untersuchungsgebiete Schottland, Shetland Inseln, Färöer Inseln und der Ostsee. Hierfür wurden auf einer Feldkampagne vom 25. Mai bis 11. Juni 2011 Planktonproben aus Netzzügen und definierten Wassertiefen mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS, engl. liquid chromatography - mass spectrometry) auf das Vorkommen von Azaspirsäure, Okadasäure und deren Derivate Dinophysistoxine, Pectenotoxine, Yessotoxine, Gymnodimine und Spirolide sowie der hydrophilen Domoinsäure analysiert. Fast alle erwarteten Toxine konnten an der schottischen Küste, den Shetland Inseln und in der Ostsee detektiert werden, keine hingegen an den Färöer Inseln. Auch wenn sich die Toxinzusammensetzung in den Gebieten sehr ähneln, zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede innerhalb der fraktionierten Netzzugproben (>200µm, 200-55µm, 50-20µm). Die Ostseeregion hebt sich ausschließlich durch das zusätzliche Auftreten weiterer Pectenotoxine (PTX-1, PTX-11, PTX-12) ab, die besonders in Zusammenhang mit einer *Dinophysis* spp. Blüte, die sich größtenteils aus *D. norvegica* zusammensetzte, beobachtet werden konnten. Mit Hilfe multivariater Verfahren wurden Toxine in Relation zu Umweltparametern gesetzt (Salzgehalt, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe, Chlorophyll α). Aus den Analysen gingen jedoch keine signifikanten bzw. eindeutigen Korrelationen mit den Begleitparametern hervor. Da ausschließlich die Fraktion der toxischen Dinoflagellaten herangezogen wurde, stützt sich die Analyse teils auf Einzelfunde und ist somit nicht aussagekräftig genug. Im Rahmen zukünftiger Kampagnen sollte dennoch eine erneute Überprüfung auf Korrelationen zwischen Toxingehalten und Umweltkonditionen erfolgen um Rückschlüsse auf toxische Algenblüten zu ermöglichen.

Der zweite Abschnitt der vorliegenden Arbeit setzt einen speziellen Fokus auf Azaspirsäuren (AZAs, engl. azaspiracids) und beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung bislang unbekannter Verbindungen. *Azadinium spinosum* gilt bislang der einzige Produzent von AZA-1 und AZA-2. Zwei verschiedene Stämme von *Azadinium poporum*, die bislang als nicht toxisch galten, sowie die neu entdeckte Art *Amphidoma languida* produzieren jedoch chemische Verbindungen, die den Azaspirsäuren ähneln. In Kulturisolaten von *A. poporum* aus Korea konnte die Masse $[M+H]^+$ m/z 858 detektiert werden, die eigentlich den bekannten AZA-7, -8, -9, -10 zugeordnet wird, welche als Schalentiermetabolite gelten. Das Nordseeisolat von *A. poporum* hingegen zeigte die Masse m/z 846. In Kulturisolaten von *A. languida* konnten zwei chemische Verbindungen mit $[M+H]^+$ m/z 830 und m/z 816 nachgewiesen werden, die ebenfalls Ähnlichkeiten hin-

sichtlich des Fragmentierungsmusters aufzeigten. Alle Verbindungen weisen im Vergleich zu den bisher bekannten Azaspirsäuren bislang einzigartige Fragmente auf (m/z 348, m/z 248, m/z 154). Mit Hilfe von Methylierungsexperimenten konnte für die unbekannt Substanzen das Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe, typisch für bekannte Azaspirsäuren, überprüft und bestätigt werden. Auf Basis von LC-MS/MS-Analysen in Kombination mit hochauflösender Fourier - Transform - Ionenzyklotron - Resonanz - Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) wurden für alle potentiellen AZA Verbindungen, in Anlehnung an die bislang bekannten, Strukturvorschläge unterbreitet. Für eine eindeutige Bestätigung der chemischen Strukturen der neu entdeckten Verbindungen AZA-858, AZA-846, AZA-830 und AZA-816 sind jedoch weiterführende Studien nötig. Auf Basis der bisherigen Untersuchungen erfolgte eine Analyse archivierter Planktonproben vergangener Forschungskampagnen aus dem Nordseeraum, dem Ebro Delta bis hin zur Argentinischen Küste. Ausschließlich im Nordseeraum konnten die Substanzen AZA-846, AZA-830 und AZA-816 detektiert werden. Besonders auffällig war dabei eine ausgeprägte Verbreitung der beiden Substanzen von *A. languida* in der Skagerrak Region, was auf eine weitflächige Verbreitung dieser Art in der Nordsee hindeutet, da das Kulturisolat aus der Bantry Bay in Irland stammt.

ABSTRACT

Marine toxins, produced by various phytoplankton species, pose a serious threat to human health worldwide due to the accumulation in shellfish. The following thesis is divided into two parts. The first part deals with the occurrence and spatial distribution of lipophilic toxins within four geographical areas (Scotland, Faroe Islands, Shetland Islands and the Baltic Sea). Therefore plankton samples were collected during a field survey from 25th May to 11th June 2011 from net hauls and discrete depths. Samples were analyzed by LC-MS for the occurrence of azaspiracid, okadaic acid and its derivatives dinophysistoxins, pectenotoxins, yessotoxin, gymnodimine, spirolides and additionally the hydrophilic domoic acid. Almost all expected phycotoxins could be detected within the plankton samples from the Scottish coast, the Shetland Islands and the Baltic Sea, whereas nothing was found at stations around the Faroe Islands. Toxin profiles of fractionated samples from the net hauls showed considerable differences within the fractions (>200 μm , 200-55 μm , 50-20 μm). Although the composition of toxins within the different regions seems to be very similar, samples from the Baltic Sea revealed the additional presence of further pectenotoxins (PTX-1, PTX-11, PTX-12), especially within a bloom of *Dinophysis spp.*, mainly composed of *D. norvegica*. With multivariate methods phycotoxin contents were related to environmental parameters, namely salinity, temperature, oxygen, nutrients and chlorophyll *a*, revealing no significant or unambiguous correlations between these parameters. Due to the fact that in the fraction of toxic dinoflagellates some toxins were only detected sporadically, no significant results were found. Future field studies should be carried out to check for the presence of correlation between toxic algae blooms and environmental conditions.

Within the second part of this study a special focus was set on the detection and classification of unknown azaspiracids. *Azadinium spinosum* is to date the only producer of AZA-1 and AZA-2. But two geographical distinct strains of the so far non-toxic *Azadinium poporum* as well as the new discovered species *Amphidoma languida* seem to produce putative azaspiracids. Samples of *A. poporum* Korea reveal unexpected results due to the fact that masses of AZA-7, -8, -9, -10 (m/z 858) could be detected which are normally associated with shellfish metabolites. Samples of *A. poporum* from the North Sea show instead an unknown compound with m/z 846. Cultures of *A. languida* revealing two unknown compounds with $[M+H]^+$ m/z 830 and m/z 816, showing similar fragmentation pattern to *A. poporum*. All compounds show in comparison to known azaspiracids within MS/MS analysis unique fragments with m/z 348, m/z 248, m/z 154. Also the presence of a free carboxylic function, which normally can be found in azaspiracids, has been proven by methylation with diazomethane. On the basis of LC-MS/MS analysis, combined with high resolution mass spectrometry (FT-ICR-MS) for the determination of sum formula for all putative AZA com-

pounds chemical structure were are proposed. For verification of proposed structures further analysis via NMR are needed. On this basis of this work archived field samples from former research cruises within the North Sea, the Ebro Delta up to the coast of Argentina were analyzed for the presence of the putative azaspiracids. Exclusively within the North Sea region AZA-846, AZA-830 and AZA-816 could be detected, revealing also an extensive distribution of the compounds related to *A. languida* (AZA-830, AZA-816) within the Skagerrak/Denmark region. Although the alga was originally isolated from the Bantry Bay in Ireland, all signs are that the distribution of *A. languida* is more widely within the North Sea.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (Mikromol/l)
Abb.	Abbildung
ASP	Amnesische Schalentiervergiftung (engl. amnesic shellfish poisoning)
AZA	Azaspirsäure (engl. azaspiracid)
AZP	Schalentiervergiftung durch Azaspirsäure
bar	Einheit für den Druck (1 bar = 10 ⁻⁵ Pascal)
c	Stoffmengenkonzentration
CE	Kollisionsenergie [V]
CFP	Ciguatera Fischvergiftung
Chl <i>α</i>	Chlorophyll <i>α</i>
cps	rel. Flächeneinheit (engl. counts per second)
CTD	Leitfähigkeits-, Temperatur-, Tiefensonde (engl. conductivity, temperature, depth)
DA	Domoinsäure (engl. Domoic Acid)
Da	Dalton
DSP	Diarrhöische Schalentiervergiftung (engl. diarrheic shellfish poisoning)
DTX	Dinophysistoxin
EPI	Enhanced Produkt Ionen - Scan / Spektrum
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (lat. et alli)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FS	Forschungsschiff
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie
g	Erdbeschleunigung g = 9,81 m/s
GEOHAB	Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms
Gl.	Gleichung
GYM	Gymnodimine
HAB	toxische Algenblüte (engl. harmful algal bloom)
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IOC	Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO
l	Liter
Lat	geographische Breite [°]
LC	Flüssigkeitschromatograph
LC-MS	Kopplung zwischen Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)
Lon	geographische Länge [°]
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. limit of detection)
M	Mol
m	Meter

m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MilliQ	Reinstwasser
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
ms	Millisekunde
n	Probenanzahl
n.d.	nicht detektiert
ng	Nanogramm
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NO _x / NO ₂ / NO ₃	Gesamtstickstoff / Nitrit / Nitrat
NSP	Neurotoxische Schalentiervergiftung (engl. neurotoxic shellfish poisoning)
NT	Netzzug
OA	Okadasäure (engl. Okadaic Acid)
OA-d8	Okadasäure C ₈ Diol-Ester
pg	Picogramm
PO ₄	Phosphat
PSP	Paralytische Schalentiervergiftung (engl. paralytic shellfish poisoning)
PSU	praktische Salzgehaltseinheit (engl. practical salinity unit)
PTX	Pectenotoxin
PTX-2sa	Pectenotoxin-2 Secosäure (engl. seco acid)
RDA	Redundanzanalyse
RT	Retentionszeit
S	Salzgehalt
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SCOR	Scientific Committee on Oceanic Research
Si	Silikat
SPX-1	13 Desmethylspirolide C
SRM	Selective Reaction Monitoring
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TIC	Total Ionen Chromatogramm
TMSDM	Trimethylsilyldiazomethan
UTC	Koordinierte Weltzeit (engl. coordinated universal time)
V	Volt
v	Volumen in ml
v:v	Volumenanteil : Volumenanteil
YTX	Yessotoxin

INHALT

DANKSAGUNG	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
ABSTRACT	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
Aufgabenstellung	5
2 THEORETISCHER HINTERGRUND	7
2.1 Marine Toxine	7
2.1.1 Amnesische Schalentiervergiftung	7
2.1.2 Diarrhöische Schalentiervergiftung und assoziierte Toxine	8
2.1.3 Cyclische Imine	11
2.1.4 Schalentiervergiftung durch Azaspirsäuren	13
2.2 Massenspektrometrie	15
2.2.1 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Ionenfalle, ESI)	16
Nachweismethoden	18
3 MATERIAL & METHODEN	20
3.1 Feldkampagne FS <i>Heincke</i> 2011	20
3.1.1 Untersuchungsgebiet	20
3.1.2 Ozeanographische Beobachtungen	21
3.1.3 Probennahme	22
3.1.4 Toxin Extraktion	24
3.1.5 Messungen der Feldproben via LC-MS	25
3.1.6 Nährstoffanalysen	30
3.1.7 Chlorophyllanalysen	30
3.1.8 Multivariate Statistik	31
3.2 Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Azaspirsäuren	32
3.2.1 Probenübersicht und Vorbereitung	32
3.2.2 LC-MS Analysen	33
3.2.3 FT-ICR-MS Messungen	34
3.2.4 Veresterung mit Trimethylsilyldiazomethan	35
4 ERGEBNISSE & DISKUSSION	36
4.1 Feldkampagne FS <i>Heincke</i> 2011	36
4.1.1 Ozeanographische Beobachtungen	36

4.1.2	Toxinprofile	42
4.1.3	Multivariate Statistik	51
4.2	Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Azaspisensäuren	57
4.2.1	Kulturisolate <i>Azadinium poporum</i> und <i>Amphidoma languida</i>	58
4.2.2	Feldkampagnen 2007 - 2011	68
5	FAZIT UND AUSBLICK	74
6	REFERENZEN	75
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
8	TABELLENVERZEICHNIS	84
9	ANHANG.....	85
Anlage 1:	Stationsplan HE358	86
Anlage 2:	Spezifikationen der CTD	88
Anlage 3:	Chlorophyll <i>a</i> -Konzentrationen	89
Anlage 4:	Nährstoffkonzentrationen	90
Anlage 5:	Toxinkonzentration der > 200 µm Fraktion	92
Anlage 6:	Toxinkonzentration der 200–55 µm Fraktion	94
Anlage 7:	Toxinkonzentration der 50–20 µm Fraktion	96
Anlage 8:	Multivariate Statistik.....	98
Anlage 9:	LC-MS/MS Chromatogramme der Kulturen <i>A. poporum</i> und <i>A. languida</i>	101
Anlage 10:	Ergebnisse der FT-ICR-MS der Kulturen <i>A. poporum</i> und <i>A. languida</i>	103
Anlage 11:	LC-MS/MS Ergebnisse der Veresterungsexperimente von <i>A. poporum</i> und <i>A. languida</i>	104
Anlage 12:	Ergebnisse der FS <i>Poseidon</i> 2007	106
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	109

1 EINLEITUNG

Phytoplankton nimmt eine der Schlüsselrolle im marinen Ökosystem ein und bildet die Grundlage der marinen Nahrungskette. Ungefähr 5000 verschiedene Spezies sind weltweit bekannt, von denen ein Bruchteil von ungefähr 300 Arten in der Lage ist weitflächige Algenblüten auszubilden (FAO, 2004). Algenblüten können als ein natürliches Phänomen angesehen werden. Während einer Blüte kann die Konzentration der mikroskopisch kleinen Organismen mehrere Millionen Zellen pro Liter erreichen und deutliche Verfärbungen des Wassers sichtbar werden (Masó & Garcés, 2006). Von den 300 zur Algenblüte fähigen Arten können ungefähr 80 Spezies für die Produktion diverser Toxine verantwortlich gemacht werden. Hauptproduzenten (75%) sind diverse Arten der Dinoflagellaten (Guéret & Brimble, 2010).

Das Auftreten giftiger Algenblüten, sogenannter „Harmful Algal Blooms (HABs)“, ist weltweit bekannt. Sie treten verstärkt in küstennahen Regionen auf, da hier das Wachstum durch ein komplexes Zusammenpiel aus biologischen, physikalischen und chemischen Faktoren begünstigt wird (Anderson *et al.*, 2010). Global gesehen hat in den letzten Jahrzehnten die Häufigkeit und Intensität wie aber auch die geographische Verbreitung drastisch zugenommen (Hallegraeff *et al.*, 1995). Begünstigt scheint dieser Trend durch eine Vielzahl natürlicher wie auch anthropogener Faktoren. Als mögliche Ursachen werden u.a. die steigenden Aktivitäten in den Küstenregionen in Bezug auf Aquakulturen, Industriebetriebe und Landwirtschaft und die damit einhergehende Eutrophierung und zunehmende Verschmutzung, aber auch der globale Klimawandel angesehen (Anderson, 2007). Eine steigende geographische Verbreitung ist nicht nur auf natürliche Einflüsse, wie Meeresströmungen und auftretende Stürme zurückzuführen, welche Algenblüten kilometerweit entlang der Küstenlinie transportieren können (Glibert *et al.*, 2005), sondern wird auch menschlichen Aktivitäten zugeschrieben. Als Beispiel seien an dieser Stelle der Transport von Phytoplankton, inklusive der toxischen Algen, mit dem Ballastwasser von Schiffen hervorgehoben (Hallegraeff, 1998), welcher in diversen Feldstudien eingehend betrachtet wurde (vgl. u.a. Butrón *et al.*, 2011). Auch die weltweite Züchtung mariner Organismen und deren globaler Transport kann für eine Einbringung von Phytoplankton in neue Regionen verantwortlich gemacht werden (Camacho *et al.*, 2007). Die Fähigkeit mancher Arten in Ruhestadien, sogenannten Zysten, über einen längeren Zeitraum zu überdauern (Anderson *et al.*, 1995) unterstützt diesen Prozess weiterhin. Eine Verbreitung diverser Arten in neue Gebiete wird durch zahlreiche Studien bestätigt (z.B. Botana *et al.*, 2010).

Marine Toxine bilden im Allgemeinen eine Gruppe komplexer, biologisch aktiver Verbindungen, die sich hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus stark voneinander unterscheiden. Die ökologi-

schen Funktionen dieser Toxine sind noch weitgehend unbekannt, auch wenn einige Toxine als Verteidigungsmechanismus gegenüber Fressfeinden diskutiert werden (Turner & Tester, 1997; Paul *et al.*, 2007). Bei einigen Arten können allelopathische Effekte innerhalb einer Planktongemeinschaft beobachtet werden (Fistarol *et al.*, 2004; Granéli *et al.*, 2008).

Ein Massenaufreten toxischer Algen geht einher mit weitreichenden Auswirkungen für Fischerei, Aquakultur, Tourismus, Ökosystem und menschlicher Gesundheit. Besonders gefährlich ist die Fähigkeit der Akkumulation in marinen Lebewesen. Aber auch eine Aufnahme über das Wasser bzw. die Luft, in Form von Aerosolen ist möglich. Die Abbildung 1 veranschaulicht die Verbreitung mariner Phycotoxine in der Nahrungskette.

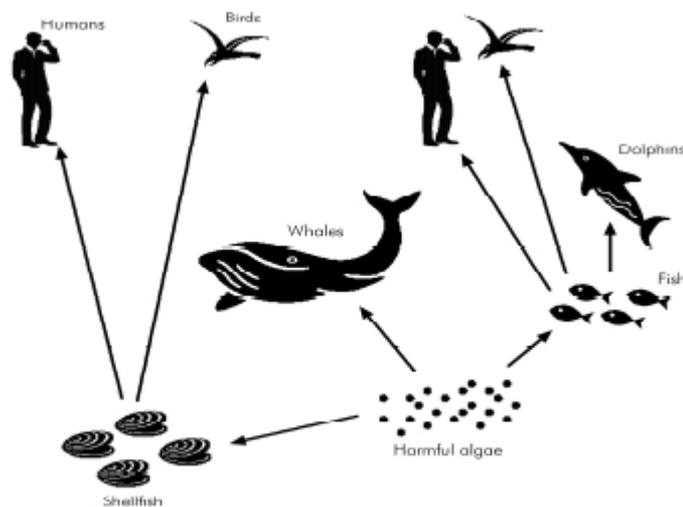


Abb. 1: Ausbreitung von toxischen Algen in der Nahrungskette (Gerrsen *et al.*, 2010).

Der Toxintransfer innerhalb der marinen Nahrungskette in höhere trophische Niveaus erfolgt über sogenannte Transportvektoren, wie beispielsweise das Zooplankton (Turner & Tester, 1997). Neben dem Menschen sind eine Vielzahl weiterer mariner Säugetiere, wie Wale und Delphine, aber auch Seevögel direkt von toxischen Algen betroffen. Für den Menschen agieren u.a. Schalentiere, Krustentiere und Fische als Transportvektor. Muscheln beispielsweise filtrieren große Mengen an Wasser und nehmen dabei auch toxische Algen auf. Die Toxine können im Gewebe der Muschel akkumulieren, ohne diese selbst zu schädigen (Gerrsen *et al.*, 2010). Selbst Monate nach dem Auftreten der toxischen Algenblüten lassen sich noch hohe Konzentrationen in den Muscheln nachweisen (Stobo *et al.*, 2008). Über den Verzehr solch kontaminierter Meeresfrüchte gelangen die Toxine dann in die Nahrungskette des Menschen und können ab bestimmten Schwellengehalten Krankheitssymptome hervorrufen.

Zu den bekanntesten Formen von Vergiftungssyndromen gehören die diarrhäische Schalentiervergiftung (DSP, engl. diarrheic shellfish poisoning), die paralytische Schalentiervergiftung (PSP,

engl. paralytic shellfish poisoning), die amnesische Schalentiervergiftung (ASP, engl. amnesic shellfish poisoning), die neurotoxische Schalentiervergiftung (NSP, engl. neurotoxic shellfish poisoning), die Schalentiervergiftung durch Azaspirsäure (AZP, engl. azaspiracid shellfish poisoning) wie auch die Ciguatera Fischvergiftung (CFP, engl. ciguatera fish poisoning), die sich jedoch auf tropische Regionen beschränkt (Campàs et al, 2007). Auftretende Krankheitserscheinungen variieren von milden bis zu hoch akuten Symptomen. Hierzu zählen u.a. Kopfschmerzen, Schwindel, Atembeschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö und Schüttelfrost, wie aber auch Muskellähmungen, Halluzinationen, Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und im schlimmsten Fall Atmungs- und Herzversagen (Botana, 2008).

Toxische Algen können weltweit mit mehr als 60.000 Vergiftungsfällen pro Jahr in Verbindung gebracht werden, mit einer Gesamtsterblichkeitsrate von ungefähr 1,5 % (Guéret & Brimble, 2010). Einige Arten und ihre Toxine weisen dabei ein so hohes Potential auf, das selbst Konzentrationen von einigen hundert Zellen pro Liter zur Kontamination von Meeresorganismen ausreichen (Anderson *et al.*, 2002). Für DSP-Events werden Konzentrationen von 10^2 bis 10^4 Zellen pro Liter berichtet (Masó & Garcés, 2006). Zum Schutze des Menschen, aber auch um wirtschaftlichen Schäden entgegenzuwirken, wurden in den meisten betreffenden Ländern weitflächige Monitoring Programme mit festgelegten Grenzwerten implementiert. Hierbei werden die Organismen selbst wie aber auch Planktonproben auf Toxine hin untersucht. Diverse Aktivitäten seitens FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), WHO (World Health Organization) und IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission) unterstützen hierbei eine weltweite Harmonisierung und geben Empfehlungen für eine Risikoeinschätzung heraus (Toyufuku, 2006). Auf europäischer Ebene wurden innerhalb der Verordnung (EG) 853/2004 Grenzwerte für diverse Toxingruppen für in Verkehr gebrachte Meerestiere festgelegt. Die Verordnung (EU) Nr.15/2011 beschäftigt sich hingegen mit den anerkannten analytischen Nachweismethoden für Routinemessungen.

Seit 1980 bis zum Jahre 2004 war der Maus-Bioassay (MBA) eine der Standard-Referenz Methode zum routinemäßigen Nachweis mariner Toxine. Zwar sind die gesetzlich vorgeschriebenen Konzentrationen teils nachweisbar, unterhalb dieser Grenze weist der MBA jedoch erhebliche Nachteile in der Empfindlichkeit auf (Hess, 2010). Ein weiterer Nachteil geht einher mit der fehlenden Spezifität gegenüber einzelnen Toxinen. Seitdem wurden diverse Alternativmethoden, wie Immunoassays (ELISA) und chromatographische Methoden entwickelt (Botana, 2008). Gerade chemisch analytische Methoden, besonders die Einführung der Massenspektrometrie gekoppelt an die Flüssigkeitschromatographie (LC-MS), haben die routinemäßigen Analysen gesetzlich relevanter Toxine erheblich beeinflusst. Diese Technik weist eine hohe Spezifität wie auch Empfindlich-

keit auf, und kommt ohne aufwendige Derivatisierungs- bzw. Aufreinigungsschritte aus (Dominguez et al., 2010). Des Weiteren ist eine Detektion und Quantifizierung multipler Toxine in einer Analyse über deren unterschiedliche Massen möglich, welches in diversen Screening-Methoden über die Jahre weiterhin verbessert wurde (McNabb et al., 2005; Stobo et al., 2005; Fux et al., 2007; Blay et al., 2011).

Um das Auftreten und die Dynamiken giftiger Algenblüten wie auch die biologischen Interaktionen innerhalb der Nahrungskette besser verstehen zu können, sind tiefgreifende Kenntnisse über ökologische und ozeanographische Bedingungen, aber auch Kenntnisse über die beeinflussenden anthropogenen Faktoren wichtig. Internationale sowie nationale Programme agieren hierbei als Netzwerke zur Koordination diverser Forschungen und zum Informationsaustausch (Masó & Garcés, 2006). Als Beispiel sei an dieser Stelle das „Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms (GEOHAB)“ Programm, welches im Jahre 1999 vom wissenschaftlichen Ausschuss für Meeresforschung (SCOR, engl. scientific committee on ocean research) und der internationalen Ozeanographischen Kommission (IOC, engl. intergovernmental oceanographic commission) der UNESCO ins Leben gerufen wurde, angeführt. Das Hauptziel ist hierbei die Entwicklung von Observationssystemen und Modellen um giftige Algenblüten vorhersehen zu können und somit die Auswirkungen des Auftretens zu reduzieren (GEOHAB, 2010). Die Entdeckung einer Vielzahl noch nicht beschriebener, wie auch neuer Derivate bereits bekannter Toxine aus diversen Regionen der Welt geht einher mit einem steigenden Forschungsinteresse. Neben den Interaktionen innerhalb der einzelnen trophischen Ebenen sind Bioaktivität und Toxizität, aber auch deren pharmazeutisches Potential (Camacho et al., 2007) von Interesse. Die steigende geographische Distribution und das Auftreten neuer vermeidlich toxischer Algenarten verdeutlicht aber auch die Wichtigkeit eines besseren Verständnisses über Entstehung, Dynamiken und Interaktion toxischer Algen im marinen Lebensraum, um deren Auswirkungen für das Ökosystem und den Menschen besser verstehen zu können.

Aufgabenstellung

Die vorliegende Masterarbeit beschäftigt sich mit der Detektion lipophiler Algentoxine im Nordseeraum und ist prinzipiell in zwei Abschnitte unterteilt.

Die Forschungsausfahrt NORCOHAB III (25.05. bis 11.06.2011) beschäftigte sich mit der genetischen Diversität, der Toxizität und der Variabilität ausgewählter Algen im Nordseeraum. Hierfür wurden diverse Küstenabschnitte beprobt, welche für das wiederkehrende Auftreten giftiger Algenblüten bekannt sind und sich hinsichtlich abiotischer und biotischer Faktoren unterscheiden. Im Rahmen der hier vorliegenden Masterarbeit erfolgte die Identifizierung und Bestimmung der Toxinprofile entlang der Fahrtroute, um Aussagen über Zusammensetzung und Variabilität der auftretenden Toxine zu erlauben. Hierbei wurden hauptsächlich die lipophilen Toxine berücksichtigt. Zu diesen zählen Okadasäure und zugehörige Derivate (Dinophysistoxine), Azaspirsäuren, Pectenotoxine, Yessotoxine, Gymnodimine und Spirolide. Zusätzlich wurde Domoinsäure, als hydrophiles Toxin, in die Untersuchungen einbezogen. Für die Detektion der Toxine wurde die LC-MS Technik eingesetzt. An jeder Station erfolgte zusätzlich die Bestimmung von Salzgehalt, Temperatur und Sauerstoffgehalt durch die Aufnahme von Tiefenprofilen. Weiterhin wurden Wasserproben zur Nährstoffanalyse und Chlorophyll *a* Bestimmung entnommen. Den Untersuchungen wird die Hypothese zu Grunde gelegt, dass deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Toxinprofile innerhalb der verschiedenen Untersuchungsgebiete ersichtlich sind. Weiterhin wird angenommen, dass (1) eine Korrelation zwischen Toxinen und Umweltparametern vorliegt und (2) sich dabei Gemeinsamkeiten zwischen den Untersuchungsgebieten aufzeigen lassen.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit konzentriert sich auf die Identifizierung und anschließende Charakterisierung unbekannter Azaspirsäuren. Erste Berichte über das Auftreten von Azaspirsäuren gehen auf das Jahr 1995 zurück durch in Verkehr gebrachte Muscheln aus Irland (McMahon & Silke, 1996). Das hierfür verantwortliche Toxin wurde später isoliert und strukturell als Azaspirsäure charakterisiert (Satake *et al.*, 1998). Seither wurden diverse weitere Analoga identifiziert, die sich anhand charakteristischer Fragmente nachweisen lassen (Rehmann *et al.*, 2008). Erst im Jahre 2007 konnte die Gattung *Azadinium* spp. als Hauptproduzent dieses Toxins identifiziert werden (Tillmann *et al.*, 2009). Betrachtet man das Toxinprofil von Kulturen der Art *Azadinium spinosum*, isoliert aus Planktonproben der dänischen Küste, so lassen sich ausschließlich Azaspirsäure 1 und 2 nachweisen (Krock *et al.*, 2009), während alle anderen bekannten Azaspirsäuren Muschelmetabolite darstellen. In Kulturisolaten von *Azadinium poporum*, die in der Nordsee (Tillmann *et al.*, 2011a) und in China und Korea (Potvin *et al.*, 2011) isoliert wurden, und bislang als untoxisch galten, wurden jedoch Verbindungen nachgewiesen, deren Massenspektren denen von Azaspirsäure

ähneln. Eine weitere Unklarheit liefert ein Isolat der neuentdeckten Art *Amphidoma languida* aus Irland (Tillmann *et al.*, 2011b). *A. languida* produziert keine für *Azadinium* spp. typische Azaspirsäure, jedoch lassen sich klassische Fragmente nachweisen, die mit Azaspirsäuren in Verbindung gebracht werden können. Basierend auf diesen Ergebnissen beschäftigt sich der zweite Abschnitt der vorliegenden Arbeit mit einer genaueren Charakterisierung dieser Substanzen. Mit Hilfe der LC-MS/MS-Technik, in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie, werden diese Verbindungen eingehend betrachtet, um anhand der Fragmentierungsprozesse Aussagen über den strukturellen Aufbau der Moleküle zu ermöglichen. Von großem Interesse ist hierbei besonders die Zuordnung der von *A. languida* produzierten Verbindung, da bisher eindeutige Beweise für einen direkten Zusammenhang mit Azaspirsäuren fehlen. Basierend auf dieser Ausgangssituation erfolgte zusätzlich die Betrachtung von archivierten Proben vergangener Forschungskampagnen, welche im Zeitraum 2007 bis 2011 in verschiedenen Küstenregionen im Nordseeraum bis hin zur spanischen und argentinischen Küstenlinie stattgefunden haben. Es handelt sich hierbei um Extrakte aus Planktonproben, diverser Tiefen und Fraktionen, welche auf Azaspirsäuren hin analysiert werden. Hierbei wird angenommen, dass sich bereits in diesen Proben einige der neu entdeckten Verbindungen nachweisen lassen.

2 THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Marine Toxine

Marine Phycotoxine sind natürlich vorkommende chemische Verbindungen des Sekundärstoffwechsels diverser mariner Mikroalgen, die als komplexe Strukturen vorliegen. Sie lassen sich prinzipiell nach ihrer Löslichkeit in die Gruppen der hydrophilen und lipophilen Toxine unterteilen und gehören diversen chemischen Klassen, eingeschlossen der Aminosäuren, Alkaloiden und Polyketiden, an. Die hier betrachteten Algentoxine zählen zu den kleineren Molekülen, mit typischen Molekulargewichten von 300 bis 1500 Da (Hess, 2010). Des Weiteren weisen sie teils deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres Wirkmechanismus und Toxizitätspotentials auf. Nachfolgend werden ausschließlich die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Toxine kurz näher erläutert. Eine Unterteilung erfolgt hierbei nach der weit verbreiteten klassischen Zuordnung zum ausgelösten Krankheitssyndrom (Campàs *et al.*, 2007).

2.1.1 Amnesische Schalentiervergiftung

Die Amnesische Schalentiervergiftung (ASP) lässt sich auf das Toxin Domoinsäure (DA, engl. Domoic Acid) und deren Isomeren zurückführen. Der Gruppe der ASP-Toxine werden neben der Hauptkomponente DA, weitere Iso-Domoinensäuren (Iso-DA, A bis H) und Diastereoisomere Epi-Domoinensäuren (epi-DA) zugeordnet (Lefebvre & Robertson, 2010).

Ursprünglich wurde dieses Toxin aus der Rotalge *Chondria armata* isoliert. Hauptproduzenten sind jedoch, neben diversen Rotalgen, weitgehend Diatomeen der Gattung *Pseudo-Nitzschia*, die weltweit verbreitet sind (Kotaki, 2008). Damit ist ASP die einzig bekannte Form der Schalentiervergiftung, die sich auf Diatomeen zurückführen lässt. Die Toxinproduktion kann stark innerhalb der einzelnen Arten variieren, und es lassen sich deutliche geographische Unterschiede feststellen (Jeffery, 2004). Die Produktion wird u.a. mit Stress in Verbindung gebracht, besonders Silikat- und Phosphatlimitierungen scheinen zu einer Erhöhung der Produktion an Domoinensäure beizutragen (Pan *et al.*, 1998).

DA ist eine wasserlösliche zyklische Aminosäure (Abb. 2), die zusammen mit Kainsäure zu den Strukturanalogen der Glutaminsäure zählt. Glutamat übernimmt im Gehirn als stimulierender Neurotransmitter eine wichtige Rolle ein, die durch diese Toxine erheblich gestört wird (ESFA, 2009).

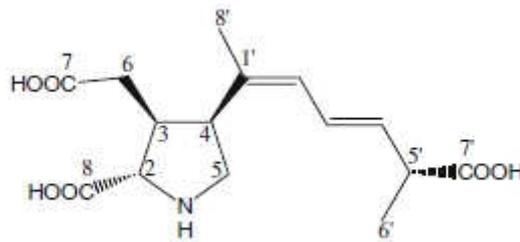


Abb. 2: Chemische Struktur der Domoinsäure.

DA besitzt hierbei eine hundertfach höhere Affinität zu Untereinheiten der Glutamatrezeptoren der Hirnregion, besonders in Bereichen des Hippocampus, und beeinflusst somit die neuronalen Funktionen. Durch die Bindung wird u.a. der Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} begünstigt, resultierend in einer Depolarisation der Membran und einer anschließenden Störung der eigentlichen Zellfunktion bis hin zum Zelltod (Pulido, 2008).

Auswirkungen für den Menschen können besonders aus einem im Jahre 1987 in Kanada stattgefundenen Ereignis aufgezeigt werden. Hier kam es zu Vergiftungsfällen von über 100 Personen. Als Ursache wurde der Verzehr von mit Domoinsäure kontaminierten Miesmuscheln identifiziert, die mit dem Auftreten der Kieselalge *Pseudo-Nitzschia f. multiseriata* in Verbindung gebracht wurde (Wright *et al.*, 1989). Die Auswirkungen gingen mit gastrointestinalen und neurologischen Symptomen einher, wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Bauchkrämpfe, Kopfschmerzen, Orientierungslosigkeit und Verlust des Kurzzeitgedächtnisses (Amnesie). Zusätzlich wiesen einige Personen erhebliche neurologische Dysfunktionen auf, bis hin zu Schlaganfall und Koma (Perl *et al.*, 1990; Teitelbaum *et al.*, 1990). Durch Sutherland *et al.* (1990) wurde bestätigt, dass es zu einer Verkümmern der Neuronen in der Hippocampus Region mit ernsten, irreversiblen Gedächtnisschädigung kommt. Domoinsäure wird weiterhin auch mit Massensterben von Seevögeln und Seelöwen in Verbindung gebracht (Doucette & Tasker, 2008). Lefebvre *et al.* (2009) kann entnommen werden, dass selbst geringe Konzentrationen die Genexpression bei Fischen beeinflussen können. Zum Schutze des Menschen erfolgte durch die EU die Einführung eines Grenzwertes für ASP Toxine von 20 mg/kg Muschelfleisch (Verordnung (EG) Nr.853/2004).

2.1.2 Diarrhäische Schalentiervergiftung und assoziierte Toxine

Die diarrhäische Schalentiervergiftung (DSP) wird auf die Toxingruppe Okadasäure (OA) und deren Derivate Dinophysistoxine (DTX) -1, -2 und -3 zurückgeführt. DTX-1 und DTX-2 werden dabei direkt durch Algen produziert, während die Gruppe der DTX-3-Toxine als Metabolite von Schalentieren gelten (McNabb, 2008). Weiterhin sind wasserlösliche OA-Derivate wie auch natürlich vorkommende OA-Diolester bekannt. Die Diolester gelten dabei als äußerst labil, der C_8 -Diolester

kann beispielweise durch Enzyme im Schalentier zur aktiven OA hydrolysiert werden (Torgersen *et al.*, 2008b).

Ursprünglich wurde OA bereits Anfang der 80er Jahre aus dem Schwamm *Halichondria okadai* isoliert (Yasumoto & Murata, 1993). Als Hauptproduzenten dieser Toxine gelten jedoch Dinoflagellaten der Gattung *Dinophysis*, aber auch Arten der benthischen Gattung *Prorocentrum* (Lee *et al.*, 1989). Erste Berichte über das Auftreten von DSP-Vorkommen stammen aus den Niederlanden (1960) und Japan (1976) (Tubaro *et al.*, 2008). Obwohl beide Gattungen weltweit verbreitet sind, scheinen Europa und Japan besonders betroffen zu sein (Dominguez *et al.*, 2010)

OA (Abb. 3) und deren Derivate DTXs gehören zu der Klasse der lipophilen Polyether. Das Grundgerüst setzt sich aus einer Hauptkette von 38 Kohlenstoffatomen zusammen.

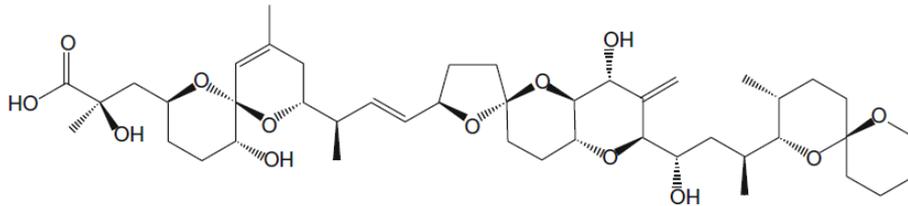


Abb. 3: Chemische Struktur der Okadasäure.

Die DTX-Derivate unterscheiden sich von der Hauptkomponente OA durch die Anzahl und Stellung der Methylgruppen, DTX-3 Toxine weisen eine zusätzliche Acylgruppe auf (Dominguez *et al.*, 2010).

Der Verzehr kontaminierter Meeresfrüchte verursacht beim Menschen gastrointestinale Beschwerden, die bereits schon nach 30 Minuten auftreten können und i.d.R. nach 3 Tagen abgeklungen sind. Symptome gehen mit Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen sowie dem charakteristischen, namensgebenden Hauptsymptom der Diarrhöe einher (McNabb, 2008). OA und DTX gelten als potente Inhibitoren der Protein-Phosphatase (PP), mit hoher Affinität zu den spezifischen Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2a (Yasumoto & Murata, 1993). Diese Phosphatasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die die Dephosphorylierung diverser Proteinen durchführen und somit eng mit wichtigen metabolischen Prozessen in eukaryotischen Zellen verknüpft sind. Der Wirkmechanismus wird mit der freien Carboxylgruppe in Verbindung gebracht, da Methyl- und Diolester nicht als Phosphatase-Inhibitoren gelten (Dominguez *et al.*, 2010). Des Weiteren werden Tierversuchen als tumorfördernd angesehen (Draisci, 1996; Ciminiello *et al.*, 2002).

Bereits geringe Zellkonzentrationen von *Dinophysis* (~ 200 Zellen/l), können ausreichen, um über eine Kontamination von Schalentieren den Menschen zu beeinträchtigen (FAO, 2004). In diesem Zusammenhang wurde innerhalb der EU für die Gruppe der DSP-Toxine ein Grenzwert von 160 µg/kg Muschelfleisch eingeführt.

Assoziierte Toxine

Ursprünglich wurden die Toxingruppen der Pectenotoxine und Yessotoxine den DSP-Toxinen zugeordnet, da sie oft in Verbindung mit OA und DTXs auftraten und auch im MBA gemeinsam detektiert wurden. Jedoch weisen diese Toxine andere Wirkmechanismen auf und gelten nicht als PP-Inhibitoren. Prinzipiell werden sie auch nicht eindeutig mit dem charakteristischen DSP-Syndrom Diarrhöe in Verbindung gebracht (Aune *et al.*, 2002; Paz *et al.*, 2008). Für beide Toxingruppen existieren keine Berichte über das Auftreten von Vergiftungserscheinungen beim Menschen, jedoch gelten sie als äußerst toxisch im MBA.

Die Pectenotoxine (PTXs) umfassen eine Gruppe diverser Analoga und lassen sich wie OA und DTXs auf Dinoflagellaten der Gattung *Dinophysis* zurückführen. PTXs konnte jedoch auch in zahlreichen Arten heterotropher Dinoflagellaten der Gattung *Protoperdinium* detektiert werden (Dominguez *et al.*, 2010). In Planktonextrakten lassen sich hauptsächlich PTX-2, -11, -12, -13 und -14 sowie die PTX-2 Secosäure nachweisen. PTX-2 nimmt in der Regel einen Hauptanteil ein. Die weiteren Analoga werden weitgehend als Metabolite angesehen (Krock *et al.*, 2008b). PTXs bilden eine Gruppe lipophiler makrozyklischer Polyether (Grundverbindung PTX2, Abb. 4). PTX-1 und PTX-2 wurden bereits Anfang der 80er Jahre aus Muscheln in Japan isoliert und charakterisiert (Yasumoto & Murata, 1993).

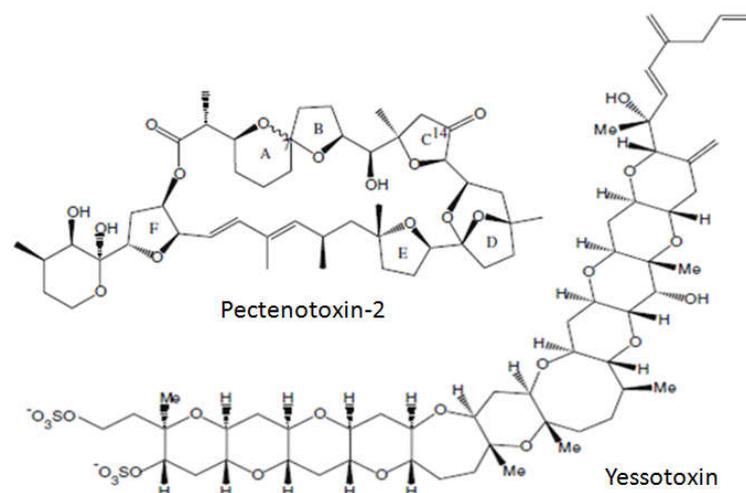


Abb. 4: Chemische Strukturen der Toxine Pectenotoxin-2 und Yessotoxin.

Analoga dieser Toxingruppe, besonders aber PTX-1 und PTX-2, gelten allgemein als hepatotoxisch und können makroskopische Änderungen in der Leber hervorrufen. Weiterhin weisen sie zytotoxische Eigenschaften und gelten u.a. als Störstoffe des Aktin-Zytoskeletts und können Apoptose auslösen (Vilariño & Espiña, 2008). Die Toxizität dieser Verbindungen wird auf die cyclische Struktur zurückgeführt, gerade da die offenkettigen Secosäuren als nicht toxisch angesehen werden (Burgess & Shaw, 2001). Innerhalb der EU werden PTXs bisher weiterhin in Kombination mit OA und DTX betrachtet und sind innerhalb des Grenzwerts von 160 µg/kg Muschelfleisch eingeschlossen.

Die Yessotoxine (YTXs; Abb. 4) hingegen bilden eine Gruppe leiterförmiger Polyether mit zwei Sulfateestern an der Seitenkette (Yasumoto & Murata, 1993). Auch wenn das Grundgerüst lipophil ist, entsteht durch diese zwei Sulfatgruppen ein amphoterer Charakter (Paz *et al.*, 2008). Die Gruppe der YTXs umfasst über 90 Analoga, die noch nicht alle eindeutig beschrieben sind (Miles *et al.*, 2005). Erste Berichte über YTX stammen aus Japan (Murata *et al.*, 1987). YTX wurde aber auch u.a. in Europa, Kanada und Neuseeland identifiziert. Für die Produktion sind Dinoflagellaten der Arten *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* und *Gonyaulax spinifera* verantwortlich (Munday *et al.*, 2008).

Der genaue Wirkmechanismus von YTXs ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass ein Hauptangriffspunkt der Herzmuskel ist (Tubaro *et al.*, 2010). Weiterhin wird YTX mit der Beeinflussung von Durchlassporen in der Mitochondrienmembran in Verbindung gebracht, resultierend in einer Dysfunktion der Mitochondrien, die zum programmierten Zelltod führen kann (Korsnes & Espenes, 2011). In der EU-Verordnung Nr. 853/2004 wird der Grenzwert auf 1 mg YTX Äquivalent pro kg Muschelfleisch festgelegt.

2.1.3 Cyclische Imine

Die Gruppe der cyclischen Imine lässt sich in verschiedene, sehr strukturähnliche Untergruppen aufteilen. Neben den für diese Arbeit relevanten Spiroliden (SPX) und Gymnodiminen (GYM) werden des Weiteren die Pinnatoxine, Prorocentrolide, Pteriatoxine und Spiro-Prorocentrimine dieser Gruppe zugeordnet. Alle Untergruppen weisen dabei makrocyclische Merkmale und eine Imingruppe auf (Cembella & Krock, 2008).

Die Spirolide stellen innerhalb der cyclischen Imine die größte Untergruppe dar, mit insgesamt 14 strukturähnlichen Verbindungen. Zu den Hauptkomponenten, SPX A bis G, kommen weitere Derivate (C, D, G) hinzu (Otero *et al.*, 2011). Das Derivat 13-Desmethylspirolid C (Abb. 5, links) wird

dabei auch als SPX-1 bezeichnet. Konzentrationsangaben der Spirolide werden in der Regel auf dieses Derivat bezogen, da nur für SPX-1 zertifizierte Referenzstandards vorliegen (ESFA, 2010).

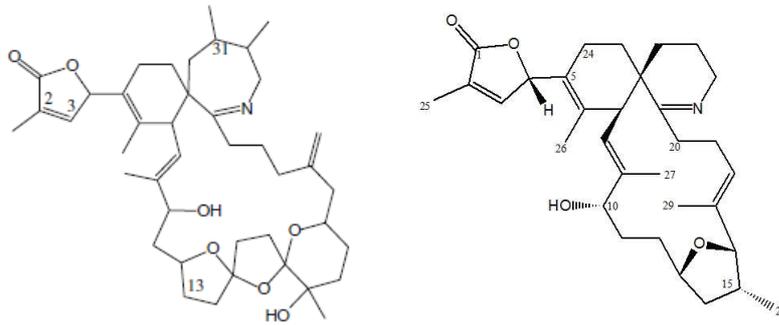


Abb. 5: Chemische Strukturen der Toxine 13-Desmethylspirolid C (links) und Gymnodimin A (rechts).

Spirolide wurden zum ersten Mal Anfang der 90er Jahre in Kanada entdeckt und isoliert (Hu *et al.*, 1995). Verantwortlich für dieses Toxin waren Dinoflagellaten der Art *Alexandrium ostenfeldii*, welche auch im Zusammenhang mit der paralytischen Schalentiervergiftung (PSP) stehen (Cembella *et al.*, 1999), und weitverbreitet in Amerika und Europa sind. Neben *A. ostenfeldii* gilt auch *A. peruvianum* als ein Hauptproduzent der Spirolide (Guéret & Brimble, 2010).

Gymnodimin (Abb. 5, rechts) und deren zwei Strukturanaloga B und C werden durch Dinoflagellaten der Art *Karenia selliformis* produziert (MacKenzie *et al.*, 2002). Erste Berichte über das Auftreten stammen aus Neuseeland, wo dieses Toxin während eines Routinemonitorings aus Austern isoliert wurde (Seki *et al.*, 1995). Innerhalb der Gruppe der cyclischen Imine zählen die Gymnodimine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 500 Da, zu den kleinsten Molekülen (Cembella & Krock, 2008).

Spirolide und Gymnodimine zählen beide zu den schnell wirkenden Toxinen und agieren dabei nach einem „Alles oder Nichts Prinzip“ (Cembella & Krock, 2008). Basierend auf diesem Prinzip verstarben die Tiere entweder nach dem Auftreten von Hyperaktivität, neurologischen Symptomen und Atemlähmungen nach kürzester Zeit oder sie erholten sich nach 20 Minuten vollständig, ohne weitere Nachwirkungen zu zeigen (Munday, 2008). Aufgrund ähnlicher Symptome wird bei den Toxingruppen auch ein ähnliches Wirkungsprinzip vermutet. Die biologische Aktivität der cyclischen Imine wird dabei hauptsächlich mit der vorhandene Imingruppe in Verbindung gebracht, unterstützt durch die Tatsache, dass bei den beiden Spiroliden E und F diese Gruppe durch eine acyclische Ketoamingruppe ersetzt ist und beide Verbindung als inaktiv im MBA gelten (Hu *et al.*, 1996, ESFA, 2010).

Bisher existieren keine Berichte über Vergiftungsfälle beim Menschen, die sich ausschließlich auf das Auftreten von Spiroliden oder Gymnodiminen zurückführen lassen, da diese in der Regel mit

weiteren Toxinen auftreten (ESFA, 2010). Im Falle der Spirolide gelten 13-Desmethylspirolid C, Spirolid C und 20 Methylspirolid G als besonders toxisch. (Munday, 2008). Spirolide wie auch Gymnodimine werden beide als neurotoxisch angesehen. Der Wirkmechanismus wird dabei u.a. auf die hohe Affinität dieser Toxine für Acetylcholinrezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem zurückgeführt, welche durch das Vorhandensein weitgehend blockiert werden (Gill *et al.*, 2003; Kharrat *et al.*, 2008). Basierend auf den bisherigen Ergebnissen erfolgten keine Vorgaben oder Empfehlungen für diese Toxingruppe. Der Forschungsbedarf geht dabei auch mit eventuellen Auswirkungen durch Langzeiteinwirkung einher (ESFA, 2010).

2.1.4 Schalentiervergiftung durch Azaspirsäuren

Azaspirsäuren (AZAs) bilden im Allgemeinen eine Gruppe strukturähnlicher, stickstoffhaltiger Polyethertoxine, die eine einzigartige Spiro-Ringanordnung, ein zyklisches Amin und eine Carbonsäuregruppe aufweisen (Abb. 6). Seit dem ersten Auftreten wurden diverse weitere Analoga identifiziert. Neben der eigentlichen Hauptkomponente AZA-1, wurden AZA-2 und -3, die sich hauptsächlich hinsichtlich des Grads der Methylierung unterscheiden, wie auch weitere hydroxylierte und carboxylierte Analoga detektiert, so dass mittlerweile über 30 AZA-Verbindungen bekannt sind (Rehmann *et al.*, 2008). AZAs unterscheiden sich deutlich von anderen stickstoffhaltigen Toxinen, wie beispielsweise GYM oder SPX, u.a. durch das Fehlen der für deren Toxizität verantwortlich gemachten Imingruppe (James *et al.*, 2000).

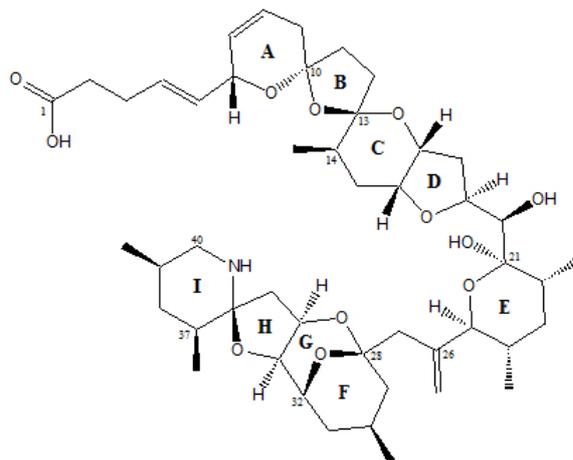


Abb. 6: Chemische Struktur von Azaspirsäure 1.

Erste Berichte über das Auftreten von Vergiftungserscheinungen beim Menschen stammen aus dem Jahr 1995 in den Niederlanden und wurden durch kontaminierte Miesmuscheln aus Irland verursacht (McMahon & Silke, 1996). Die Symptome ähnelten denen der diarrhischen Schalentiervergiftung (Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfen und Diarrhöe), jedoch konnten ausschließlich geringe Konzentrationen an DSP-Toxinen nachgewiesen werden. Das verantwortliche Toxin wurde

später isoliert und strukturell als AZA-1 charakterisiert (Satake *et al.*, 1998). Irland galt in den nachfolgenden Jahren als besonders betroffen, da es auch in den folgenden Jahre 1997, 1998, und 2000 zu Vergiftungsfällen aufgrund kontaminierter Muscheln kam (James *et al.*, 2004). Auch in weiteren europäischen Ländern, wie Norwegen, England, Dänemark, Frankreich, Spanien und Portugal (James *et al.*, 2002; James *et al.*, 2004; Magdalena *et al.*, 2003; Vale *et al.*, 2008), aber auch in Chile (Alvarez *et al.*, 2010; López-Rivera *et al.*, 2010) sowie Afrika (Taleb *et al.*, 2006) wurden seitdem AZAs detektiert. Neben diversen kontaminierten Muschelarten ließen sich diese Toxine auch in Krabben nachweisen (Torgersen *et al.*, 2008a).

Basierend auf der Polyetherstruktur und dem saisonalen Auftreten wurde ebenfalls ein Dinoflagellat als Produzent vermutet (James *et al.*, 2000). Jedoch konnte dieser lange Zeit nicht ausgemacht werden. AZAs konnten beispielsweise im heterotrophen Dinoflagellaten *Protoperidinium crassipes* gefunden werden, jedoch ist dieser auch als Fressfeind diverser kleinerer Dinoflagellaten bekannt (James *et al.*, 2003). Erst im Jahre 2007 wurden Dinoflagellaten der Art *Azadinium spinosum* als Produzenten von AZAs identifiziert. *A. spinosum* ist dabei mit einer Größe von 12-16 µm kleiner als alle bisher bekannten toxinproduzierenden Dinoflagellaten (Tillmann *et al.*, 2009). Eine weitere anschließend entdeckte Art dieser Gattung, *Azadinium poporum*, galt bisher als untoxisch, da keine bekannten AZAs detektiert werden konnten (Tillmann *et al.*, 2011a). In Kulturen von *A. spinosum* lassen sich ausschließlich AZA-1 und AZA-2 nachweisen (Krock *et al.*, 2009). Weitere AZA-Analoga werden als Schalentiermetabolite angesehen. Beispielsweise wird AZA-1 in Muscheln durch C-Demethylierung in das neben AZA-1 und -2 häufig in geringeren Konzentrationen vorliegende AZA-3 umgewandelt (McCarron *et al.*, 2009; O'Driscoll *et al.*, 2011).

Auch wenn durch AZA-Toxine ähnliche Symptome wie durch OA und DTXs der diarrhöischen Schalentiervergiftung hervorgerufen werden, lassen sich keine DSP charakteristischen Wirkmechanismen, wie beispielsweise die Inhibition der Protein-Phosphatase, nachweisen (Twiner *et al.*, 2008). AZAs werden hingegen mit weitreichenden Organschäden in Verbindung gebracht (Ito *et al.*, 2000). Besonders betroffen scheinen hierbei Leber, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Milz wie auch der Dünndarm (Furey *et al.*, 2010). Eine chronische Exposition mit subletalen Dosen von AZA-1 wird in Mäusen z.B. mit der Entwicklung von Lungentumoren in Verbindung gebracht (Ito *et al.*, 2002). AZA-1 gilt als zytotoxisch für diverse Zelllinien, einhergehend mit auftretender Nekrose (Ito *et al.*, 2000; Twiner *et al.*, 2005). Auch existieren Berichte über teratogene Effekte bei Fischen (Colman *et al.*, 2005).

Basierend auf den Vergiftungserscheinungen beim Menschen und gestützt durch die bisherigen Studien wurden zum Schutze des Menschen durch die EU bisher Grenzwerte von 160 µg AZA-1 Äquivalente je kg Muschelfleisch festgelegt.

2.2 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) lassen sich chemische Verbindungen charakterisieren, um Rückschlüsse auf Masse, Struktur und Zusammensetzung von Molekülen zu erlauben. Neben der eigentlichen Charakterisierung ist weiterhin eine quantitative Analyse möglich. Hierfür reichen bereits kleinste Substanzmengen. Das Grundprinzip der MS ist die Detektion von Ionen im Hochvakuum entsprechend ihrer unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z -Verhältnis). Ein Massenspektrometer besteht dabei grundlegend aus drei Hauptkomponenten (Abb. 7).



Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

In der Ionenquelle wird die zu untersuchende Substanz ionisiert. Hierfür stehen, abhängig von der vorliegenden Substanz, verschiedene Möglichkeiten, wie beispielsweise Elektronen- oder Atomstoßmethoden, Feldionisationsmethoden wie auch Sprühmethoden, zur Verfügung. Im anschließenden Massenanalysator erfolgt die Auftrennung der Ionen hinsichtlich der unterschiedlichen m/z -Verhältnisse, welche anschließend im Detektor erfasst werden.

Nach dem Prinzip der Massenanalyse lassen sich Massenspektrometer in 4 Grundtypen unterteilen (Ekman *et al.*, 2009). Die Trennung der Ionen kann in (1) magnetisch / elektrischen Sektorfeld-Instrumenten, (2) Quadrupol-Systemen, (3) Flugzeit-Massenspektrometer und (4) in elektrische oder magnetische Ionenfallen (Bsp. Quadrupole-Ionenfalle, Orbitrap, Fourier-Transform Ionenzyklotron-Resonanz MS) erfolgen. Die Auswahl des Analysators hat erhebliche Auswirkungen auf das Auflösungsvermögen und die Genauigkeit der Untersuchung. Besonders bei der Untersuchung komplexer Substanzgemische bietet sich eine Kopplung des MS an diverse Chromatographiemethoden zur vorherigen Auftrennung der Probe an. Für die Analyse und Quantifizierung von marinen Toxinen hat sich eine Kopplung an die Flüssigkeitschromatographie (LC) bewährt. Mittels LC kann das zu untersuchende Substanzgemisch vor Eintritt in die Ionenquelle des MS hinsichtlich der vorliegenden Polaritätsunterschiede der einzelnen Toxine aufgetrennt werden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden die Hauptanalysen mit Hilfe eines Triple-Quadrupol MS mit linearer Ionenfalle, gekoppelt an eine LC, durchgeführt. Zur Ionisierung der Probensubstanz wurde die Elektrospray-Ionisierung (ESI) genutzt. Dieses System wird nachfolgend näher erläutert.

2.2.1 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Ionenfalle, ESI)

Triple Quadrupol Instrumente zählen zu den klassischen „Arbeitspferden“ bei der Identifikation und Quantifizierung bekannter Substanzen (Krauss *et al.*, 2010). Auch die Detektion mariner Toxine erfolgt hauptsächlich mit Triple Quadrupol-Instrumenten. Diverse Screening-Methoden ermöglichen die Detektion multipler Toxine in einer Analyse (McNabb *et al.*, 2005, Fux *et al.*, 2007). Dabei sind die Analysen ohne aufwendige Derivatisierungs- und Aufreinigungsschritte möglich (Dominguez *et al.*, 2010). Diese Systeme weisen für diese Anwendung eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität auf, jedoch gehen Einschränkungen einher mit der relativ geringen Auflösung, in der Praxis meist Nominalmassenauflösung, so dass beispielweise m/z 101 von m/z 102 unterschieden werden kann. Somit ist diese Technik anfällig für Interferenzen zwischen Ionen gleicher Masse in komplexen Gemischen (Blay *et al.*, 2010), wodurch auch die Möglichkeit zur Detektion unbekannter Substanzen erheblich eingeschränkt wird (Krauss *et al.*, 2010).

Die Kombination mehrerer Massenspektrometer hintereinander wird auch als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet. Bei einem Triple Quadrupol MS (Abb. 8) werden drei Quadrupol-Einheiten hintereinander gereiht (Q1, Q2, Q3), welche sich jeweils aus vier parallelen Metallstäben, angeordnet um eine zentrale Achse, zusammensetzen. Das Trennprinzip basiert auf der Ablenkung von Ionen im elektrischen Feld. Durch Wechsel- und Gleichspannungsfelder an den Metallelektroden können ausgewählte Ionen die Anordnung passieren, während andere abgelenkt und damit zurückgehalten werden. Q1 und Q3 dienen hierbei den eigentlichen Messungen, Q2 hingegen wird zur gezielten Fragmentierung der Ionen eingesetzt.

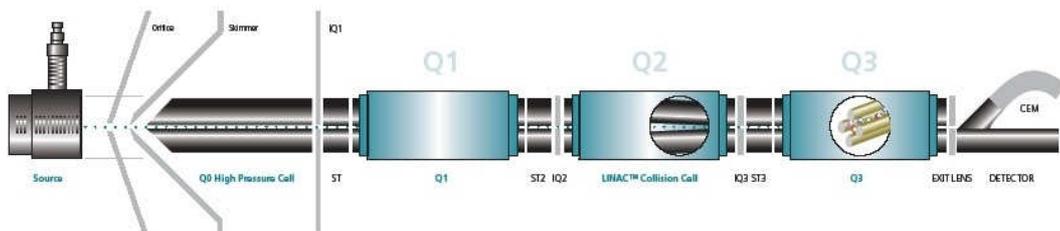


Abb. 8: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Triple Quadrupol Massenspektrometers (AB SCIEX, 2010).

Nach Ionisierung in der Ionenquelle werden die Ionen über ein Interface in den ersten Quadrupol Q1 gelenkt, der als Massefilter agiert und nur bestimmte m/z passieren lässt. Diese Ionen werden im Anschluss in der Kollisionszelle (Q2) zum Beispiel durch den Zusammenstoß mit Kollisionsgas (z.B. Stickstoff) in charakteristische Bruchstücke fragmentiert, welche in Q3 gescannt oder gefiltert und vom nachfolgenden Detektor erfasst werden. Die Analysen erfolgen im Vakuum, um einer vorzeitigen Entladung der Ionen durch Zusammenstöße mit Luftmolekülen entgegenzuwirken (McMaster, 2005).

Bei dem für die Analysen zu Grunde liegenden Triple Quadrupol Spektrometer besteht die Option den letzten Quadrupol (Q3) im normalen Modus oder als lineare Ionenfalle zu betreiben. Durch Anlegen eines definierten elektrischen Feldes an zusätzliche Endkappen-Elektroden des Quadrupols, werden Ionen entsprechend ihres m/z -Verhältnisses auf ellipsoiden Bahnen zurückgehalten und in der Falle gesammelt. Durch Veränderung des elektrischen Potentials ist bei Erreichen einer definierten Spannung das Austreten einzelner Ionen in axialer Richtung, entsprechend ihrem m/z -Verhältnis möglich, gefolgt von der anschließenden Detektion. Auf diese Weise lässt sich der gesamte Scanbereich abdecken. Durch Ionenfallen kann eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden. Im Vergleich zu einer herkömmlichen 3D Ionenfalle weist die lineare Variante eine höhere Effizienz im Zurückhalten der Ionen auf (Hager, 2002).

Abschließend soll an dieser Stelle auf die verwendete Ionenerzeugung eingegangen werden. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit die ESI-Methode angewendet. Diese Methode gehört zu den bei Atmosphärendruck stattfindenden Sprühhmethoden. Sie eignet sich für eine Vielzahl von Verbindungen diverser Polaritäten, und findet auch bei der Analyse mariner Toxine Anwendung (Quilliam, 2003). Im Vergleich zu anderen Verfahren gilt sie als eine äußerst schonende Methode, da der Analyt meist unfragmentiert ionisiert werden kann (Ekman, 2009). Das grundlegende Prinzip dieser Methode soll mit der Abbildung 9 schematisch verdeutlicht werden.

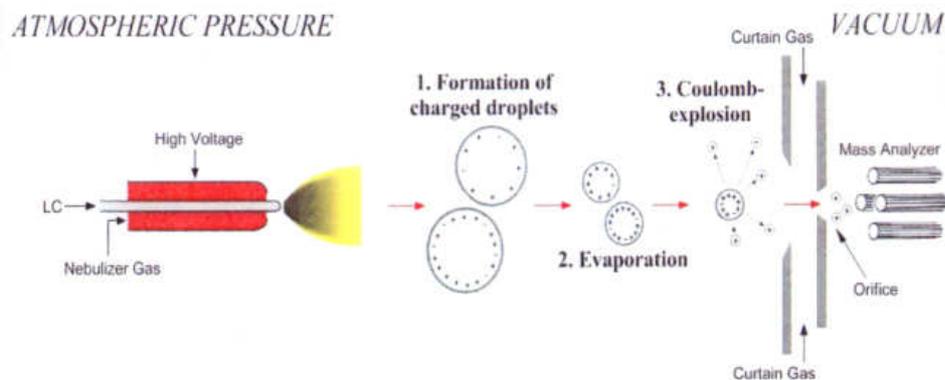


Abb. 9: Schematische Darstellung der Methode der Elektrospray-Ionisation (Applied Biosystems, 2003).

Durch das Anlegen einer hohen Spannung (bis zu 6 kV) an der LC-Kapillare, in Kombination mit einer Gegenelektrode entsteht ein starkes elektrisches Feld und es kann eine rasche und feine Zerstäubung der austretenden Flüssigkeit erfolgen. Ab Erreichen eines Schwellenwertes kommt es hierbei zur Ausbildung eines stabilen Sprays. Die Art der angelegten Spannung ist ausschlaggebend für die anschließende Ladung der erzeugten Ionen. Am Austritt bilden sich geladene Flüssigkeitströpfchen, welche durch die anschließende Evaporation des Lösungsmittels, meist durch Verwendung eines neutralen Trägergases (z.B. Stickstoff), verkleinert werden. Ab einem gewissen Radius der Tröpfchen zerfallen diese aufgrund von Abstoßungskräften, in sogenannten Coulomb-

sche Explosionen, ein weiteres Mal, resultierend in der Bildung freier geladener Ionen in der Gasphase. Durch die vorhandene Potentialdifferenz im Interface werden die Ionen ins das Massenspektrometer gelenkt (Lehmann, 1996; Hesse *et al.*, 2002).

Nachweismethoden

Grundlegend sind vier verschiedene Nachweismethoden möglich mit denen Rückschlüsse auf chemische Verbindungen gezogen werden können. Hierbei unterscheidet man zwischen Precursor Ionen Scan, Produkt Ionen Scan, Neutral Loss Scan und Selected Reaction Monitoring, auch als Multiple Reaction Monitoring bekannt (Ardrey, 2003). In der Abbildung 10 sind diese vier Detektionsmethoden schematische dargestellt.

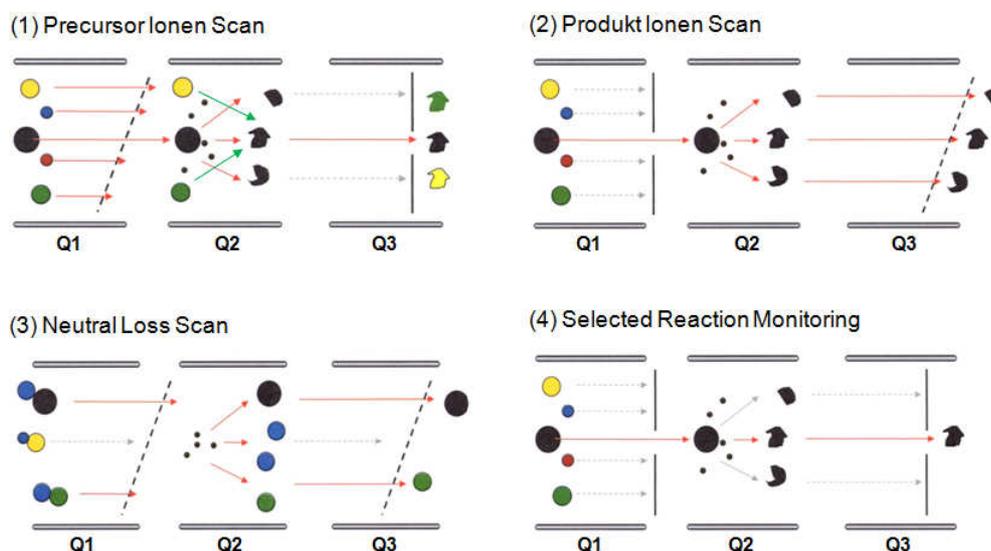


Abb. 10: Schematische Darstellung der MS/MS Detektionsmethoden mit (1) Precursor Ionen Scan, (2) Produkt Ionen Scan, (3) Neutral Loss Scan und (4) Selected Reaktion Monitoring (verändert aus Applied Biosystems, 2003).

Beim Precursor Ionen Scan (1) wird in Q1 der komplette gewünschte Massenbereich abgescannt und anschließend erfolgt die jeweilige Fragmentierung in der Kollisionszelle Q2. Q3 ist so eingestellt, dass ausschließlich ein Fragment (Produkt Ion) mit einem definierten m/z -Verhältnis gefiltert und zum Detektor durchgelassen wird. Somit lassen sich die Precursor Ionen ermitteln aus denen dieses spezielle Fragment resultiert. Beim Produkt Ionen Scan (2) wird in Q1 ein spezifisches Precursor Ion des betrachteten Massebereiches isoliert. In Q3 erfolgt die Selektion aller resultierenden Produkt Ionen, die bei der Fragmentierung in der Kollisionszelle (Q2) entstanden sind. Somit erhält man die charakteristische Fragmentierung eines einzelnen Precursor Ions. Mit Hilfe des Neutral Loss Scan (3) werden Ionen ermittelt, die mit einem spezifischen Masseverlust fragmentieren. Da es innerhalb von Molekülen zu Umlagerungsreaktionen kommen kann, die auf spezifische Strukturmerkmale hinweisen und mit einem konstanten Masseverlust in Verbindung

gebracht werden können, lassen sich bei diesem Modus alle Ionen ermitteln, bei denen dieses Strukturmerkmal vorliegt. Bei diesem Analyse-Modus scannen Q1 und Q3 synchron, wobei Q3 jedoch um dem Massenverlust entsprechende Massendifferenz versetzt scannt. Mit der Selected Reaction Monitoring-Methode (4) wird in Q1 ein Precursor Ion mit definiertem m/z -Verhältnis aus allen Ionen isoliert. Diesem Ion lässt sich ein spezifisches Produkt Ion zuordnen, welches in Q3 nach der Fragmentierung selektiert wird. Mit Hilfe dieser Monitoring Methode sind quantitative Analysen eines gewünschten Moleküls möglich, bei denen einige wenige charakteristische Precursor Ionen und deren zugehörige Produkt Ionen betrachtet werden.

Mit Hilfe eines Triple Quadrupol MS lassen sich Rückschlüsse auf die möglichen Strukturen eines Moleküls ziehen, jedoch sind hierbei gegebenenfalls mehrere Strukturzuordnungen möglich. Durch hochauflösende MS, beispielweise der Fourier - Transform - Ionenzyklotron - Resonanz - Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) sind exakte Massebestimmungen möglich, die Aufschluss auf die Elementarzusammensetzung eines Moleküls geben. Die FT-ICR-Technik basiert dabei auf dem Prinzip, dass Ionen in einem starken, homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten, spezifische Kreisbewegungen, entsprechend unterschiedlicher m/z -Verhältnisse, aufweisen. Durch das Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes können hierbei Ionen gezielt angeregt werden, wenn die Zyklotron-Frequenz mit der angelegten Wechselfeld-Frequenz übereinstimmt. Im Resonanzfall bewegen sich die Ionen auf vergrößerte Bahnen dichter an die Detektorplatten, welches erfasst werden kann. Die Variation des Wechselfeldes ermöglicht die Detektion von Ionen unterschiedlicher Masse. Die hohe Genauigkeit resultiert u.a. aus der Möglichkeit, Ionen mehrfach zu analysieren. Je länger dabei die gewählte Aquisitionszeit desto besser ist die resultierende Auflösung (Lehmann, 1996; Ekman, 2009).

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Feldkampagne FS *Heincke* 2011

3.1.1 Untersuchungsgebiet

Unter dem Begriff „NORCOHAB III“ erfolgte in der Zeit vom 25.05. bis 11.06.2011 eine Feldkampagne mit der FS *Heincke* (HE358) im Nordseeraum. Start- und Zielhafen war Bremerhaven (53° 33' N, 8°35' E). Die Abbildung 11 verdeutlicht die Gesamtroute dieser Forschungsausfahrt und zeigt die hierbei ausgewählten Untersuchungsgebiete.

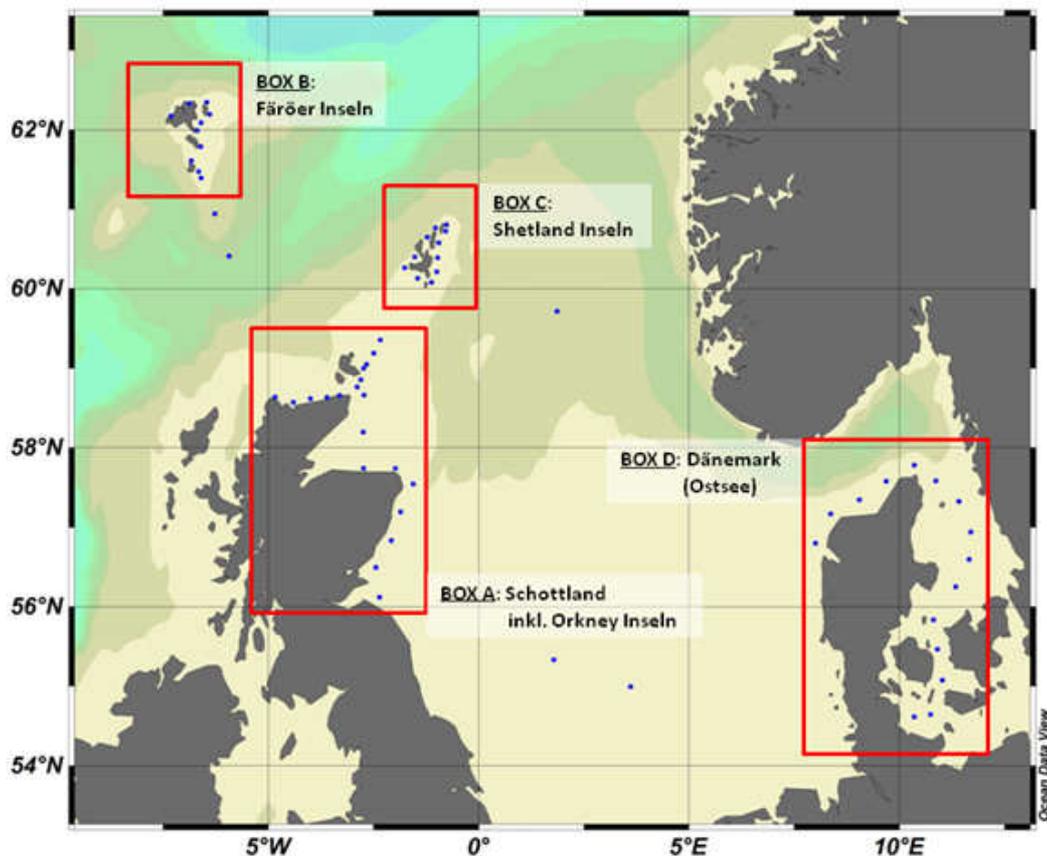


Abb. 11: Übersichtskarte der Feldkampagne der FS *Heincke* 2011. Stationen sind durch blaue Markierungen innerhalb der rot markierten Untersuchungsgebiete A bis D dargestellt.

Insgesamt wurden auf dieser Kampagne 62 Stationen beprobt. Als Untersuchungsgebiete wurden die West- und Ostküste Schottlands inkl. der Orkney Inseln (Box A), die Färöer Inseln (Box B), die Shetland Inseln (Box C) und die Ostseeregion (Box D) ausgewählt. 5 weitere Stationen verteilen sich auf die Überführungen zwischen den jeweiligen Gebieten. Mit der Abbildung 12 ist die Verteilung der jeweiligen Stationen in den Gebieten verdeutlicht. Eine detaillierte Übersicht der Stationen unter Angabe der Koordinaten kann dem Anhang entnommen werden (Anlage 1).

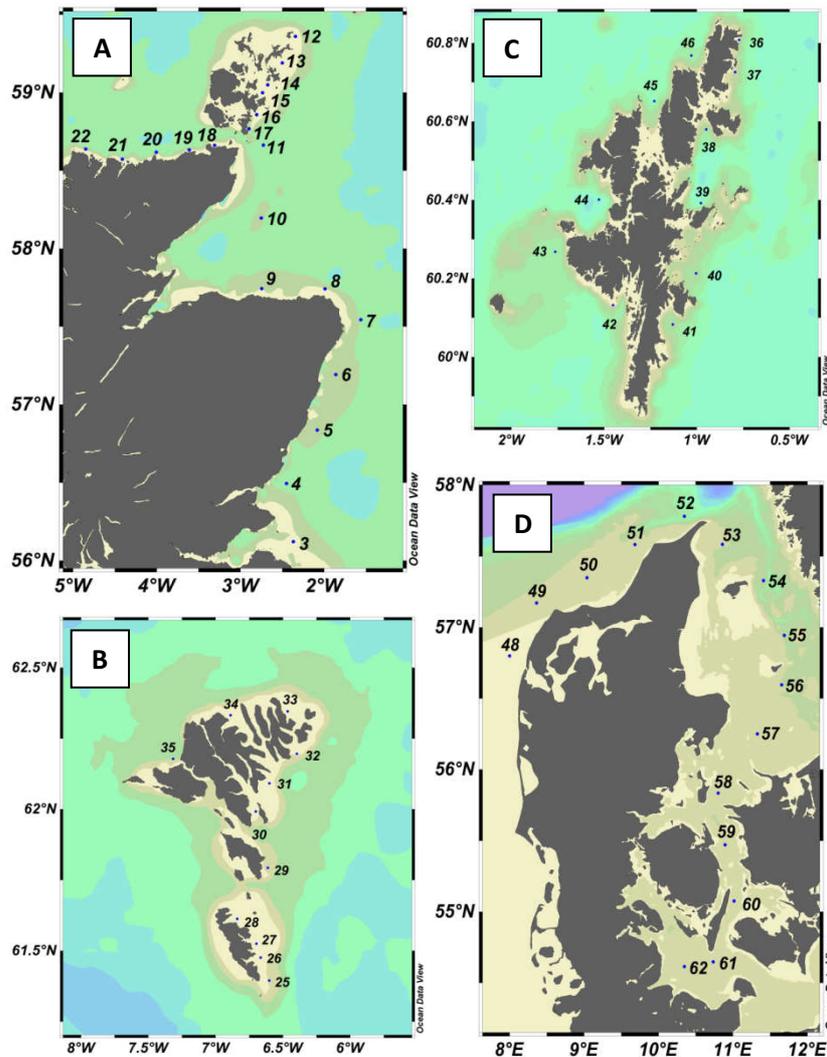


Abb. 12: Darstellung der Stationsverteilung in den einzelnen Untersuchungsgebieten der Feldkampagne 2011 mit (A) Schottland inkl. Orkney Inseln (Station 3-22), (B) Färöer Inseln (Station 25-35), (C) Shetland Inseln (Station 36-46) und (D) Ostsee (Station 48 - 62).

3.1.2 Ozeanographische Beobachtungen

Zur Bewertung der ozeanographischen Bedingungen werden insbesondere die Parameter Temperatur, Salzgehalt und Sauerstoff herangezogen. An jeder Station wurden Tiefenprofile mit einer Leitfähigkeit-, Temperatur-, Tiefen- und Sauerstoffsonde, umgangssprachlich CTD (engl. conductivity, temperature, depth) durchgeführt. Hierfür wurde die bordeigene CTD der FS *Heincke* verwendet. Bei diesem Messinstrument handelte es sich um eine SBE911plus der Firma Sea-Bird Electronics Inc. (Washington, USA), welche zusätzlich mit weiteren Sensoren ausgestattet war. In der Tabelle 1 ist die Konfiguration der kompletten CTD-Einheit mit Angabe aller Sensoren sowie Typenbezeichnung dargestellt. Eine genaue Spezifikation der einzelnen Sensoren wurde dem Anhang beigelegt (Anlage 2).

Tab. 1: Auflistung der Sensorik der CTD-Einheit mit Typenbezeichnung.

Instrument	Typ
CTD	SBE911plus
Wasserschöpfereinheit	SBE32 (12 x 6 Liter)
Sensorkpaket	
Pumpe	SBE5T
Temperatursonde	SBE3plus
Leitfähigkeitssonde	SBE4c
Sauerstoffsonde	SBE43
Chlorophyllsensor	Fluorometer WetLabs Eco-AFI/Fl
Transmissometer	WetLabs CStar, 25 cm
Altimeter	Benthos PSA 900D
CTD Deckseinheit	SBE11



Die Bedienung des Gerätes erfolgte über einen Einleiterdraht aus dem Windenleitstand via Desktop-PC über die zugehörigen Seasave Software (Version 7.17, Sea-Bird Electronics, Inc. 2010). Als Aufnahmezeit stehen 24 Hz auf allen Kanälen zur Verfügung (24 Messungen pro Sekunde). Die CTD wurde mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,5 m/s abgelassen. Das Tiefenprofil wurde online am Rechner verfolgt und kontrolliert. Das Abwärtsprofil der CTD dient der Ermittlung der hydrographischen Parameter, während das Aufwärtsprofil zur Gewinnung von Wasserproben genutzt wird.

Die Rohdaten der Abwärtsprofile wurden anschließend mit der SBE Data Processing Software (Version 7.21, Sea-Bird Electronics, Inc. 2010) weiter bearbeitet. Hierbei erfolgte eine Kontrolle wie auch ein Mitteln der Daten in 1 m Abständen. Die Temperatur wird nach IST-90 Standard angegeben. Die anschließende Visualisierung der jeweiligen Tiefenprofile erfolgte mit Hilfe der Software Ocean Data View (Version 4.3.6., Rainer Schlitzer, 2010).

3.1.3 Probennahme

An jeder Station wurden Wasserproben aus vorab festgelegten Wassertiefen (3 m, 8 m, 15 m) mit Hilfe des Rosettenschöpfers der SBE911plus entnommen. Für spätere Nährstoffanalysen wurden 100 ml Seewasser unter Vakuum über einen 0,2 µm Membranfilter (Ø 47 mm, Whatman® Nucleopore, Dassel, Deutschland) filtriert. Filter wie auch Filtrationseinheit wurden vorab mit destilliertem Wasser wie auch filtriertem Probenwasser gespült. Das Filtrat wurde anschließend in 50 ml Weithalsflaschen (PE, KAUTEX TEXTRON GmbH & Co. KG, Bonn, Deutschland) abgefüllt und sofort bei -25 °C eingefroren.

Um Rückschlüsse auf die vorhandene Menge an Phytoplankton zu erlauben, erfolgte die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes. Hierfür wurde an jeder Station aus den drei Tiefen eine definierte Menge Seewasser in Braunglasflaschen abgefüllt. Abhängig vom Gehalt in der Probe wurden 500 ml bis 1000 ml mittels Vakuum über einen Glasfaserfilter (GF/F) mit einer Porengröße von $0,7\ \mu\text{m}$ (\varnothing 47 mm, Whatman®, Dassel, Deutschland) filtriert. Die Filter wurden vorab mit $0,2\ \mu\text{m}$ steril filtriertem Seewasser eingeweicht, und abschließend damit auch nachgespült. Die Filtrationseinheit wurde während des Vorgangs mit Alufolie abgedunkelt. Filtriertes Seewasser wurde je nach Bedarf mit Hilfe von VacuCap 90 Flaschenaufsatzfiltern ($0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße, Membran \varnothing 90, Filterfläche $60\ \text{cm}^2$; PALL GmbH, Dreieich, Deutschland) hergestellt und zwischengelagert. Filter wurden der Filtration entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäße (neoLab Migde Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei $-25\ ^\circ\text{C}$ an Bord eingefroren. Die anschließende Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei $-80\ ^\circ\text{C}$.

Zur Beprobung von *Azadinium* spp. wurde aus jeder Wassertiefe 1 l Seewasser entnommen und mit einer $20\ \mu\text{m}$ Nitex Gaze vorfiltriert. Diese Proben wurden dann vereinigt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen von 3 l mittels Vakuum über einen $5\ \mu\text{m}$ Polykarbonat-Filter (Nucleopore Membran Filter, \varnothing 47 mm, Whatman®, Dassel, Deutschland) filtriert. Die Filter wurden vorsichtig der Filtration entnommen und bis zur weiteren Aufbereitung in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sartstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) gelagert.

Mit Hilfe eines Planktonnetzes (\varnothing 20cm, Maschenweite: $20\ \mu\text{m}$, HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH, Kiel, Deutschland) wurden an jeder Station 1 bis 2 vertikale Netzzüge, mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $0,5\ \text{m/s}$ durch die oberen 20 m der Wassersäule durchgeführt (Abb. 13, links). Proben wurden in einem Messzylinder mit $0,2\ \mu\text{m}$ filtriertem Seewasser auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Bei Entnahme zweier Netzzüge wurden diese vereinigt. Gesamtvolumina wurden entsprechend notiert.



Abb. 13: Planktonnetz an Bord der FS Heincke (links); Gazeturm zur Fraktionierung der Planktonproben (rechts).

Vom Gesamtvolumen eines Netzzuges wurden für Zählproben und taxonomische Untersuchungen definierte Volumina abgenommen. Das noch zur Fraktionierung stehende Volumen wurden entsprechend notiert und die Probe mit Hilfe eines Gazeturms (Abb. 13, rechts) in drei Fraktionen (200 µm, 50 µm und 20 µm) aufgeteilt. Vom Gazebelag wurde die jeweilige Fraktion mit 0,2 µm filtriertem Seewasser in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf 45 ml mit filtriertem Seewasser aufgefüllt.

Für die Bestimmung der lipophilen Toxine wurde hiervon ein Aliquot von 20 ml abgenommen und in neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Mittels Zentrifuge mit Aufschwingrotor (Allegra® X-15R, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) wurde die Probe bei 4°C für 15 min bei 3220 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das feuchte Pellet wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (neoLab, Heidelberg, Deutschland) überführt und erneut für 15 min bei 16100 x g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Restseewasserüberstand wurde abpipettiert. Das Pellet stand dann für die anschließende Extraktion der Toxine zur Verfügung.

3.1.4 Toxin Extraktion

Die Extraktion der Azaspirsäuren (engl. azaspiracids) von den Polykarbonat-Filtern erfolgte in den jeweiligen Zentrifugenröhrchen. Die Filter wurden mit 0,5 oder 1 ml Methanol (MeOH, für präparative Chromatographie, Prepsolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), abhängig von der vorhandenen Biomasse, gespült. Dieser Vorgang wurde mehrfach bis zur vollständigen Entfärbung des Filters wiederholt. Der Extrakt wurde in einen 0,45 µm Zentrifugenfilter (Ultrafree Tubes, Filter Unit Inserts 0,45 µm Durapore® HV, Millipore, Eschborn, Deutschland) überführt und für 30 Sekunden bei 800 x g mit der 5415R zentrifugiert. Das Filtrat wurde in Autosamplervials (2 ml, Agilent Technologies GmbH, Böblingen Deutschland) überführt und dieses mit einer Bördelzange verschlossen und bis zur Analyse bei -25 °C gelagert.

Die Zellpellets der fraktionierten Planktonproben wurden mit einer definierten Menge MeOH (0,5 bis 1 ml) in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die Zellen zu homogenisieren und zu extrahieren, wurden 0,9 g Keramik-Kügelchen (Lysing Matrix D, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) hinzugegeben. Die Homogenisierung erfolgte in einem FastPrep FP 120 Instrument (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) bei 6,5 m/s für 45 Sekunden. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe der 5415R für 15 min bei 16100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 0,45 µm Zentrifugenfilter überführt und erneut für 30 Sekunden zentrifugiert (800 x g). Das Filtrat wurde in Autosamplervials überführt und bis zur Analyse bei -25 °C gelagert.

3.1.5 Messungen der Feldproben via LC-MS

(1) Analytische Reagenzien und Standards

Wasser wurde mit Hilfe einer ELGA PureLab Anlage (ELGA Labwater, Celle, Deutschland) deionisiert und aufgereinigt ($< 18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$). Des Weiteren wurden Ameisensäure (A3858, 98 - 100 % rein, Biochemica, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Ammoniumformiat (25204, 99,9 % rein, Honeywell Riedel de Haen®, Seelze, Deutschland) für die Pufferherstellung benötigt. Das Lösungsmittel Acetonitril (99,9 % rein, hypergrade für LC/MS LiChrosolv®) wurde über die Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Zur Kalibrierung, Identifikation und Quantifizierung der lipophilen Toxine standen zwei verschiedene Standardlösungen zur Verfügung. Für die Analyse der Extrakte der Toxin-Filter wurde ein AZA-1-Standard mit einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet, welcher durch das Marine Institute in Galway (Irland) zur Verfügung gestellt wurde. Ein Multi-Toxin-Standard wurde freundlicherweise durch Dr. Michael Quilliam (Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Halifax, Kanada) zur Verfügung gestellt. Dieser Standard diente zur Bewertung der lipophilen Toxine in den Fraktionen der Netzzüge. Die Zusammensetzung des Standards kann der Tabelle 2 entnommen werden. Als Blindwert für die Messungen wurde MeOH (98,9 % rein, hypergrade for LC/MS LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Tab. 2: Auflistung der Komponentenzusammensetzung des Multi-Toxin-Standards mit Konzentrationsangaben der einzelnen Toxine in $\mu\text{g/ml}$.

Toxin	Abk.	MW [g/mol]	Konzentration	
			[nM]	[$\mu\text{g/ml}$]
Domoinsäure	DA	311	1000	0,31
Dinophysistoxin 1	DTX-1	818	600	0,49
Okadasäure	OA	804	600	0,48
Gymnodimin	GYM1	507	60	0,03
Pectenotoxin 2	PTX-2	858	250	0,21
Pectenotoxin 2 Secosäure	PTX2-sa	876	50	0,04
Pectenotoxin 11	PTX-11	874	250	0,22
Azaspirsäure 1	AZA-1	841	60	0,05
13-Desmethylspirolid C	SPX-1	691	60	0,04
Yessotoxin	YTX	1142	200	0,23

(2) LC-MS Analyse

Die Toxinanalyse wurde mit einem AB SCIEX 4000 Q Trap® Triple Quadrupol Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt, welches mit einer Turbo V™ Ionenquelle ausgestattet ist. Das Massenspektrometer ist an einen Flüssigkeitschromatograph (LC) der

Firma Agilent (Modell 1100, Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt. Die Abbildung 14 zeigt den Aufbau des Komplettsystems an Bord der FS *Heincke*.



Abb. 14: Triple Quadrupole Massenspektrometer 4000 QTRAP® mit LC-Ankopplung an Bord der FS *Heincke*.

Der LC ist ausgestattet mit einem Lösungsmittelreservoir, einem Lösungsmittelentgaser (G1379A), einer Binär-Pumpe (G1312A), einem temperierbarem Säulenofen (G1316A) und einem auf 4 °C gekühlten Autosampler (G1329A). Die Bedienung des Gerätes erfolgt mit der zugehörigen Analyst Software (Version 1.4.2., Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Für die Messungen an Bord der FS *Heincke* wurde das System mit Druckluft aus der Maschine versorgt. Diese wurde vor Eintritt in einen Stickstoffgenerator (N2-22, Parker Balston Analytical Gas Systems, Maidstone, Großbritannien) mit Hilfe eines Aktivkohlefilters (Option Carbon Absorber P/N 159.003678, Parker Filtration and Separation, Etten-Leur, Niederlande) aufgereinigt. Der Generator liefert Stickstoff mit einem Druck von 7 bar.

Die Trennung der lipophilen Algentoxine erfolgte auf einer C 8 Umkehrphasen HPLC-Säule. Diese Säule (50 x 2 mm) ist gepackt mit 3 µm Hypersil BDS 120 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und wurde bei der Messung auf 20°C temperiert. Die Flussrate für die Auftrennung wurde mit 0,2 ml min⁻¹ festgelegt. Für die Gradienten-Elution wurden zwei Eluenten A und B eingesetzt. Der Eluent A bestand aus Wasser (MilliQ), Eluent B bestand aus einer Mischung von Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 95:5 (v:v). Beide Eluenten enthalten zusätzlich 50 mM Ameisensäure und 2 mM Ammoniumformiat.

Extrakte der 5 µm Toxin Filter

Die Extrakte der Toxinfilter wurden ausschließlich auf die Azaspisäuren 1 bis 3 untersucht. Das Injektionsvolumen für die Analyse betrug 5 µL Probenextrakt. Ein kompletter Messdurchlauf benötigt 26 Minuten. Zu Beginn erfolgte die Äquilibration der Trennsäule für 8 min mit 30 % Eluent

B. Anschließend erfolgte der eigentliche Durchlauf beginnend mit einer linearen Gradienten-Elution innerhalb von 8 min bis zum Erreichen von 100 % B. Während der anschließenden isokratischen Elution (bis zur 15. Minute) ändert sich die Zusammensetzung der Eluenten nicht und beträgt somit 100 % B. Das System kehrt dann (nach 18 min) in seinen Ausgangszustand (30 % B) zurück. Folgende Einstellungsparameter wurden für AZA-Methode am Massenspektrometer eingestellt: Curtaingas: 10 psi, CAD: Medium, Ionisationsspannung 5500 V, Umgebungstemperatur, Nebulizergas: 10 psi, Trockengas: Aus, Interface Heater: An, Declustering Spannung: 100 V, Eingangsspannung: 10 V, Ausgangsspannung: 30 V. Selective Reaction Monitoring (SRM) erfolgte im positiven Ionenmodus, mit einer Messzeit für jeden Übergang von 20 ms. Die Tabelle 3 verdeutlicht die betrachteten Massenübergänge unter Angabe der angewendeten Kollisionsenergie.

Tab. 3: AZA-SRM-Methode mit Angabe der betrachteten Massenübergänge und eingesetzten Kollisionsenergie (CE) in V zur Detektion von Azaspirsäure 1, -2, und 3.

Toxin	Massenübergang [m/z]	CE [V]	Massenübergang [m/z]	CE [V]
AZA-1	842 → 824	40	842→672	70
AZA-2	856 → 838	40	856→672	70
AZA-3	828 → 810	40	828→658	70

Extrakte der Planktonproben der Netzzüge

Die Extrakte der fraktionierten Planktonproben wurden mit einer Multi-Toxin-Methode vermessen. Der Chromatographie-Lauf unterteilt sich hierfür, entsprechend der Toxine, in die folgenden drei Perioden:

- (1) 0 – 8,75 min für Domoinsäure
- (2) 8,75 – 11,20 min für Gymnodimin und Spirolide
- (3) 11,20 – 18,0 min für Okadasäure, Dinophysistoxine, Pectenotoxine, Yessotoxin und Azaspirsäure 1

Die Äquilibration der Trennsäule erfolgte hierbei in 12 min mit 5 % B, gefolgt von einem linearen Gradienten bis zum Erreichen von 100 % B (in 10 min). Die anschließende isokratische Elution ist in der 15 Minute beendet. In der 18 Minute sind die Ausgangsbedingungen von 5 % B wieder erreicht. Ein kompletter Durchlauf beträgt somit 30 Minuten. Die nachfolgende Tabelle 4 veranschaulicht die Einstellungsparameter des Massenspektrometers, unterteilt in die 3 festgelegten Perioden der Multi-Toxin-Methode. Die SRM-Messungen erfolgten im positiven Ionenmodus.

Tab. 4: Einstellungsparameter des Massenspektrometers für die Multi-Toxin Detektionsmethode, unterteilt in die Perioden (1) für DA (2) für GYM und SPX und (3) für OA, DTX, PTX, YTX, AZA-1.

Parameter	Periode 1 0 - 8,75 min	Periode 2 8,75 - 11,2 min	Periode 3 11,2 - 18,0 min
Curtaingas	20 psi	10 psi	10 psi
CAD	Medium	Medium	Medium
Ionisationsspannung	5500 V	5500 V	5500 V
Temperatur	275 °C	Umgebung	Umgebung
Nebulizergas	50 psi	10 psi	10 psi
Trockengas	50 psi	-	-
Interface Heater	On	On	On
Declustering Spannung	50 V	50 V	50 V
Eingangsspannung	10 V	10 V	10 V
Austrittsspannung	15 V	15 V	15 V

Die Tabelle 5 liefert die Übersicht über die analysierten Toxine und zeigt deren spezifische Massenübergänge vom Precursor Ion zum Fragment Ion auf. Weiterhin ist die verwendete Kollisionsenergie in V angegeben. Die Messzeit für jeden Übergang betrug 50 ms.

Tab. 5: SRM Methode: Berücksichtigte Massenübergänge der LC-MS Analyse (Precursor Ion → Fragment Ion) der Toxin-detektion unter Angabe der eingesetzten Kollisionsenergie (CE) in Volt.

Toxin	Massenübergang [m/z]	CE [V]
DA	312 → 266	30
	312 → 161	20
GYM	508 → 490	40
Spirolid A	692 → 150	55
13-Desmethylspirolid C	692 → 164	55
Spirolid C	706 → 164	55
20-Methylspirolid G	706 → 164	55
OA	822 → 223	55
DTX-1	836 → 237	55
DTX-2	822 → 223	55
OA-d8	946 → 223	55
PTX-2	876 → 213	55
PTX2-sa	894 → 213	55
PTX-11	892 → 213	55
AZA-1	842 → 824	55
YTX	1160 → 965	55

Das Toxin Domoinsäure (DA) wird mit zwei Übergängen, nämlich 312 m/z → 266 m/z und 312 m/z → 161 m/z (vgl. Tab. 5) bestimmt, weil der empfindliche Übergang 312 m/z zu 266 m/z sehr unspezifisch ist und eine zweifelsfreie Zuordnung bei nur einem Übergang nicht eindeutig gewährleistet ist.

(3) Auswertung und Bestimmung der Toxinkonzentration

Mit Hilfe der Analyst Software (Version 1.5, Applied Biosystems) wurden die aufgenommenen Ionenspurchromatogramme manuell integriert. Für die Identifizierung der Toxine wurden neben den entsprechenden Massenübergängen zusätzlich die Retentionszeiten der Toxine im Standard mit denen in der Probensubstanz verglichen. Weiterhin erfolgte die Begutachtung der Total Ionen Chromatogramme (TIC), welche die Summe aller auftretenden Toxine nach dem Zeitpunkt ihrer Elution in einer Probe widerspiegeln. Über das Q1/Q3-Masseverhältnis konnte eine zusätzliche Kontrolle für das jeweilige Toxin durchgeführt werden. Produkt Ionen Scans und CID-Spektren lieferten charakteristische Fragmentierungsmuster zur Identifizierung und konnten mit entsprechender Literatur verglichen werden.

Für die Auswertung wurde ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) von 3 als Nachweisgrenze berücksichtigt. Da das Hauptaugenmerk auf der eigentlichen Detektion der Toxine lag, wurde S/N = 5 als Bestimmungsgrenze angesehen und zur Quantifizierung herangezogen. Das Ergebnis der manuellen Integration wurde zur weiteren Bearbeitung aus dem Programm exportiert.

Da Fläche und Konzentration des Standards bekannt sind, lässt sich mit Hilfe der folgenden Gleichung (1) die absolute Konzentration eines Toxins im Probenextrakt bestimmen.

$$c_{\text{Extrakt}} = (A_{\text{Extrakt}} / A_{\text{Standard}}) \times c_{\text{Standard}} \quad (\text{Gl. 1})$$

- c: Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
A: Analytical Peak Area in cps

Über das verwendeten Extraktionsvolumen lässt sich anschließend die Masse des Toxins im Extrakt bestimmen (Gleichung 2).

$$m_{\text{Toxin}} = c_{\text{Toxin}} \times v_{\text{Extrakt}} \quad (\text{Gl. 2})$$

- m: Toxin im Extrakt in μg
c: absolute Konzentration im Extrakt in $\mu\text{g/ml}$
v: verwendetes Extraktionsvolumen in ml

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, werden die berechneten Massen der einzelnen Toxine auf die jeweiligen Gesamtvolumina bezogen. Im Falle der fraktionierten Netzzugproben erfolgte eine Hochrechnung der Konzentration auf das zur Verfügung stehende Gesamtvolumen, resultierend in den Angaben eines Toxins in ng je Netzzug. Mit Hilfe des Durchmessers des Planktonnetzes und der beprobten Wassertiefe kann auf ein durchschnittliches Wasservolumen von $2,5 \text{ m}^3$ geschlossen werden. Dieses Volumen wird dabei indirekt allen Stationen zugrunde gelegt. Nicht

im Standard enthaltene Toxine wurden als Äquivalente angegeben. Dies betrifft insbesondere die Gruppe der Spirolide, Pectenotoxine wie auch den C₈-Diolester (OA-d8). Für die Spirolide erfolgten die Berechnungen in Äquivalenten zu 13 Desmethylspirolid C (SPX-1). OA-d8 wird als Äquivalent zur Okadasäure (OA) angegeben.

3.1.6 Nährstoffanalysen

Die Nährstoffanalysen erfolgten extern in Kooperation mit der Universität Oldenburg und wurden am Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM) durchgeführt. Es wurden hierbei die Konzentrationen an Nitrat, Nitrit, Phosphat und Silikat ermittelt. Die Analysen erfolgten nach Grasshoff *et al.* (1999) und wurden ungefähr 4 Monate nach Beendigung der Ausfahrt durchgeführt. Nach Dore *et al.* (1996) hat die Einlagerungsdauer für diesen Zeitraum keine Auswirkungen auf die vorliegenden Konzentrationen, vorausgesetzt die Proben wurden nach der Entnahme sofort eingefroren, welches der Fall war. Um Minderbefunde, besonders bei der Analyse der Silikatkonzentration entgegen zu wirken, wurden die Proben über die Dauer von zwei Tagen langsam im Kühlschrank aufgetaut (B. Schnetger, 2011, pers. Mitteilung).

3.1.7 Chlorophyllanalysen

Die Chlorophyll Extraktion wurde in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um Verfälschungen und Schädigungen der Pigmente durch Lichteinfluss zu vermeiden. Konzentrationen an Chlorophyll *a* wurden mittels Fluorometrie bestimmt, unter Berücksichtigung der Phaeophytinkonzentration. Phaeophytin gilt hierbei als Chlorophyll-Abbauprodukt, u.a. zurückzuführen auf Verdauungsvorgänge des Zooplanktons. Die Aufarbeitung sowie die anschließende Berechnung erfolgten in Anlehnung an die Vorschriften des International Council for the Exploration of the Sea (ICES, Aminot & Rey, 2000).

Für die Analysen wurden die gefrorenen Filter in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) mittels Pinzette überführt. Nach Zugabe von 10 ml Aceton (90 %, Aceton / Wasser, 90:10, v/v, Aceton für HPLC und MilliQ, A1567, Biochemica, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wurden die Röhrchen verschlossen und bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank gelagert. Nacheinander wurden die Proben mit Hilfe eines Sonifikators (Sonifier 250, Branson Ultrasonics BV, Eemnes, Niederlande) auf Eis für eine Dauer von 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Output control 5-6, Duty cycle 37 %) und anschließend die Zerstörung der Filter visuell begutachtet und ggf. wiederholt. Die aufgearbeiteten Proben wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert, um eine zufriedenstellende Lösung der Pigmente zu erlauben. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 4 °C bei 3050 x g (Sigma 3K-1, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Oste-

rode, Deutschland) wurde der Überstand zur Messung abgenommen und in Rundküvetten überführt. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte mit dem TD 700 Tischfluorometer von Turner Designs (NORDANTEC GmbH, Bremerhaven, Deutschland). Die Kalibrierung des Gerätes mit einer Chlorophyll-*a* Standardlösung war bereits durch das Laborpersonal erfolgt, so dass Säurekoeffizient (F_m) und Kalibrierungsfaktor (K_x) für die anschließenden Berechnungen bekannt waren und übernommen werden konnten ($F_m = 2,10$; $K_x = 0,5402$). Als Blindwert für die Messungen diente 90 % -iges Aceton. Zusätzlich wurden als Kontrolle Leerfilter mit aufgearbeitet und vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 665$ nm ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von zwei Tropfen 1 M Salzsäure (HCl) direkt in die Küvette, die Vermischung dieser und die erneute Messung der Fluoreszenz. Durch die Zugabe der HCl kann die Chlorophyllkonzentration um den Phaeophytin Gehalt korrigiert werden. Mit Hilfe der folgenden Gleichung (3) nach Holm-Hansen *et al.* (1965) kann aus den ermittelten Fluoreszenzwerten, unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenvolumina, die Konzentrationen an Chlorophyll *a* in $\mu\text{g} / \text{l}$ berechnet werden.

$$\text{Chlorophyll } a \text{ } (\mu\text{g/l}) = (F_m / (F_m - 1)) \times (F_{VS} - F_{NS}) \times K_x \times (v_1/v_2) \quad (\text{Gl. 3})$$

F_m, K_x :	Säurekoeffizient für Chlorophyll a und Faktor der Kalibrierung
F_{VS} :	Fluoreszenz vor Zugabe der HCl
F_{NS} :	Fluoreszenz nach der Zugabe der HCl
v_1 :	Extraktionsvolumen Aceton in ml.
v_2 :	Probenvolumen in ml

3.1.8 Multivariate Statistik

Mit Hilfe multivariater Methoden wurde überprüft in wie weit sich Korrelationen zwischen Toxin-konzentrationen und aufgenommenen Umweltparameter aufzeigen lassen. Für die Durchführung der Analysen wurde die Software R (Version 2.11.1, 31.05.2010) verwendet. Die einzelnen Toxine wurden hierfür in Gruppen zusammengefasst, dies betrifft insbesondere die DSP-Toxine OA und DTX, die Pectenotoxine und die Spirolide. Es wurden alle Konzentrationen ab der Nachweisgrenze berücksichtigt. Für die Umweltparameter erfolgte eine tiefengewichtete Mittelung der Konzentrationen. Mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA), auf Basis der maximalen Korrelation, erfolgte eine Überprüfung auf Klassifizierung der einzelnen Stationen hinsichtlich ihrer Umweltparameter. Pair-Plots wurden für die Visualisierung der Datenlage und Verknüpfung der einzelnen Parameter untereinander herangezogen. Mit Hilfe von Redundanzanalysen (RDA) erfolgte eine übergreifende Überprüfung auf Korrelationen zwischen Toxinkonzentrationen und Begleitparameter in einem Untersuchungsgebiet. Weiterhin wurde das Tool der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) herangezogen um Untersuchungsgebiete von einander abzutrennen.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Azaspirsäuren

3.2.1 Probenübersicht und Vorbereitung

Für die Analysen unbekannter Azaspirsäuren standen Kulturoisolate von *Azadiunium poporum* aus der Nordsee, China und Korea sowie Isolate der neuentdeckten Art *Amphidoma languida* aus Irland zur Verfügung. Im Rahmen der Untersuchungen erfolgte weiterhin die Analyse von archivierten Probenextrakten diverser Feldkampagne, die im Zeitraum 2007 bis 2011 stattfanden. Die Tabelle 6 veranschaulicht dabei die einzelnen Kampagnen und deren Untersuchungsgebiete.

Tab. 6: Übersicht des herangezogenen Probenmaterials der Feldkampagnen 2007 - 2011 für die Analyse unbekannter AZAs unter Angabe der Durchführungszeit, des Untersuchungsgebietes und Anzahl der Stationen.

Nr.	Feldkampagne		Untersuchungsgebiet	Stationen
1	FS <i>Poseidon</i> (PO352)	10.06.-04.07.2007	Ostküste Schottland inkl. Orkneys, Südküste Norwegen, Nordküste Dänemark	37
2	FK <i>Uthörn</i> (HAB DK)	07.07.-18.07.2008	Deutsche Bucht, Dänische Westküste	31
3	FS <i>Heincke</i> (HE302)	21.04.-13.05.2009	Deutsche Bucht, Ostküste Schottland inkl. Orkneys, Ost- und Südküste Irland	60
4	Ebro Delta	01.05 01.07.2010	Spanien: Alfacs Bucht, Fangar Bucht	16
5	Puerto Deseado	02.10.-12.10.2010	Argentinische Küste	42
6	FS <i>Heincke</i> (HE358)	25.05.-11.06.2011	Ostküste und Nordküste Schottland inkl. Orkneys, Shetland Inseln, Färöer Inseln, Ostküste Dänemark	62

Das Probenmaterial setzte sich je Station aus Extrakten fraktionierter Netzzugproben (200 µm, 50 µm, 20 µm) sowie Extrakten der 3 µm bzw. 5 µm Fraktion aus diversen Tiefen (20 m, 10 m, 3 m) zusammen. Ausnahmen bilden die beiden Feldkampagnen Puerto Deseado und Ebro Delta. Bei der Puerto Deseado Kampagne standen ausschließlich Extrakte der 5 µm Fraktion aus gepoolten Wassertiefen bis 10 m, bei der Ebro Delta Kampagne Extrakte der 5 µm Fraktion aus diversen Tiefen (1 m bis 10 m), zur Verfügung. Für die Ausfahrt mit der FS *Heincke* (HE358) wurden ausschließlich die Extrakte der Netzzüge zur weiteren Analyse herangezogen.

Die Probenextrakte der Feldkampagnen waren bis zur Analyse in HPLC Vials bei -25 °C eingelagert. Die Füllstände wurden zu Beginn entsprechend kontrolliert und ggf. in passende Mikroinsätze (5 x 30 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mittels Pasteurpipette überführt. Beim Vorliegen zu geringer Substanzmenge bzw. bei trockenen Proben wurden diese mit einer definierten Menge (50 µl bis 300 µl) MeOH in LC/MS Qualität wieder aufgefüllt. Volumina wurden entsprechend notiert.

3.2.2 LC-MS Analysen

Für die LC-MS Messungen der Probenextrakte wurde das in Abschnitt 3.1.5 erläuterte Massenspektrometer 4000 QTrap® mit LC-Ankopplung verwendet. Die Untersuchung des Probenmaterials erfolgte dabei in Anlehnung an die der Extrakte der Toxin Filter der HE358 und wurde bereits in diesem Abschnitt beschrieben. Das herangezogene Probenmaterial wurde nach diversen für Azaspisensäuren charakteristischen Übergängen (Precursor Ion → Fragment Ion) hin analysiert, welche in der Tabelle 7 mit Angabe der verwendeten Kollisionsenergie dargestellt sind. Die Zusammenstellung dieser Methode beruht u.a. auf den bisher gewonnenen Ergebnissen. Für die meisten Toxine erfolgte die Betrachtung zweier charakteristischer Fragment Ionen.

Tab. 7: Auflistung der berücksichtigten Massenübergänge der LC-MS Analyse (Precursor Ion → Fragment Ion) für die Detektion unbekannter AZAs mit Angabe der verwendeten Kollisionsenergie (CE) in Volt.

Nr.	Massenübergang [m/z]	Massenübergang [m/z]	Zuordnung
1	842 → 824	842 → 672	AZA-1,(6)
2	856 → 838	856 → 672	AZA-2
3	828 → 810	828 → 658	AZA-3
4	844 → 826	-	AZA-4, -5
5	872 → 854	-	AZA-11, -12, -17
6	816 → 736	816 → 348	<i>Amphidoma</i> spp.
7	830 → 812	830 → 348	<i>Amphidoma</i> spp.
8	858 → 840	858 → 348	<i>Azadinium</i> spp.
9	846 → 828	846 → 348	<i>Azadinium</i> spp.
10	870 → 852	-	AZA-2 (methyliert)
	CE: 40 V	CE: 70 V	

Als Blindwert wurde in definierten Abständen MeOH in LC/MS Qualität analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein AZA-1-Standard ($c=20$ ng/ml) verwendet. Eine genaue Quantifizierung konnte aufgrund fehlender Standards nicht erfolgen und war innerhalb dieser Untersuchungen auch nicht angestrebt. Mit Hilfe der zugehörigen Software erfolgten die Beurteilung der aufgenommenen Spektren sowie die anschließende Auswertung der einzelnen Ionenspuren über die manuelle Integration der Flächen. Über Produkt Ionen Scans wurden für ausgewählte Extrakte, abhängig von der relativen Intensität, die Fragmentierungsmuster einzelner Massen ermittelt. Die Proben wurden hierfür teilweise gezielt aufkonzentriert, um die Signalintensität zu verbessern. Für die Aufkonzentrierung wurden die Extrakte mit Stickstoff in einer Labtherm® Apparatur (Liebisch, Bielefeld, Deutschland) eingedampft und in einer definierten Menge MeOH wieder aufgenommen. Über die erhaltenden Fragmentierungsmuster, in Kombination mit Literaturangaben, lassen sich Rückschlüsse auf den eigentlichen Prozess der Abspaltung sowie die einzelnen Fragmente

ziehen, um anschließend Aussagen über einen möglichen strukturellen Aufbau des Moleküls zu erlauben.

3.2.3 FT-ICR-MS Messungen

Um die Rückschlüsse auf die genaue Elementarzusammensetzung der Azaspirsäuren assoziierten Toxine zu erhalten, wie auch um bisherigen Strukturvorschläge der LC-MS Messung zu bestätigen, wurden ausgewählte Probenextrakte mittels hochauflösender FT-ICR-MS vermessen. Diese Messungen erfolgten in Kooperation mit der Bruker Daltonik GmbH in Bremen. Für Extrakte, bei denen mehrere Peaks einer Nominalmasse zugeordnet waren, erfolgte vorab eine manuelle Fraktionierung mit dem LC-MS System 4000 QTrap™. Probenextrakte im Eluenten wurde vor der Injektion ins Massenspektrometer in einem neuen HPLC-Vial aufgefangen, insgesamt wurden jeweils drei Durchläufe zum sammeln angesetzt. Die FT-ICR-MS Analysen wurden mit einem solariX Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einem 12 Tesla supraleitenden Magneten, durchgeführt (Abb. 15).



Abb. 15: FT-ICR-MS solariX der Firma Bruker Dalton GmbH in Bremen.

In Anlehnung an die bisherigen Untersuchungen, wurde die ESI-Methode verwendet. Hierfür wurde eine Apollo II Dual Ionenquelle der Firma Bruker genutzt. Die Messungen erfolgten im positiven Ionenmodus mit einer Kapillarspannung von 4,5 kV und einer Durchflussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ unter Verwendung von Trocken- und Nebulizergas. Die Steuerung des Gerätes erfolgte über die Apex Control Software (Version 1.50.96, Bruker).

Die Proben wurden vor der Direkteinspritzung in das Gerät, entsprechend der vorliegenden Konzentration in einem definierten Verhältnis (1:1 MeOH: MilliQ + 0,1 % Ameisensäure) verdünnt. Nach Aufnahme eines Full Scans, erfolgte eine Ein-Punkt Kalibrierung auf ein bekanntes in den Proben vorliegendes Fragment (419,3159). MS/MS-Experimente wurden mit einer Kollisionsspannung von 31 V durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine interne Rekalibrierung auf die Masse des betrachteten Precursor Ions. Abhängig von der Intensität wurden 19 bis 64 Scans für ein Spektrum

aufaddiert. Alle Ionen waren einfach geladen. Die interne Kalibrierung wurde mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ ppm durchgeführt. Die anschließende Bearbeitung erfolgte mit der Data Analysis Software (Bruker, Version 3.4.186.0). Die Angabe der Elementarzusammensetzung wurde mit einer Genauigkeit von maximal ± 2 ppm zugelassen.

3.2.4 Veresterung mit Trimethylsilyldiazomethan

AZAs weisen in ihrer Grundstruktur eine freie Carboxylgruppe auf. Um Rückschlüsse auf eine eventuelle Verbindung der unbekanntesten AZAs mit den bereits identifizierten zu erlauben soll mit Hilfe von Veresterungsexperimenten die Bildung von Methylestern an dieser zu Grunde gelegten Carboxylgruppe erfolgen.

Die Methylierung wurde mit Trimethylsilyldiazomethan (TMSDM, 527524, 2M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Je nach Substanzmenge des Extraktes wurden 50 μ l bzw. 100 μ l für die Aufarbeitung herangezogen. Probenextrakt und TMSDM wurden in einem 1:1 Verhältnis in HPLC Vials zusammengefügt und mittels Vortexer (Cenco Instruments b. v. Breda, Niederlande) vermischt. Dieser Vorgang wurde in 5 min Abständen über Zeitraum von 30 min wiederholt, so dass eine ausreichende Durchmischung gewährleistet werden konnte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μ l Essigsäure (100 %, Eisessig; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und die erneute Vermischung. Durch Zugabe der Essigsäure kommt es zur Stickstoff-Freisetzung und überschüssiges TMSDM zerfällt. Mittels Stickstoffstrom wurden die Proben eingengt und entsprechend der Ausgangsvolumina in 50 bis 100 μ l MeOH wieder aufgenommen. In Anlehnung an die bereits beschriebene AZA-Methode erfolgte eine LC-MS Analyse. Jedoch wurden entsprechend der vorliegenden Methylierung weitere Massenübergänge berücksichtigt (Tab. 8). Unbehandelte Extrakte wurden als Kontrolle mit analysiert.

Tab. 8: Betrachtete Massenübergänge der LC-MS Analyse (Precursor Ion \rightarrow Fragment Ion) der Methylierungsexperimente.

Nr.	Massenübergang [m/z]	Massenübergang [m/z]	Zuordnung
1	816 \rightarrow 736	816 \rightarrow 348	<i>Amphidoma</i> spp.
2	830 \rightarrow 750		methyliert
3	830 \rightarrow 812	830 \rightarrow 348	<i>Amphidoma</i> spp.
4	844 \rightarrow 826		methyliert
5	858 \rightarrow 840	858 \rightarrow 348	<i>Azadinium</i> spp.
6	872 \rightarrow 854		methyliert
7	846 \rightarrow 828	846 \rightarrow 348	<i>Azadinium</i> spp.
8	860 \rightarrow 842		methyliert
	CE: 40 V	CE: 70 V	

4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

4.1 Feldkampagne FS *Heincke* 2011

Im Rahmen der FS *Heincke* Kampagne HE358 wurden in der Zeit vom 25.05. bis zum 11.06.2011 von insgesamt 61 Stationen Netzzug- und Wasserproben via LC-MS-Analyse auf ihre Toxingehalte untersucht. Zusätzlich wurden als Umweltparameter Temperatur- (T), Salzgehalt- (S) und Sauerstoffprofile sowie Nährsalze (NO_x , Si, PO_4) und Chlorophyll *a* Konzentration ermittelt.

4.1.1 Ozeanographische Beobachtungen

Temperatur, Salzgehalt und Sauerstoffprofile

Die Auftragung der Profildaten T in C°, S in PSU und O₂ in ml/l erfolgte über die jeweils zurückgelegte Distanz in einem Untersuchungsgebiet (Abb. 16 - 19). Eine Übersicht über die jeweilige Stationslage in einem Gebiet kann der Abbildung 12 (Abschnitt 3.1.1) entnommen werden.

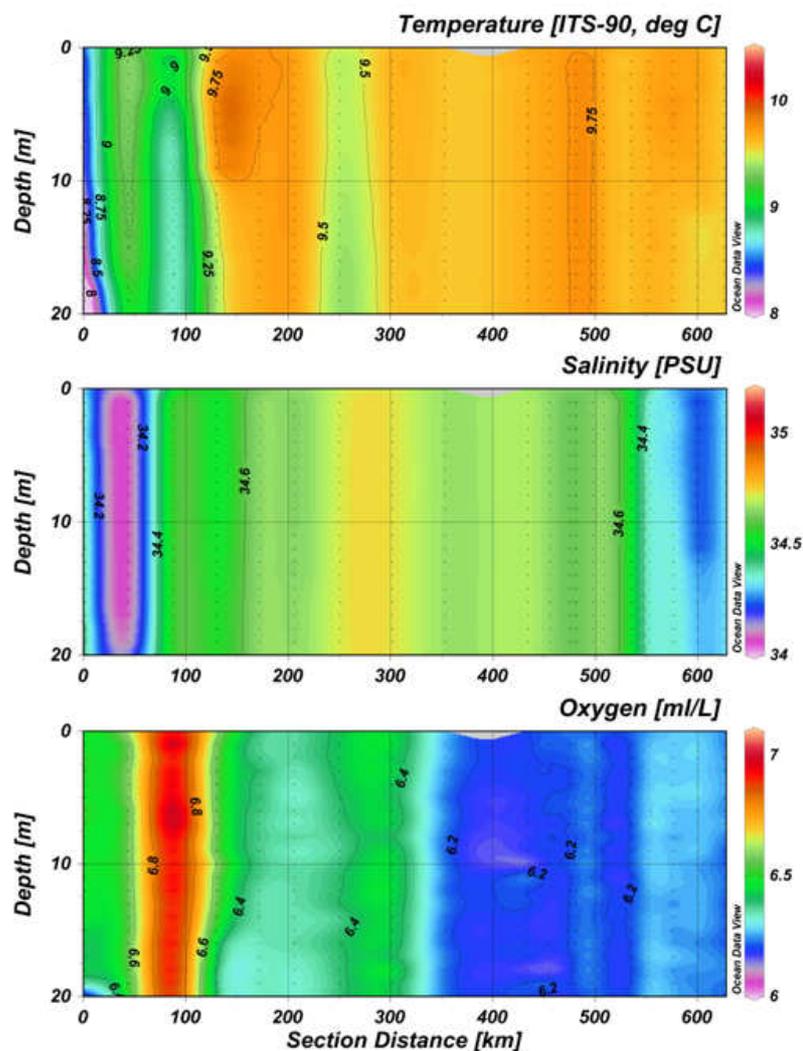


Abb. 16: T, S und O₂-Tiefenprofile Schottlands inkl. der Orkney Inseln (Station 3 bis 22) aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes. Stationen sind durch gepunktete Linien kenntlich gemacht.

Für den schottischen Transekt variierte die Temperatur zwischen 8 und 9,8 °C, Salzgehalte lagen zwischen 34 und 34,7, und Sauerstoffgehalte zwischen 6,2 und 7 ml/l. Der vordere Bereich bis knapp über die 100 km Distanz (Station 3 bis 6) hebt sich in allen drei Parametern von den restlichen Stationen ab. Innerhalb der Wassersäule lag eine recht gleichmäßige Durchmischung vor, so dass Unterschiede ausschließlich zwischen den Stationen erkennbar sind. Die aus der Abbildung ersichtlich Regelmäßigkeit ist u.a. auch auf die teils großen Entfernungen der Stationen zueinander zurückzuführen. Hierdurch können auftretende Differenzen um eine Station herum nicht lokalisiert werden. In den Tiefenprofilen der Färöer Inseln (Abb. 17) sind aufgrund der Berücksichtigung der tatsächlich zurückgelegten Distanz bei der Umrundung der Insel grau hinterlegte Fläche erkenntlich, welche Bereiche darstellen an denen keine Probennahmen erfolgten. Die räumliche Trennung der Stationen zueinander, die teils auch in abgelegenen Buchten durchgeführt wurden, lässt die Darstellung über die Distanz sehr gleichmäßig wirken, so dass auch hier die Profile eher getrennt voneinander betrachtet werden müssen.

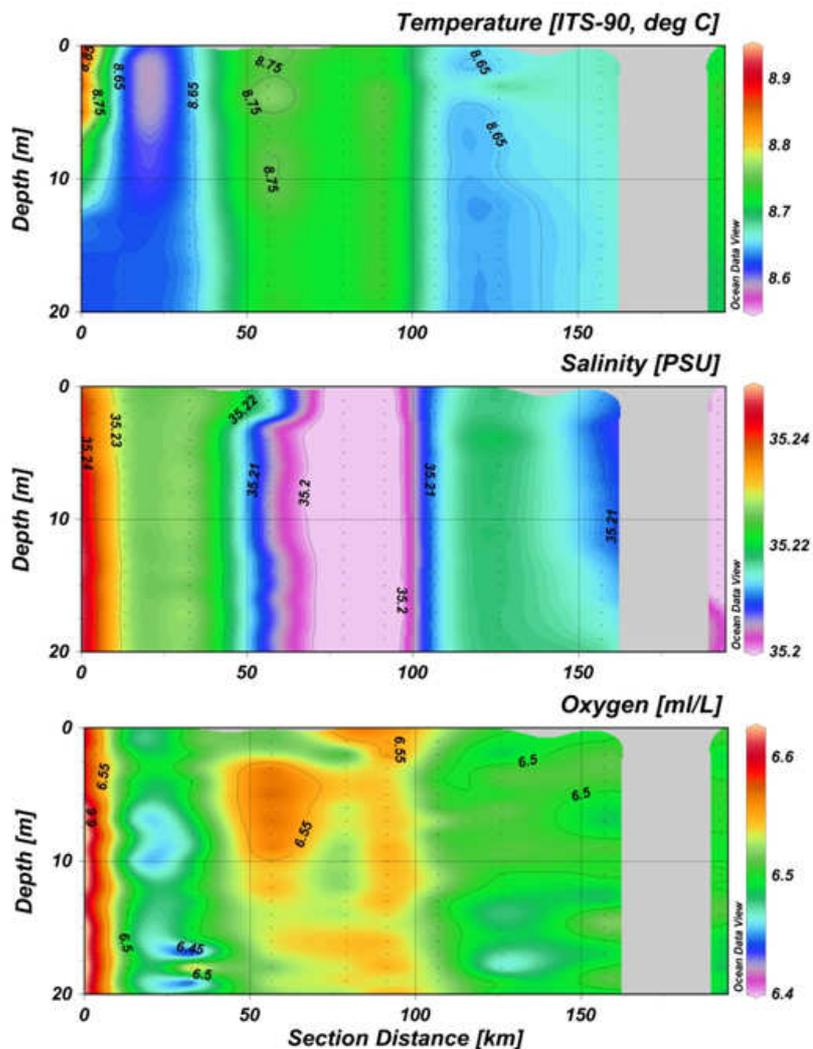


Abb. 17: T, S und O₂-Tiefenprofile der Färöer Inseln (Station 25 bis 35) aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes. Stationen sind durch gepunktete Linien kenntlich gemacht.

Aufgrund der hier dargestellten Form hebt sich besonders die erste Station der Färöer Inseln (Station 25) von den anderen ab. Hierbei muss jedoch gewählte Skalierung der jeweiligen Parameter berücksichtigt werden. Beispielsweise lagen beim Salzgehalt ausschließlich äußerst geringe Variationen zwischen 35 und 35,24 PSU vor. Temperaturen in diesem Gebiet lagen im Bereich von 8,6 und 8,8 °C und O₂-Konzentrationen variierten zwischen 6,45 und 6,6 ml/l. Allgemein kann jedoch gesagt werden, dass sich innerhalb der einzelnen Stationen keine großen Unterschiede über die Tiefe zeigten und die Wassermassen in den oberen 20 m relativ gut durchmischt scheinen. Auch in den Tiefenprofilen der Shetland Inseln (Abb. 18) muss die räumliche Entfernung der Stationen zueinander berücksichtigt werden.

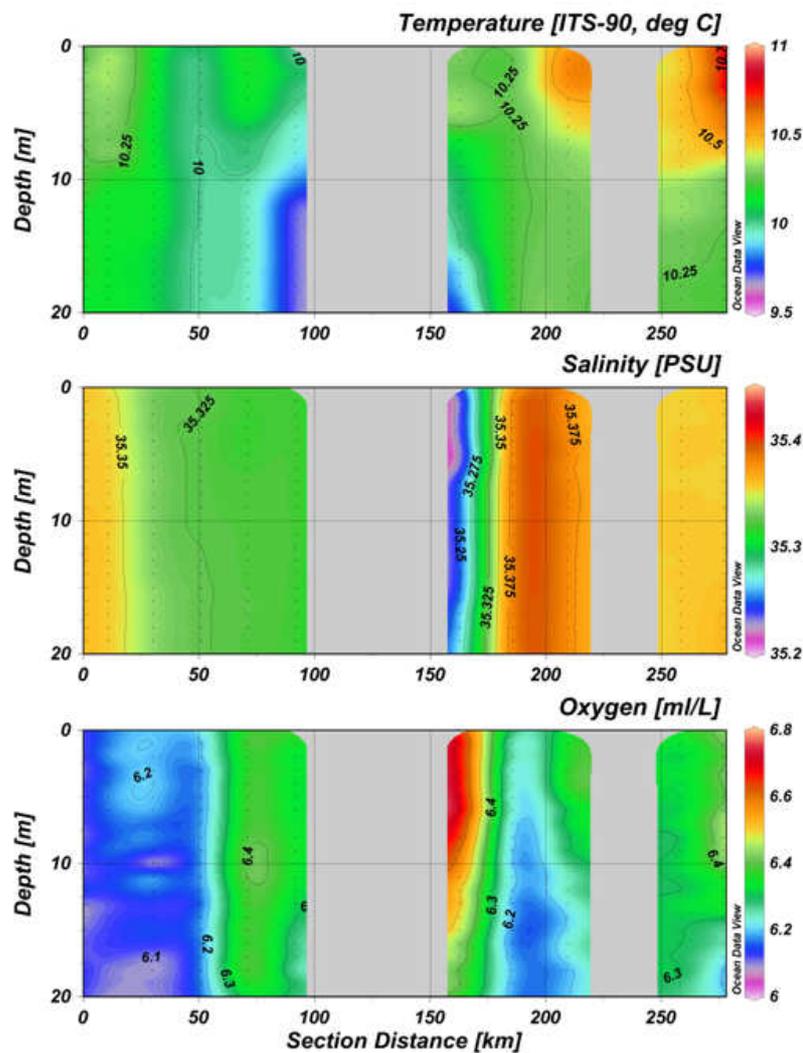


Abb. 18: T, S und O₂-Tiefenprofile der Shetland Inseln (Station 36 bis 46) aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes. Stationen sind durch gepunktete Linien kenntlich gemacht.

Temperaturen variierten in diesem Gebietes zwischen 9,6 und 11 °C in Oberflächennähe (~ 200 km entspricht Station 44). Salzgehalte lagen zwischen 35,2 und 35,4 PSU, ohne erkennbare Unterschiede innerhalb der Wassersäule. Die O₂-Gehalte variierten zwischen 6,1 bis 6,8 ml/l. Im Falle von Temperatur und O₂ können leichte Unterschiede innerhalb der einzelnen Profile über die

Wassertiefe ersehen werden. Im Vergleich zu den bisher dargestellten Untersuchungsgebieten im Nordseeraum hebt sich der Ostseebereich erwartungsgemäß von denen ab (Abb. 19). Innerhalb der Tiefenprofile kann bereits in den oberen 20 m Wassersäule eine deutliche Schichtung der Wassermassen ausgemacht werden.

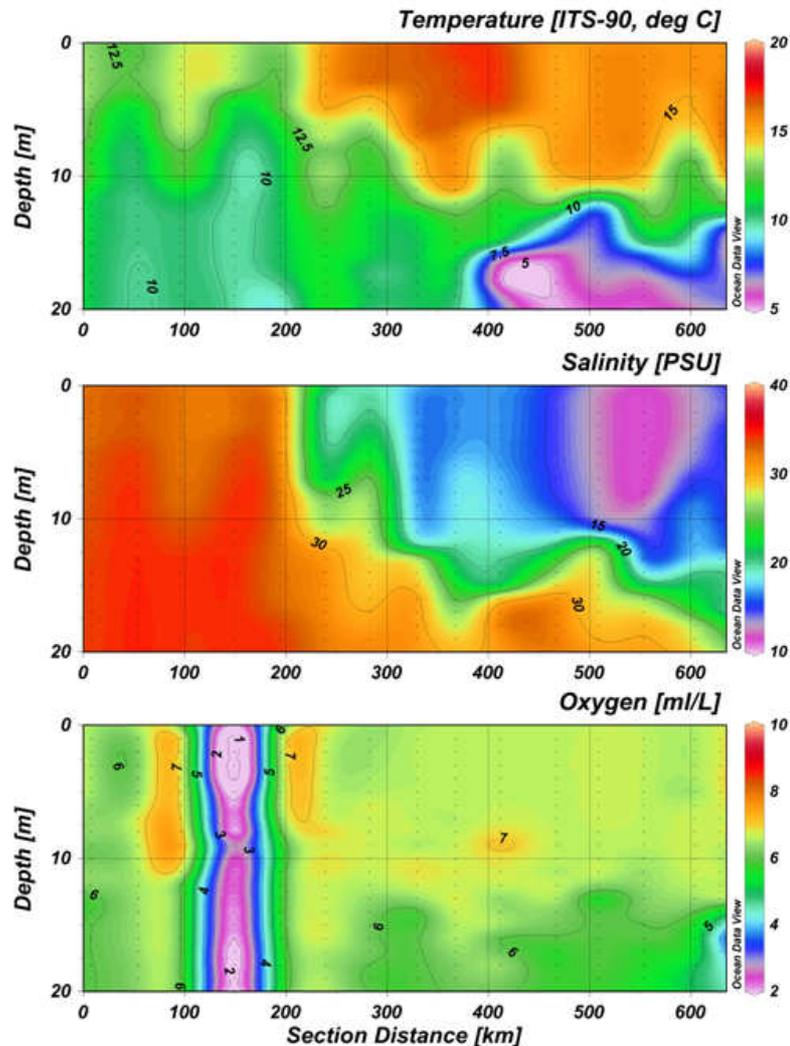


Abb. 19: T, S und O₂-Tiefenprofile der Ostsee (Station 48 bis 62) aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes. Stationen sind durch gepunktete Linien kenntlich gemacht.

Ab der Distanz von 240 km (= Station 53) konnten im Vergleich zur Tiefe in den oberen 10 m Wassersäule deutlich höhere Temperaturen (15-20 °C), einhergehend mit geringeren Salzgehalten (10-25 PSU) ermittelt werden. Unterhalb der 10 m Grenze sinken die Temperaturen bis auf 5 °C, mit einem Salzgehalt von durchschnittlich 30 PSU. Weiterhin besonders auffällig ist der starke Abfall der O₂-Konzentrationen im Bereich um die Station 51 (Distanz =150 km). Durchschnittlich variierten die Konzentrationen zwischen 6 und 7 ml/l, hier jedoch wurden Gehalte von 1-2 ml/l ermittelt.

Chlorophyll *a*

Als Bewertungsparameter der Phytoplankton Biomasse wurde die Chlorophyll *a* - Konzentration herangezogen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der Abbildung 20 dargestellt, eine detaillierte Übersicht kann dem Anhang entnommen werden (Anlage 3, Tab. 11).

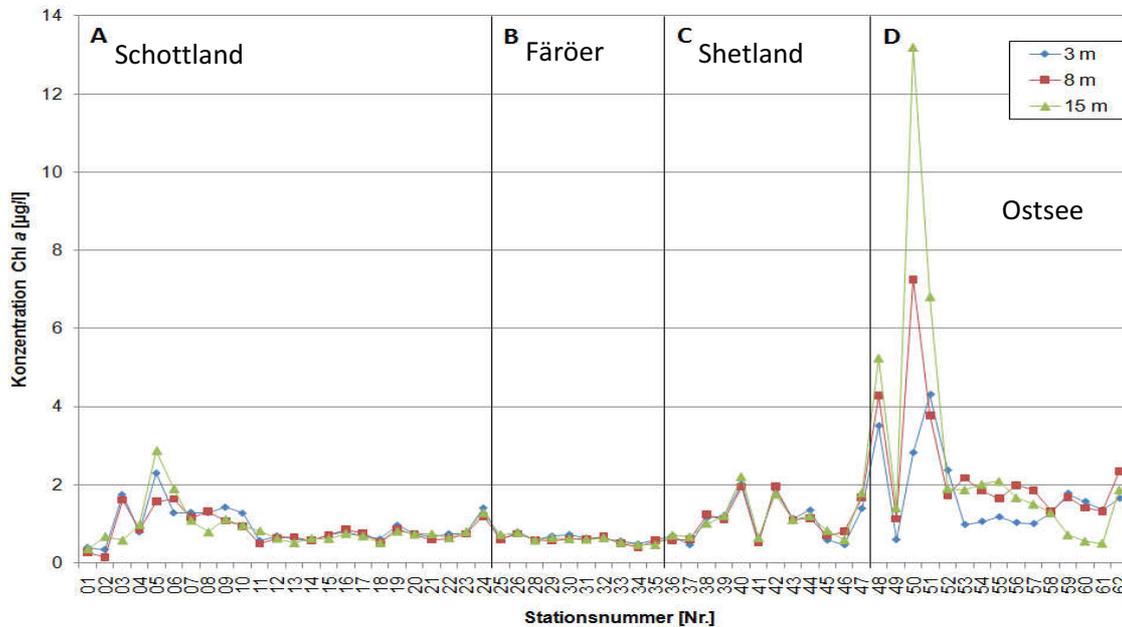


Abb. 20: Ermittelte Chlorophyll *a* - Konzentrationen der Stationen der Feldkampagne HE358, unterteilt in die drei Entnahmetiefen 3 m, 8 m und 15 m mit (A) Schottland, (B) Färöer Inseln, (C) Shetland Inseln und (D) Ostsee.

Im Vergleich zu den Stationen der Orkney Inseln und der schottischen Nordküste (11 bis 22), mit durchschnittlichen Konzentrationen um 1 µg/l, konnten an der Ostküste höhere Konzentrationen mit bis zu 3 µg/l ermittelt werden. Hierbei sind leichte Variationen innerhalb der Entnahmetiefen sichtbar. An den Stationen der Färöer Inseln lagen weitgehend sehr ähnliche Konzentrationen an Chlorophyll *a* vor, durchschnittlich um 0,7 µg/l. An den Stationen der Shetland Inseln konnten Chlorophyllgehalte von 0,5 bis 2 µg/l an den Stationen 40 und 42 ermittelt werden. Die Ostsee hingegen zeichnet sich innerhalb der ersten Stationen durch auffallend hohe Konzentrationen mit bis zu 13 µg/l an der Station 50 aus. Ab der Station 53 lagen deutlich geringere Konzentrationen an Chlorophyll *a* vor, die sich im Bereich zwischen 0,6 und 2,4 µg/l bewegen. Innerhalb dieses Untersuchungsgebietes lassen sich auch deutliche Unterschiede innerhalb der jeweiligen Entnahmetiefen erkennen.

Nährstoffe

Die detaillierten Ergebnisse der Nährstoffanalysen für Nitrat (NO_3), Phosphat (PO_4) und Silikat (Si) können dem Anhang entnommen werden (Anlage 4, Tab. 12). An dieser Stelle wird ausschließlich eine grobe Übersicht über die ermittelten Konzentrationen angeführt.

Nitrat: Die NO_3 - Konzentrationen an der schottischen Ostküste lagen i. d. R. unterhalb von $0,3 \mu\text{M}$. An der Nordküste Schottlands hingegen variierten diese zwischen $0,4$ und $1,7 \mu\text{M}$. Die Stationen der Färöer Inseln wiesen Konzentrationen an Nitrat von 4 bis $7,3 \mu\text{M}$ auf. An den Shetland Inseln lagen die Werte durchschnittlich über $1 \mu\text{M}$ mit Ausnahmen der Stationen 40 und 42 ($\sim 0,6 \mu\text{M}$) und erreichten Konzentrationen von bis zu $3,6 \mu\text{M}$. In der Ostsee lagen bis zur Station 56 die Konzentrationen meist unterhalb von $0,3 \mu\text{M}$ und stiegen dann auf Konzentrationen zwischen 1 - $3,8 \mu\text{M}$ an, wobei höheren Konzentrationen in der Tiefe vorlagen.

Phosphat: PO_4 - Konzentrationen variierten im schottischen Untersuchungsgebiet zwischen $0,1$ bis $0,3 \mu\text{M}$. An den Färöer Inseln lagen diese zwischen $0,4$ bis $0,8 \mu\text{M}$. Die Konzentrationen an den Shetland Inseln variierten zwischen $0,1$ und $0,6 \mu\text{M}$, lagen jedoch meistens im Bereich um $0,3 \mu\text{M}$. Innerhalb der drei Entnahmetiefen waren keine ersichtlichen Trends erkennbar. In der Ostseeregion konnten Konzentrationen von $0,1$ bis $0,7 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Bis zur Station 58 wurden hierbei jedoch Werte von $0,3 \mu\text{M}$ nicht überschritten. Im weiteren Verlauf konnten Konzentrationen von $0,7 \mu\text{M}$ ausschließlich in 15 m Wassertiefe ermittelt werden.

Silikat: Si-Gehalte variierten im schottischen Untersuchungsgebiet durchschnittlich zwischen 1 - $4 \mu\text{M}$. Ausnahmen bildeten die Stationen 6 und 12, mit Konzentrationen unterhalb von $1 \mu\text{M}$ und die Stationen 3 und 5 mit Konzentrationen bis zu $5,8 \mu\text{M}$. An den Stationen der Färöer Inseln lagen die Konzentrationen an Si zwischen $2,5$ und $5,8 \mu\text{M}$, ohne erkennbaren Trend innerhalb der einzelnen Entnahmetiefen. An den Stationen der Shetland Inseln konnten Konzentrationen von 1 bis $3,5 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Werte unterhalb von $1 \mu\text{M}$ lagen ausschließlich an der Station 42 und 46 vor. In der Ostseeregion variierten die Konzentrationen an Si bis zur Station 57 zwischen $0,4$ und $4 \mu\text{M}$. Besonders auffällig sind die weiteren Stationen, an denen deutliche Unterschiede innerhalb der Entnahmetiefen sichtbar waren und Höchstkonzentrationen von bis zu $20 \mu\text{M}$ in 8 m Tiefe ermittelt worden.

4.1.2 Toxinprofile

Die einzelnen Toxine wurden mittels LC aufgetrennt und via MS detektiert. Eine Quantifizierung erfolgte ab einem S/N von 5. Für die Untersuchungen wurden die fraktionierten Netzzugproben (>200 µm, 200-55 µm, 50-20 µm) wie auch für die Schöpferproben (20-5 µm) herangezogen. Die Angabe der Toxinkonzentrationen erfolgt im Falle der Netzzugproben in ng je Netzzug. Mit der Abbildung 21 soll exemplarisch für die durchgeführten Analysen ein LC-MS-Chromatogramm aufgezeigt werden. Hierfür wurde die Probe der 50-20 µm Fraktion der Station 53 in der Ostsee ausgewählt, da dieses alle im Rahmen dieser Arbeit relevanten Toxine widerspiegelt. Das Chromatogramm ist dabei unterteilt in die drei Perioden der angewendeten Multi-Toxin-Methode und spiegelt alle Ionenspuren in dieser Probe wieder. Für die anschließende Quantifizierung wurden die jeweiligen Einzelspuren der Toxine herangezogen.

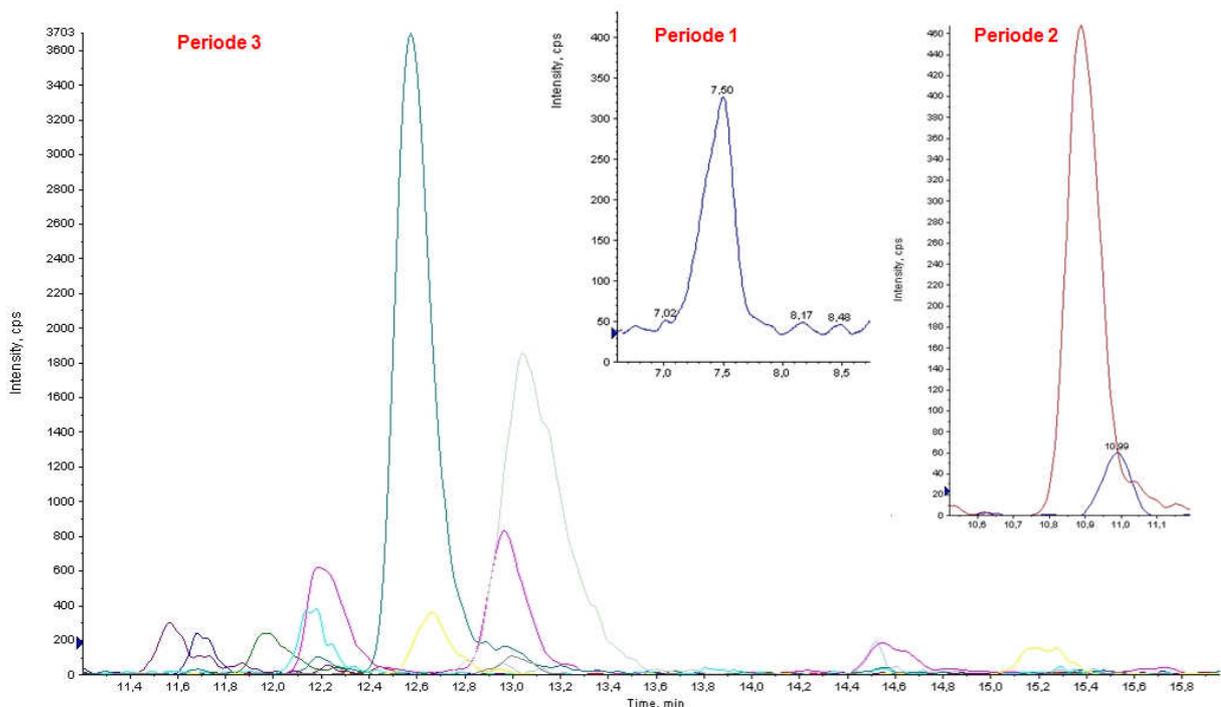


Abb. 21: Ionenspur-Chromatogramme der 50-20 µm der Station 53 in der Ostsee im positiven Ionenmodus unterteilt in die Periode (1) mit Domoinsäure (DA), (2) mit den Spiroliden 13 Desmethylspirolid-C (SPX-1) und Spirolid A und (3) mit Okadasäure (OA), Dinophysistoxine (DTX), Pectenotoxine (PTX), Azaspirsäuren (AZA) und Yessotoxine (YTX).

Zur Veranschaulichung der jeweils auftretenden Retentionszeiten der Toxine wurden die einzelnen Ionenspuren dieser für die ausgewählte Probe der Station 53 einzeln aufgetragen (Abb. 22). Hierbei erfolgte eine Normalisierung auf 100 %. Weiterhin werden Toxine gleicher Gruppe untereinander dargestellt, um die jeweilige Verschiebung der Retentionszeiten hervorzuheben.

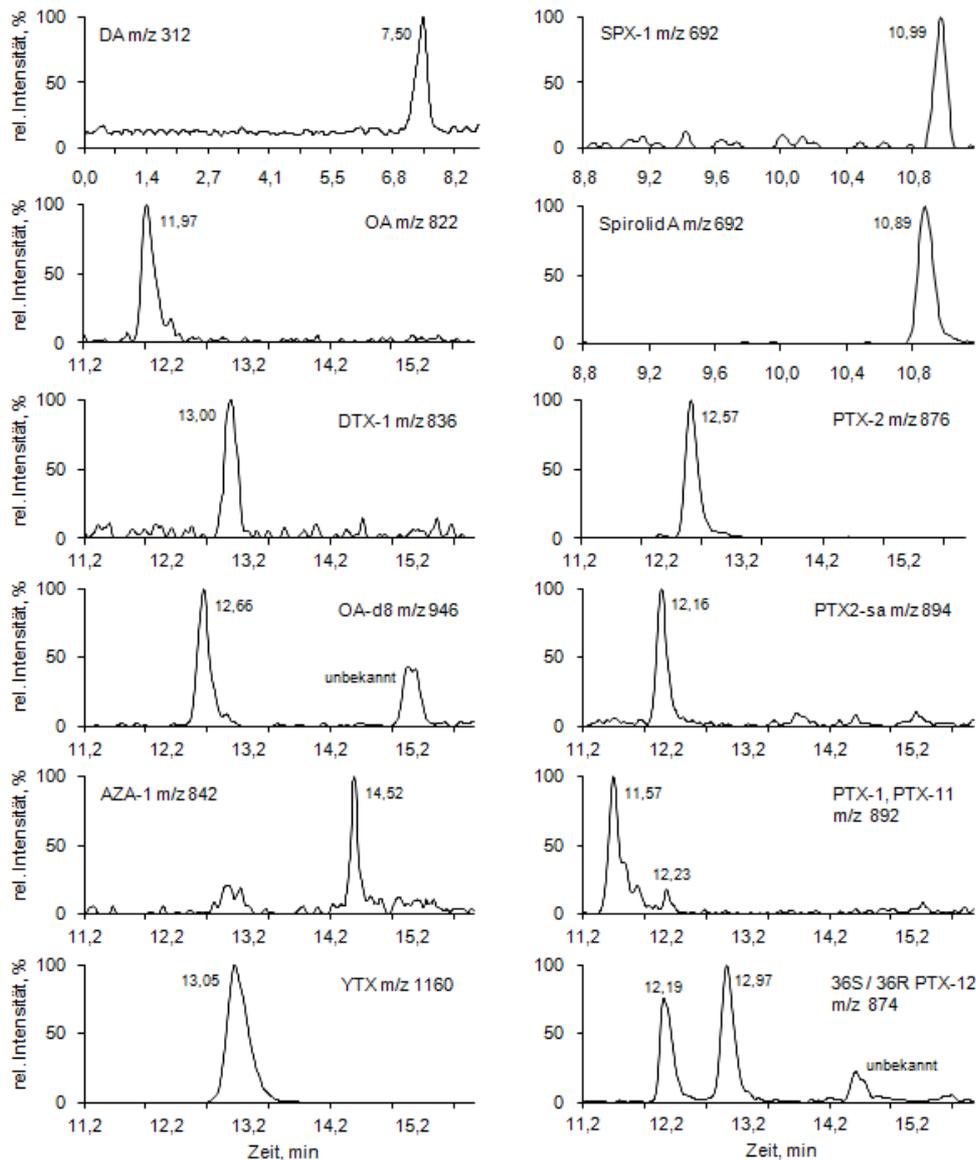


Abb. 22: Normalisierte Ionenspuren der Toxine der 50-20 µm Fraktion der Station 53 im positiven Ionenmodus mit Angabe der Retentionszeit für DA [M+H]⁺, SPX-1 [M+H]⁺, Spirolid A [M+H]⁺, OA [M+NH₄]⁺, DTX-1 [M+NH₄]⁺, PTXs [M+NH₄]⁺, AZA-1 [M+H]⁺ und Yessotoxin [M+NH₄]⁺.

Basierend auf der ausgewählten Probe erfolgte für alle Stationen die Betrachtung der einzelnen Ionenspuren innerhalb der jeweiligen Fraktionen. Nachfolgend werden die hierbei ermittelten Toxinprofile der einzelnen Fraktionen veranschaulicht. Bei der Darstellung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich an den Stationen um die Summe aller auftretenden Toxine handelt.

> 200 µm Fraktion

Die Toxinprofile der >200 µm Fraktion der Netzzüge über die einzelnen Stationen, angegeben in ng je Netzzug sind in der Abbildung 23 dargestellt. Innerhalb dieser Fraktion konnten ausschließlich Domoinsäure (DA), Azaspirsäure-1 (AZA-1), 13 Desmethylspirolid C (SPX-1) und Spirolid A de-

tektiert werden. Detaillierte Toxinkonzentrationen können der Tabelle 13 im Anhang (Anlage 5) entnommen werden. An den Stationen der Färöer Inseln konnten innerhalb dieser Fraktion keine Toxine nachgewiesen werden.

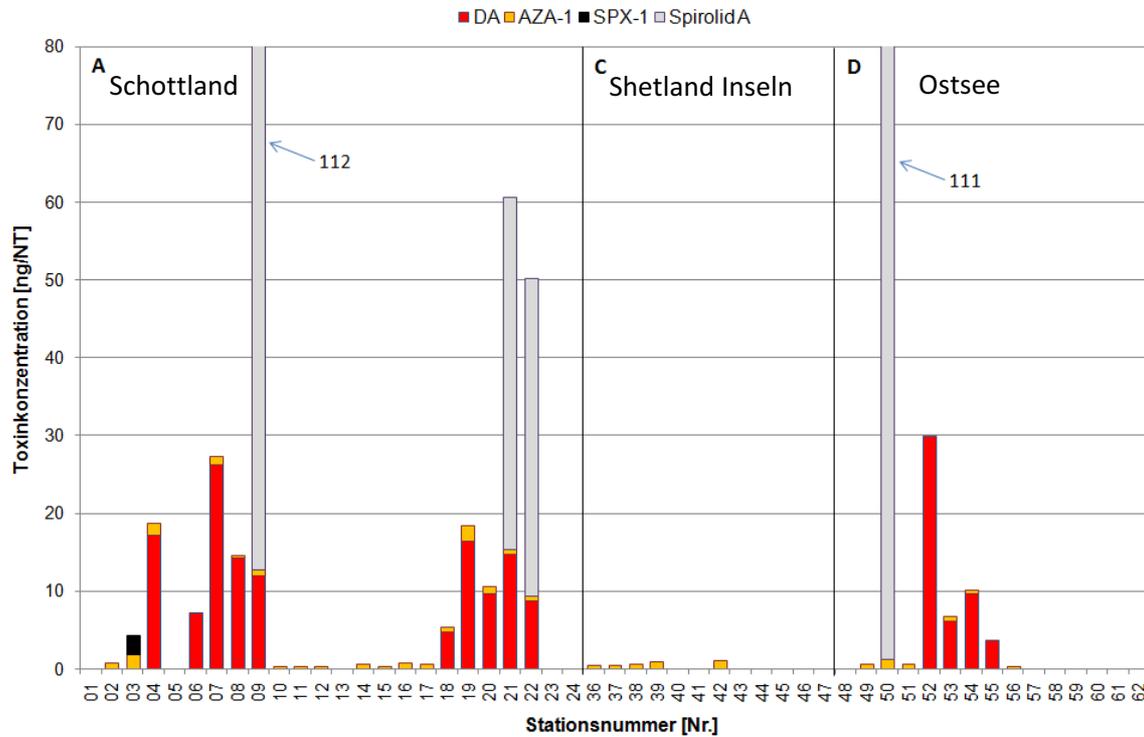


Abb. 23: Aufsummierten Toxinkonzentrationen der Netzzüge der > 200 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland (A), Shetland Inseln (C) und Ostsee (D).

DA konnte in allen drei Untersuchungsgebieten gefunden werden, nicht jedoch an den Stationen der Orkneys Inseln (11-17) in der schottischen Region, hier lag ausschließlich AZA-1 vor. Konzentrationen variieren für DA an den jeweiligen Stationen zwischen 3,6 und 30 ng/NT. Auch AZA-1 lag in allen Gebieten vor, mit Konzentrationen von 0,2 bis 2 ng/NT. Mit Ausnahme der Shetland Inseln konnte an vereinzelt Stationen Spirolid A detektiert werden, wohingegen SPX-1 (~ 2,3 ng/NT) ausschließlich an einer Station der schottischen Ostküste gefunden wurde. Als Äquivalente zu SPX-1 ergeben sich Konzentrationen für Spirolid A im Bereich von 40 bis 112 ng/NT.

200-55 µm Fraktion

Die Ergebnisse der 200-55 µm Fraktion sind in der Abbildung 24 graphisch dargestellt. Eine detaillierte Übersicht kann dem Anhang entnommen werden (Anlage 6, Tab. 14). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Fraktion so ist ersichtlich, dass neben DA, AZA-1 und Spirolid A auch Pectenotoxine (PTXs) sowie Dinophysistoxin-1 (DTX-1) gefunden wurde. Wie bereits in der > 200 µm Fraktion konnten an den Stationen der Färöer Inseln keine Toxine nachgewiesen werden.

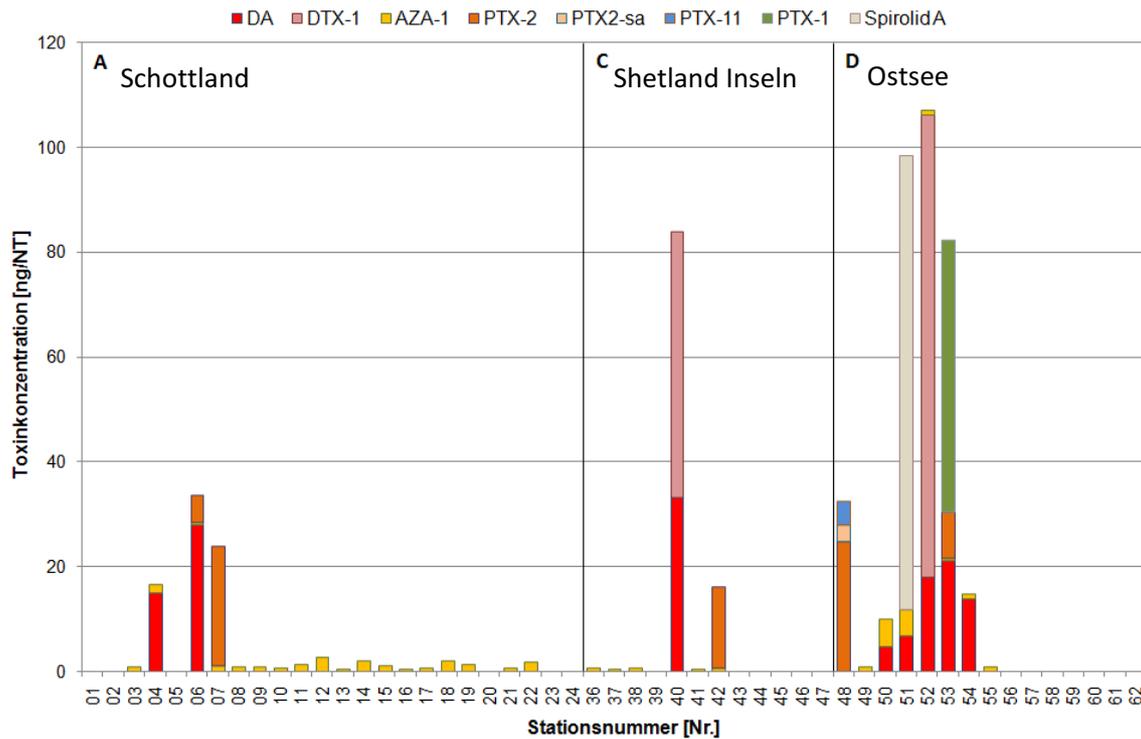


Abb. 24: Aufsummierte Toxinkonzentrationen der Netzzüge der 200-55 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland (A), Shetland Inseln (C) und Ostsee (D).

Auch in dieser Fraktion konnte DA in allen drei Untersuchungsgebieten gefunden werden, wobei es ausschließlich in der Ostsee an mehreren zusammenhängenden Stationen vorlag. Konzentrationen liegen hierbei zwischen 5 bis 33 ng/NT. Berücksichtigt man, dass an den Stationen 5 und 20 AZA-1 unterhalb des LOQ lag, so konnte dieses Toxin im gesamten Untersuchungsgebiet Schottlands gefunden werden. Ansonsten lag es vereinzelt an den Shetland Inseln, aber auch in der Ostsee vor. Die ermittelten Konzentrationen variieren hierbei zwischen 0,2 und 5 ng/NT in der Ostsee. In allen drei Untersuchungsgebieten ließ sich vereinzelt auch PTX-2 detektieren mit Konzentrationen von 5 bis 25 ng/NT. In der Ostseeregion konnten hierbei auch weitere PTXs detektiert werden. So lag an der Station 48 lag neben PTX-2 auch die hydrolysierte Form PTX2-sa sowie PTX-11 vor, an der 53 hingegen trat PTX-2 in Kombination mit PTX-1 auf. Als PTX-11 Äquivalent entspricht die vorliegende Konzentration an PTX-1 ~ 53 ng/NT.

50-20 µm Fraktion

Mit der Abbildung 25 werden die Ergebnisse der 50-20 µm Fraktion der Netzzüge verdeutlicht (Anlage 7, Tab. 15). Wie auch in den beiden vorherigen Fraktionen konnten an den Stationen der Färöer Inseln keine Toxine nachgewiesen werden. Neben den bisher detektierten Toxinen wurden innerhalb dieser Fraktion weitere PTXs sowie Okadasäure (OA), der C₈-Diol Ester der Okadasäure (OA-d8) sowie Yessotoxin (YTX) gefunden.

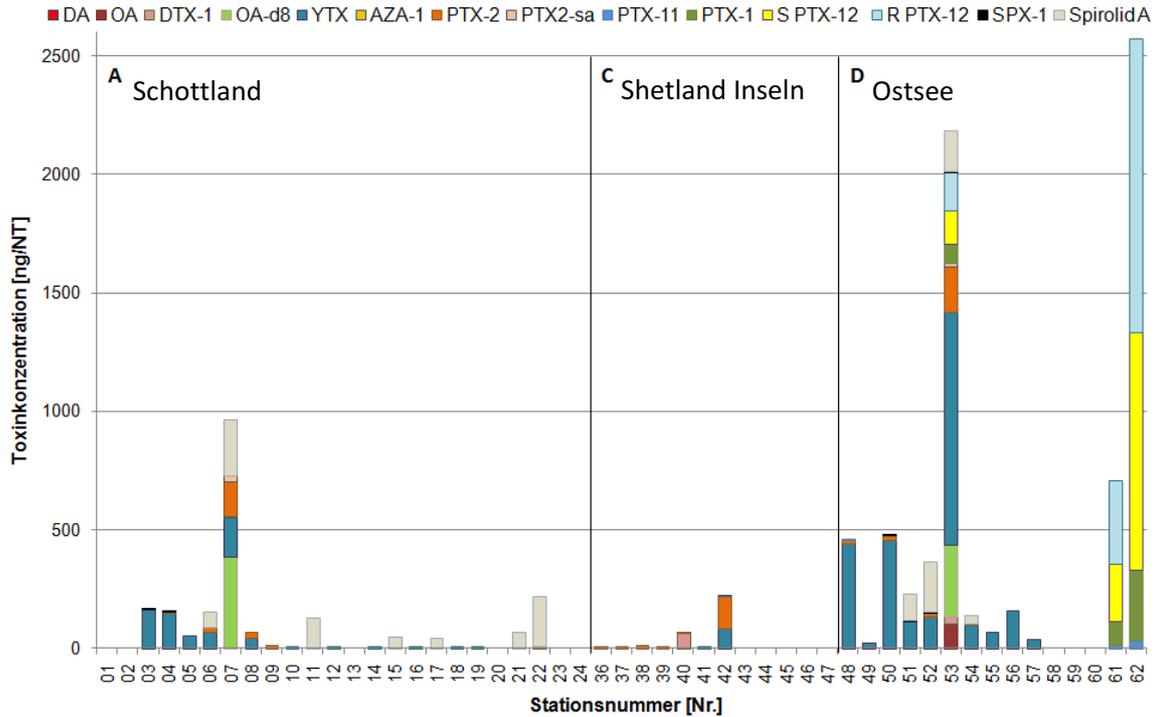


Abb. 25: Aufsummierte Toxinkonzentrationen der Netzzüge der 50-20 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland (A), Shetland Inseln (C) und Ostsee (D).

Im schottischen Gebiet konzentrieren sich die Funde für YTX ausschließlich auf die Ostküste. Während es an den Shetland Inseln nur an einer Station vorlag, konnte YTX im Ostseebereich bis zur 57 kontinuierlich gefunden werden. Die ermittelten Konzentrationen variieren hierbei zwischen 22 ng und 980 ng/NT an der Station 53. AZA-1 konnte ebenfalls, in Anlehnung an die Ergebnisse der 200-55 µm Fraktion, in allen drei Untersuchungsgebieten gefunden. Im Vergleich zu den weiteren Toxinen konnten jedoch äußerst geringe Konzentrationen (0,3 bis 2 ng/NT) ermittelt werden, so dass diese Funde aus der Abbildung schwer ersichtlich sind. Ausschließlich Schottland und die Ostsee wiesen vereinzelt SPX-1 (0,9 -6 ng/NT) auf, auch in Kombination mit dem weitaus häufiger auftretenden Spirolid A (35 - 240 ng SPX-1 Äquivalente/NT). Aus der Graphik ist ersichtlich, dass sich die Ostseeregion von den anderen beiden Untersuchungsgebieten abhebt. Besonders auffällig ist im diesem Zusammenhang die Station 53, an der neben OA, deren Derivat DTX-1 und dem Ester OA-d8 diverse PTXs aber auch Spirolide vorlagen. Somit spiegelt diese Station alle relevanten lipophilen Toxine wieder. Weiterhin auffällig sind die Stationen 61 und 62, an welchen ausschließlich eine Mischung PTX-1, PTX-11 und 36S bzw. 36 R PTX-12 auftraten. Als Äquivalente zu PTX-2 resultieren z.B. für PTX-12 an der Station 62 Konzentrationen von 351 ng/NT für 36S PTX-12 und 1240 ng/NT für 36R PTX-12.

5 µm Fraktion

Die 5 µm Fraktion diente ausschließlich der Beprobung von *Azadinium* spp. und wurde auf AZA-1, -2 und -3 untersucht. Hierbei konnte ausschließlich an zwei Stationen der Shetland Inseln AZA-1 detektiert werden. An der Station 40 lag die ermittelte Konzentration bei 0,02 ng/l während an der 41 ausschließlich Spuren unterhalb des LOQ nachgewiesen wurden. Der Fund an der Station 40 konnte bereits auf dem Schiff durch Identifizierung und Isolierung von *A. spinosum* unter dem Mikroskop bestätigt werden (U. Tillmann, pers. Mitteilung).

Betrachtet man abschließend die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung so sind für die Untersuchungsgebiete Schottland, Shetland und der Ostsee, in denen diverse Algentoxine nachgewiesen werden konnten, Ähnlichkeiten innerhalb der Toxinzusammensetzung der fraktionierten Netzzugproben ersichtlich. Besonders deutlich ist dies in der >200 µm Fraktion. Auch wenn die Ostseeregion durch deren Umweltparameter als komplett anderes Gebiet gekennzeichnet ist, so konnten in diesem dennoch die gleichen Toxine nachgewiesen werden. Vergleicht man hingegen jedoch die Toxinprofile der einzelnen Fraktionen miteinander, so lassen sich hierbei deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung entnehmen. Das Toxin DA konnte hauptsächlich in den größeren Fraktionen nachgewiesen werden. Während durch die 50-20 µm Fraktion die toxischen Algen berücksichtigt werden, lassen sich in den größeren Fraktionen heterotrophe Organismen, wie z.B. diverse Ziliatenarten, größere Dinoflagellaten und Zooplankton (z.B. Copepoden) als Konsumenten der Algen finden. Da Diatomeen, wie *Pseudo-Nitzschia* spp. der Produzent von DA, als Frühjahrsblüher bekannt sind und i.d.R. im Jahresverlauf vor den Dinoflagellatenblüten auftreten (O'Boyle & Silke, 2010) lässt sich aus diesem Fund schließen, dass zur Zeit der Probennahme diese Alge bereits weitgehend durch Organismen höherer trophischer Ebenen gefressen wurde. Das Toxin YTX hingegen wurde ausschließlich in der 50-20 µm Fraktion gefunden, was eher auf die Anwesenheit der betreffenden Dinoflagellaten hindeutet. Ein ähnliches Bild kann den Spiroliden entnommen werden. Betrachtet man beispielsweise die Stationen 21 und 22, so ist ersichtlich, dass Spirolid A ausschließlich in der 50-20 µm und der >200 µm Fraktion gefunden wurde. Die Netzzugproben der 200-50 µm Fraktion zeigten zwar, dass potentielle Konsumenten (z.B. *Ceratium* spp., *Protoberidinium* spp.) zu finden waren, jedoch lagen diese in äußerst geringen Abundanz vor. Dies deutet jedoch darauf hin, dass diese Organismen größtenteils bereits durch höhere trophische Niveaus gefressen wurden, so dass die Toxine ausschließlich noch in der >200 µm Fraktion nachgewiesen werden konnten. An den Stationen 61 und 62 konnten Toxine ausschließlich in der 50-20 µm Fraktion gefunden werden. Auch wenn unter dem Mikroskop eine Vielzahl potentieller Konsumenten, größtenteils zusammengesetzt aus diversen Copepoden und deren Nauplien, ersichtlich waren, konnte keine Aufnahme der Toxine durch die höheren Ebenen beo-

bachtet werden. Bereits auf dem Schiff konnte an diesen Stationen eine *Dinophysis* Blüte beobachtet werden. Da ausschließlich Toxine in der 50-20 µm Fraktion vorlagen, könnte es sich hierbei ggf. um eine äußerst junge Blüte handeln, die noch nicht durch Organismen höherer Ebenen gefressen wurde. Es kann in diesem Zusammenhang aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Alge einfach nicht gefressen wurde. Beispielsweise ist aus Frassexperimenten an *Azadinium spinosum* bekannt, dass diese Alge durch Copepoden nicht direkt gefressen wird, sondern Toxine hauptsächlich über Vektororganismen, wie z.B. *Favella* spp., welche *Azadinium* als Nahrungsquelle nutzen, aufgenommen werden (P. Messtorff, nicht veröffentlicht). Die hier aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen die komplexen Zusammenhänge der einzelnen trophischen Ebenen untereinander und heben auch besonders den Aspekt der vorliegenden Planktongemeinschaft an einem Ort hervor. Betrachtet man z.B. im Gegensatz hierzu z.B. die Station 53 so deutet die Verteilung der Toxine innerhalb der einzelnen Fraktionen auf eine relativ gemischte Planktonpopulation hin.

Auch wenn im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die einzelnen Stationen keine durchgehende Betrachtung der Planktongemeinschaft unter dem Mikroskop erfolgte, wurden dennoch basierend auf den Ergebnissen der 50-20 µm Fraktion ausgewählte Stationen (7, 42, 53, 61, 62) für eine qualitative Beurteilung herangezogen um Rückschlüsse auf das Vorhandensein toxischer Dinoflagellaten zu ermöglichen. Hierbei konnten in allen Proben die relevanten Algenarten ausgemacht werden. Im Falle der Spirolide wurde das Vorkommen des Produzenten *Alexandrium* spp. (Cembella *et al.*, 1999) bestätigt. Auch die Anwesenheit verschiedener *Dinophysis* Arten (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica* und *D. rotundata*), welche für die Produktion von OA, DTX-1 aber auch von PTXs bekannt sind (Lee *et al.*, 1989; Dominguez *et al.*, 2010), konnte bestätigt werden. *D. norvegica* nahm dabei den Hauptanteil in den Ostseeproben ein. Weiterhin konnte eine Identifizierung von *Protoceratium reticulatum* wie auch von *Gonyaulax spinifera*, die als Produzenten von YTX gelten (Munday *et al.*, 2008), erfolgen. Allgemein zeigte sich in den Proben eine vielfältige Mischung von typischen Dinoflagellaten und Diatomeen Plankton (U. Tillmann, pers. Mitteilung).

Betrachtet man die Ergebnisse der drei Untersuchungsgebiete so ist der einzig deutlich ersichtliche Unterschied zwischen diesen das zusätzliche Auftreten weiterer Pectenotoxine in der Ostseeregion. Hier konnten neben PTX-2 und PTX2-sa weiterhin die Analoga PTX-1, PTX-11, und PTX-12 gefunden werden. PTX-1 und PTX-11 liegt bei der Analyse zwar der gleiche Massenübergang zugrunde, jedoch erfolgte über den PTX-11 Standard und dem Verhältnis der verschobenen Retentionszeit eine Identifizierung von PTX-1, die im Einklang mit der Literatur ist. Durch Krock *et al.* (2008b) wird eine weite Verbreitung von PTX-1 im Nordseeraum und in der Region des Skagerraks bestätigt. Die Identifizierung der Diastereoisomere 36S-PTX-12 und 36R-PTX12 erfolgte nach Abgleich mit den Arbeiten von Miles *et al.* (2004). Diese Untersuchungen bestätigen einen Doppel-

peak gleichen Retentionsverhältnisses aus Seewasserproben der Ostsee (vgl. Abb. 22), der auf *Dinophysis* spp. zurückgeführt wird. Auch *D. norvegica* wird für die Produktion von PTX-12 bestätigt, welche auch den Hauptanteil der bereits angesprochenen *Dinophysis* Blüte der Stationen 61 und 62 ausmachten. Im Falle der Station 53 wird PTX-2 mit m/z 876 durch das Vorhandensein von PTX-12 mit m/z 874 durch den zweifachen ^{13}C Isotopensatelliten von PTX-12 überlagert. Unter Beachtung des Isotopenverhältnisses von PTX-12 mit $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$ erfolgte vor der Quantifizierung von PTX-2 eine Korrektur der Intensität um 17 %, da dieser Anteil auf PTX-12 entfallen würde. Es konnten in diesem Zusammenhang keine Literaturquellen ausfindig gemacht werden, die ein Vorkommen von PTX-12 in den weiteren Untersuchungsgebieten bestätigen. Jedoch kann dies aufgrund der weiten Verbreitung von *Dinophysis* spp. nicht ausgeschlossen werden, besonders da auch die beiden Arten *D. acuminata* und *D. acuta* als potentielle Produzenten von PTX-12 aufgeführt sind (Miles *et al.*, 2004).

Aufgrund der hohen Zellzahl an *Dinophysis* spp. an den Stationen 61 und 62, sowie den an diesen detektierten hohen Konzentration an PTXs mit bis zu 2500 ng PTXs/NT an Station 62, erfolgte eine Auszählung dieser Proben. Hierbei konnten Zellkonzentrationen von $3,22 \times 10^5$ für Station 61 und $1,34 \times 10^6$ Zellen/NT für Station 62 ermittelt werden. Unter Annahme einer gleichen Verteilung der einzelnen Toxine resultieren somit exemplarisch für die Station 62 Zellquoten von 0,02 pg PTX-11/Zelle, 0,2 pg PTX-1/Zelle, 0,75 pg 36S PTX-12/Zelle und 0,95 pg 36R PTX-12/Zelle. Verglichen mit vorherigen Ausfahrten ist dieses Toxinprofil sehr ungewöhnlich, da normalerweise PTX-2 einen Hauptanteil der Pectenotoxine ausmacht (vgl. Krock *et al.*, 2008a, Krock *et al.*, 2008b, Krock *et al.*, 2009, Krock *et al.*, in Vorbereitung). Ein Vergleich der Zellquoten mit Literaturangaben gestaltet sich aufgrund der bislang begrenzten Datenlage über *Dinophysis*-Kulturen als äußerst schwierig, besonders auch in Bezug auf die Art *D. norvegica* wie auch die Toxine PTX-1 und PTX-12. Für PTX-11 hingegen berichten Mackenzie *et al.* (2005) und Pizarro *et al.* (2009) von im Felde ermittelten Zellquoten zwischen 0,1 bis 65 pg/Zelle.

Ein Abgleich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Toxinkonzentrationen mit Literaturangaben ist i.d.R. schwierig, da diese von verschiedenen Faktoren abhängen, saisonale Unterschiede zeigen, aber auch methodische Unterschiede vorliegen. Das Auftreten von giftigen Algenblüten ist in den betrachteten Gebieten bekannt und durch Literatur und Monitoring Programme bestätigt (vgl. Swan & Davidson, 2011; Hinder *et al.* 2011; Uronen, 2007). Es existieren aber auch Berichte über *Alexandrium* spp. Blüten an den Färöer Inseln, die in Zusammenhang mit Fischsterben in Lachsfarmen und der Produktion von Spiroliden durch *A. ostenfeldii* stehen (Smayda, 2006). Konzentrationen in Seewasserproben variieren allgemein gesehen im pg- und ng-Bereich (z.B. Lucas *et al.*, 2005; Uronen, 2007; Krock *et al.* 2008a; Krock *et al.*, 2009). Besonders auffällig in diesem

Zusammenhang ist jedoch das im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Spirolidprofil im Vergleich zu zwei Forschungskampagnen im Nordseeraum der Jahre 2007 und 2008. In den früheren Jahren machte 20 Methylspirolid G einen Hauptanteil der Spirolide aus (Krock *et al.*, 2008a; Krock *et al.*, in Vorbereitung). Dieses Toxin wurde innerhalb der aktuellen Ausfahrt überhaupt nicht gefunden, während jedoch Spirolid A in der schottischen wie auch in der Ostseeregion weit verbreitet vorlag. Hierbei muss jedoch auch die zeitliche Versetzung der Fahrten berücksichtigt werden und die Interaktionen der Gesamtheit ein Einflussfaktoren die das Auftreten von giftigen Algen begünstigen.

Bei der Auswertung der Toxinprofile ist zu berücksichtigen, dass es sich in Bezug auf die Absolutkonzentrationen um eine semiquantitative Auswertung handelt. Nicht im Standard enthaltene Toxine wurden als Äquivalente zu im Standard enthaltenden Toxinen angegeben. Des Weiteren lag ausschließlich eine Ein-Punkt-Kalibration vor. Der Toxin-Standard wurde in einem Konzentrationsverhältnis von 1: 10 eingesetzt. Bei der Auswertung der Ionenspuren zeigte sich, dass das Toxin DA nicht mehr im Standard ersichtlich war. Hierfür erfolgte anschließend eine nachträgliche Quantifizierung mit einem externen Standard ($c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), unter Berücksichtigung der Intensitäten der ersten Messung. Weiterhin sei angemerkt, dass das zur Quantifizierung genutzte S/N-Verhältnis von 5 im Vorfeld festgelegt wurde und von einem besseren S/N als Bestimmungsgrenze, i.d.R. um den Faktor 3 größer als die Nachweisgrenze, abgesehen wurde. Da im Rahmen dieser Arbeit die eigentliche Detektion der Toxine und deren Vergleich innerhalb der einzelnen Fraktionen im Vordergrund stand, werden die auf diese Weise ermittelten Absolutmengen, auch wenn diese nicht der höchsten Genauigkeit entsprechen, als ausreichend zuverlässig angesehen.

Abschließend soll an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, dass bei der Auswertung der Toxindaten an diversen Stationen Schottlands, der Shetland Inseln, wie auch an den ersten Stationen der Ostsee bei der Durchsicht der Ionenspuren des OA-C₈ Diol Esters (m/z 946), weitere Peaks mit einer RT von 15,3 min beobachtet wurden. Dieser Peak ist neben dem des Diol Esters auch an der Station 53 ersichtlich (vgl. Abb. 21, Abb. 22). Dieser Fund konnte übergreifend in allen Fraktionen beobachtet werden, trat jedoch verstärkt in der 50-20 μm Fraktion auf, in welcher die meisten toxischen Dinoflagellaten vorliegen. Höchste Intensitäten, mit über 80.000 cps lagen beispielweise an der Station 42 vor, so dass diese Probe auch für weitere Untersuchungen herangezogen wurde. Produkt Ionen Scans des geladenen Moleküls m/z 946 erbrachten nach Aufkonzentrierung das in der Abbildung 26 dargestellte Spektrum.

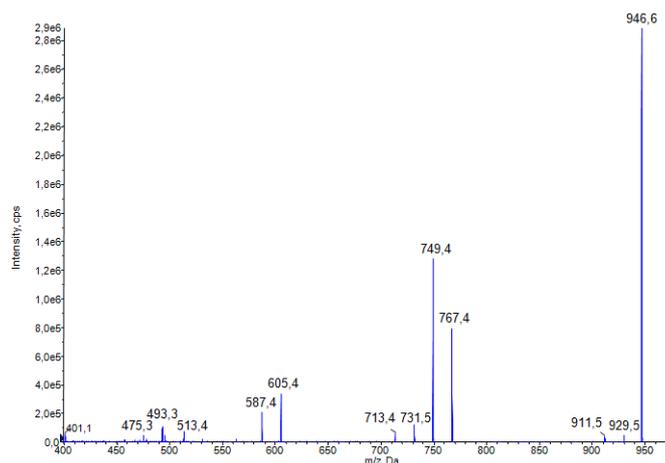


Abb. 26: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Ammonium Addukts $[M+NH_4]^+$ von Pseudo-OA-d8 m/z 946.

Auch in vorherigen Analysen konnte dieser Peak in Nordseeproben mehrfach beobachtet werden, jedoch ohne eine direkte Zuordnung (B. Krock, pers. Mitteilung). Suzuki *et al.* (2004) und Paz *et al.* (2007) kann die Fragmentierung des OA-C₈ Diol Esters (m/z 946) im positiven Ionenmodus entnommen werden. Hierbei stimmen ausschließlich die ersten beiden Fragment Ionen (m/z 929, m/z 911) mit diesem überein. In Fux *et al.* (2011) wird auch dem Derivat der Okadasäure DTX-1-D7 im positiven Ionenmodus die Masse m/z 946 zugeordnet. Jedoch lassen sich auch hier keine Übereinstimmungen finden. Aufgrund einer fehlenden Zuordnung wurde von einer Quantifizierung in OA Äquivalenten abgesehen. Weitere Literaturrecherchen konnte keine Identifizierung hervorbringen. Es kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Substanz um ein Toxin handeln könnte, gerade da dem Fragmentierungsmuster Differenzen von 18 Da entnommen werden können (z.B. m/z 767 → m/z 749 → m/z 731 → m/z 713), welche auf Wasserabspaltungen hindeuten und klassisch für Polyketide sind. In diesem Falle sind weitere Untersuchungen nötig, die jedoch nicht zum Bestandteil der vorliegenden Arbeit gehören. Die Funde wurden für die anschließende Korrelationsanalyse vernachlässigt.

4.1.3 Multivariate Statistik

Der eigentliche Grundgedanke dieser Analyse ist es Umweltparameter zu charakterisieren, durch welche die Möglichkeit gegeben wird auf eine potentielle Algenblüte zu schließen. Die Ergebnisse der Umweltparameter sind bereits im Abschnitt 4.1.1 veranschaulicht wurden. Im Rahmen der statistischen Analysen wurden folgende Hypothesen überprüft: (1) Toxinkonzentrationen korrelieren mit einem oder mehreren Umweltparametern und (2) innerhalb der betrachteten Untersuchungsgebiete lassen sich hierbei Gemeinsamkeit hinsichtlich der charakterisierenden Parameter ausmachen. Weiterhin wurden folgende Annahmen zugrunde gelegt: (1) Toxinkonzentrationen der 50-20 µm Fraktion werden mit dem Auftreten der toxischen Dinoflagellaten gleichgesetzt, da

die meisten relevanten Dinoflagellaten in dieser Fraktion zu finden sind, (2) im Falle der Azaspirsäure wird die 20-5 µm Fraktion herangezogen, da sich in dieser *Azadinium* spp. befinden. Für die Umweltparameter erfolgte eine tiefengewichtete Mittelung der Datensätze. Im Falle der CTD-Daten wurden zwei Intervalle berücksichtigt, (1) für 0-10 m und (2) für 10-20 m. Die Toxinkonzentrationen wurden vor der Analyse zur Normalisierung logarithmiert. Der zugehörige R-Code und die zugrunde gelegte Datentabelle sind auf der beigelegten CD hinterlegt.

Aus der ausschließlichen Betrachtung der Umweltparameter aller Untersuchungsgebiete über eine Hauptkomponentenanalyse (PCA), auf Basis der maximalen Korrelationen, ist bereits ersichtlich, dass die Gebiete hinsichtlich ihrer Umweltparameter in Gruppen klassifiziert werden können (Anlage 8, Abb. 47). Während sich die Ostsee und das Gebiet um die Färöer Inseln deutlich abtrennen lassen, kann dies nicht für Schottland und Shetland erfolgen. Auf dieser Basis erfolgte eine getrennte Betrachtung für die jeweiligen Untersuchungsgebiete. Durch Pair-Plots erfolgte hierbei eine erste Einschätzung eventueller Zusammenhänge zwischen Toxinen und einzelnen Umweltparametern. Die jeweiligen Plots können dem Anhang entnommen werden (Anlage 8). Für Schottland (Abb. 48) lassen sich aus dem Plot ausschließlich Korrelationen von YTX mit den Parametern T, O₂, PO₄ und Chl entnehmen, jedoch liegen die Koeffizienten hierbei zwischen 0,45 und 0,57. An den Färöer Inseln (Abb. 49) sind durch das Fehlen von Toxinen ausschließlich die Umweltparameter zueinander ersichtlich. Für die Shetland Inseln (Abb. 50) sind Korrelationen der detektierten Toxine mit S, T und O₂ ersichtlich. Beispielsweise weisen YTX und PTX mit S Koeffizienten von ~ 0,8 auf. YTX weist zusätzlich Korrelationen zum Sauerstoffgehalt auf (~0,7). Ermittelte Korrelationen mit den Nährstoffgehalten liegen unterhalb von 0,5. Weiterhin sind Korrelationen mit Chl ersichtlich, diese liegen jedoch zwischen 0,49 und 0,68. Betrachtet man den Datensatz der Ostsee (Abb. 51) so sind hier höchste Korrelation von YTX mit T (0,63) und PTX mit Si (0,67) und PO₄ (0,68) ersichtlich. Ausgehend von dieser Datenlage erfolgte eine Redundanzanalyse (RDA) für die einzelnen Gebiete. Hierbei können alle Umweltparameter gleichzeitig berücksichtigt werden. Durch die RDA werden sogenannte „Eigenwerte“ als gewichtete Summen der Toxine berechnet, welche als abhängige Variable mit den erklärenden Umweltparametern in einer multiplen linearen Regression berücksichtigt werden. Hierbei wird eine maximale Korrelation zugrunde gelegt. Die RDA-Achsen der zur Darstellung gewählten Biplots stellen somit die Eigenwerte der Linearkombinationen der Umweltvariablen dar und geben keine direkte Auskunft über die einzelnen Umweltparameter.

Die Abbildung 27 zeigt den Biplot der RDA für das schottische Untersuchungsgebiet. Toxingruppen sind in rot, Begleitparameter als blaue Umweltvektoren kenntlich gemacht. Jede Station kann in Beziehung zu allen Umweltparametern gesetzt werden in dem Lote gefällt werden. Die jeweilige

Pfeilrichtung kennzeichnet die positive Richtung und die Länge gibt Auskunft über den jeweiligen Einfluss. Je dichter eine Station an einer Pfeilspitze einer Umweltvariablen liegt, desto enger ist sie mit ihr korreliert.

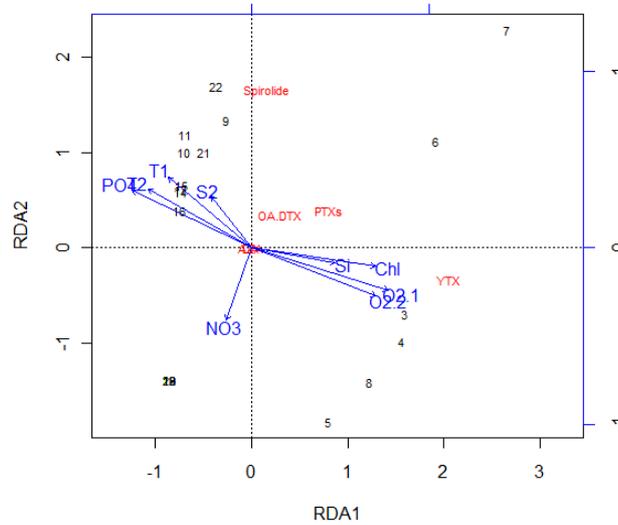


Abb. 27: Biplot der Redundanzanalyse der schottischen Region mit logarithmierten Toxindaten und zugehörigen Umweltparametersatz (Stationen im Untersuchungsgebiet: 3-22; Rot: Toxingruppen; blaue Pfeile: Umweltvektoren).

Aus der Graphik ist ersichtlich, dass sich die Vektoren für O₂, Chl und Si kollinear verhalten, jedoch negativ korreliert sind mit den ebenfalls kollinear verlaufenden Vektoren für T, S und PO₄. Der NO₃ Vektor verhält sich zu allen anderen gegenläufig. Die Toxine AZA-1 und DA liegen im Ursprung des Plots und werden somit als unspezifisch eingestuft und nicht durch die Parameter gekennzeichnet. Dies ist im Einklang mit der Tatsache, dass beide Toxine nicht in der herangezogenen Fraktion vorlagen. Weiterhin lassen sich Gruppen für SPX und YTX entnehmen, die durch positive wie auch negative Korrelationen zu den Umweltparametern gekennzeichnet sind und sich gegensätzlich verhalten. Mit der Abbildung 28 wird die RDA-Analyse für die Shetland Inseln verdeutlicht.

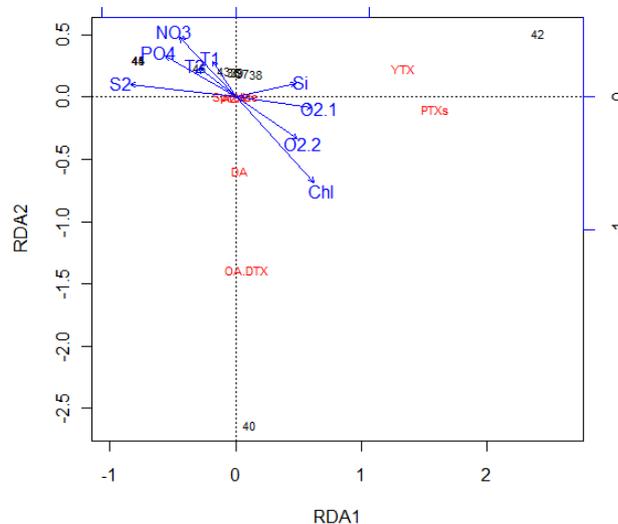


Abb. 28: Biplot der Redundanzanalyse der Shetland Inseln mit logarithmierten Toxindaten und zugehörigen Umweltparametersatz (Stationen im Untersuchungsgebiet: 36-46; Rot: Toxingruppen; blaue Pfeile: Umweltvektoren).

Der Abbildung kann entnommen werden, dass die Vektoren für T, S, PO₄ und NO₃ weitgehend kollinear verlaufen und negativ korreliert sind mit denen von Si, O₂ und Chl. Spirolide und AZA-1 werden erneut als unspezifisch eingestuft. Die Stationen 40 und 42 heben sich deutlich von den restlichen im oberen linken Viertel des Plots ab. Aus den Ergebnissen der 50-20 µm Fraktion ist ersichtlich, dass die 42 durch hohe Konzentrationen an YTX und die 41 durch die Toxingruppen OA, DTX und DA gekennzeichnet ist. Hierbei handelt es sich in diesem Untersuchungsgebiet jedoch um Einzelfunde. Vergleicht man die Umweltvektoren der Shetland Inseln mit denen der schottischen Region, so verhalten sich diese mit Ausnahme des NO₃-Vektors sehr ähnlich, wohl auch bedingt durch die geographische Lage der Gebiete zueinander. An den Shetland Inseln konnten jedoch im Vergleich zu der schottischen Region keine Spirolide nachgewiesen werden. Für das Untersuchungsgebiet der Ostsee wird der entsprechende Biplot der RDA mit der Abbildung 29 veranschaulicht.

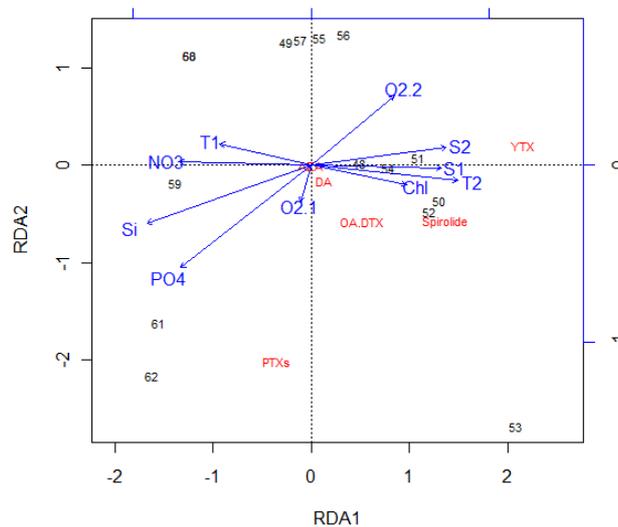


Abb. 29: Biplot der Redundanzanalyse der Ostsee mit logarithmierten Toxin- und zugehörigen Umweltparameterdaten (Stationen im Untersuchungsgebiet: 48-62; Rot: Toxingruppen; blaue Pfeile: Umweltvektoren).

Es lassen sich weiterhin deutlich zwei Richtungen der Umweltvektoren ausmachen, die negativ korreliert sind. Besonders auffällig sind hierbei die tiefenabhängigen Vektoren für T und O₂. Diese weisen eine negative Korrelation zueinander auf, wohingegen die Salzvektoren sich dennoch parallel verhalten. AZA-1 wird erneut als unspezifisch eingestuft, konnte jedoch auch nicht in der berücksichtigten Fraktion in diesem Gebiet nachgewiesen werden. Vergleicht man diese Graphik mit den anderen beiden Untersuchungsgebieten so ist ersichtlich, dass die Umweltvektoren sich anders verhalten, so dass Toxingruppen nicht mehr durch die gleichen Parameter charakterisiert werden, wie z.B. im Falle von YTX. Betrachtet man die Stationen 61 und 62, so traten an beiden ausschließlich PTXs, die in Verbindung mit der bereits erwähnten *Dinophysis* spp. Blüte stehen. Beide Stationen sind dabei deutlich durch PO₄ und Si gekennzeichnet.

Betrachtet man abschließend die Ergebnisse dieser Untersuchung, so lassen sich keine allgemeingültigen Aussagen machen. Auch wenn vereinzelt Korrelationen mit Umweltparametern innerhalb eines Untersuchungsgebietes ersichtlich sind, so liegen diese nicht unbedingt immer im signifikanten Bereich (vgl. Pair-Plots). Weiterhin lassen die Toxinkonzentrationen keine eindeutigen gemeinsamen Parameter zwischen den Untersuchungsgebieten erkennen. Eine Vergleichbarkeit wird allerdings durch die geringen Toxinkonzentrationen und dadurch resultierende dünne Datenlage erschwert. In diesem Zusammenhang hat es aber keinen Sinn die Toxindaten aus den größeren Planktonfraktionen heranzuziehen, weil es sich dabei um Toxine aus höheren trophischen Ebenen des Planktons handelt, die keine direkten Rückschlüsse auf das Vorkommen von toxischen Algenblüten zulassen. Auch wenn sich die eigentliche Toxinzusammensetzung in den betrachteten Gebieten sehr ähnelt, stützen sich die Untersuchungen teilweise auf Einzelfunde eines Toxins, so dass das Ergebnis als nicht aussagekräftig angesehen werden kann und eine Vergleichbarkeit erschwert wird. Weiterhin auffällig ist z.B. die Gruppe der Spirolide. Diese wurde im schottischen Untersuchungsgebiet wie auch in der Ostsee gefunden, jedoch nicht an den Shetland Inseln. Für beide Gebiete wird diese Toxingruppe dabei hinsichtlich der Umweltparameter anders charakterisiert. Betrachtet man jedoch die Shetland Inseln, so kann das Fehlen von Spiroliden nicht auf die dortigen Umweltparameter zurückgeführt werden, da sich diese Shetland und Schottland, wo Spirolide gefunden wurden, weitgehend ähneln. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren das Auftreten giftiger Algen bestimmen. Betrachtet man hingegen die Gruppe der PTXs, so lagen diese zwar übergreifend in allen drei Untersuchungsgebieten vor, jedoch konnte ausschließlich für die Ostseestationen 61 und 62 auffällige Korrelationen mit Silikat und Phosphat beobachtet werden. Auch wenn Phosphat als ein wichtiger Nährstoff für Dinoflagellaten angesehen werden kann (Gisselson *et al.*, 2002) und Korrelationen hierbei als sinnvoll angesehen werden, würde Silikat eher in Zusammenhang mit Diatomeen erwartet werden, da dieser Nährstoff als eine Hauptgrundlage für diese gesehen wird (Pan *et al.*, 1998). Jedoch korrelieren an beiden Stationen Silikat und Dinoflagellaten der Gattung *Dinophysis* spp., die PTXs produzieren, wofür es keine kausale Erklärung gibt.

In einem weiteren Schritt wurde dennoch versucht mit Hilfe einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) die Gebiete Schottland, Shetland und die Färöer Inseln hinsichtlich toxischer und nicht-toxischer Stationen abzutrennen. Während die Färöer Inseln deutlich abgegrenzt werden, kann dies für Schottland und Shetland nicht erfolgen und die Datensätze beider Gebiete werden weitgehend schlecht durch das Modell charakterisiert (Anlage 8, Abb. 52). An den Färöer Inseln konnten übergreifend niedrigere Temperaturen und deutlich höhere Nährstoffkonzentrationen ermittelt werden. Während tiefere Temperaturen Algenwachstum in den meisten Fällen tatsächlich verlangsamen, wird für hohe Nährstoffkonzentrationen jedoch das Gegenteil erwartet. Auf wei-

terführende Analysen zur Diskriminierung einzelner Gebiete wurde in diesem Zusammenhang verzichtet.

Es muss bei den Untersuchungen natürlich auch berücksichtigt werden, dass mit Ausnahme der Stationen 61 und 62 keine Algenblüten gefunden wurden. Generell waren die Toxinkonzentrationen bei dieser Untersuchung sehr gering, auch wenn punktuell höhere Konzentrationen gefunden wurden. Es wäre dennoch interessant bei zukünftigen Kampagnen die Zusammenhänge zwischen Toxinen und Umweltparametern genauer zu betrachten. Besonders auch im Zusammenhang mit dem tatsächlichen Auftreten einer Algenblüte. Es sollten dabei neben den hier betrachteten weitere Parameter wie z.B. Zellzahl der toxischen Arten, Planktongemeinschaft, Lichtklima, weitere Nährstoffe wie Ammonium und resultierende Nährstoffverhältnisse, Strömungen, Frischwasser-einfluss etc., in die Analysen einbezogen werden. Besonders da nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Algenwachstum ausschließlich durch die hier betrachteten Parameter beschrieben werden kann, wären durch die zusätzlichen Informationen auch weitere Möglichkeiten für eine Verknüpfung einzelner Parameter gegeben, die ggf. bessere Rückschlüsse auf toxische Algen erlauben. An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass Chlorophyll *a* i.d.R. zur Bewertung der Biomasse herangezogen wird, was jedoch anders als bei Diatomeen, welche normalerweise den weitaus größten Anteil an der Planktongemeinschaft ausmachen, nicht besonders gut zur Beurteilung von Abundanzen toxischer Dinoflagellaten geeignet ist. Exemplarisch sei auch die Station 50 in der Ostsee angesprochen mit besonders hoher Chlorophyllkonzentration mit bis zu 13 µg/l und auffällig geringen Sauerstoffgehalten (~ 1-2 ml/l), die jedoch eher auf eine hohe Zellzahl nicht toxischer Diatomeen der Art *Guinardia flaccida* zurückgeführt werden konnte. Die Stationen der *Dinophysis* Blüte hingegen wiesen im Vergleich relativ geringe Konzentrationen an Chlorophyll *a* (~ 2 µg/l) auf. Mit Ausnahme der Domoinsäure produzierenden Diatomeenart *Pseudo-Nitzschia* spp. stammt der größte Beitrag zu Chlorophyll *a* von ungiftigen Diatomeen, während Dinoflagellaten weitere Hauptpigmente wie z.B. Peridinin aufweisen (Laza-Martinez *et al.*, 2007), deren Vorkommen für die Detektion giftiger Algen wesentlich aussagekräftiger ist. Durch aufwendigere Pigmentanalysen sollte dies eventuell berücksichtigt werden. Im Rahmen zukünftiger Vorhaben könnte eventuell auch ein anderer Ansatz als sinnvoll angesehen werden. In diesem Zusammenhang wären z.B. auch mehrjährige Studien an einem Ort von Interesse, so dass eine ausreichende Datenlage gewährleistet werden könnte und eine bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich der vorliegenden Umweltparameter in Bezug auf das Auftreten toxischer Algen eher Rückschlüsse auf beeinflussende Faktoren zulassen würde als Einzelkampagnen.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Azaspirsäuren

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung potentieller Azaspirsäuren (AZAs) und liefert erste Ergebnisse hinsichtlich einer strukturellen Aufklärung dieser. Seit dem ersten Nachweis von AZAs sind mehr als 30 weitere Analoga der Toxingruppe identifiziert worden, welche ein charakteristisches Fragmentierungsmuster aufweisen. Zur Verdeutlichung des Fragmentierungsmusters wird in der Abbildung 30 das Produkt Ionen Spektrum (EPI) von AZA-1 mit $[M+H]^+$ m/z 842 als Referenzspektrum aufgezeigt.

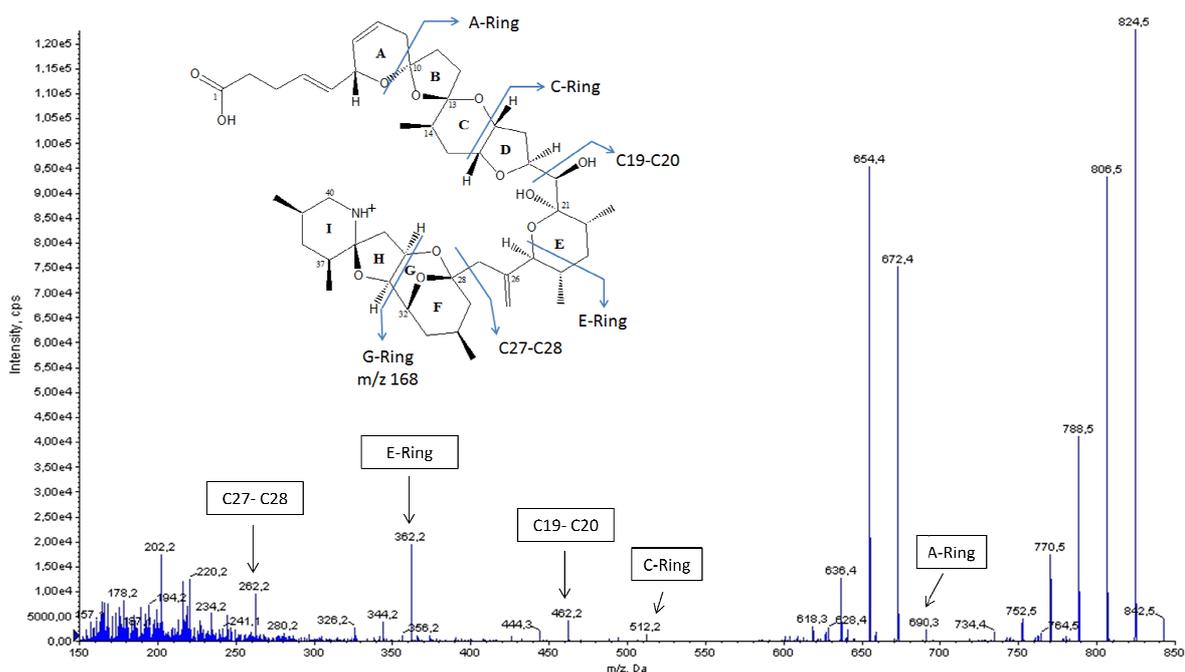


Abb. 30: MS/MS Produkt Ionen Spektrum von AZA-1 mit $[M+H]^+$ m/z 842 und Zuordnung der auftretenden Fragmentgruppen, in Anlehnung an die Arbeiten von Brombacher *et al.* (2002) und Rehmann *et al.* (2008).

Dem Spektrum können die charakteristischen Fragmentgruppen für AZA-1 inklusive der auftretenden Wasserabspaltungen, erkennbar an einer Differenz von 18 Da, entnommen werden. Während sich die vorderen Fragmente bis zur C19-C20-Abspaltung, bedingt durch die Struktur der verschiedenen AZAs unterscheiden, haben jedoch alle bislang bekannten AZAs die Fragmente m/z 362, m/z 262 sowie m/z 168 gemein (Brombacher *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2008). Die dargestellte Fragmentierung der bekannten AZAs stellt die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen an verschiedenen Kulturoislaten dar. Die Hauptanalysen zur Ermittlung der jeweiligen Fragmentierung der Substanzen wurden hierbei mit einem Triple Quadrupol MS durchgeführt.

4.2.1 Kulturoisolate *Azadinium poporum* und *Amphidoma languida*

LC-MS Analysen der Kulturoisolate von *A. poporum* aus Korea (Potvin *et al.*, 2011) und China lieferten aufgrund der Detektion der Masse $[M+H]^+$ m/z 858 (Anlage 9, Abb. 53) unerwartete Ergebnisse, da diese Masse eigentlich AZA -7, -8, -9 und -10 zugeordnet wird, welche als Schalentiermetabolite gelten und nicht mit der Produktion durch einen Dinoflagellaten in Verbindung gebracht werden (James *et al.*, 2004). Das resultierende EPI des protonierten Moleküls m/z 858 für das Kulturoisolat *A. poporum* Korea ist in der Abbildung 31 dargestellt. Das EPI der China-Kultur zeigt das gleiche Fragmentierungsmuster (Anlage 9, Abb. 54).

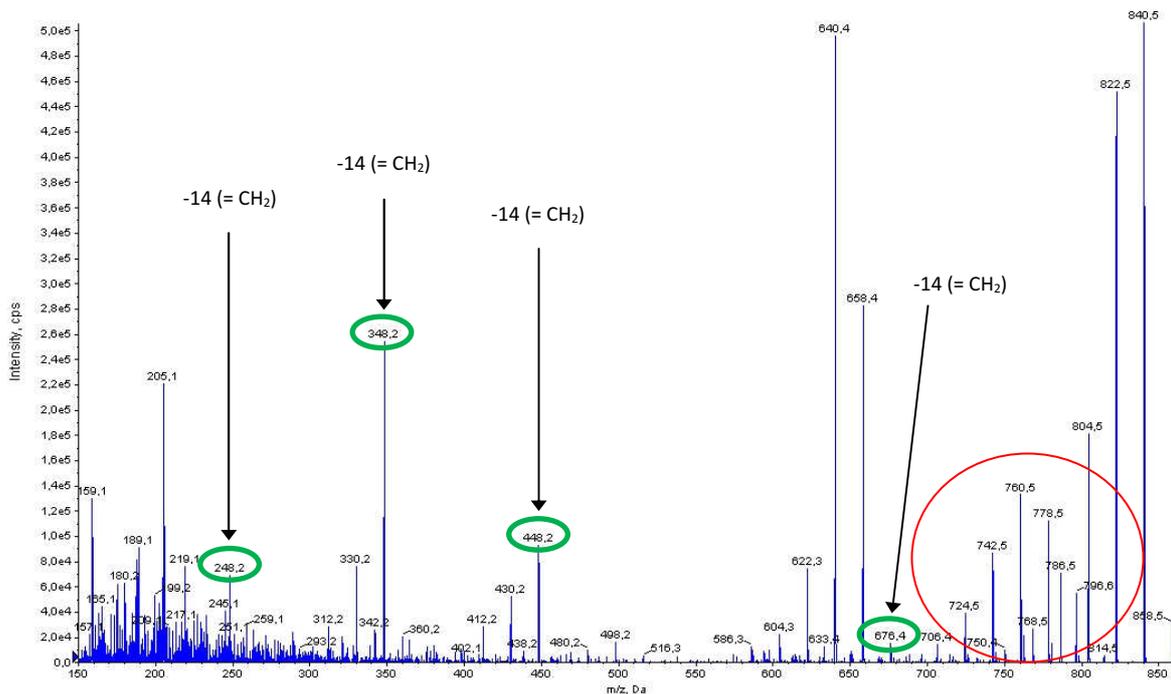


Abb. 31: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 858 der Kultur *A. poporum* Korea.

Aus dem Spektrum sind Fragment Ionen mit m/z 676, m/z 448, m/z 348 und m/z 248 ersichtlich. Verglichen mit dem EPI von AZA-1 zeigt sich hierbei für alle Fragmentgruppen eine kontinuierliche Verschiebung dieser von 14 Da, welche der Masse einer Methylengruppe (CH₂) entsprechen würden. Weiterhin auffällig ist, dass der Bereich um m/z 750 zusätzliche Abspaltungen aufweist, die sich nicht ausschließlich auf die üblichen Wasserabspaltungen der bekannten AZAs zurückführen lassen (Abb. 32).

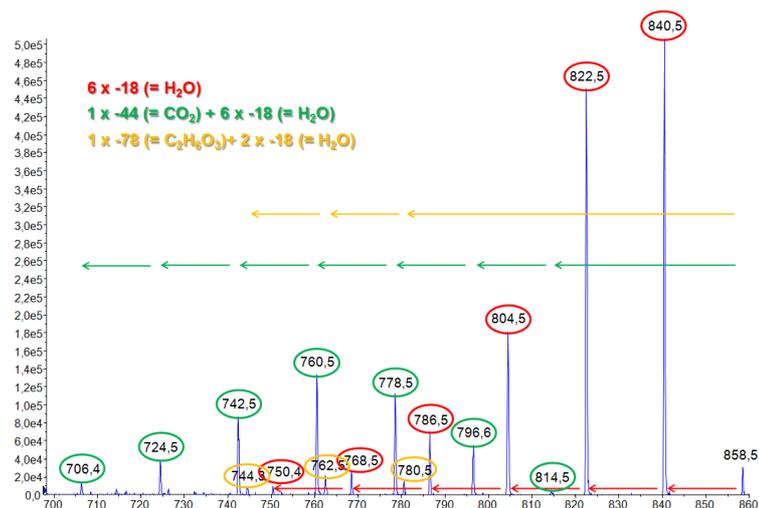


Abb. 32: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 700 bis 860 m/z des protonierten Moleküls m/z 858 von *A. poporum* Korea.

Im ausgewählten Bereich lassen sich, ausgehend vom Molekülion m/z 858, neben 6 aufeinander folgenden Differenzen von 18 Da, die auf Wasserverluste hindeuten (Rot), zusätzlich die Fragment Ionen m/z 814 (Grün) mit einer Differenz von 44 Da und m/z 780 (Gelb) mit 78 Da, denen sich jeweils weitere Verluste mit 18 Da (= H₂O) anschließen. Die Masse 44 würde hierbei auf eine CO₂-Abspaltung hindeuten. Durch FT-ICR-MS konnte für m/z 858 eine Elementarzusammensetzung von C₄₇H₇₂NO₁₃ und für m/z 814 von C₄₆H₇₂NO₁₁ ermittelt werden, wodurch eine CO₂-Abspaltung bestätigt wird.

Betrachtet man die Molekularzusammensetzung von AZA-1 mit C₄₇H₇₁NO₁₂ und vergleicht diese mit der von AZA-858 mit C₄₇H₇₁NO₁₃, so ist ausschließlich eine Differenz von einem Sauerstoffatom ersichtlich. Basierend auf diesem Ergebnis und unter Berücksichtigung der Differenz der Ausgangsmoleküle, wird angenommen, dass eine weitere Hydroxylgruppe an der Carboxyl-Seitenkette von AZA-858 vorliegt. Weiterhin wird durch die kontinuierliche Verschiebung der Fragmente um 14 Da die Hypothese aufgestellt, dass eine Methyl- oder Methylengruppe des F-I Ringsystems im Vergleich zu AZA-1 fehlen muss. AZAs weisen bei der Abspaltung des G-Rings das Fragment m/z 168 mit C₁₀H₁₆NO auf (Rehmann *et al.*, 2008). FT-ICR-MS Analysen von AZA-858 zeigten jedoch das Fragment m/z 154, mit C₉H₁₄NO, welches im Vergleich zu m/z 168 ebenfalls noch eine Differenz von CH₂ (=14 Da) aufweist. Hieraus resultiert die Annahme, dass eine der Methylgruppen des I-Rings an die Carboxyl-Seitenkette verschoben vorliegen könnte.

Durch die veränderte Struktur der Carboxyl-Seitenkette und der damit einhergehenden veränderten Chemie, könnten möglicherweise die weiteren Abspaltungen von AZA-858 durch Nachbargruppeneffekte begünstigt werden. An dieser Stelle sei besonders auf das Fragment m/z 780 hingewiesen, welches vom Molekülion einer Differenz von m/z 78 entspricht. Der Literatur der Azas-

pirsäuren lassen sich keine Berichte über das Auftreten einer solchen Abspaltung entnehmen. Für diese Differenz wurde mit Hilfe der FT-ICR-MS eine Zusammensetzung von $C_2H_6O_3$ ermittelt. Hieraus ergeben sich jedoch keine einfachen Abspaltungen, die der Differenz zugrunde liegen könnten. Auch der Vergleich mit weiteren Toxingruppen konnte zu keiner Klärung beitragen. Es liegt dabei die Vermutung nahe, dass es sich eventuell auch um 2 Verbindungen handeln könnte und diese nicht einzeln registriert wurden. Normalerweise erfolgt das Protonieren eines Moleküls an den basischen Stellen des Moleküls. Im Falle der Azaspirsäuren wird eine Protonierung üblicherweise am Stickstoffatom des I-Rings beobachtet. Diese Stelle wäre im Vergleich zur Carboxylgruppe basischer. Jedoch könnte es prinzipiell auch möglich sein, dass eine Protonierung an der Carboxylgruppe erfolgen könnte. Ausgehend von den bisherigen Annahmen zum Aufbau der Seitenkette von AZA-858 soll der nachfolgende Vorschlag (Abb. 33) einen möglichen Reaktionsablauf verdeutlichen der zur 78er-Abspaltung führen könnte und in plausiblen Verbindungen enden würde. Dennoch ist dieser Vorschlag rein spekulativ und kann nicht durch Literatur gestützt werden.

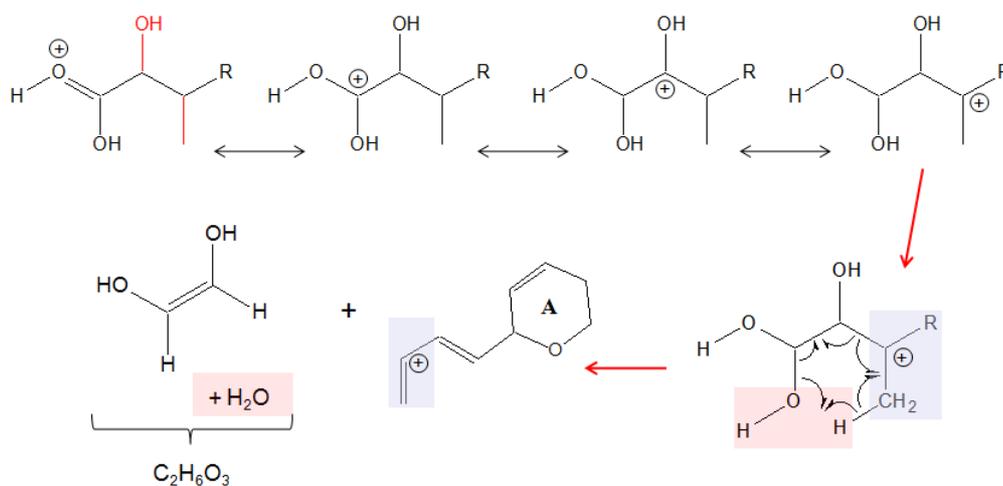


Abb. 33: Möglicher Reaktionsablauf zur Erklärung der Abspaltung m/z 78 des protonierten Moleküls m/z 858.

Unter Annahme, dass die Protonierung an der Carboxylgruppe erfolgt, könnte es, bedingt durch die Doppelbindung zu einer Ladungsverschiebung innerhalb der Molekülstruktur kommen, resultierend in einer geöffneten 6-Ring Struktur, in welcher es durch eine Art „Pseudo“ Retro-Diels-Alder Reaktion zu weiteren Umlagerungen kommt. Der Bruch dieser Struktur würden, neben der stabilen Allylverbindung (mit Rest R), die neutralen Produkte Dihydroxyethylen und Wasser hervorbringen, die im CID-Spektrum ausschließlich durch einen Peak ersichtlich sind und zusammen die Differenz $C_2H_6O_3$ ergeben. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Ladungsverschiebung an die Carboxylgruppe des Moleküls wäre ggf. durch weitere MS^3 -Experimente möglich. Die Isolierung des m/z 780 mittels Ionenfalle mit anschließender Fragmentierung würde weitere Rückschlüsse auf

dieses Fragment zu lassen und einen indirekten Beweis liefern können. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die vorliegende Konzentration nicht ausreicht und dass es sich bei der resultierenden Differenz m/z 78 um eine sehr kleine Abspaltung handelt, einhergehend mit Empfindlichkeitsproblemen dieser Herangehensweise.

Basierend auf den bisher gemachten Aussagen würde sich der nachfolgende Vorschlag für eine mögliche Struktur von AZA-858 ergeben (Abb. 34). Die blauen Markierungen sollen hierbei verdeutlichen, dass in diesem Bereich eine Methylgruppe fehlen sollte.

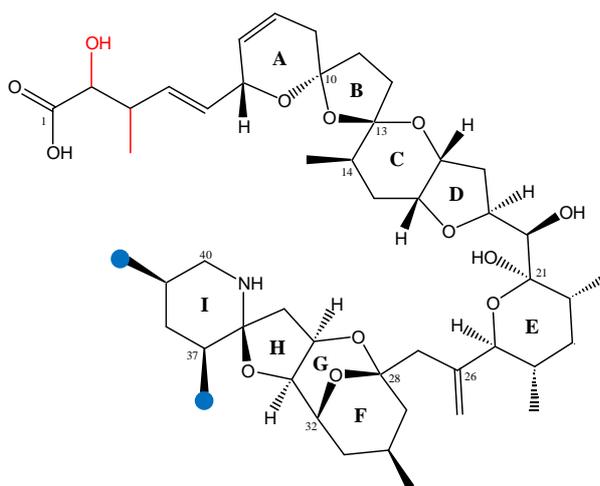


Abb. 34: Strukturvorschlag für AZA-858.

Basierend auf dem Fund in den Kulturisolaten von *A. poporum* Korea/China wurden Isolate der gleichen Art aus der Nordsee (*A. poporum* C5) eingehender betrachtet. Über Precursor Scans der m/z 348 konnte hierbei die Detektion der Masse m/z 846 erfolgen (Anlage 9, Abb. 53). Das resultierende EPI ist in der Abbildung 35 dargestellt.

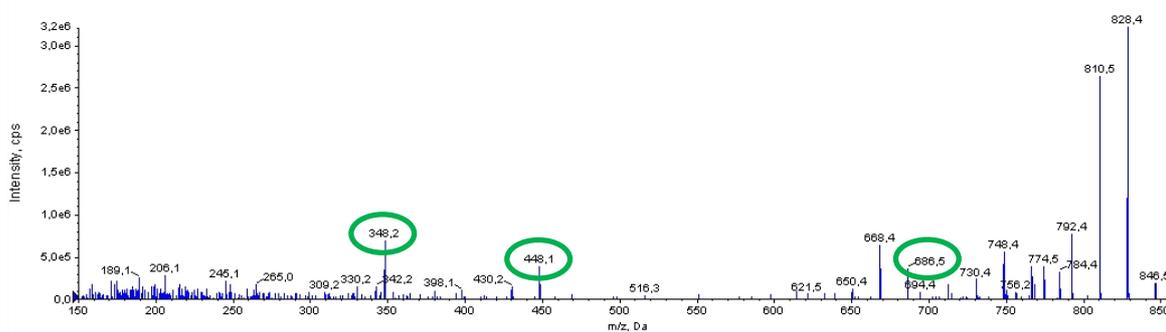


Abb. 35: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 846 der Kultur *A. poporum* C5, Nordsee.

Aus dem Spektrum sind ebenfalls die Fragmente m/z 448 und m/z 348 ersichtlich. Die A-Ring Abspaltung kann dem Fragment m/z 686 zugeordnet werden. Durch FT-ICR-MS konnten auch die Fragmente m/z 248 und m/z 154 ermittelt werden, welche in dem hier gezeigten Spektrum nicht

ersichtlich sind bzw. im Rauschen untergehen. Verglichen mit AZA-858 zeigt die erste Fragmentierungsgruppe jedoch ein ähnliches Muster (Abb. 36).

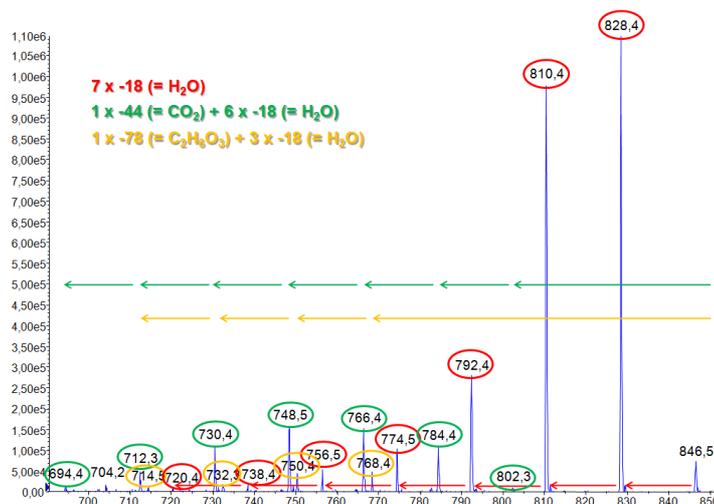


Abb. 36: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 690 bis 850 m/z des protonierten Moleküls m/z 846 von *A. poporum* C5, Nordsee.

Ausgehend von Molekülion deuten die sieben aufeinander folgenden Differenzen von 18 Da auf Wasserverluste hin. Weiterhin sind aus dem Spektrum das Fragment m/z 802 ersichtlich, welches mit einer Differenz von 44 Da erneut auf eine CO_2 -Abspaltung hindeutet, aber auch das Fragment m/z 768, resultierend in der bereits beobachteten Differenz von m/z 78. Beiden Fragmenten schließen sich weitere Wasserverluste (= 18 Da) an. Aus FT-ICR-MS konnte für AZA-846 eine Molekularzusammensetzung von $\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{NO}_{13}$. Im Vergleich zu AZA-858 mit $\text{C}_{47}\text{H}_{71}\text{NO}_{13}$ liegt somit eine Differenz von einem Kohlenstoffatom vor. Ausgehend von den gemeinsamen Wasserverlusten, der CO_2 -Abspaltung wie auch der 78er-Abspaltung liegt die Vermutung nahe, dass für die Carboxyl-Seitenkette von AZA-846 eine gleiche Struktur vorliegt. Weiterhin deuten die Fragmente m/z 448, m/z 348 wie auch m/z 248 und m/z 154, die auch in AZA-858 vorliegen, auf einen ähnlichen strukturellen Aufbau der Molekülstruktur hin. Hieraus würde resultieren, dass ein Unterschied ausschließlich innerhalb der Ringstrukturen A bis D vorliegen muss. Eine mögliche Erklärung zum Ausgleich der Differenz zu AZA-858, wäre der Verlust einer Methylengruppe im Bereich der Ringstrukturen A bis D, in Kombination mit dem Wegfall der Doppelbindung des A-Rings sein. Basierend auf dieser Annahme soll die nachfolgende Abbildung 37 einen möglichen Strukturvorschlag für AZA-846 verdeutlichen. Der Wegfall einer Methylgruppe des I-Rings ist erneut durch die blauen Markierungen gekennzeichnet.

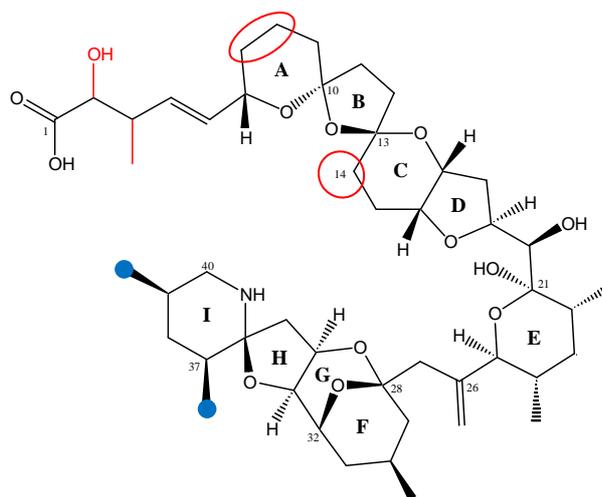


Abb. 37: Strukturvorschlag für AZA-846.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass für AZA-858 der A-Ring Bruch mit dem Fragment m/z 658, für AZA-846 hingegen mit dem Fragment m/z 686 einhergeht. Da für beide Moleküle die gleiche Struktur der Seitenkette, basierend auf dem beobachteten Fragmentierungsmuster, angenommen wurde, deutet dies darauf hin, dass die A-Ring Spaltung an unterschiedlichen Stellen des Ringes erfolgen muss. Betrachtet man die Differenzen zwischen dem Ausgangsmolekül und dem jeweiligen Fragment Ion, so ergibt sich für AZA-858 eine Differenz von $C_{10}H_{16}O_4$, für AZA-846 hingegen eine Differenz von $C_7H_{12}O_4$. Basierend auf dieser Datenlage müssten die nachfolgend dargestellten Bruchstellen der A-Ring Struktur den vorgeschlagenen Molekülen zugrunde liegen (Abb. 38).

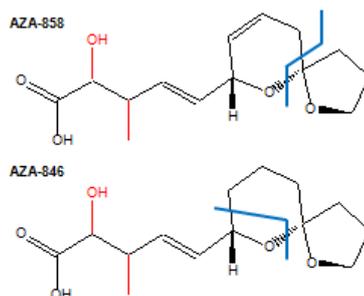


Abb. 38: Darstellung der Bruchstellen der A-Ring Struktur von AZA-858 und AZA-846.

Während AZA-858 den gleichen Bindungsbruch innerhalb des A-Ringes wie AZA-1 aufweist (vgl. Abb. 30), würde für AZA-846 hingegen dieser an einer bisher nicht bekannten Stelle erfolgen. Den bekannten AZAs ist gemein, dass der A-Ring Bruch analog zu dem von AZA-1 erfolgt. Diesen Molekülen liegt dabei aber ein 6-Ring mit einer Doppelbindung zugrunde. Die Fragmentierung der AZAs beruht hierbei auf einer ablaufenden Retro-Diels-Alder Reaktion innerhalb der A-Ring Struktur (Rehmann *et al.*, 2008). Die Voraussetzung für diese Reaktion wäre also im Falle von AZA-858 durch den 6-Ring und die Doppelbindung weiterhin gegeben. Ein gesättigter Ring würde diese

Reaktion jedoch nicht mehr zulassen und könnte dabei eventuell einen anderen Bindungsbruch begünstigen.

Bei den LC-MS Analysen der Kulturoisolate der neuentdeckten Art *Amphidoma languida* aus der Bantry Bay in Irland, welche Ähnlichkeiten zu *Azadinium* spp. aufweist (Tillmann *et al.*, 2011b), konnten durch Precursor Scan der m/z 348 die Massen m/z 830 und m/z 816 detektiert werden (Anlage 9, Abb. 53). Mit der Abbildung 39 wird hierbei zuerst das aufgenommene EPI der m/z 830 verdeutlicht.

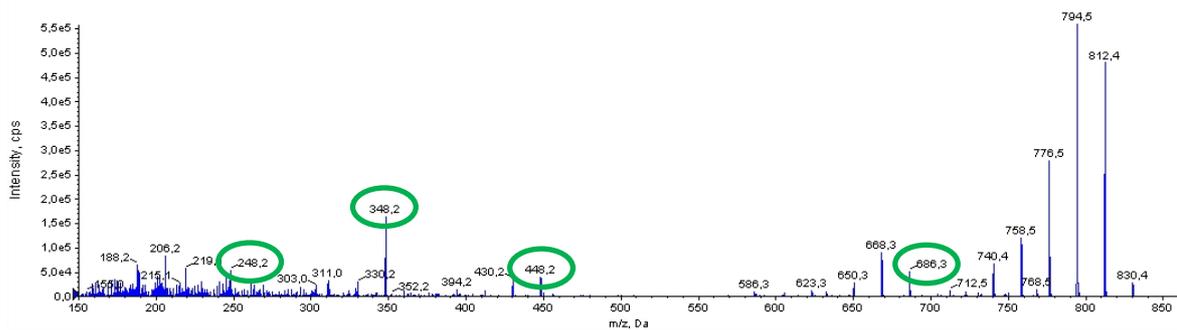


Abb. 39: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 830 der Kultur *A. languida*.

Dem Spektrum können erneut die bereits beobachteten Fragmente m/z 248, m/z 348 und m/z 448 entnommen werden. Die A-Ring Abspaltung mit m/z 686 stimmt mit dem Fragment von AZA-846 überein. Betrachtet man jedoch den Bereich von 700 bis 830 m/z so sind im Vergleich zu AZA-858 und AZA-846 Unterschiede im Fragmentierungsmuster ersichtlich (Abb. 40).

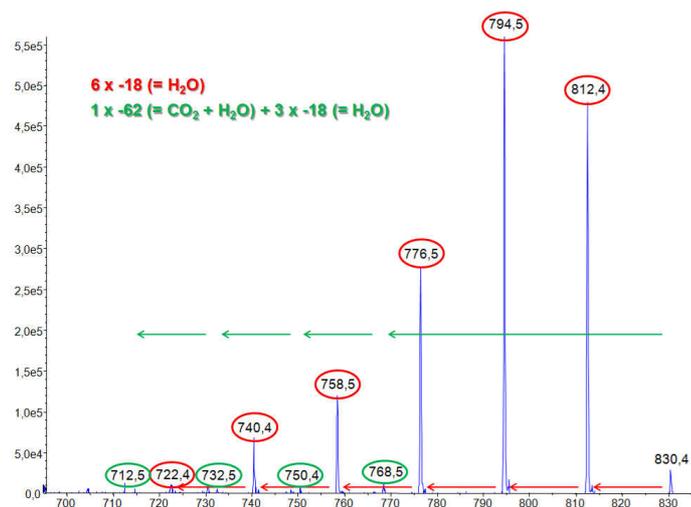


Abb. 40: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 700 bis 830 m/z des protonierten Moleküls m/z 830 von *A. languida*.

Es zeigen sich zwar weiterhin die bereits erwähnten Wasserverluste ($=18$ Da), auch könnte das Fragment m/z 768 auf eine eventuelle CO_2 -Abspaltung hindeuten, jedoch ist diese verglichen mit

den bisherigen Beobachtungen weniger stark ausgeprägt und konnte durch FT-ICR-MS nicht bestätigt werden. Weiterhin ist keine M78-Abspaltung mehr ersichtlich. Im Vergleich zu AZA-846 ($C_{46}H_{71}NO_{13}$) konnte für AZA-830 eine Molekularzusammensetzung von $C_{46}H_{71}NO_{12}$ bestimmt werden, resultierend in einer Differenz von einem Sauerstoffatom. Da die Fragmentierung von AZA-830 bis zum A-Ring mit der von AZA-846 übereinstimmt und auch das Fragment m/z 154 aus den FT-ICR-MS Analysen ersichtlich war, wird bis dahin die gleiche Struktur angenommen, so dass der Unterschied in der Seitenkette vorliegen muss. Ausgehend von dieser Datenlage wird der folgende Vorschlag für eine mögliche Struktur von AZA-830 angenommen (Abb. 41).

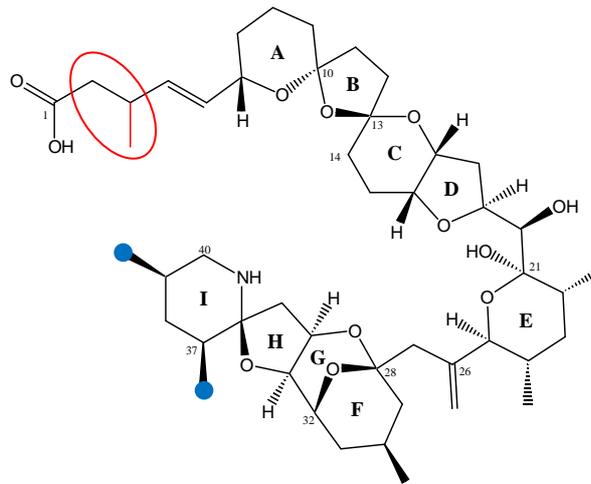


Abb. 41: Strukturvorschlag für AZA-830.

Durch das Fehlen der Hydroxylgruppe würde die Differenz des Sauerstoffatoms ausglich und die Ausgangsmasse von AZA-830 bestätigt werden. Die restliche Fragmentierung würde dadurch unverändert bleiben und auch das A-Ring Fragment mit m/z 686 könnte erklärt werden. Eventuell würde der Wegfall der OH-Gruppe und die damit veränderte Chemie der Seitenkette dazu beitragen, dass die bislang beobachteten Abspaltung der ersten Fragmentierungsgruppe von AZA-858 und AZA-846, insbesondere die ausgeprägte CO_2 -Abspaltung wie auch die 78er Differenz, unterdrückt werden. Betrachtet man hingegen das entsprechende EPI der m/z 816, so weist dieses im Gegensatz zu AZA-830 auffällige Unterschiede auf (Abb. 42).

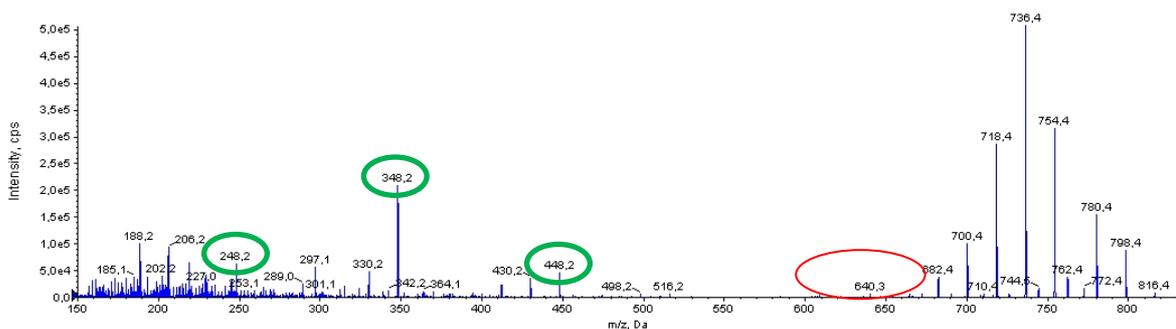


Abb. 42: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 816 der Kultur *A. languida*.

Es sind zwar weiterhin die Fragmente m/z 248, m/z 348 und m/z 448 ersichtlich, auch die m/z 154 konnte via FT-ICR-MS ermittelt werden, jedoch fehlt die bislang beobachtete A-Ring Abspaltung. Auch zeigt sich ausgehend vom Molekülion erneut ein veränderter Fragmentierungsprozess der ersten Fragmentgruppe (Abb. 43).

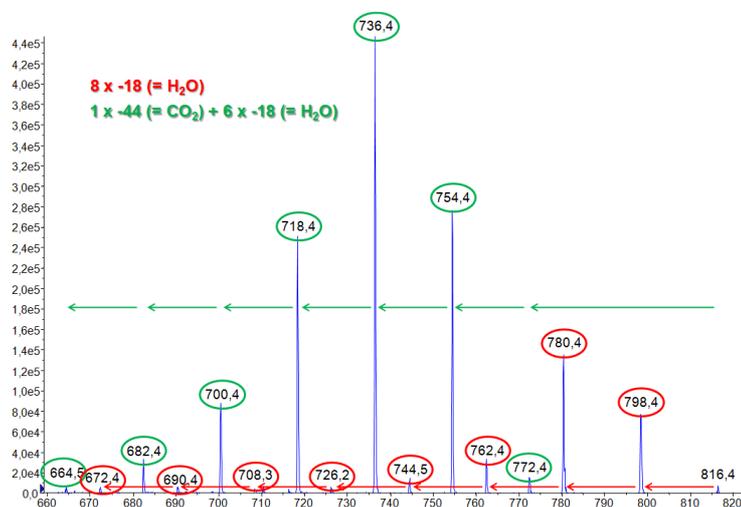


Abb. 43: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 660 bis 820 m/z des protonierten Moleküls m/z 816 von *A. languida*.

Es ist zwar eine Kette von acht Wasserverlusten ersichtlich (Rot). Diese werden jedoch im Vergleich zu AZA-830 von einer weitaus stärker ausgeprägten CO_2 -Abspaltung mit weiteren Wasserverlusten überlagert (Grün). Die CO_2 Differenz konnte hierbei durch FT-ICR-MS bestätigt werden. AZA-830 mit einer Molekularzusammensetzung von $\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{NO}_{12}$ weist im Vergleich zu AZA-816 mit $\text{C}_{45}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}$ eine Differenz von CH_2 auf. Ausgehend von der Tatsache, dass ebenfalls die Fragmente m/z 248, m/z 348 und m/z 448 beobachtet werden können, wird vermutet, dass eine Änderung im Bereich der A bis D Ring-Struktur vorliegen sollte. Auf dieser Grundlage wird der nachfolgende Strukturvorschlag für AZA-816 unterbreitet (Abb. 44).

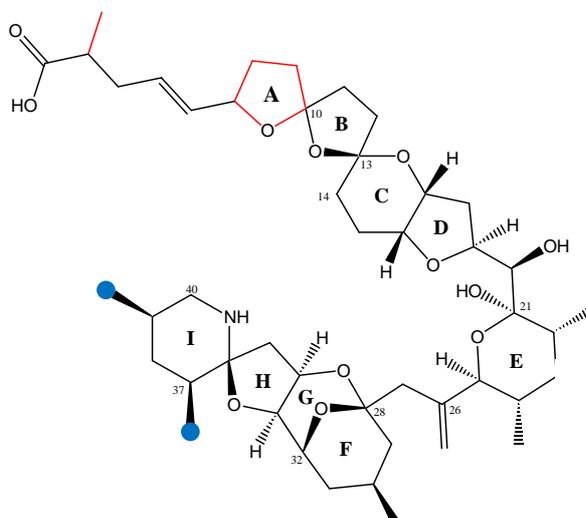


Abb. 44: Strukturvorschlag für AZA-816.

Da für AZA-816 keine A-Ring Abspaltung beobachtet werden kann, würde dies ggf. darauf hindeuten, dass anstelle der bisherigen 6-Ring Struktur ein 5-Ring vorliegen kann und dieser durch die veränderte Geometrie und Chemie eine Unterdrückung des A-Ring Fragmentes begünstigt. Da jedoch trotzdem eine ausgeprägte CO₂-Abspaltung ersichtlich war, könnte die Nähe der Methylgruppe diese eventuell begünstigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen eine erste Verknüpfung der bisher unbekannt Substanzen von *A. poporum* und *A. languida* mit den bekannten AZAs und verdeutlichen eine mögliche Verbindung dieser. Den Fragmentierungsprozessen lassen sich dabei deutliche Ähnlichkeiten entnehmen. Auch wenn diverse AZA-Analoga die Fragmente m/z 658 wie auch m/z 448 aufweisen, so haben diese dann jedoch das m/z 362, Fragment wieder gemein. Somit weisen die potentiellen AZAs beider Algenarten bislang einzigartige Fragmente auf, das E-Ring Fragment mit m/z 348 sowie das F, G, H, I-Ring Fragment mit m/z 248. Für alle vier Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Strukturvorschläge unterbreitet, resultierend aus den ermittelten Fragmentierungsmustern die via LC-MS/MS ermittelt wurden in Anlehnung an die Struktur von AZA-1. Diese Ergebnisse wurden weiterhin gestützt durch die Kombination mit hochauflösender MS. Die beobachteten zusätzlichen Abspaltungen werden bislang zwar nicht in Verbindung mit AZAs gebracht, könnten aber durch die aufgezeigten veränderten Strukturen der Moleküle begünstigt werden. Die zugrunde gelegten Reaktionsmechanismen, wie z.B. im Falle der M-78 Erklärung durch eine „scheinbare“ Retro-Diels-Alder Reaktion, sind rein spekulativ und sollen lediglich plausible Möglichkeiten verdeutlichen, die jedoch nicht durch die zur Verfügung stehenden Mittel überprüft werden konnten und somit weiterer Untersuchungen und Recherchen bedürfen.

Die Bestimmung der jeweiligen Molekularzusammensetzung der Moleküle via FT-ICR-MS erfolgte unter Berücksichtigung der Stickstoffregel, wodurch nur eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen möglich war. Es wurde den Molekülen, in Anlehnung an die AZAs, ein Stickstoffatom zugrunde gelegt. Basierend auf den ähnlichen Fragmentierungsmustern wird die Wahrscheinlichkeit, einer beachtlichen Änderung der Grundstruktur als relativ klein angesehen. Es erfolgte dennoch eine Überprüfung unter Annahme von drei N-Atomen, die jedoch kein sinnvolles Ergebnis der weiteren Fragmente mehr zuließ und dem Molekül damit eine komplett andere Struktur zugrunde gelegt hätte und somit gegen das aufgenommene Fragmentierungsmuster sprechen würde. Die kontinuierliche Massendifferenz von 14 Da, die mit Ausnahme der A-Ring Abspaltung, allen Fragmenten entnommen werden kann, wurde einer CH₂-Gruppe gleichgesetzt, da dies die einzig bleibende plausible Erklärung für diese Differenz wäre. Da diese durch FT-ICR-MS auch für den G, H, I-Ring (m/z 154) ermittelt werden konnte, muss diesem Bereich die Änderung vorliegen. Aus den Untersuchungen sind zwar keine Rückschlüsse auf die betreffende Stelle möglich, jedoch werden

die Methylgruppen des I-Rings der AZAs als plausible angesehen, da ein Verlust an anderer Stelle mit einer Strukturänderung der Moleküle einhergehen muss.

Die bisherigen Annahmen und Ergebnisse wurden weiterhin durch die durchgeführten Methylierungsexperimente unterstützt. Die Möglichkeit der Methylierung der freien Carboxylgruppe mit TMSDM wurde vorab an *Azadinium spinosum*, dem Produzenten von AZA-1 und AZA-2 (Krock *et al.*, 2009) bestätigt. Auch für die einzelnen Kulturisolate konnte eine Methylierung der jeweiligen Substanz erfolgen, resultierend in einer Massenverschiebung von 14 Da mit einhergehender Verschiebung der Retentionszeiten. Den EPIs der jeweiligen Methylester kann dabei entnommen werden, dass durch die Anlagerung der Methylgruppe die bislang beobachteten Abspaltungen der ersten Fragmentierungsgruppe nicht mehr ersichtlich waren und ausschließlich Wasserverluste auftraten (Anlage 11, Abb. 56). Die Methylierung scheint dazu beizutragen, dass Nachbargruppeneffekte mit der Carboxylgruppe weitgehend unterdrückt werden. Auch wenn vorab indirekt von einer freien Carboxylgruppe an der Seitenkette ausgegangen wurde, kann mit diesen Ergebnissen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den bekannten AZAs bestätigt werden.

Dennoch sei an dieser Stelle abschließend hervorgehoben, dass es sich bei den unterbreiteten Strukturvorschlägen um begründete Annahmen handelt, die durch weitere Analysen bestätigt werden müssen. Auch wenn die bisherigen Untersuchungen bereits erste strukturelle Elemente hervorbringen, kann die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) Auskunft über einzelne Atome und deren Wechselwirkungen ermöglichen, so dass eine eindeutige Bestimmung der vorliegenden Molekülstrukturen von AZA-858, AZA-846, AZA-830 und AZA-816 erfolgen kann. Hierdurch könnte der eindeutige Beweis für eine Verbindung der bislang als nicht toxisch geltenden Art *Azadinium poporum* und der neu entdeckten Art *Amphidoma languida* mit dem bekannten Produzenten der Azaspisäuren aufgezeigt werden und die bisherigen Strukturvorschläge bestätigt werden.

4.2.2 Feldkampagnen 2007 - 2011

Basierend auf den Ergebnissen der Kulturisolate von *A. poporum* und *A. languida* erfolgte eine Durchsicht archivierter Proben der Jahre 2007 bis 2011 aus dem Nordseeraum, dem Ebro Delta bis hin zur argentinischen Küste. Da bislang die entsprechenden Massenübergänge von AZA-858, AZA-846, AZA-830 und AZA-816 nicht berücksichtigt wurden, sollte überprüft werden, ob sich diese Substanzen bereits in den Proben vergangener Forschungskampagnen finden lassen. Für die Analysen wurden Seewasser- und fraktionierte Netzzugproben herangezogen und mittels LC-MS analysiert. Zu Beginn sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass innerhalb des Probenmaterials der Puerto Deseado Ausfahrt (2010) an der argentinischen Küste, wie auch der Ebro Delta Kam-

pagne (2010) in der Alfacs / Fangar Bucht in Spanien, weder AZA-1 noch weitere Azaspärsäure ähnliche Substanzen gefunden werden konnten.

Auffällig hingegen war das Probenmaterial der Forschungsausfahrt der FS *Poseidon* im Jahre 2007. Im Rahmen dieser Kampagne wurden die Gebiete der schottischen Ostküste, der Südküste Norwegens und der Nordküste Dänemark beprobt. Innerhalb der Skagerrak Region (vgl. Stationskarte, Anlage 12, Abb. 57) konnte dabei weitgehend an allen Stationen (415 bis 436) AZA-830 nachgewiesen werden. Exemplarisch für diesen Fund wird mit der Abbildung 45 das Total Ionen Chromatogramm des Produkt Ionen Scans der m/z 830 der 20-3 µm Fraktion der Station 430 der Nordküste Dänemarks gezeigt, da diese Probe besonders hohe Intensitäten aufwies. Dem Chromatogramm können im Gegensatz zur *A. languida* Kultur jedoch deutlich zwei Peaks, mit RT 12,05 min und RT 12,96 min, entnommen werden. Dies war auch weitgehend für alle anderen Proben der Region der Fall. Für beide Peaks kann die entsprechende Fragmentierung der Abbildung entnommen werden.

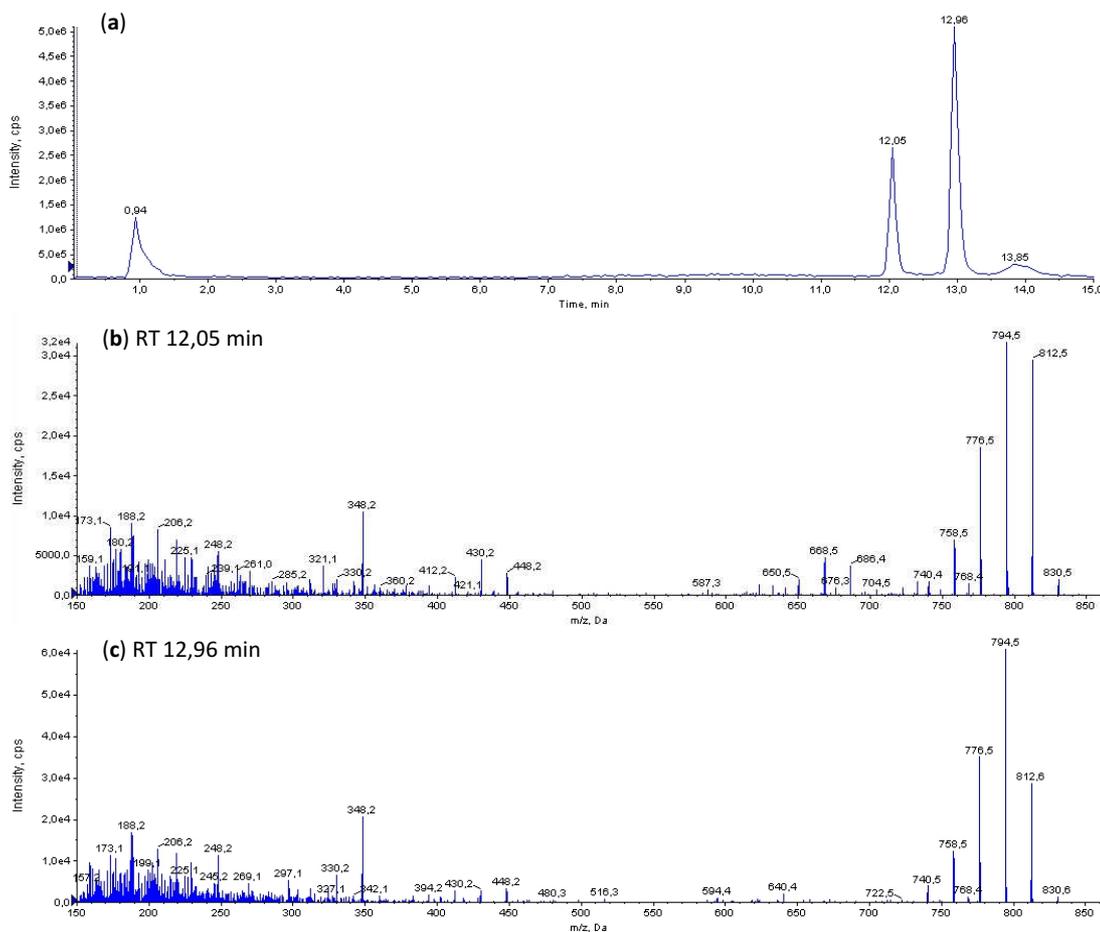


Abb. 45: (a) Total Ionen Chromatogramm des protonierten Moleküls m/z 830 der 20-3 µm Fraktion der Station 430 der Feldkampagne FS *Poseidon* 2007 (Skagerrak/Dänemark). MS/MS Produkt Ionen Spektrum der RT 12,05 (b) und RT 12,96 (c) mit CE = 70V.

Während der erste Peak mit RT 12,05 min hinsichtlich Retentionszeit und Fragmentierungsmuster AZA-830 zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 39), zeigt die Fragmentierung des zweiten Peaks (RT 12,89 min) eher Ähnlichkeiten zu AZA-816, da insbesondere die A-Ring Abspaltung nicht mehr ersichtlich ist, während jedoch weiterhin die Fragmente m/z 448, m/z 348 und m/z 248 vorliegen. Die zusätzliche CO₂-Abspaltung für AZA-816 kann in Spektrum jedoch nicht beobachtet werden. Die Methylierungsexperimente mit TMSDM erfolgte erst nach Durchsicht des gesamten Probenmaterials, jedoch konnte hierdurch im Anschluss bestätigt werden, dass es sich bei dem zweiten Peak um die methylierte Form von AZA-816 handelt, dessen erste Fragmentierungsgruppe durch die Methylierung um 14 Da verschoben vorliegt, und somit mit m/z 830 die gleiche Molekularmasse wie AZA-830 hat. Die Ausbildung von Methylestern wird durch die Extraktion wie auch der Lagerung der Proben in Methanol (MeOH) begünstigt. Im Falle der FS *Poseidon* Proben lagen diese seit 2007 in MeOH vor, was die Ausbildung erheblich begünstigt. Durch die Verwendung anderer organischer Lösungsmittel zur Extraktion der Proben kann die Formation von Methylestern weitgehend vermieden werden (Jauffrais *et al.*, in Vorbereitung).

Beide Substanzen konnten übergreifend in allen Fraktionen der Netzzüge (>200µm, 200-55 µm, 50-20 µm) wie auch in der 20-3 µm Fraktion der Schöpferproben (3m, 10m) gefunden werden. Für die betreffenden Stationen der Skagerrak Region erfolgte eine Quantifizierung beider Substanzen als AZA-1 Äquivalente (Anlage 12, Tab. 19). AZA-830 wurde in den fraktionierten Netzzugproben in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 7,2 ng/NT und der AZA-816 Methylester von 0,06 bis 3,6 ng/NT nachgewiesen. In den 20-3 µm Fraktionen, durch welche *A. languida* direkt widerspiegelt wird und denen ein maximales Wasservolumen von 4l zugrunde lagen, konnten Konzentration für AZA-830 von 0,01 bis 0,5 ng/l und für ME-AZA-816 von 0,01 bis 1,32 ng/l ermittelt werden. An der Station 430 lagen dabei die höchsten Konzentrationen vor. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass durch die Fraktionen der Netzzüge ausschließlich höhere trophische Niveaus detektiert werden. Weiterhin liegt den Netzzügen ein größeres Wasservolumen zugrunde. Allgemein gesehen konnten jedoch die höchsten Konzentrationen an den Stationen der Nordküste Dänemarks ermittelt werden.

Das Ausgangsmolekül AZA-816 hingegen war im Probenmaterial so gut wie gar nicht mehr sichtbar und lag ausschließlich bei höchsten Intensitäten der ME-AZA-816, noch in verhältnismäßig geringen Intensitäten vor. Zum Beispiel wies die 20-3 µm Fraktion der Station 430 für AZA-830 Intensitäten von 87.000 cps und für ME-AZA-816 von 241.000 cps auf, während die Grundform AZA-816 nur noch 7000 cps erreichte, welches in AZA-1 Äquivalenten noch einer Konzentration von 0,016 ng/l entsprechen würde. Aus dem EPI der Station 430 konnte keine eindeutige Zuordnung für AZA-816 mehr erfolgen. Erst nach Vereinigung der 20-3 µm Fraktion der 10 m Tiefe

zweier Stationen (430,431), denen die höchsten Intensitäten zugrunde lagen, und anschließender Aufkonzentrierung durch Eindampfung mit Stickstoff, konnte das in der Abbildung 46 dargestellte LC-MS/MS-Chromatogramm für AZA-816 mit entsprechender Fragmentierung ermittelt werden.

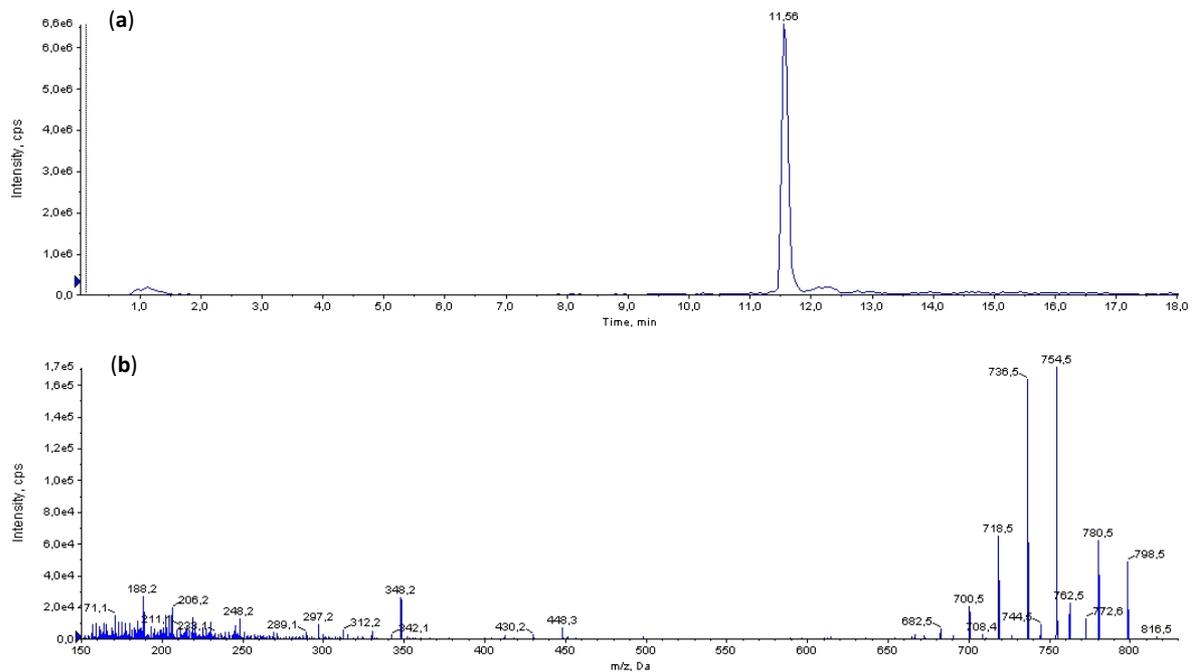


Abb. 46: LC-MS/MS Chromatogramm (a) und Produkt Ionen Spektrum (b) des protonierten Moleküls m/z 816 (CE 70V) der 20-3 μ m Fraktion der aufkonzentrierten Feldprobe 430/431 der Feldkampagne FS *Poseidon* 2007.

Verglichen mit dem EPI von AZA-816 des Kulturisolates von *A. languida* (vgl. Abb. 42) zeigt die aufkonzentrierte Probe, bei gleicher Retentionszeit mit einer Kette von Wasserabspaltung und der ausgeprägten CO_2 -Abspaltung, erkenntlich am Fragment Ion m/z 772, exakt das gleiche Fragmentierungsmuster wie die Kultur auf. Im Rahmen der *Poseidon* Kampagne konnte zwar auch AZA-846, das der Kultur *A. poporum* C5 aus der Nordsee zugeordnet wird, vereinzelt in der Skagerrak Region detektiert werden, jedoch war aufgrund äußerst geringer Intensitäten keine eindeutige Zuordnung durch aufgenommene Produkt Ionen Spektren möglich.

Betrachtet man im Gegensatz zu dieser Feldkampagne die restlichen Ausfahrten der Jahre 2008 bis 2011, so konnte ein solch ausgebreiteter Fund in diesen nicht nachgewiesen werden. Innerhalb des Probenmaterials der FS *Heincke* Kampagne HE302 (2009) konnte zwar vereinzelt die m/z 872 detektiert werden, welches AZA-12 aber auch der methylierten Form von AZA-858 entsprechen würde, jedoch stimmte weder die Retentionszeit mit dieser überein, noch konnte ein aussagekräftiges EPI gewonnen werden. Es wurde in diesem Zusammenhang aber auch eher erwartet, dass AZA-846 im Nordseebereich vorliegen sollte und nicht AZA-858, die in mit Kulturisolaten aus Korea und China in Verbindung steht. Im Probenmaterial der HAB-DK Kampagne (2008), mit Stationen entlang der dänischen Küstenlinie bis in die Skagerrak Region konnte übergreifend in den

fraktionierten Netzzugproben sowie in der Fraktion der Filterproben die m/z 830 nachgewiesen werden, jedoch mit äußerst geringen Intensitäten, welche die 6000 cps nicht übersteigen. Auch wenn durch EPIs keine eindeutige Zuordnung erfolgen konnte, zeigt die Ionenspur der m/z 830 den bereits angesprochenen Doppelpeak, mit gleichen Retentionszeiten, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass es sich hierbei auch um AZA-830 und ME-AZA-816 handelt. Die Grundform von AZA-816 konnte hingegen erneut nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Ausfahrt erfolgte die Isolierung von *A. poporum* C5 (Tillmann *et al.*, 2011a). Auch um die betreffende Station 21 ($56^{\circ}14.52' N$, $007^{\circ}27.54' E$) konnte innerhalb der Filterfraktion AZA-846 nachgewiesen werden, lag jedoch nicht in den fraktionierten Netzzugproben vor. Das erneut analysierte Probenmaterial der FS *Heincke* Ausfahrt 2011 erbrachte auch keine spektakulären Funde. Für die Analyse wurden ausschließlich die Proben der fraktionierten Netzzüge, in denen auch AZA-1 vorlag, herangezogen. Auch wenn vereinzelt, besonders in der Skagerrak Region, die m/z 846 vorlag, so konnten nie beide Masseübergänge ($846 \rightarrow 828$; $846 \rightarrow 348$) gleichzeitig detektiert werden. Weiterhin überstiegen die Intensitäten nie die 2500 cps, wodurch weiterführende Untersuchungen kein aussagekräftiges Ergebnis erbrachten. Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse der LC-MS Analyse für die einzelnen Kampagnen, mit Angabe der Intensitäten der einzelnen Massenübergänge, kann der beigelegten CD entnommen werden.

Betrachtet man abschließend die Ergebnisse dieser Untersuchung, so konnten ausschließlich im Probenmaterial der FS *Poseidon* Ausfahrt (2007) relativ hohe Konzentrationen an AZA-830 und ME-AZA-816 in AZA-1 Äquivalenten ermittelt werden, die auch eine eindeutige Zuordnung zu den von *A. languida* produzierten Substanzen erlauben. Diese Aussagen wurden weiterhin durch die FT-ICR-MS gestützt, da die aufkonzentrierte Feldprobe auch für diese Messungen herangezogen wurde und sich die gleichen Elementarzusammensetzungen ermittelt ließen wie für die Kultur (Anlage 12, Tab. 18). Weiterhin wurde diese Feldprobe auch für die Methylierungsexperimente mit TMSDM herangezogen und erbrachte hierbei das bereits aus den Kulturen bekannte Ergebnis für AZA-830 und AZA-816, mit gleicher Retentionszeitverschiebung (Anlage 12, Abb. 58). Auch die entsprechenden EPI verdeutlichten die 14 Da Verschiebung der ersten Fragmentierungsgruppe durch die Methylierung (Anlage 12, Abb. 59).

Da die Grundform AZA-816 weitgehend nicht mehr nachweisbar war, sehr wohl aber die Methylester, wurde AZA-816 indirekt über die Ionenspur m/z 830 des Methylesters quantifiziert. Auch der Masseüberhang m/z 844 konnte durchgehend im Probenmaterial in geringen Intensitäten ausgemacht werden. Dieser würde der methylierten Form von AZA-830 entsprechen, wird jedoch durch den zweifach ^{13}C Isotopensatelliten von AZA-1 (m/z 842) überlagert. Jedoch deutet dies darauf hin, dass auch AZA-830 bereits als Methylester im Probenmaterial vorlag. Die Quantifizie-

nung wurde dennoch mit aufgenommen, da sie eine Übersicht über den Konzentrationsbereich liefern soll, der auch unter diesen Bedingungen in AZA-1 Äquivalenten höher ausfällt als für AZA-1 im Rahmen der aktuell ausgewertete Ausfahrt HE358. Unter Berücksichtigung der Möglichkeit der Methylester sei abschließend an dieser Stelle erwähnt, dass durch die gewählte AZA-Methode der LC-MS-Analyse, diverse Azaspisäuren berücksichtigt wurden, deren Massen auch Rückschlüsse auf eine eventuelle Methylierung der unbekannt Substanzen erlauben würden. Ausschließlich im Falle der m/z 846 wurde der entsprechende Übergang m/z 860 nicht in dieser Methode mit einbezogen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass AZA-846 nicht auch in methylierter Form im Probenmaterial vorlag. Dennoch zeigen die Ergebnisse der *Poseidon* Ausfahrt, dass die bislang unbekannt Substanzen AZA-830 und AZA-816 bereits in archivierten Proben vorlagen. Auch lässt sich hieraus eine weite Verbreitung von *A. languida* verdeutlichen, da das Kulturisolat dieser Art aus Irland stammt (Tillmann *et al.*, 2011b), während sich die Funde im Rahmen dieser Ausarbeitung auf die Skagerrak Region beschränken.

5 FAZIT UND AUSBLICK

Im Rahmen der FS Heincke Ausfahrt 2011 konnten zwar in den Untersuchungsgebieten Schottland, Shetland und der Ostsee Algentoxine nachgewiesen werden, jedoch konnte mit Ausnahme zweier Stationen in der Ostsee keine Algenblüten gefunden werden. Auch wenn sich die Toxinzusammensetzung der Gebiete weitgehend ähnelt, waren deutliche Unterschiede innerhalb der einzelnen trophischen Niveaus der Planktongemeinschaft sichtbar. Aus den durchgeführten Korrelationsanalysen der Toxinkonzentration mit den Umweltparametern Temperatur, Salinität, Sauerstoffgehalt, Nährstoffe und Chlorophyll *a* waren keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Parametern ersichtlich. Die Analysen waren jedoch erschwert durch relativ geringe Toxinkonzentrationen in der Fraktion der toxischen Dinoflagellaten, sowie Einzelfunde bestimmter Toxine und der daraus resultierenden relativ dünnen Datenlage. Auch wenn die Ergebnisse dieser Untersuchung keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Umweltparametern und dem Auftreten von toxischen Algen erlauben, so sollte dennoch in zukünftigen Kampagnen eine erneute Überprüfung erfolgen, auch wenn es nicht unbedingt einfach ist eine im Vorfeld geplante Feldphase auf einem Schiff mit einer Algenblüte in Einklang zu bringen. Hierbei sollten dann auch weitere Faktoren berücksichtigt werden, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine Beeinflussung von toxischen Algen ausschließlich durch die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Parameter gegeben ist.

Im Falle der unbekanntenen Azaspisensäuren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erste Verknüpfung der bislang unbekanntenen Substanzen zweier geographisch unterschiedlicher Stämme der bislang als nicht toxisch geltenden Art *Azadinium poporum* (AZA-858, AZA-846) und der neuentdeckten Art *Amphidoma languida* (AZA-830, AZA-816) mit den bekannten Azaspisensäuren erfolgen. Bereits die Detektion von AZA-830 und AZA-816 in archivierten Feldproben der Skagerrak/Dänemark Region verdeutlichen eine weite Verbreitung *A. languida*, da das Kulturoisolat aus Irland stammt. Für alle Verbindungen wurden, gestützt durch LC-MS-Analysen in Kombination mit hochauflösender MS, Vorschläge zum strukturellen Aufbau unterbreitet, deren Richtigkeit jedoch durch weitere Analysen erst bestätigt werden muss. In diesem Zusammenhang sind bereits Analysen via Kernresonanzspektroskopie (NMR) geplant, die jedoch eine ausreichende Substanzmenge aus einer Kultur voraussetzen. Hierdurch besteht die Möglichkeit die Lage einzelner Atome zu lokalisieren und eventuell die hier gemachten Aussagen zu bestätigen und könnte somit einen endgültigen Beweis für die Existenz bislang nicht berücksichtigter Azaspisensäure ähnlicher Verbindungen bestätigen. In einem weiteren Schritt müsste eine Überprüfung des Toxizitätspotentials der neuen Verbindungen erfolgen. Hierfür sind bereits Toxizitätstests via Maus-Bioassay in Kooperation mit dem Marine Institute in Irland in Planung.

6 REFERENZEN

AB SCIEX (2010): Advanced hybrid Triple Quadrupole-Linear Ion Trap Technology: 4000 QTRAP® LC/MS/MS. <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms040200.pdf>

Álvarez, G., Uribe, E., Ávalos, P., Marino, C., Blanco, J. (2010): First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* in Northern Chile. *Toxicon* 55, 638-641. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.014](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.014)

Aminot, A., Rey, F. (2000): Standard procedures for the determination of chlorophyll *a* by spectroscopic methods. International Council for the Exploration of the Sea, ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, pp25. Online: <http://www.ices.dk/ocean/procedures/timeschl.pdf>

Anderson, D. M., Reguera, B., Pitcher, G. C., Enevoldsen, H. O. (2010): The IOC International Harmful Algal Bloom Program: History and science impact. *Oceanography* 23 (3), 72-85. [Doi: 10.5670/oceanorg.2010.25](https://doi.org/10.5670/oceanorg.2010.25).

Anderson, D. M. (2007): The ecology and oceanography of harmful algal blooms: Multidisciplinary approaches to research and management. IOC Technical Series 74, UNESCO, 38pp. IOC/2007/TS/74

Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J. M. (2002): Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* Vol. 25, No. 4b, 704-726.

Anderson, D.M., Fukuyo, Y., Matsuoka, K. (1995) Cyst Methodologies. In: Manual on harmful marine microalgae. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.). IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, pp 546.

Applied Biosystems (2003): 4000 QTrap™ LC / MS / MS System. Basic Operator Training Course.

Aune, T., Sørby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T. (2002): Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of xyessotoxin towards mice. *Toxicon* 40, 77-82.

Ardrey, R. E. (2003): Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction. John Wiley & Sons Ltd. England, 276 pp.

Blay, P., Hui, J. P. M., Chang, J., Melanson, J. E. (2011): Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography – high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400, 577-585. [Doi: 10.1007/s00216-011-4772-2](https://doi.org/10.1007/s00216-011-4772-2)

Botana, L. M., Vilarino, N., Alfonso, A., Vale, C., Louzao, C., Elliot, C. T., Campbell, K., Botana, A. M. (2010): The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 29, No 11, 1316-1325. [Doi: 10.1016/j.trac.2010.09.004](https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.004)

Botana, L. M. (2008): Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, pp 940.

Brombacher, S., Edmonds, S., Volmer, D. A. (2002): Studies on azaspiracid biotoxins. II. Mass spectral behavior and structural elucidation of azaspiracid analogs. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 16, 2306-2316. [Doi: 10.1002/rcm.863](https://doi.org/10.1002/rcm.863)

Burgess, V. Shaw, G. (2001): Pectenotoxins - an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International* 27, 275–283.

Butrón, A., Orive, E., Madariaga, I. (2011): Potential risk of harmful algae transport by ballast water: The case of Bilbao harbor. *Marine Pollution Bulletin* 62, 747-757. [Doi: 10.1016/j.marpollbul.2011.01.008](https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2011.01.008)

Campàs, M., Prieto-Simón, B., Marty, J. L. (2007): Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. *Talanta* 72, 884-895. [Doi: 10.1016/j.talanta.2006.12.036](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.036)

Camacho, F. G., Rodríguez, J. G., Mirón, A. S., García, M. C. C., Belarbi, E. H., Chisti, Y., Grima, E. M. (2007): Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances* 25, 176-194. [Doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.2008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.2008)

Cembella, A. D., Krock, B. (2008): Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Biogeography, Biosynthesis, and Pharmacology. In Botana, L. M. (Eds.): Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 561-580.

- Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M. A. (1999):** Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Nat. Toxins*, 7, 197-206.
- Ciminiello, P., Dell' Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. (2002):** Direct detection of yessotoxin and its analogues by liquid chromatography coupled with electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 968, 61-69.
- Christian, B., Luckas, B. (2008):** Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC – MS methods. *Anal Bioanal Chem* 391, 117-134. [Doi: 10.1007/s00216-007-1778-x](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1778-x)
- Colman, J. R., Twiner, M. J., Hess, P., McMahon, T., Satake, M., Yasumoto, T., Doucette, G. J., Ramsdell, J. S. (2005):** Teratogenic effects of azaspiracid-1 identified by microinjection of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Toxicol* 45, 881-890. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2005.02.014](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2005.02.014)
- Dominguez, H. J., Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Franco, J. M., Fernández, J. J. (2010):** Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectotoxin and okadaic acid groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicol* 56, 191-217. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2009.11.005](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.11.005)
- Dore, J. E., Houlihan, T., Hebel, D. V., Tien, G., Tupas, L., Karl, D. M. (1996):** Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. *Marine Chemistry*, 53, 173-185.
- Doucette, T. R., Tasker, R. A. (2008):** Domoic Acid: Detection, methods, pharmacology and toxicology. In Botana, L. M. (Eds.): *Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 397-429.
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R. (1996):** First report of Pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicol* 34 No. 8, 923-935.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkhalm, A.M., Kray, A. (2009):** Mass spectrometry - Instrumentation, interpretation and applications. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp 390.
- EFSA – European Food Safety Authority (2010):** Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish - cyclic imines. *EFSA Journal*, 8(6):1628, pp 39. [doi:10.2903/j.efsa.2010.1628](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1628)
- ESFA - European Food Safety Authority (2009):** Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – domoic acid. *The EFSA Journal*, 1181, pp 61.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004):** Marine Biotoxins. Food and Nutrition Paper 80, pp 287. Online: <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.htm>
- Fistarol, G. O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., Granéli, E. (2004):** Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb Ecol*, Vol. 34, 45-56.
- Furey, A., O' Doherty, S., O' Callaghan, K., Lehane, M., James, K. J. (2010):** Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations. *Toxicol* 56, 173-190. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2009.09.009](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.09.009)
- Fux, E., Smith, J. L., Tong, M., Guzmán, L., Anderson, D. M. (2011):** Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicol* 57, 275-287. [Doi:10.1016/j.toxicol.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.12.002)
- Fux, E., McMillan, D., Bire, R., Hess, P. (2007):** Development of an ultra-performance liquid chromatography – mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J. Chromatogr. A*, 1157, 273-280. [Doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.016](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.016)
- GEOHAB (2010):** Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in Fjords and coastal embayments. A. Cembella, L. Guzmán, S. Roy, J. Diogéne (Eds.), IOC and SCOR, Paris, France and Newark, Delaware USA, pp 57.
- Gerrsen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelmann, M., Mulder, P. P. J., van den Top, H. J., de Boer, J. (2010):** Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins* 2, 878-904. [Doi: 10.3390/toxins2040878](https://doi.org/10.3390/toxins2040878)

- Gill, S., Murphy, M., Clausen, J., Richard, D., Quilliam, M. A., MacKinnon, S., LaBlanc, P., Mueller, R., Pulido, O. (2003): Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: A pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neuro Toxicology*, 24, 593-603. [Doi: 10.1016/S0161-813X\(03\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00014-7)
- Gisselson, L. A., Carlsson, P., Granéli, E., Pallon, J. (2002): *Dinophysis* blooms in the deep euphotic zone of the Baltic Sea: do they grow in the dark? *Harmful Algae* 1, 401-418.
- Glibert, P.M., Anderson, D. M., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K. G. (2005): The global complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography*, Vol. 8, No.2, 136-147.
- Granéli, E., Weberg, M., Salomon, P. S. (2008): Harmful Algal Blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8, 94-102. [Doi: 10.1016/j.hal.2008.08.011](https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.011)
- Grasshoff, K. M., Erhardt, K. M., Kremling, K. (1999): *Methods of seawater analysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Deutschland, pp 600.
- Guéret, S. M., Brimble, M. A. (2010): Spiroimine shellfish poisoning (SSP) and the spirolide family of shellfish toxins; Isolation, structure, biological activity and synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1350-1366. [Doi: 10.1039/c005400a](https://doi.org/10.1039/c005400a)
- Hager, J. W. (2002): A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 512-526. [Doi:10.1002/rec.607](https://doi.org/10.1002/rec.607)
- Hallegraeff, G. M. (1998): Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser* 168, 297-309.
- Hallegraeff, G.M. (1995): Harmful algal blooms: a global review. In: *Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.). IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, pp 546.
- Hess, P. (2010): Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. *Anal Bioanal Chem* 397, 1683-1694. [Doi: 10.1007/s00216-009-3444-y](https://doi.org/10.1007/s00216-009-3444-y)
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2002): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 6te Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 437.
- Hinder, S. L., Hays, G. C., Brooks, C. J., Davies, A. P., Edwards, M., Walne, A. W., Gravenor, M. B. (2011): Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: history, review of epidemiology, and future implications. *Environmental Health* 10:54, 1-12. Online: <http://www.ehjournal.net/content/10/1/54>
- Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A., Wright, J. L. C. (1996): Characterization of biological inactive spirolide E and F: Identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, Vol. 37, No. 43, 7671-7674.
- Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M., Wright, J. L. C. (1995): Spirolide B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2159-2161.
- Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T., Yasumoto, T. (2002): Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40, 193-203.
- Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahon, T., James, K. J., Yasumoto, T. (2000): Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38, 917-930.
- James, K. J., Fidalgo Sáez, M. J., Furey, A., Lehane, M. (2004): Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 21, 879-892.
- James, K. J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. (2003): Ubiquitous benign alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41, 145-151.
- James, K. J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake, M., Yasumoto, T. (2002): First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40, 909-915.

- James, K. J., Furey, A., Satake, M., Yasumoto, T. (2000):** Azaspiracid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe. Harmful Algal Blooms 2000 Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. and Lewis, R.J. (eds) Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 250-253.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C. (2004):** Amnesic shellfish poisoning. Food and Chemical Toxicology 42, 545-557. [Doi: 10.1016/j.fct.2003.11.010](https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.010)
- Kharrat, R., Servent, D., Girard, E., Quanounou, G., Amar, M., Marrouchi, R., Benoit, E., Molgó, J. (2008):** The marine phycotoxin Gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. J. Neurochem. 107, 952-963. [Doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05677.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05677.x)
- Korsnes, M. S., Espenes, A. (2011):** Yessotoxin as an apoptotic inducer. Toxicol 57, 947-958. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2011.03.012](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2011.03.012)
- Kotaki, Y. (2008):** Ecobiology of amnesic shellfish toxin producing Diatoms. In Botana, L. M. (Eds.): Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 382-396.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J. (2010):** LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. Anal Bioanal Chem 397, 943-951. [Doi: 10.1007/s00216-010-3608-9](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3608-9)
- Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D. (2009):** Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. Harmful Algae 8, 254-263. [Doi:10.1016/j.hal.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.06.003)
- Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D. (2008a):** LC-MS-MS aboard ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea. Anal Bioanal Chem 392 (5), 797-803. [Doi: 10.1007/s00216-008-2221-7](https://doi.org/10.1007/s00216-008-2221-7)
- Krock, B., Tillmann, U., Selwood, A. I., Cembella, A. D. (2008b):** Unambiguous identification of Pectenotoxin-1 and distribution of Pectenotoxins in plankton from North Sea. Toxicol 52, 927-935. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2008.09.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.09.006)
- Laza-Martinez, A., Seoane, S., Zapata, M., Orive, E. (2007):** Phytoplankton pigment patterns in a temperate estuary: from unialgal culture to natural assemblages. J. of Plankton Res., Vol. 29 (11), 913-929. [Doi: 10.1093/plankt/fbm069](https://doi.org/10.1093/plankt/fbm069)
- Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. (1989):** Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. Journal of Applied Phycology 1, 147-152.
- Lefebvre, K. A., Robertson, A. (2010):** Domoic acid and human exposure risks: A review. Toxicol 56, 218-230. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2009.05.034](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.05.034)
- Lefebvre, K. A., Tilton, S. C., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Srinouanprachan, S., Stapleton, P. L., Farin, F. M., Gallagher, E. P. (2009):** Gene expression profiles in zebrafish brain after acute exposure to domoic acid at symptomatic and asymptomatic doses. Toxicological Sciences 107 (1), 65-77. [Doi: 10.1093/toxsci/knf207](https://doi.org/10.1093/toxsci/knf207)
- Lehmann, W. D. (1996):** Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, pp 419.
- López-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriatry, M., O'Driscoll, D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K. J., Furey, A. (2010):** First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. Toxicol 55, 692-701. [Doi: 10.1016/j.toxicol.2009.10.020](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.10.020)
- Luckas, B., Dahlmann, J., Erler, K., Gerdt, G., Wasmund, N., Hummert, C., Hansen, P. D. (2005):** Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. Environ. Toxicol. 20, 1-17. [Doi: 10.1002/tox.20072](https://doi.org/10.1002/tox.20072)
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A. (2005):** Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. Harmful Algae 4, 75-85. [Doi:10.1016/j.hal.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.12.001)
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., McNabb, P. (2002):** Production of gymnodimine by *Karenia selliformis* (Haywood et al.). In: Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C.R., Vargo, G. A. (Eds.). 2004. Harmful Algae

2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanography Commission of UNESCO, 160-162.

Magdalena, A. B., Lehane, M., Kryš, S., Fernández, M. L., Furey, A., James, K. J (2003): The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon* 42, 105-108.

McCarron, P., Kilcoyne, J. Miles, C. O., Hess, P. (2009): Formation of azaspiracids-3, -4, -6 and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *J. Agric. Food Chem.* 57, 160-169.

Maclean, C., Cembella, A. D., Quilliam, M. A. (2003): Effects of light, salinity and inorganic nitrogen on cell growth and spiroside production in the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangen. *Botanica Marina*, Vol. 46, 466-476.

McMahon, T., Silke, J., (1996): West coast of Ireland: winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14 (2).

McMaster, M. C. (2005): LC/MS - A practical User's Guide. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, pp 165.

McNabb, P. (2008): Chemistry, Metabolism and Chemical Analysis of okadaic acid group toxins. In Botana, L. M. (Eds.): *Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 209-227.

McNabb, P., Selwood, A., Holland, P. T. (2005): Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study. *Journal of AOAC International* Vol.88 No. 3, 761-772.

Miles, C. O., Samdal, I. A., Aasen, J. A. G., Jensen, D. J., Quilliam, M. A., Petersen, D., Briggs, L. M., Wilkins, A. L., Rise, F., Cooney, J. M., MacKenzie, A. L. (2005): Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075-1091. [Doi: 10.1016/j.hal.2005.03.005](https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.03.005)

Miles, C. O., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M. A., Naustvoll, L. J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D. J., Cooney, J. M. (2004): A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1423-1433.

Munday, R. (2008): Toxicology of cyclic imines: Gymnodimine, spiroside, pinnatoxins, pteriatoxins, Procentrolide, spiro-prorocentrimine and symbioimine: In Botana, L. M. (Eds.): *Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 561-580.

Munday, R., Aune, T., Rossini, G. P. (2008): Toxicology of Yessotoxins. In Botana, L. M. (Eds.): *Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 329-339.

Munday, R., Towers, N. R., MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P. T., Miles, C. O. (2004): Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon* 44, 173-178. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.017](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.017)

Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S., Yasumoto, T. (1987): Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters* Vol. 28, No. 47, 5869-5872.

O' Driscoll, D., Skrabáková, Z., O' Halloran, J., van Pelt, F. N. A. M., James, K. J. (2011): Mussels increase xenobiotic (azaspiracid) toxicity using a unique bioconversion mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3102-3108.

O'Boyle, S., Silke, O. (2010): A review of phytoplankton ecology in estuarine and coastal waters around Ireland. *Journal of Plankton Research*, Vol. 32 (1), 99-118. [Doi:10.1093/plankt/fbp097](https://doi.org/10.1093/plankt/fbp097)

Otero, A., Chapela, M. J., Atanassova, M., Vieites, J. M., Cabado, A. G. (2011): Cyclic imines: chemistry and mechanism of action. A Review. *Chem. Res. Toxicol.*, in press. [Doi: dx.doi.org/10.1021/tx200182m](https://doi.org/10.1021/tx200182m)

Pan, Y., Bates, S. S., Cembella, A. D. (1998): Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: A physiological Perspective. *Nat. Toxins* 6, 127-135.

Paul, V. J., Arthur, K. E., Ritson-Williams, R., Ross, C., Sharp, K. (2007): Chemical Defenses: From compound to communities. *Biol. Bull.* 213, 226-251.

- Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J. M., Fernández, J. J. (2008):** Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar. Drugs* 6, 73-102. [Doi: 10.3390/md20080005](https://doi.org/10.3390/md20080005)
- Paz, B., Daranas, A. H., Cruz, P. G., Franco, J. M., Pizarro, G., Souto, M. L., Norte, M., Fernández, J. J. (2007):** Characterization of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicon* 50, 225-235. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2007.03.015](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.015)
- Perl, T. M., Bécard, L., Kosatsky, T., Hockin, J. C., Todd, E. C. D., Remis, R. S. (1990):** An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 322, No. 25, 1775-1780.
- Pizarro, G., Paz, B., González-Gil, S., Franco, J. M., Reguera, B. (2009):** Seasonal variability of lipophilic toxins during a *Dinophysis acuta* bloom in Western Iberia: Differences between picked cells and plankton concentrates. *Harmful Algae* 8, 926-937. [Doi:10.1016/j.hal.200905.004](https://doi.org/10.1016/j.hal.200905.004)
- Potvin, E., Jeong, H. J., Kang, N. S., Tillmann, U., Krock, B. (2011):** First report of the photosynthetic dinoflagellate Genus *Azadinium* in the Pacific Ocean: morphology and molecular characterization of *Azadinium* cf. *poporum*. *Eukaryot. Microbiol.* In press. [Doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00600.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00600.x)
- Pulido, O. M. (2008):** Domoic acid toxicology pathology: a review. *Mar. Drugs* 6, 180-219. [Doi: 10.3390/md20080010](https://doi.org/10.3390/md20080010)
- Quilliam, M. A. (2003):** The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *J. Chromatogr. A* 1000, 527-548. [Doi: 10.1016/S0021-9673\(03\)00586-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00586-7)
- Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M. A. (2008):** Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra – performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 22, 549-558. [Doi: 10.1002/rcm.3385](https://doi.org/10.1002/rcm.3385)
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998):** Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9967-9968.
- Seki, T., Satake, M., MacKenzie, L., Kaspar, H. F., Yasumoto, T. (1995):** Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand Oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Letters*, Vol. 36 No. 39, 7093-7096.
- Smayda, T. J. (2006):** Harmful Algal Bloom Communities in Scottish Coastal Waters: Relationship to Fish Farming and Regional Comparisons – A Review. Scottish Executive Environment Group, Paper 2006/3, 224 pp. Online: <http://www.scotland.gov.uk/Publications/2006/02/03095327/0>
- Stobo, L. A., Lacaze, J-P C. L., Scott, A. C., Petrie, J., Turrell, (2008):** Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters. *Toxicon* 51, 635-648. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2007.11.020](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.020)
- Stobo, L. A., Lacaze, J-P C. L., Scott, A. C., Gallacher, S., Smith, E. A., Quilliam, M. A. (2005):** Liquid chromatography with mass spectrometry – Detection of lipophilic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* Vol. 88 No. 5, 1371-1382.
- Sutherland, R. J., Hoelsing, J. M., Whishaw, I. Q. (1990):** Domoic acid, an environmental toxin, produces hippocampal damage and severe memory impairment. *Neuroscience Letters*, 120, 221-223.
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M. A. (2004):** Discovery of okadaic esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1131-1138. [Doi: 10.1002/rcm.1455](https://doi.org/10.1002/rcm.1455)
- Swan, S. C., Davidson, K. (2011):** Monitoring programme for the presence of toxin producing plankton in shellfish production areas in Scotland. Scottish Marine Institute, Annual Report 2010, pp 56. Online: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/phyto2010.pdf>
- Taleb, H., Vale, P., Amahir, R., Benhadouch, A., Sagou, R., Chafik, A. (2006):** First detection of azaspiracids in mussels in North West Africa. *J. Shellfish Research* 25(3), 1067-1070.
- Teitelbaum, J. S., Zatorre, R. J., Carpenter, S., Gendron, D., Evans, A. C., Gjedde, A., Cashman, N. R. (1990):** Neurological sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 322 No. 25, 1781-1787.

- Tillmann, U., Elbrächter, M., John, U., Krock, B. (2011a):** A new non-toxic species in the dinoflagellate genus *Azadinium*: *A. poporum* sp.nov. Eur. J. Phycol 46(1), 74-87. [Doi: 0.1080/09670262.2011.556753](https://doi.org/10.1080/09670262.2011.556753)
- Tillmann, U., Salas, R., Gottschling, M., Krock, B., O'Driscoll, D., Elbrächter, M. (2011b):** *Amphidoma languida* sp. nov. (Dinophyceae) reveals a close relationship between *Amphidoma* and *Azadinium*. Protist, in press. [Doi: org/10.1016/j.protis.2011.10.005](https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.10.005)
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. D. (2009):** *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as primary producer of azaspiracid toxins. Eur. J. Phycol. 44(1), 63-79. [Doi: 10.1080/09670260802578534](https://doi.org/10.1080/09670260802578534)
- Torgersen, T., Bremnes, N. B., Rundberget, T. Aune, T. (2008a):** Structural confirmation and occurrence of azaspiracids in Scandinavian brown crabs (*Cancer pagurus*). Toxicon 51, 93-101. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2007.08.008](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.008)
- Torgersen, T., Miles, C. O., Rundberget, T., Wilinks, A. L. (2008b):** New esters of okadaic acid in Seawater and blue mussels (*Mytilus edulis*). J. Agric. Food Chem. 56, 9626-9635.
- Toyofuku, H. (2006):** Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins. Marine Pollution Bulletin 52, 1735-1745. [Doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.07.007](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.07.007)
- Tubaro, A., Dell'Ovo, V., Sosa, S., Florio, C. (2010):** Yessotoxin: A toxicological overview. Toxicon 56, 163-172.
- Tubaro, A., Sosa, S., Bornancin, A., Hungerford, J. (2008):** Pharmacology and Toxicology of diarrhetic shellfish toxins. In Botana, L. M. (Eds.): Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 229-253.
- Turner, J. T., Tester, P. A. (1997):** Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. Limnol Oceanogr 42, 5 (Part 2), 1203-1214.
- Twiner, M. J., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G. J. (2008):** Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an emphasis on human health impacts. Mar. Drugs 6, 39-72. [Doi: 10.3390/md20080004](https://doi.org/10.3390/md20080004)
- Twiner, M. J., Hess, P., Bottein Dechraoui, M-J., McMahon, T., Samons, M. S., Satake, M., Yasumoto, T., Ramsdell, J. S., Doucette, G. J. (2005):** Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. Toxicon 45, 891-900. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.015](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.015)
- Uronen, P. (2007):** Harmful algae in the planktonic food web of the Baltic Sea. MONOGRAPHS of the Boreal Environment Research 28, Finnish Environment Institute, pp 47.
- Verordnung (EU) Nr. 15/2011** der Kommission vom 10.Januar 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 hinsichtlich anerkannter Testmethoden zum Nachweis mariner Biotoxine in lebenden Muscheln. ABl. L6, 11.01.2011.
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29 April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. ABl. L139, 30.04.2004.
- Vale, P., Bire, R., Hess, P. (2008):** Confirmation by LC-MS/MS of azaspiracids in shellfish from the Portuguese north-western coast. Toxicon 51, 1449-1456. [Doi: 10.1016/j.toxicon.2008.03.022](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.022)
- Vilariño, N., Espiña, B. (2008):** Pharmacology of Pectenotoxin. In Botana, L. M. (Eds.): Seafood and Freshwater Toxins - Pharmacology, Physiology and Detection, 2nd Edition. CRC Press, Taylor Francis Group, Boca Raton, 361-369.
- Wright, J. L. C., Boyd, R. K., De Freitas, A. S. W., Falk, M., Foxall, R. A., Jamieson, W. D., Laycock, M.V., McCulloch, A. W., McInnes, A. G., Odense, Pathak, V. P., Quilliam, M. A., Ragan, M. A., Sim, P. G., Thibault, P., Walter, J. A., Giglan, M., Richard, D. J. A., Richard, D. J. A., Dewar, D. (1989):** Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can. J. Chem. 67, 481-490.
- Yasumoto, T., Murata, M. (1993):** Marine Toxins. Chem. Rev. 93, 1987-1909.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Ausbreitung von toxischen Algen in der Nahrungskette.....	2
Abb. 2:	Chemische Struktur der Domoinsäure.....	8
Abb. 3:	Chemische Struktur der Okadasäure.....	9
Abb. 4:	Chemische Strukturen der Toxine Pectenotoxin-2 und Yessotoxin.....	10
Abb. 5:	Chemische Strukturen der Toxine 13-Desmethylspiroolid C und Gymnodimin A.....	12
Abb. 6:	Chemische Struktur von Azaspirsäure 1.....	13
Abb. 7:	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.....	15
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Triple Quadrupol Massenspektrometers.....	16
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Methode der Elektrospray-Ionisation.....	17
Abb. 10:	Schematische Darstellung der MS/MS Detektionsmethoden mit (1) Precursor Ionen Scan, (2) Produkt Ionen Scan, (3) Neutral Loss Scan und (4) Selected Reaktion Monitoring.....	18
Abb. 11:	Übersichtskarte der Feldkampagne der FS <i>Heincke</i> 2011.....	20
Abb. 12:	Darstellung der Stationsverteilung in den einzelnen Untersuchungsgebieten der Feldkampagne 2011 mit Schottland inkl. Orkney Inseln, Färöer Inseln, Shetland Inseln und Ostsee.....	21
Abb. 13:	Planktonnetz an Bord der FS <i>Heincke</i> ; Gazeturm zur Fraktionierung der Planktonproben.....	23
Abb. 14:	Triple Quadrupole Massenspektrometer 4000 QTRAP® mit LC-Ankopplung.....	26
Abb. 15:	FT-ICR-MS solariX der Firma Bruker Dalton GmbH in Bremen.....	34
Abb. 16:	T, S und O ₂ -Tiefenprofile Schottlands inkl. der Orkney Inseln aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes.....	36
Abb. 17:	T, S und O ₂ -Tiefenprofile der Färöer Inseln aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes.....	37
Abb. 18:	T, S und O ₂ -Tiefenprofile der Shetland Inseln aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes.....	38
Abb. 19:	T, S und O ₂ -Tiefenprofile der Ostsee aufgetragen über die zurückgelegte Distanz innerhalb des Untersuchungsgebietes.....	39
Abb. 20:	Ermittelte Chlorophyll <i>a</i> - Konzentrationen der Feldkampagne 2011, unterteilt in die Entnahmetiefe 3 m, 8 m und 15 m.....	40
Abb. 21:	Ionenspur-Chromatogramme der 50-20 µm der Station 53 in der Ostsee im positiven Ionenmodus unterteilt in die Periode (1) mit Domoinsäure, (2) mit den Spiroliden 13 Desmethylspiroolid-C und Spiroolid A und (3) mit Okadasäure, Dinophysistoxine, Pectenotoxine, Azaspirsäuren und Yessotoxine.....	42
Abb. 22:	Normalisierte Ionenspuren der Toxine der 50-20 µm Fraktion der Station 53 im positiven Ionenmodus mit Angabe der Retentionszeit für DA, SPX-1, Spiroolid A, OA, DTX-1, PTXs, AZA-1 und Yessotoxin.....	43
Abb. 23:	Aufsummierten Toxinkonzentrationen der Netzzüge der > 200 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland, Shetland Inseln und Ostsee.....	44
Abb. 24:	Aufsummierte Toxinkonzentrationen der Netzzüge der 200-55 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland, Shetland Inseln und Ostsee.....	45
Abb. 25:	Aufsummierte Toxinkonzentrationen der Netzzüge der 50-20 µm Fraktion in ng/NT, aufgetragen über die einzelnen Stationen in den Untersuchungsgebieten Schottland, Shetland Inseln und Ostsee.....	46
Abb. 26:	MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Ammonium Addukts von Pseudo-OA-d8 m/z 946.....	51
Abb. 27:	Biplot der Redundanzanalyse der schottischen Region mit logarithmierten Toxindaten und zugehörigen Umweltparametersatz.....	53
Abb. 28:	Biplot der Redundanzanalyse der Shetland Inseln mit logarithmierten Toxindaten und zugehörigen Umweltparametersatz.....	53

Abb. 29: Biplot der Redundanzanalyse der Ostsee mit logarithmierten Toxindaten und zugehörigen Umweltparametersatz.....	54
Abb. 30: MS/MS Produkt Ionen Spektrum von AZA-1 mit $[M+H]^+$ m/z 842 und Zuordnung der auftretenden Fragmentgruppen.....	57
Abb. 31: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Moleküls m/z 858 der Kultur <i>A. poporum</i> Korea.....	58
Abb. 32: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 700 bis 860 m/z des protonierten Moleküls m/z 858 von <i>A. poporum</i> Korea.....	59
Abb. 33: Möglicher Reaktionsablauf zur Erklärung der Abspaltung m/z 78 des protonierten Moleküls m/z 858.....	60
Abb. 34: Strukturvorschlag für AZA-858.....	61
Abb. 35: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 846 der Kultur <i>A. poporum</i> C5, Nordsee.....	61
Abb. 36: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 690 bis 850 m/z des protonierten Moleküls m/z 846 von <i>A. poporum</i> C5, Nordsee.....	62
Abb. 37: Strukturvorschlag für AZA-846.....	63
Abb. 38: Darstellung der Bruchstellen der A-Ring Struktur von AZA-858 und AZA-846.....	63
Abb. 39: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 830 der Kultur <i>A. languida</i>	64
Abb. 40: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 700 bis 830 m/z des protonierten Moleküls m/z 830 von <i>A. languida</i>	64
Abb. 41: Strukturvorschlag für AZA-830.....	65
Abb. 42: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 816 der Kultur <i>A. languida</i>	65
Abb. 43: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des Bereiches 660 bis 820 m/z des protonierten Moleküls m/z 816 von <i>A. languida</i>	66
Abb. 44: Strukturvorschlag für AZA-816.....	66
Abb. 45: Total Ionen Chromatogramm des Produkt Ionen Scans des protonierten Moleküls m/z 830 der 20-3 μ m Fraktion der Station 430 der Feldkampagne FS Poseidon 2007. MS/MS Produkt Ionen Spektrum der RT 12,05 (b) und RT 12,96 (c).....	69
Abb. 46: LC-MS/MS Chromatogramm (a) und Produkt Ionen Spektrum (b) des protonierten Moleküls m/z 816 der 20-3 μ m Fraktion der aufkonzentrierten Feldprobe 430/431 der Feldkampagne FS <i>Poseidon</i> (2007).....	71
Abb. 47: Hauptkomponentenanalysen des Umweltparameterdatensatzes der Stationen der Gebiete Ostsee, Färöer Inseln, Schottland, und Shetland Inseln.....	98
Abb. 48: Pair-Plot der Toxin- und Umweltdaten des schottischen Untersuchungsgebietes.....	98
Abb. 49: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Färöer Inseln.....	99
Abb. 50: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Shetland Inseln.....	99
Abb. 51: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Ostseeregion.....	100
Abb. 52: Ergebnis der linearen Diskriminanzanalyse für den zusammengefassten Datensatz Schottland und Shetland (a) und Schottland, Shetland und Färöer Inseln (b).....	100
Abb. 53: LC-MS/MS Chromatogramme der protonierten Moleküle $[M+H]^+$ der Kulturen <i>A. poporum</i> Korea m/z 858, <i>A. poporum</i> C5 Nordsee m/z 846, <i>A. languida</i> m/z 816, <i>A. languida</i> m/z 830.....	101
Abb. 54: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 858 der Kultur <i>A. poporum</i> , China.....	102
Abb. 55: Ergebnis der LC-MS Analyse vor und nach Veresterung der Kulturisolate von <i>A. poporum</i> und <i>A. languida</i> für AZA-858, AZA-846, AZA-816 und AZA-830.....	104
Abb. 56: MS/MS Produkt Ionen Spektren der protonierten Moleküle der Veresterungsexperimente.	105
Abb. 57: Stationsverteilung der Feldkampagne FS <i>Poseidon</i> 2007 (Krock <i>et al.</i> , 2008b).....	106
Abb. 58: Ergebnis des LC-MS Analyse nach Veresterung der aufkonzentrierten Feldprobe der Stationen 430/431 der Feldkampagne FS <i>Poseidon</i> (2007).....	107
Abb. 59: MS/MS Produkt Ionen Spektren der Veresterungsexperimente der aufkonzentrierten Feldprobe der Stationen 430/431 der Feldkampagne FS <i>Poseidon</i> 2007.....	107

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Auflistung der Sensorik der CTD-Einheit mit Typenbezeichnung.	22
Tab. 2:	Auflistung der Komponentenzusammensetzung des Multi-Toxin-Standards mit Konzentrationsangaben der einzelnen Toxine in µg/ml.	25
Tab. 3:	AZA-SRM-Methode mit Angabe der betrachteten Massenübergänge und eingesetzten Kollisionsenergie in V zur Detektion von Azaspirsäure 1, -2, und 3.	27
Tab. 4:	Einstellungsparameter des Massenspektrometers für die Multi-Toxin Detektionsmethode, unterteilt in die Perioden (1) für DA (2) für GYM und SPX und (3) für OA, DTX, PTX, YTX, AZA-1..	28
Tab. 5:	SRM Methode: Berücksichtigte Massenübergänge der LC-MS Analyse der Toxindetektion unter Angabe der eingesetzten Kollisionsenergie (CE) in Volt.	28
Tab. 6:	Übersicht des herangezogenen Probenmaterials der Feldkampagnen 2007 - 2011 für die Analyse unbekannter AZAs unter Angabe der Durchführungszeit, des Untersuchungsgebietes und Anzahl der Stationen.	32
Tab. 7:	Auflistung der berücksichtigten Massenübergänge der LC-MS Analyse für die Detektion unbekannter AZAs mit Angabe der verwendeten Kollisionsenergie in Volt.	33
Tab. 8:	Betrachtete Massenübergänge der LC-MS Analyse der Methylierungsexperimente.	35
Tab. 9:	Auflistung der Stationskoordinaten der FS <i>Heincke</i> Kampagne 2011 (25.05. -11.06.2011).	86
Tab. 10:	Spezifikationen der Sensorik der eingesetzten CTD-Einheit der FS <i>Heincke</i> unter Angabe des Messbereiches, der Auflösung und der Genauigkeit des jeweiligen Sensors.	88
Tab. 11:	Ermittelte Chlorophyll <i>a</i> - Konzentrationen der Schöpferproben der einzelnen Stationen in µg/l unterteilt in die Entnahmetiefen 3 m, 8 m und 15 m.	89
Tab. 12:	Nährstoffkonzentrationen der Schöpferproben für Gesamtstickstoff, Nitrat, Nitrit, Silikat und Phosphat in µM unterteilt in die Entnahmetiefen 3 m, 8 m, 15 m.	90
Tab. 13:	Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der > 200 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT.	92
Tab. 14:	Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der 200–55 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT.	94
Tab. 15:	Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der 50-20 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT.	96
Tab. 16:	Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für AZA-816 und AZA-830	103
Tab. 17:	Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für AZA-858 und AZA-846	103
Tab. 18:	Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für die aufkonzentrierten Feldprobe 430/431 der Feldkampagne FS <i>Poseidon</i> für AZA-830 mit RT = 12,03 und RT = 12,89.	106
Tab. 19:	Ergebnis der Quantifizierung der Ionenspuren von m/z 830 für die fraktionierten Netzzugproben (> 200 µm, 200-55 µm, 50-20 µm) und die 20-3 µm Fraktion der Schöpferproben der Feldkampagne der FS <i>Poseidon</i> mit AZA-830 und ME-AZA-816 in AZA-1 Äquivalenten in ng/NT bzw. ng/l.	108

9 ANHANG

Neben den hier vorliegenden Anlagen sind der beigelegten CD folgende Anlagen hinzugefügt:

1. Datenblätter der Sensorik der CTD
2. CTD-Daten der HE358
3. Verwendete Volumina für die Extraktion der Toxine der Netzzüge und Filter
4. Berechnungstabelle der Toxinkonzentration der >200 µm, 200 - 55 µm und der 50-20 µm Fraktion mit Angabe der Flächenintensitäten der einzelnen Toxine, unter Berücksichtigung des LOD und LOQ.
5. Berechnungstabelle der Chlorophyllkonzentration.
6. R-Code der multivarianten Statistik inklusive der zugrunde gelegten Datentabelle
7. Ergebnistabellen der LC-MS-Messungen für unbekannte Azaspisensäuren für die Ausfahrten FS Heincke 2011 (HE358), der FK *Uthörn* 2008 (HAB-DK) und der FS *Poseidon* 2007 (PO352), unterteilt nach Filter- und Netzzugproben mit Angabe der Flächenintensitäten.
8. FT-ICR-Spektren
9. Berechnungstabelle der Feldkampagne FS *Poseidon* 2007 mit Angaben der Flächenintensitäten.

Anlage 1: Stationsplan HE358**Tab. 9:** Auflistung der Stationskoordinaten der FS *Heincke* Kampagne 2011 (25.05. -11.06.2011).

Nr.	Datum	Uhrzeit [UTC]	Fahrt/Station	Latitude [°]	Longitudo [°]	Zuordnung	
01	26.05.2011	06:03:00	HE358/0001	54° 59,86' N	3° 36,27' E	Transekt1	
02	26.05.2011	13:37:00	HE358/0002	55° 20,24' N	1° 46,39' E	Transekt1	
03	27.05.2011	06:05:00	HE358/0003	56° 07,32' N	2° 21,96' W	Schottland, inkl.Orkney Inseln	
04	27.05.2011	08:40:00	HE358/0004	56° 29,77' N	2° 26,96' W		
05	27.05.2011	11:43:00	HE358/0005	56° 50,27' N	2° 04,90' W		
06	27.05.2011	14:10:00	HE358/0006	57° 11,42' N	1° 51,79' W		
07	27.05.2011	16:39:00	HE358/0007	57° 32,59' N	1° 33,86' W		
08	28.05.2011	05:52:00	HE358/0008	57° 44,58' N	1° 59,61' W		
09	28.05.2011	09:01:00	HE358/0009	57° 44,67' N	2° 44,87' W		
10	28.05.2011	12:13:00	HE358/0010	58° 11,83' N	2° 44,92' W		
11	28.05.2011	15:42:00	HE358/0011	58° 39,80' N	2° 43,68' W		
12	29.05.2011	05:50:00	HE358/0012	59° 21,74' N	2° 20,60' W		
13	29.05.2011	07:54:00	HE358/0013	59° 11,49' N	2° 30,00' W		
14	29.05.2011	10:05:00	HE358/0014	59° 02,88' N	2° 40,32' W		
15	29.05.2011	12:44:00	HE358/0015	58° 59,93' N	2° 44,04' W		
16	29.05.2011	14:58:00	HE358/0016	58° 51,49' N	2° 48,28' W		
17	30.05.2011	05:51:00	HE358/0017	58° 46,06' N	2° 54,05' W		
18	30.05.2011	09:44:00	HE358/0018	58° 39,78' N	3° 18,11' W		
19	30.05.2011	11:13:00	HE358/0019	58° 38,03' N	3° 36,14' W		
20	30.05.2011	13:30:00	HE358/0020	58° 37,10' N	4° 00,04' W		
21	30.05.2011	15:44:00	HE358/0021	58° 34,54' N	4° 24,73' W		
22	30.05.2011	17:48:00	HE358/0022	58° 38,32' N	4° 51,28' W		
23	31.05.2011	05:55:00	HE358/0023	60° 24,92' N	5° 55,67' W	Transekt2	
24	31.05.2011	09:53:00	HE358/0024	60° 56,88' N	6° 16,16' W	Transekt2	
25	31.05.2011	13:18:00	HE358/0025	61° 23,94' N	6° 35,78' W	Färöer Inseln	
26	01.06.2011	05:49:00	HE358/0026	61° 28,50' N	6° 39,99' W		
27	01.06.2011	06:43:00	HE358/0027	61° 31,51' N	6° 41,82' W		
28	01.06.2011	07:51:00	HE358/0028	61° 36,87' N	6° 50,34' W		
29	01.06.2011	09:46:00	HE358/0029	61° 47,89' N	6° 36,60' W		
30	01.06.2011	11:59:00	HE358/0030	61° 59,82' N	6° 42,49' W		
31	01.06.2011	13:29:00	HE358/0031	62° 05,71' N	6° 36,09' W		
32	01.06.2011	15:43:00	HE358/0032	62° 11,92' N	6° 23,77' W		
33	02.06.2011	05:45:00	HE358/0033	62° 20,82' N	6° 27,93' W		
34	02.06.2011	08:34:00	HE358/0034	62° 19,88' N	6° 53,39' W		
35	02.06.2011	11:29:00	HE358/0035	62° 10,95' N	7° 18,65' W		
36	03.06.2011	12:05:00	HE358/0036	60° 48,44' N	0° 46,20' W		Shetland Inseln
37	03.06.2011	13:54:00	HE358/0037	60° 43,60' N	0° 47,80' W		
38	04.06.2011	05:47:00	HE358/0038	60° 34,83' N	0° 56,90' W		
39	04.06.2011	07:38:00	HE358/0039	60° 23,44' N	0° 58,71' W		

Fortsetzung Tabelle 9

Nr.	Datum	Uhrzeit [UTC]	Fahrt/Station	Latitude [°]	Longitude [°]	
40	04.06.2011	10:32:00	HE358/0040	60° 12,73' N	0° 59,90' W	Shetland Inseln
41	04.06.2011	13:17:00	HE358/0041	60° 05,20' N	1° 07,66' W	
42	05.06.2011	05:46:00	HE358/0042	60° 07,94' N	1° 27,13' W	
43	05.06.2011	08:23:00	HE358/0043	60° 16,02' N	1° 45,81' W	
44	05.06.2011	10:04:00	HE358/0044	60° 24,06' N	1° 31,73' W	
45	05.06.2011	13:04:00	HE358/0045	60° 39,32' N	1° 13,98' W	
46	05.06.2011	15:40:00	HE358/0046	60° 46,09' N	1° 01,48' W	Transekt3
47	06.06.2011	05:46:00	HE358/0047	59° 42,99' N	1° 51,67' E	
48	07.06.2011	05:46:00	HE358/0048	56° 47,99' N	7° 59,99' E	Ostsee
49	07.06.2011	08:44:00	HE358/0049	57° 10,37' N	8° 21,62' E	
50	07.06.2011	11:20:00	HE358/0050	57° 21,03' N	9° 02,53' E	
51	07.06.2011	14:19:00	HE358/0051	57° 34,98' N	9° 40,93' E	
52	07.06.2011	16:57:00	HE358/0052	57° 46,98' N	10° 20,94' E	
53	08.06.2011	05:46:00	HE358/0053	57° 35,01' N	10° 51,35' E	
54	08.06.2011	08:50:00	HE358/0054	57° 19,75' N	11° 24,57' E	
55	08.06.2011	11:32:00	HE358/0055	56° 56,61' N	11° 41,38' E	
56	08.06.2011	14:06:00	HE358/0056	56° 35,78' N	11° 39,20' E	
57	08.06.2011	16:36:00	HE358/0057	56° 15,04' N	11° 19,82' E	
58	09.06.2011	05:46:00	HE358/0058	55° 50,11' N	10° 48,13' E	
59	09.06.2011	08:21:00	HE358/0059	55° 28,21' N	10° 53,81' E	
60	09.06.2011	11:10:00	HE358/0060	55° 04,51' N	11° 01,01' E	
61	09.06.2011	14:07:00	HE358/0061	54° 38,99' N	10° 44,13' E	
62	09.06.2011	16:13:00	HE358/0062	54° 36,96' N	10° 20,94' E	

Anlage 2: Spezifikationen der CTD

Tab. 10: Spezifikationen der Sensorik der eingesetzten CTD-Einheit der FS *Heincke* unter Angabe des Messbereiches, der Auflösung und der Genauigkeit des jeweiligen Sensors.

Temperatursensor SBE 3 plus	
reich	-5 bis 35 °C
Auflösung	0,0003 °C bei 24 Hz
Genauigkeit	± 0,001 °C
Ansprechzeit	0,065 ± 0,010 Sekunden (bei 1 m s ⁻¹ Wassergeschwindigkeit)
Stromversorgung	11 - 16 VDC, 25 ma

Leitfähigkeitssensor SBE 4	
Messbereich	0,0 bis 7 S m ⁻¹
Auflösung	0,00004 S m ⁻¹
Genauigkeit	0,0003 S m ⁻¹
Ansprechzeit	0,06 Sekunden
Stromversorgung	6 bis 24 V, 18 ma bei 6 V; 12 ma bei 10 - 24 V

Sauerstoffsensor SBE 43	
Messbereich	120 % der der Oberflächensättigung (Süß- und Salzwasser)
Genauigkeit	2 % der Sättigung
Stabilität	0,5 % für 1000 Stunden
Stromversorgung	6,5 - 24 VDC, 60 mW

Anlage 3: Chlorophyll a -Konzentrationen**Tab. 11:** Ermittelte Chlorophyll a -Konzentrationen der Schöpferproben der einzelnen Stationen in $\mu\text{g/l}$ unterteilt in die Entnahmetiefen 3 m, 8 m und 15 m.

Station	Chl a [$\mu\text{g/l}$]			Station	Chl a [$\mu\text{g/l}$]		
	3 m	8 m	15 m		3 m	8 m	15 m
01	0,3960	0,2681	0,3561	32	0,6260	0,6776	0,6404
02	0,3410	0,1444	0,6738	33	0,5590	0,4961	0,5208
03	1,7429	1,6129	0,5796	34	0,4857	0,4012	0,4682
04	0,7893	0,8553	0,9790	35	0,5868	0,5744	0,4589
05	2,2915	1,5655	2,8732	36	0,6972	0,5816	0,7064
06	1,2767	1,6377	1,8955	37	0,4620	0,6012	0,6662
07	1,2891	1,1612	1,0849	38	1,1489	1,2345	1,0086
08	1,2829	1,3097	0,7879	39	1,2056	1,1117	1,2076
09	1,4211	1,0787	1,1138	40	2,0203	1,9440	2,2039
10	1,2685	0,9426	0,9570	41	0,5311	0,5115	0,6425
11	0,5713	0,4909	0,8168	42	1,8666	1,9543	1,7594
12	0,6879	0,6322	0,6250	43	1,1334	1,0932	1,1024
13	0,6198	0,6621	0,5105	44	1,3469	1,1468	1,2004
14	0,5703	0,5713	0,6260	45	0,5806	0,7023	0,8230
15	0,7075	0,7178	0,6239	46	0,4661	0,8003	0,5878
16	0,7900	0,8539	0,7508	47	1,3902	1,6728	1,7821
17	0,6889	0,7683	0,6868	48	3,5043	4,2778	5,2369
18	0,6043	0,5321	0,5105	49	0,5961	1,1303	1,4108
19	0,9622	0,8611	0,8075	50	2,8175	7,2562	13,1923
20	0,7384	0,7260	0,7322	51	4,3025	3,7807	6,8086
21	0,6611	0,5940	0,7415	52	2,3699	1,7346	1,9017
22	0,7436	0,6270	0,6394	53	0,9828	2,1760	1,8656
23	0,7549	0,7436	0,7962	54	1,0602	1,8460	2,0090
24	1,4026	1,1932	1,2778	55	1,1757	1,6480	2,0853
25	0,5889	0,6085	0,7260	56	1,0334	1,9842	1,6624
26	0,7879	0,7384	0,7735	57	1,0065	1,8604	1,4995
27	-	-	-	58	1,2829	1,3180	1,2767
28	0,5786	0,5868	0,5775	59	1,7779	1,6831	0,7137
29	0,6858	0,5631	0,6425	60	1,5696	1,4067	0,5528
30	0,7229	0,6188	0,6157	61	1,3613	1,3262	0,4971
31	0,6332	0,6043	0,6002	62	1,6501	2,3348	1,8666

Anlage 4: Nährstoffkonzentrationen

Tab. 12: Nährstoffkonzentrationen der Schöpferproben für Gesamtstickstoff (NO_x), Nitrat (NO₃), Nitrit (NO₂), Silikat (Si) und Phosphat (PO₄) in µM unterteilt in die Entnahmetiefen 3 m, 8 m, 15 m. Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Station/Tiefe	Stickstoff NO _x [µM]			Nitrat NO ₃ [µM]			Nitrit NO ₂ [µM]			Silikat Si [µM]			Phosphat PO ₄ [µM]		
	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m
01	1,42	*	*	1,37	-	-	0,05	0,07	0,04	0,47	0,31	0,71	0,14	0,11	0,08
02	*	*	0,35		-	0,33	0,02	0,05	0,03	0,72	4,27	4,66	0,10	0,19	0,16
03	0,71	*	1,19	0,67	-	1,16	0,04	0,05	0,04	5,86	4,33	3,72	0,24	0,21	0,17
04	*	*	*		-	-	0,04	0,06	0,02	2,41	3,12	1,44	0,08	0,08	0,05
05	0,68	*	0,43	0,65	-	0,36	0,03	0,04	0,07	3,15	3,37	5,69	0,18	0,22	0,18
06	*	*	*	-	-	-	0,02	0,02	0,03	0,35	1,77	3,65	0,15	0,20	0,23
07	*	*	*	-	-	-	0,04	0,02	0,02	2,16	3,19	3,04	0,29	0,23	0,15
08	*	5,68	*	-	5,62	-	0,02	0,06	0,05	4,13	3,22	4,31	0,15	0,17	0,16
09	*	*	*	-	-	-	0,03	0,02	0,02	2,25	1,66	3,23	0,22	0,25	0,30
10	*	*	*	-	-	-	0,06	0,02	0,03	1,30	3,40	2,02	0,29	0,14	0,16
11	0,91	*	1,00	0,83	-	0,93	0,07	0,09	0,07	3,76	1,14	4,59	0,34	0,34	0,31
12	1,34	0,95	*	1,27	0,89	-	0,07	0,06	0,09	1,95	2,05	0,75	0,27	0,26	0,36
13	0,40	*	0,55	0,36	-	0,51	0,04	0,05	0,04	2,41	1,95	2,10	0,26	0,20	0,23
14	1,02	1,18	0,61	0,96	1,12	0,56	0,06	0,06	0,05	2,11	3,15	2,94	0,27	0,26	0,19
15	0,39	0,58	0,54	0,33	0,52	0,48	0,05	0,06	0,06	2,59	4,11	2,28	0,25	0,06	0,23
16	0,53	*	*	0,51	-	-	0,03	0,04	0,06	3,15	1,00	2,21	0,25	0,24	0,21
17	*	0,32	*	-	0,28	-	0,07	0,04	0,13	2,17	2,63	4,03	0,30	0,24	0,32
18	*	*	*	-	-	-	0,08	0,08	0,08	2,62	1,74	2,19	0,36	0,31	0,31
19	1,08	0,93	1,46	0,99	0,85	1,38	0,08	0,08	0,08	3,07	2,76	2,69	0,32	0,21	0,28
20	0,73	*	1,30	0,61	-	1,19	0,12	0,12	0,11	2,77	1,49	3,23	0,37	0,23	0,25
21	*	1,25	1,89	-	1,14	1,77	0,15	0,11	0,12	2,14	2,70	3,36	0,38	0,32	0,29
22	1,85	0,53	*	1,62	0,36	-	0,23	0,17	0,17	3,55	1,21	2,11	0,77	0,43	0,37
23	4,83	8,55	4,83	4,63	8,34	4,59	0,21	0,22	0,24	2,78	3,80	4,06	0,60	0,54	0,56
24	4,75	5,06	3,96	4,49	4,76	3,75	0,27	0,30	0,20	3,01	1,82	1,77	0,45	0,51	0,43
25	4,19	6,94	6,11	4,02	6,71	5,92	0,18	0,23	0,19	4,41	4,29	2,21	0,45	0,62	0,68
26	6,50	7,17	5,62	6,48	6,93	5,37	0,01	0,24	0,25	2,39	2,82	4,01	0,07	0,68	0,64
28	6,63	5,78	5,83	6,40	5,46	5,61	0,23	0,32	0,21	3,77	5,84	4,92	0,55	0,56	0,51
29	4,76	6,63	4,69	4,47	6,44	4,50	0,29	0,19	0,18	3,23	2,99	3,11	0,54	0,51	0,50
30	4,70	5,06	6,18	4,49	4,88	5,99	0,21	0,18	0,19	3,58	3,84	3,59	0,50	0,53	0,52

Fortsetzung Tabelle 12															
Station/Tiefe	Stickstoff NO _x [µM]			Nitrat NO ₃ [µM]			Nitrit NO ₂ [µM]			Silikat Si [µM]			Phosphat PO ₄ [µM]		
	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m	3 m	8 m	15 m
31	6,77	6,51	4,99	6,60	6,31	4,79	0,18	0,20	0,20	4,40	4,15	2,62	0,58	0,53	0,51
32	6,40	6,26	6,30	6,21	6,07	6,12	0,20	0,19	0,18	3,87	3,35	3,72	0,54	0,58	0,64
33	6,23	6,15	4,83	6,02	5,91	4,62	0,21	0,24	0,21	3,40	2,82	3,42	0,60	0,55	0,66
34	6,22	5,95	5,43	6,02	5,77	5,22	0,20	0,18	0,21	3,37	2,90	2,04	0,54	0,53	0,58
35	7,51	5,08	6,41	7,31	4,88	6,19	0,20	0,20	0,22	2,58	2,42	2,49	0,70	0,61	0,62
36	2,65	1,07	2,95	2,46	0,92	2,81	0,19	0,15	0,14	1,85	1,78	2,79	0,61	0,51	0,41
37	1,95	2,06	1,05	1,88	1,93	0,93	0,07	0,14	0,12	2,18	1,68	1,83	0,35	0,38	0,21
38	1,83	1,26	0,64	1,70	1,12	0,49	0,13	0,13	0,15	1,00	3,32	2,27	0,40	0,35	0,40
39	3,21	1,32	2,34	3,06	1,17	2,14	0,15	0,15	0,20	3,69	1,39	1,92	0,37	0,36	0,41
40	0,87	0,49	0,73	0,72	0,38	0,59	0,15	0,11	0,14	2,49	2,42	1,43	0,40	0,23	0,27
41	1,46	3,01	1,03	1,30	2,85	0,88	0,15	0,16	0,15	1,69	3,53	1,07	0,45	0,23	0,40
42	*	0,63	0,93	-	0,56	0,89	0,07	0,07	0,04	0,53	3,18	2,14	0,42	0,23	0,24
43	1,01	3,77	2,24	0,86	3,58	2,06	0,15	0,20	0,18	2,33	3,19	2,82	0,33	0,18	0,39
44	3,37	2,25	1,78	3,19	2,06	1,59	0,18	0,19	0,19	3,11	1,38	1,03	0,34	0,30	0,43
45	1,51	1,27	1,38	1,29	1,14	1,14	0,22	0,13	0,24	1,98	1,65	1,17	0,37	0,48	0,51
46	2,25	1,41	2,81	2,14	1,26	2,68	0,12	0,16	0,13	2,45	0,64	1,86	0,05	0,28	0,32
47	*	*	*	-	-	-	0,06	0,04	0,05	1,01	1,30	0,75	0,29	0,20	0,20
48	0,83	*	*	0,55	-	-	0,28	0,18	0,09	0,40	0,52	0,75	0,15	0,21	0,13
49	*	*	*	-	-	-	0,10	0,04	0,02	*	0,88	0,55	0,13	0,26	0,09
50	0,91	*	*	0,61	-	-	0,30	0,29	0,04	*	0,28	*	0,05	0,13	0,23
51	*	0,37	*	-	0,34	-	0,05	0,03	0,24	*	0,28	3,95	0,18	0,22	0,14
52	*	*	*	-	-	-	0,11	0,09	0,10	0,55	0,81	2,19	0,60	0,12	0,22
53	*	*	*	-	-	-	0,05	0,07	0,02	2,69	*	*	0,20	0,10	0,12
54	*	*	*	-	-	-	0,03	0,09	0,04	2,03	*	*	0,06	0,11	0,09
55	1,44	*	*	1,39	-	-	0,05	0,01	0,10	3,24	2,93	2,11	*	0,09	0,16
56	0,30	*	*	0,29	-	-	0,02	0,02	0,06	3,59	2,89	3,85	0,10	0,09	0,10
57	*	*	1,34	-	-	1,28	0,02	0,04	0,05	3,56	3,16	3,90	0,07	0,04	0,15
58	*	*	1,06	-	-	0,99	0,03	0,05	0,07	6,21	5,92	8,38	0,07	0,17	0,20
59	*	1,37	4,03	-	1,31	3,85	0,05	0,05	0,18	4,00	4,46	12,24	0,13	0,07	0,51
60	0,75	1,82	2,35	0,67	1,75	2,27	0,08	0,07	0,08	5,37	5,34	8,48	0,10	0,09	0,40
61	*	0,98	0,52	-	0,91	0,40	0,04	0,07	0,12	6,27	7,73	13,71	0,12	0,39	0,38
62	*	*	2,23	-	-	1,90	0,08	0,02	0,33	5,20	6,34	20,02	*	0,12	0,67

* Unterhalb der Nachweisgrenze

NO_x (0- 80 µM): LOD 0,3 µM, LOQ 1 µM; NO₂ (0-2.170 µM): LOD 0,016 µM, LOQ 0,048 µM; Si (0-50 µM): LOD 0,1 µM, LOQ 0,3 µM; PO₄ (0-3.0 µM): LOD 0,031 µM, LOQ 0,093 µM

Anlage 5: Toxinkonzentration der > 200 µm Fraktion**Tab. 13:** Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der > 200 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT (n.d. = nicht detektiert, LOQ = Bestimmungsgrenze).

Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spiroliid A
01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,35	n.d.
04	17,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
06	7,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
07	26,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
08	14,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09	11,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	112,88
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
18	4,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
19	16,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
20	9,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
21	14,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,19
22	8,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40,91
23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fortsetzung Tabelle 13														
Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spirolid A
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	111,23
51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
52	29,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
53	6,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
54	9,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
55	3,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anlage 6: Toxinkonzentration der 200–55 µm Fraktion**Tab. 14:** Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der 200–55 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT (n.d. = nicht detektiert, LOQ = Bestimmungsgrenze).

Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spirolid A
01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
04	14,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
06	27,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,47	5,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	22,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,70	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,26	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fortsetzung Tabelle 14														
Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spirolid A
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,21	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	32,99	n.d.	50,86	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,39	15,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	24,64	3,13	4,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	4,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
51	6,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86,85
52	17,86	n.d.	88,44	n.d.	n.d.	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
53	20,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,45	9,05	n.d.	n.d.	51,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
54	13,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
55	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anlage 7: Toxinkonzentration der 50–20 µm Fraktion**Tab. 15:** Toxinkonzentrationen der einzelnen Stationen der 50-20 µm Fraktion der Netzzüge unterteilt in die jeweiligen Toxine in ng/NT (n.d. = nicht detektiert, LOQ = Bestimmungsgrenze).

Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spirolid A
01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	162,78	0,93	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,96	n.d.
04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	149,08	< LOQ	5,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,81	n.d.
05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	54,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	69,12	0,60	17,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64,72
07	n.d.	< LOQ	n.d.	384,44	168,48	1,36	150,20	21,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	240,90
08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43,61	0,91	21,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,56	14,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	126,05
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,91
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	41,49
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,47	2,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64,80
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,95	5,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	211,26
23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fortsetzung Tabelle 15														
Station	DA	OA	DTX-1	OA-d8	YTX	AZA-1	PTX-2	PTX2-sa	PTX-11	PTX-1	36S PTX-12	36R PTX-12	SPX-1	Spirolid A
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	6,99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	8,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,49	7,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	4,64	n.d.	56,44	n.d.	n.d.	0,59	7,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	81,17	0,89	137,40	4,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	438,27	n.d.	15,97	< LOQ	7,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	454,62	n.d.	19,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,18	< LOQ
51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	115,68	< LOQ	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,04	112,79
52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	134,34	0,78	14,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,65	211,26
53	4,38	98,04	33,06	300,26	982,33	0,45	190,56	13,74	< LOQ	81,22	144,02	161,76	0,97	171,47
54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	97,42	0,45	7,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35,31
55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	68,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	157,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,16	102,80	244,08	351,01	n.d.	n.d.
62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30,22	302,02	999,56	1241,31	n.d.	n.d.

Anlage 8: Multivariate Statistik

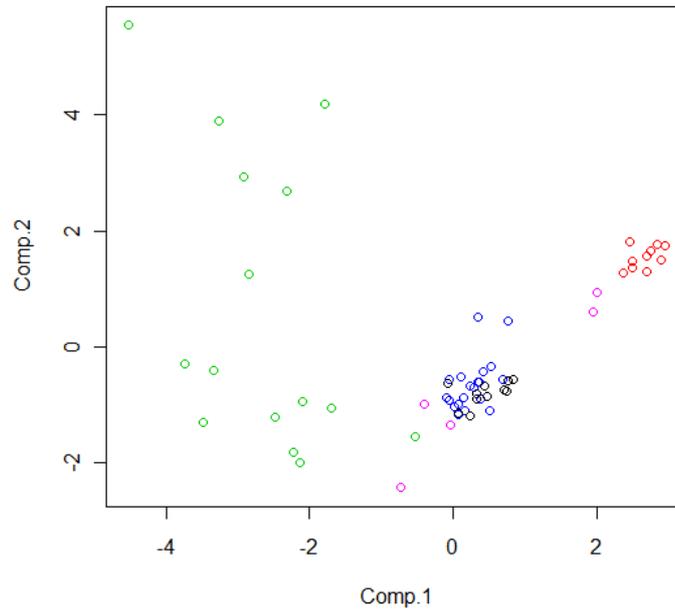


Abb. 47: Hauptkomponentenanalysen (PCA) des Umweltparameterdatensatzes der Stationen der Gebiete Ostsee (Grün), Färöer Inseln (Rot), Schottland (Blau), und Shetland Inseln (Schwarz). Zusätzlich sind die Transektstationen eingetragen (Magenta).

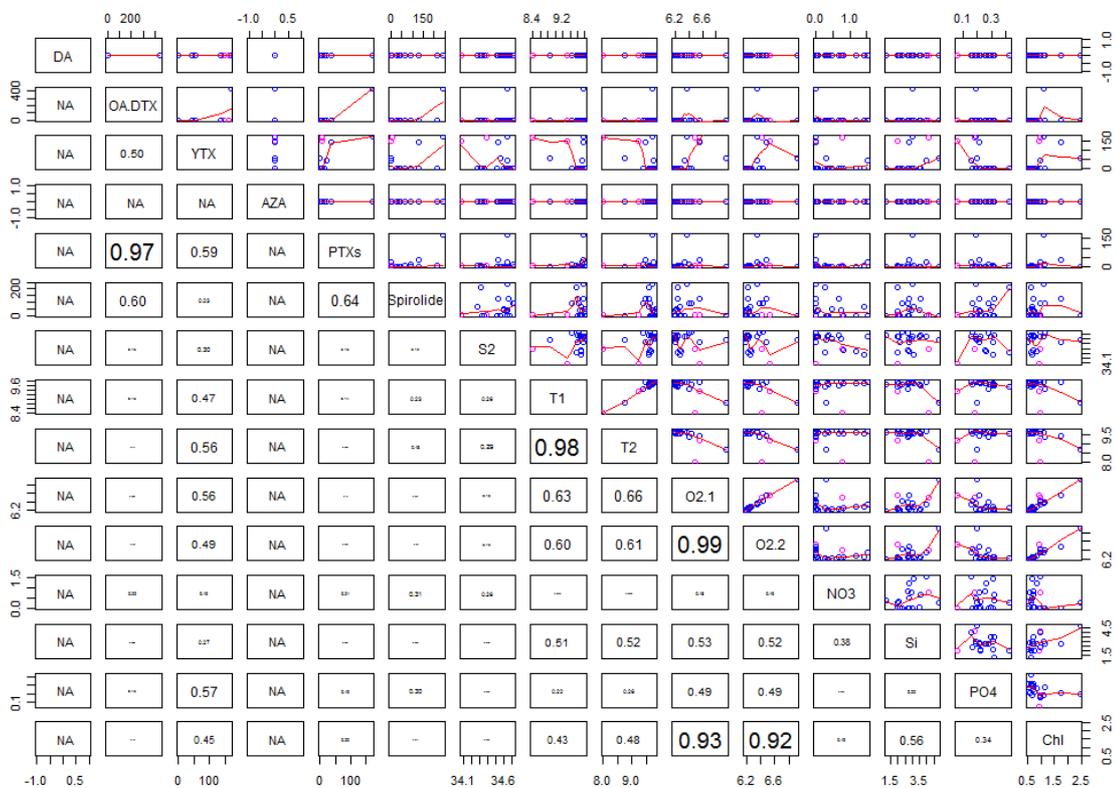


Abb. 48: Pair-Plot der Toxin- und Umweltdaten des schottischen Untersuchungsgebietes. Obere Felder zeigen Scatterplots nach paarweiser Auftragung, untere Felder die zugehörigen Korrelationskoeffizienten. Mit S: Salzgehalt, T: Temperatur, O₂: Sauerstoff für (1) 0-10 m und (2) 10-20 m, NO₃: Nitrat, Si: Silikat, PO₄: Phosphat, Chl: Chlorophyll *a*.

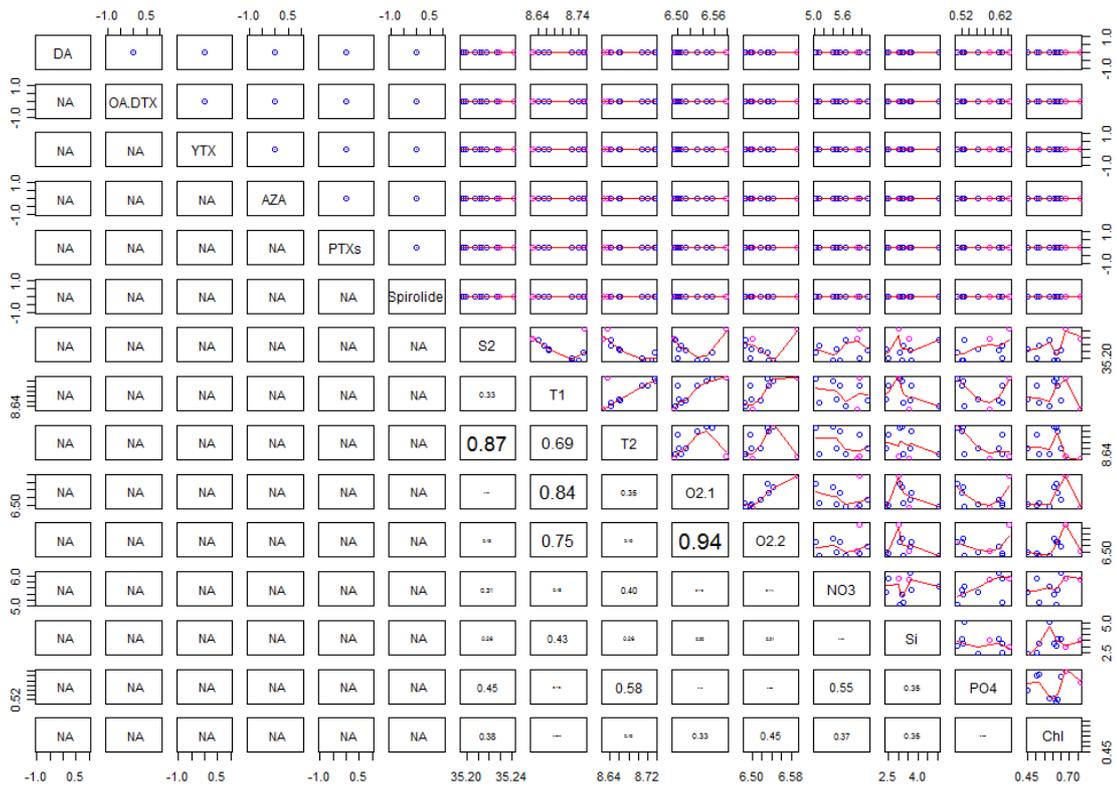


Abb. 49: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Färöer Inseln. Obere Felder zeigen Scatterplots nach paarweiser Auftragung, untere Felder die zugehörigen Korrelation-Koeffizienten. Mit S: Salzgehalt, T: Temperatur, O₂: Sauerstoff für (1) 0-10 m und (2) 10-20 m, NO₃: Nitrat, Si: Silikat, PO₄: Phosphat, Chl: Chlorophyll).

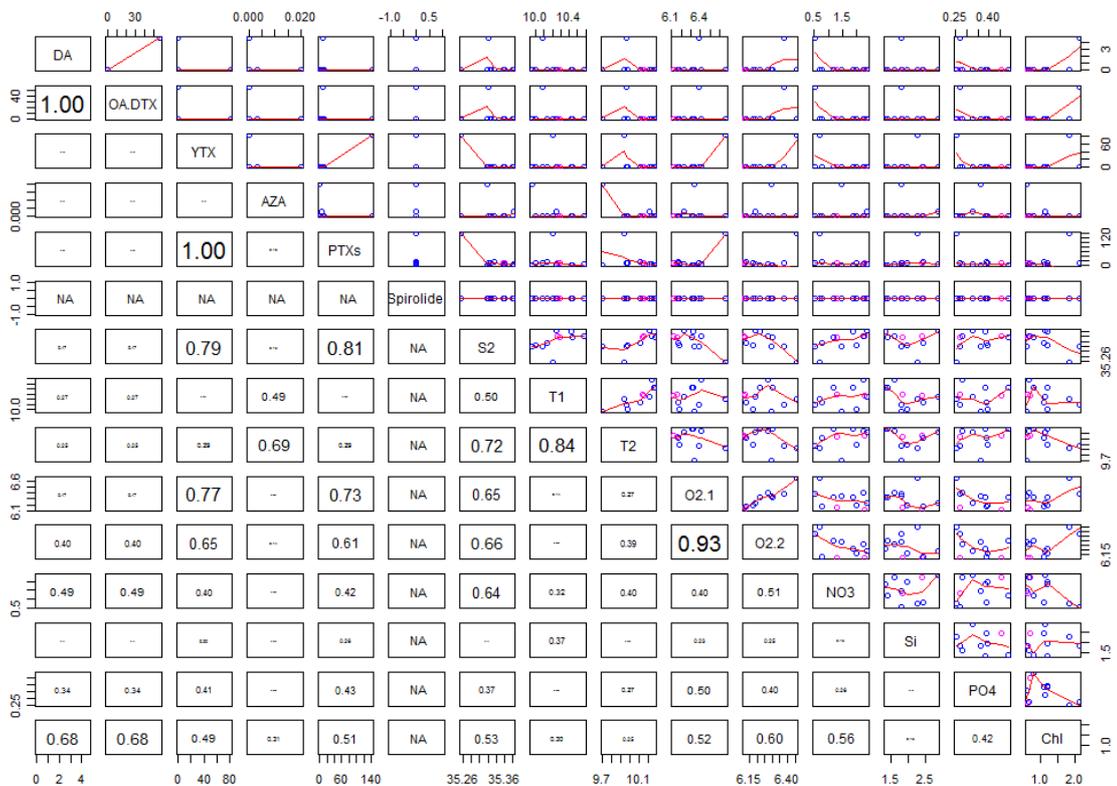


Abb. 50: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Shetland Inseln. Obere Felder zeigen Scatterplots nach paarweiser Auftragung, untere Felder die zugehörigen Korrelation-Koeffizienten. Mit S: Salzgehalt, T: Temperatur, O₂: Sauerstoff für (1) 0-10 m und (2) 10-20 m, NO₃: Nitrat, Si: Silikat, PO₄: Phosphat, Chl: Chlorophyll).

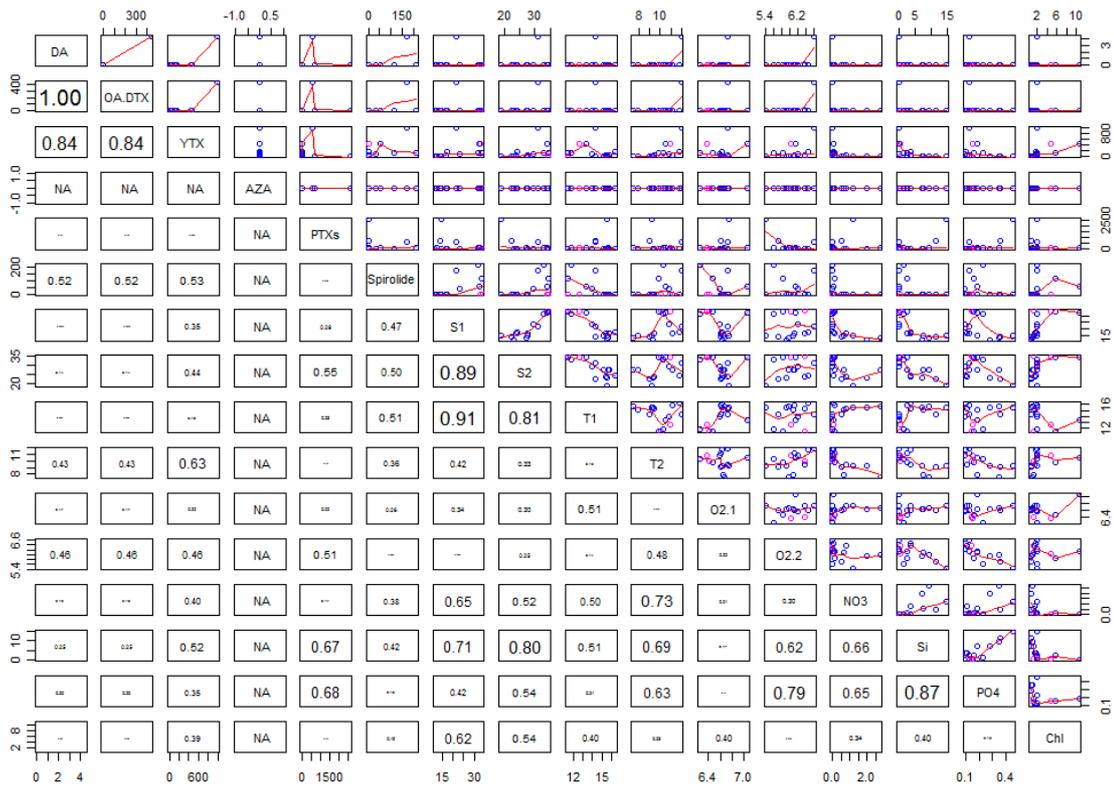


Abb. 51: Pair-Plot der Toxine und Umweltparameter der Ostseeregion. Obere Felder zeigen Scatterplots nach paarweiser Auftragung, untere Felder die zugehörigen Korrelation-Koeffizienten. Mit S: Salzgehalt, T: Temperatur, O₂: Sauerstoff für (1) 0-10 m und (2) 10-20 m, NO₃: Nitrat, Si: Silikat, PO₄: Phosphat, Chl: Chlorophyll).

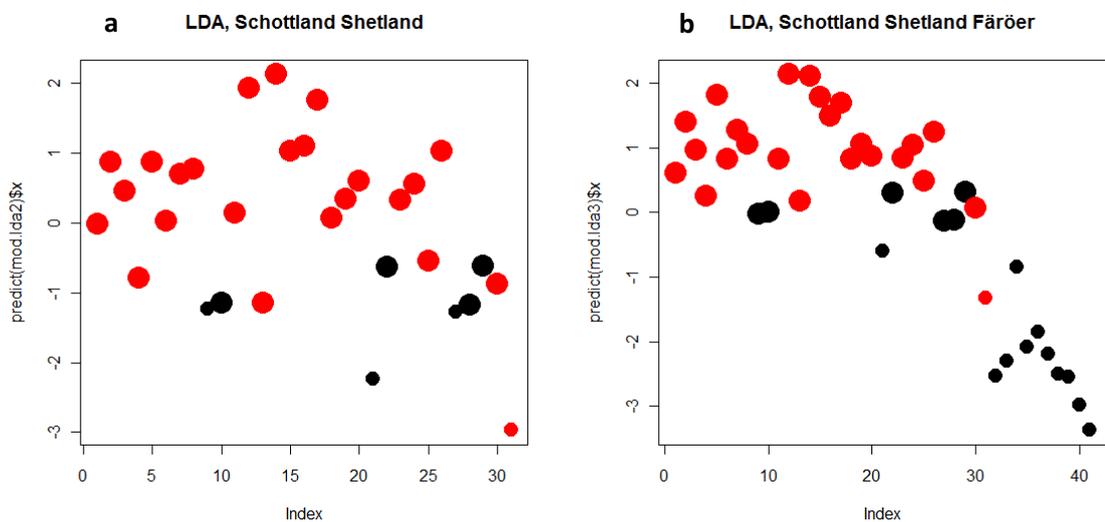


Abb. 52: Ergebnis der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) für den zusammengefassten Datensatz Schottland und Shetland (a) und Schottland, Shetland und Färøer Inseln (b). Rote Punkte symbolisieren toxische Stationen, schwarze nicht toxische.

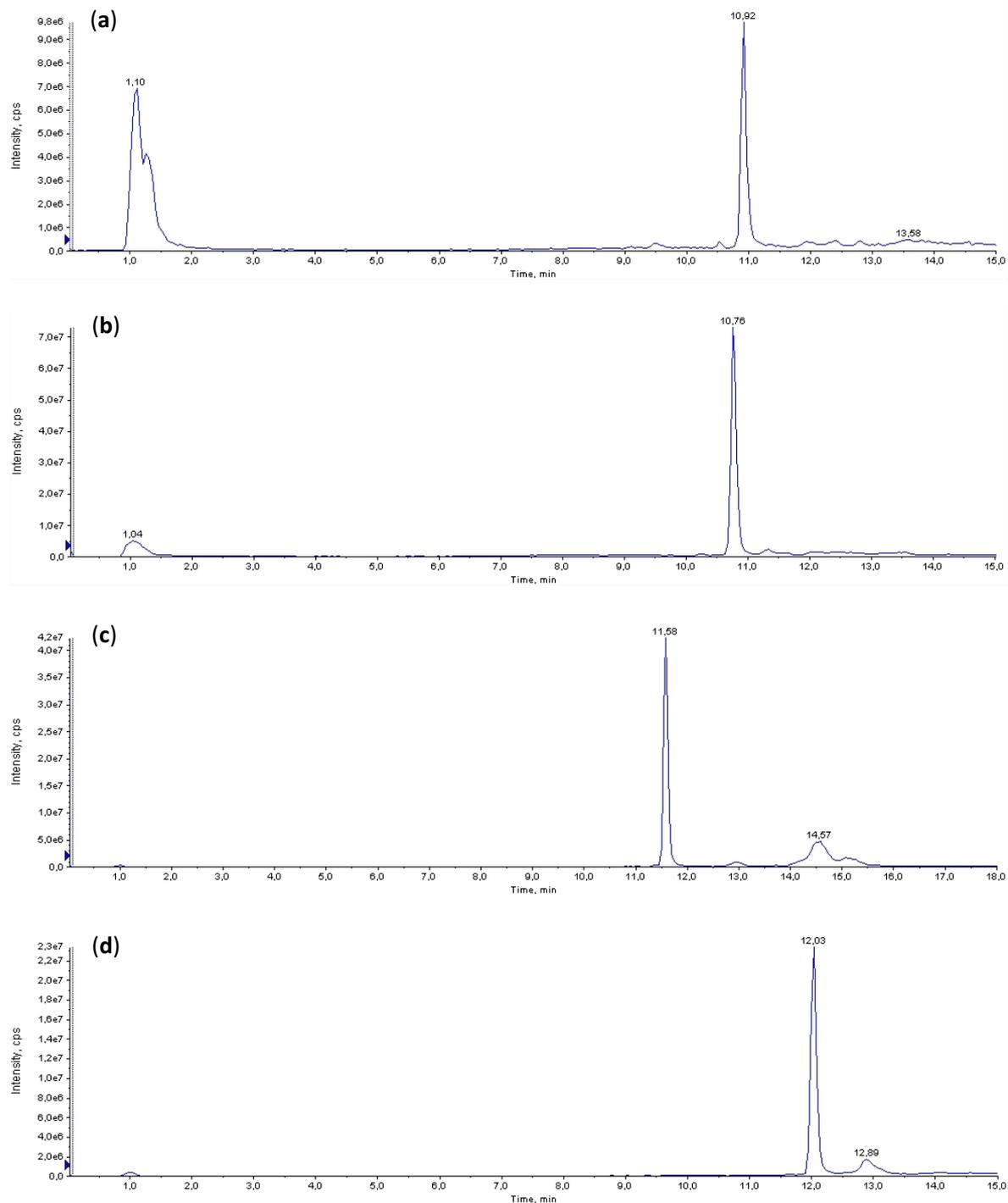
Anlage 9: LC-MS/MS Chromatogramme der Kulturen *A. poporum* und *A. languida*

Abb. 53: LC-MS/MS Chromatogramme der protonierten Moleküle $[M+H]^+$ mit CE 70V der Kulturen *A. poporum* Korea m/z 858 (a), *A. poporum* C5 Nordsee m/z 846 (b), *A. languida* m/z 816 (c), *A. languida* m/z 830 (d).

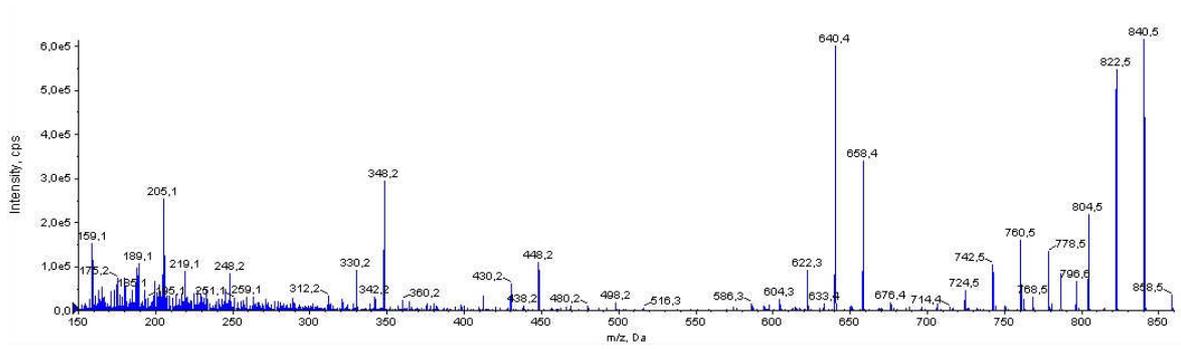


Abb. 54: MS/MS Produkt Ionen Spektrum des protonierten Moleküls m/z 858 der Kultur *A. poporum*, China

Anlage 10: Ergebnisse der FT-ICR-MS der Kulturen *A. poporum* und *A. languida***Tab. 16:** Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für AZA-816 und AZA-830 (*Amphidoma languida*).

[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm	[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm
816	C ₄₅ H ₇₀ N ₁ O ₁₂	0,0	830	C ₄₆ H ₇₂ N ₁ O ₁₂	0,0
798	C ₄₅ H ₆₈ N ₁ O ₁₁	1,2	812	C ₄₆ H ₇₀ N ₁ O ₁₁	0,0
780	C ₄₅ H ₆₆ N ₁ O ₁₀	1,1	794	C ₄₆ H ₆₈ N ₁ O ₁₀	0,0
772	C ₄₄ H ₇₀ N ₁ O ₁₀	1,1	776	C ₄₆ H ₆₆ N ₁ O ₉	0,0
762	C ₄₅ H ₆₄ N ₁ O ₉	1,1	758	C ₄₆ H ₆₄ N ₁ O ₈	0,0
754	C ₄₄ H ₆₈ N ₁ O ₉	1,1	736	C ₄₄ H ₆₆ N ₁ O ₈	0,0
736	C ₄₄ H ₆₆ N ₁ O ₈	1,1	740	C ₄₆ H ₆₂ N ₁ O ₇	0,1
718	C ₄₄ H ₆₄ N ₁ O ₇	1,0	722	C ₄₆ H ₆₀ N ₁ O ₆	0,1
700	C ₄₄ H ₆₂ N ₁ O ₆	1,0	686	C ₃₉ H ₆₀ N ₁ O ₉	0,0
448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,6	448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,0
430	C ₂₆ H ₄₀ N ₁ O ₄	0,6	430	C ₂₆ H ₄₀ N ₁ O ₄	0,0
412	C ₂₆ H ₃₈ N ₁ O ₃	0,5	348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,1
348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,4	248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,1
330	C ₂₁ H ₃₂ N ₁ O ₂	0,4	154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,3
248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,1			
154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,1			

Tab. 17: Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für AZA-858 (*A. poporum* Korea/China) und AZA-846 (*A. poporum* C5, Nordsee).

[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm	[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm
858	C ₄₇ H ₇₂ N ₁ O ₁₃	0,0	846	C ₄₆ H ₇₂ N ₁ O ₁₃	0,0
840	C ₄₇ H ₇₀ N ₁ O ₁₂	0,0	828	C ₄₆ H ₇₀ N ₁ O ₁₂	0,0
822	C ₄₇ H ₆₈ N ₁ O ₁₁	0,0	810	C ₄₆ H ₆₈ N ₁ O ₁₁	0,0
814	C ₄₆ H ₇₂ N ₁ O ₁₁	0,0	792	C ₄₆ H ₆₆ N ₁ O ₁₀	0,0
804	C ₄₇ H ₆₆ N ₁ O ₁₀	0,0	784	C ₄₅ H ₇₀ N ₁ O ₁₀	0,0
796	C ₄₆ H ₇₀ N ₁ O ₁₀	0,5	774	C ₄₆ H ₆₄ N ₁ O ₉	0,0
786	C ₄₇ H ₆₄ N ₁ O ₉	0,0	768	C ₄₄ H ₆₆ N ₁ O ₁₀	0,0
778	C ₄₆ H ₆₈ N ₁ O ₉	0,0	766	C ₄₅ H ₆₈ N ₁ O ₉	0,6
760	C ₄₆ H ₆₆ N ₁ O ₈	0,0	748	C ₄₅ H ₆₈ N ₁ O ₈	0,1
742	C ₄₆ H ₆₄ N ₁ O ₇	0,0	730	C ₄₅ H ₆₆ N ₁ O ₇	0,1
658	C ₃₇ H ₅₆ N ₁ O ₉	0,0	712	C ₄₅ H ₆₄ N ₁ O ₆	0,1
640	C ₃₇ H ₅₄ N ₁ O ₈	0,0	686	C ₃₉ H ₆₀ N ₁ O ₉	0,1
448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,0	448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,0
348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,1	348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,1
248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,1	330	C ₂₁ H ₃₂ N ₁ O ₂	0,1
154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,4	248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,1
			154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,3

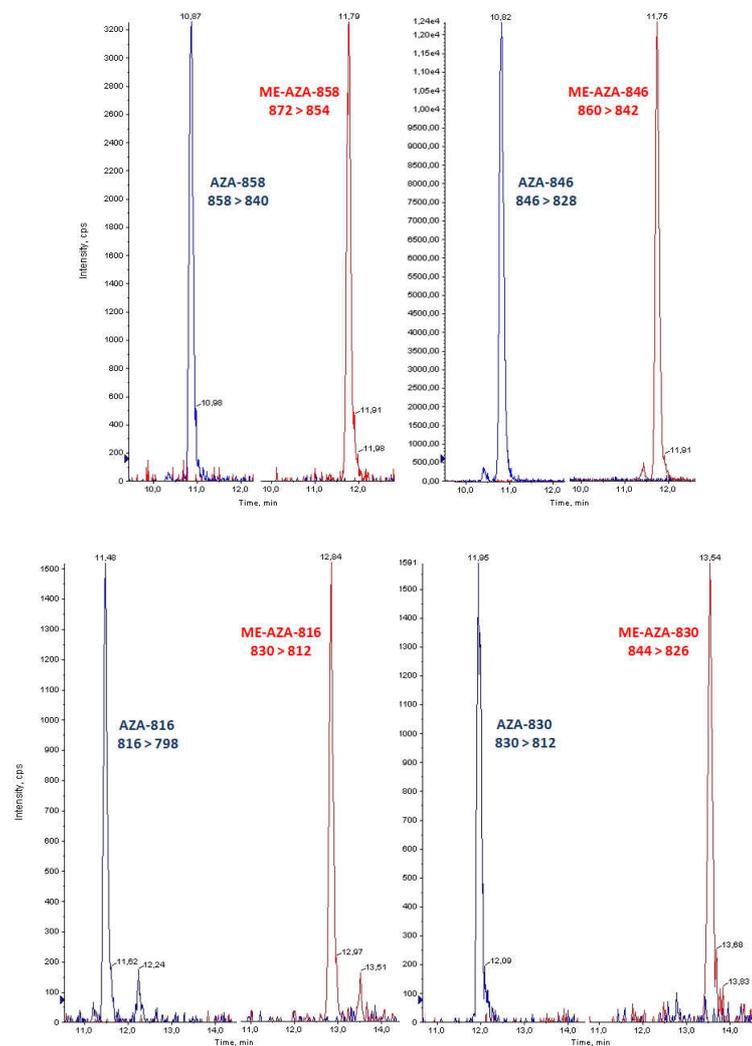
Anlage 11: LC-MS/MS Ergebnisse der Veresterungsexperimente von *A. poporum* und *A. languida*

Abb. 55: Ergebnis der LC-MS Analyse vor und nach Veresterung der Kulturisolate von *A. poporum* und *A. languida* für AZA-858, AZA-846, AZA-816 und AZA-830. Unbehandelte Substanz als Kontrolle mit zugehöriger RT in Blau und nach Methylierung mit TMSDM mit zugehöriger RT in Rot.

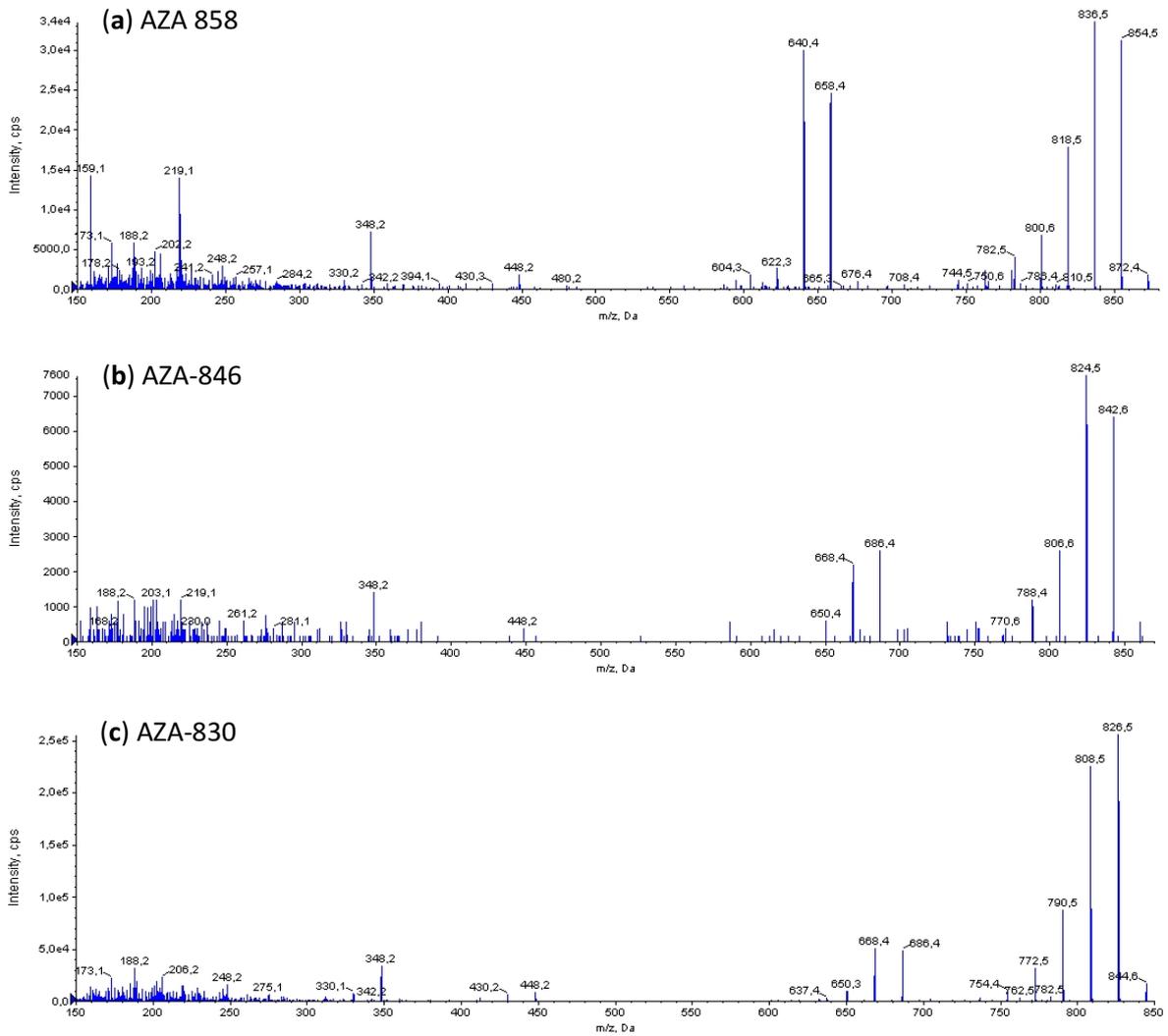


Abb. 56: MS/MS Produkt Ionen Spektren der protonierten Moleküle $[M+H]^+$ der Veresterungsexperimente mit CE 70V. Verschiebung der ersten Fragmentgruppe: *A. poporum* Korea AZA-858 \rightarrow m/z 872 (a); *A. poporum* C5 Nordsee AZA-846 \rightarrow m/z 860 (b); *A. languida* AZA-830 \rightarrow m/z 844 (c).

Anlage 12: Ergebnisse der FS Poseidon 2007

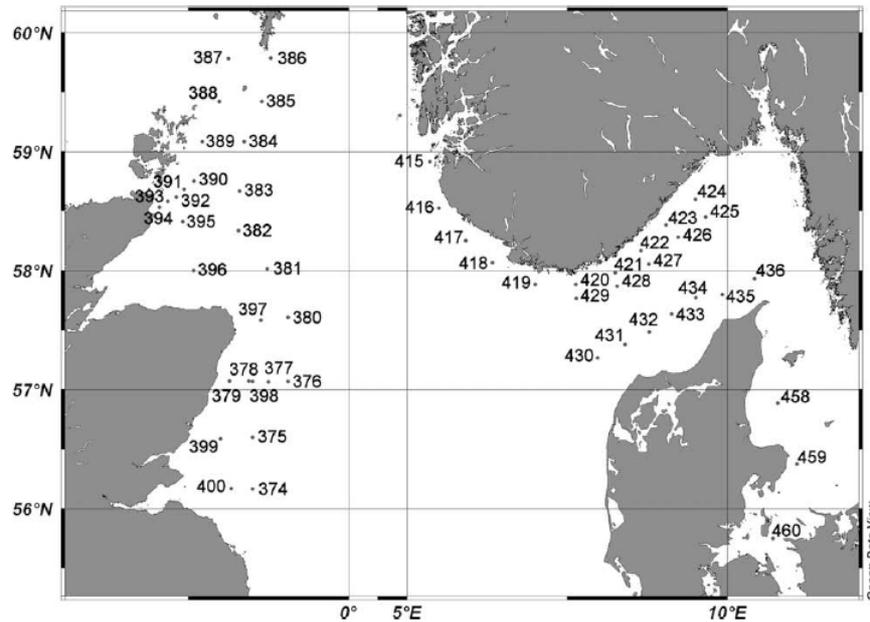


Abb. 57: Stationsverteilung der Feldkampagne FS Poseidon 2007 (Krock et al., 2008b).

Tab. 18: Ermittelte Summenformeln aus den FT-ICR-MS Messungen für die aufkonzentrierte Feldprobe der Stationen 430/431 der Feldkampagne FS Poseidon (2007) für AZA-830 mit RT = 12,03 (a) und RT = 12,89 (b).

a	[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm	b	[M+H] ⁺	Summenformel	Error ± ppm
	830	C ₄₆ H ₇₂ N ₁ O ₁₂	0,0		830	C ₄₆ H ₇₂ N ₁ O ₁₂	0,0
	812	C ₄₆ H ₇₀ N ₁ O ₁₁	0,0		812	C ₄₆ H ₇₀ N ₁ O ₁₁	0,0
	794	C ₄₆ H ₆₈ N ₁ O ₁₀	0,0		794	C ₄₆ H ₆₈ N ₁ O ₁₀	0,0
	776	C ₄₆ H ₆₆ N ₁ O ₉	0,0		776	C ₄₆ H ₆₆ N ₁ O ₉	0,0
	758	C ₄₆ H ₆₄ N ₁ O ₈	0,0		758	C ₄₆ H ₆₄ N ₁ O ₈	0,0
	740	C ₄₆ H ₆₂ N ₁ O ₇	0,0		740	C ₄₆ H ₆₂ N ₁ O ₇	0,0
	722	C ₄₆ H ₆₀ N ₁ O ₆	0,0		448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,1
	686	C ₃₉ H ₆₀ N ₁ O ₉	0,0		430	C ₂₆ H ₄₀ N ₁ O ₄	0,1
	668	C ₃₉ H ₅₈ N ₁ O ₈	0,0		348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,1
	448	C ₂₆ H ₄₂ N ₁ O ₅	0,0		330	C ₂₁ H ₃₂ N ₁ O ₂	0,1
	430	C ₂₆ H ₄₀ N ₁ O ₄	0,1		248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,2
	412	C ₂₆ H ₃₈ N ₁ O ₃	0,1		154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,2
	348	C ₂₁ H ₃₄ N ₁ O ₃	0,1				
	330	C ₂₁ H ₃₂ N ₁ O ₂	0,1				
	248	C ₁₅ H ₂₂ N ₁ O ₂	0,2				
	154	C ₉ H ₁₆ N ₁ O ₁	0,3				

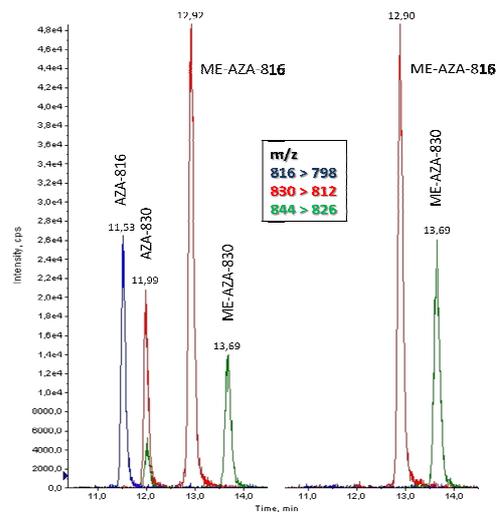


Abb. 58: Ergebnis des LC-MS Analyse nach Veresterung der aufkonzentrierten Feldprobe der Stationen 430/431 der Feldkampagne FS *Poseidon* (2007).

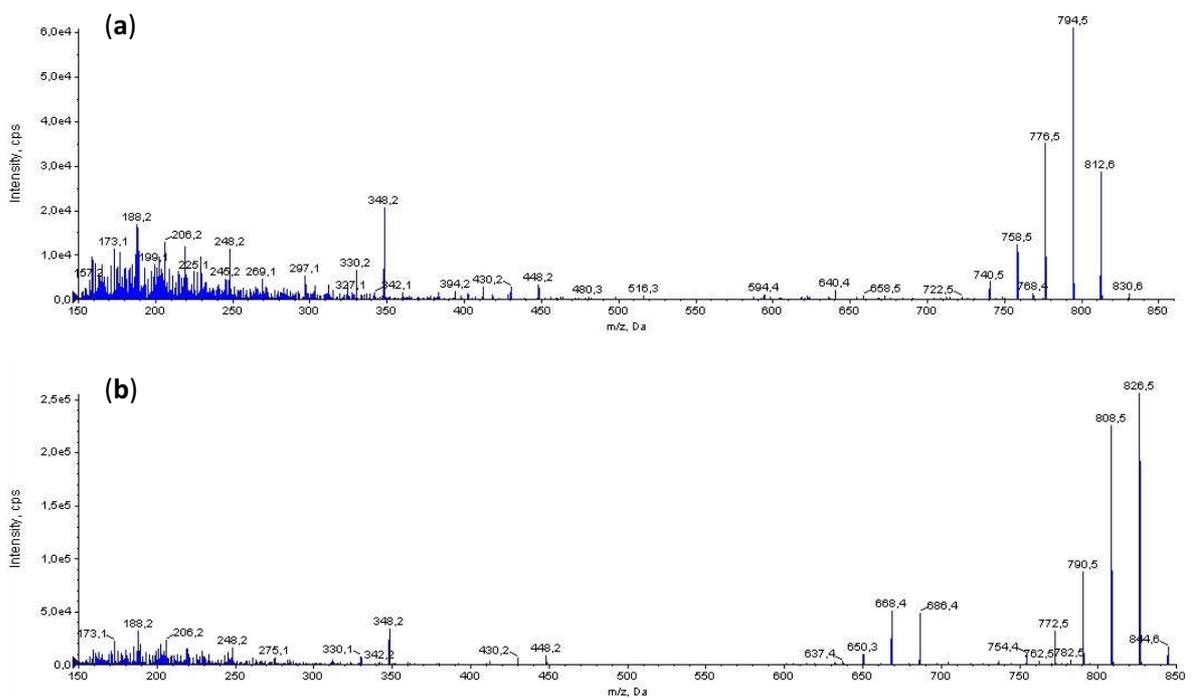


Abb. 59: MS/MS Produkt Ionen Spektrum der Veresterungsexperimente der aufkonzentrierten Feldprobe der Stationen 430/431 der Feldkampagne FS *Poseidon* 2007. (a) MS/MS des protonierten Moleküls AZA-816 → m/z 830, (b) MS/MS des protonierten Moleküls AZA-830 → m/z 844.

Tab. 19: Ergebnis der Quantifizierung der Ionenspuren von m/z 830 für die fraktionierten Netzzugproben (> 200 μm , 200-55 μm , 50-20 μm) und die 20-3 μm Fraktion der Schöpferproben (Entnahmetiefen 3m und 10m) der Feldkampagne der FS *Poseidon* (2007) mit AZA-830 (RT 12,05) und ME-AZA-816 (RT 12,89) in AZA-1 Äquivalenten in ng/NT bzw. ng/l.

Station	Lat [°]	Lon [°]	m/z 830 (RT 12,05) → AZA-830				m/z 830 (RT 12,89) → ME-AZA-816					
			> 200 μm ng/NT	200 - 55 μm ng/NT	55 -20 μm ng/NT	20-3 μm (3 m) ng/l	20-3 μm (10 m) ng/l	> 200 μm ng/NT	200 - 55 μm ng/NT	55 -20 μm ng/NT	20-3 μm (3 m) ng/l	20-3 μm (10 m) ng/l
415	58,9159	5,3554	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
416	58,5243	5,4994	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,018	n.d.	n.d.	n.d.	0,015	0,070
417	58,2516	5,9187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
418	58,0661	6,3329	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
419	57,8839	6,9989	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,006	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,012
420	57,8828	7,6348	0,305	0,340	0,063	n.d.	0,022	0,154	0,129	0,103	n.d.	0,019
421	57,9823	8,2499	0,554	0,392	0,006	n.d.	n.d.	0,260	0,316	0,100	n.d.	n.d.
422	58,1666	8,6476	kein NT	kein NT	kein NT	n.d.	0,023	kein NT	kein NT	kein NT	n.d.	0,084
423	58,3811	9,0449	kein NT	kein NT	kein NT	n.d.	n.d.	kein NT	kein NT	kein NT	n.d.	n.d.
424	58,5993	9,4986	1,112	0,177	0,200	n.d.	0,189	0,649	0,043	0,314	0,034	0,761
425	58,4507	9,6663	0,090	0,147	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,010
426	58,2807	9,232	0,113	n.d.	n.d.	n.d.	0,016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,009
427	58,0538	8,7788	n.d.	0,231	0,368	n.d.	0,010	n.d.	0,191	0,669	n.d.	0,028
428	57,8659	8,2834	n.d.	0,577	0,164	n.d.	0,034	n.d.	0,338	0,189	n.d.	0,075
429	57,7664	7,6414	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,026	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,071
430	57,2660	7,9798	0,314	0,627	0,347	n.d.	0,479	0,200	1,070	0,373	0,026	1,329
431	57,3796	8,4048	0,582	7,936	0,652	0,011	0,246	n.d.	3,554	0,623	0,064	1,136
432	57,4845	8,7841	0,187	0,047	0,166	0,063	0,129	0,097	n.d.	0,281	0,046	0,218
433	57,6337	9,1308	0,053	n.d.	0,494	0,058	0,075	n.d.	n.d.	0,764	0,063	0,038
434	57,7717	9,5091	0,219	0,066	1,229	0,091	0,080	0,066	n.d.	1,112	0,322	0,116
435	57,7992	9,9261	0,384	0,119	0,076	0,034	0,136	n.d.	n.d.	0,128	0,089	0,300
436	57,9308	10,4239	0,409	0,209	0,206	0,024	0,073	0,198	0,205	0,356	0,142	0,231

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Autor: Daniela Voß

Titel: Bestimmung von lipophilen Algentoxinprofilen im Nordseeraum
im Zeitraum 2007 bis 2011 mit speziellem Fokus auf unbekannte
Azaspirsäuren

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbständig verfasst und nur unter Benutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen anderer Autoren beruhen sind durch Quellenangaben kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum: _____ Unterschrift: _____