

Diplomarbeit

Fluoreszenzbasierte in situ Messung von Cyanobakterien: Stand der Technik, Potentiale, Limitierungen, Kompensationsmethoden und Weiterentwicklung eines optischen Sensorsystems

ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des akademischen Grads
Diplom-Ingenieur
eingereicht an der TU Wien, Fakultät für Bau- und Umweltingenieurwesen

Diploma Thesis

Fluorescence-based in situ measurement of cyanobacteria: state of the art, potential, limitations, compensation methods and further development of an optical sensor system

Submitted in satisfaction of the requirements for the degree of
Diplom-Ingenieur
of the TU Wien, Faculty of Civil and Environmental Engineering

von

Vincent Idel
Matr.Nr.: 11921691

Betreuung: Associate Prof. Dr.in techn. **Ottavia Zoboli**
Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement
Forschungsbereich Wassergütewirtschaft
Technische Universität Wien,
Karlsplatz 13/E226-01, 1040 Wien, Österreich

Wien, im Februar 2026



Die approbierte gedruckte Originalversion dieser Diplomarbeit ist an der TU Wien Bibliothek verfügbar
The approved original version of this thesis is available in print at TU Wien Bibliothek.

Kurzfassung

Ein starkes Wachstum von Cyanobakterien kann zur Bildung von Algenblüten führen. Die Häufigkeit der Berichterstattung über schwere Algenblüten, bedingt u.a. durch die Zunahme der Nährstoffmenge in den Gewässern und vermutlich den Klimawandel, hat stark zugenommen. Algenblüten können erhebliche wirtschaftliche, ökologische und gesundheitliche Risiken darstellen. Aus diesem Grund ist ein hochfrequentes Monitoring von Cyanobakterien für eine effiziente Bewirtschaftung von Wasserressourcen bzw. Ökosystemen von großer Bedeutung. Eine zu diesem Zweck häufig eingesetzte Methode ist die fluoreszenzbasierte in situ Messung von Cyanobakterien.

In diesem Review zur fluoreszenzbasierten in situ Messung werden zahlreiche Störquellen identifiziert, die die Messungen beeinträchtigen. Ein quantitatives Ranking ist aus der Literatur jedoch nicht ableitbar. Die Störungen führen teilweise dazu, dass die Messungen mit Fluoreszenzsonden nur eine Schätzung der Cyanobakterienkonzentration darstellen. Es werden verschiedene Kompensationsmethoden identifiziert und beschrieben, allerdings fehlen holistischere Ansätze. Dennoch weisen Fluoreszenzsonden bei richtigem Einsatz ein großes Potential auf, bspw. als Frühwarnsystem im Risikomanagement oder in Prognosemodellen für Cyanobakterien.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit eine experimentelle und konzeptionelle Grundlage für die Weiterentwicklung einer optischen Sonde zu einer fluoreszenzbasierten Sonde für die in situ Messung von Cyanobakterien geschaffen. Im Fokus stehen systematische erste Entwicklungsschritte, insbesondere die Bewertung der grundsätzlichen Eignung der bestehenden optischen SONDENSYSTEME für die Anregung und Detektion von Fluoreszenz. Zu diesem Zweck werden Prototypen unter Laborbedingungen mit den Fluorophoren Rhodamin WT, Uranin und Pyranin getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass Sensor 1 mit einer breitbandigen Xenon-Blitzlampe in der vorliegenden Konfiguration nicht für das Anwendungsgebiet geeignet ist, denn das schwache Fluoreszenzsignal wird vermutlich von dem Lampenspektrum überlagert und lässt sich nicht von diesem differenzieren. Sensor 2 nutzt eine LED als Lichtquelle und ermöglicht in Kombination mit einem externen Detektor eine zu-

verlässige Anregung und Detektion der Fluoreszenz. Die vorliegende Arbeit zeigt den deutlichen Einfluss der Lichtquelle und der Messgeometrie auf die Detektierbarkeit von Fluoreszenz und gibt einen Ausblick auf weitere notwendige Schritte in der Sensorentwicklung.

Abstract

The strong growth of cyanobacteria can lead to the formation of algal blooms. Reports of severe algal blooms, driven, among other factors, by increasing nutrient loads in aquatic systems and presumably by climate change, have risen sharply. Algal blooms can pose significant economic, ecological, and health risks. For this reason, monitoring cyanobacteria at high frequency is important for efficiently managing water resources and ecosystems. One method frequently employed for this purpose is fluorescence-based in situ measurement of cyanobacteria.

This review on fluorescence-based in situ measurements identifies numerous sources of interference that adversely affect the measurements. However, a quantitative ranking cannot be derived from the literature. In some cases, these disturbances lead to fluorescence-probe measurements representing only an estimate of the cyanobacteria concentration. Various compensation methods are identified and described, although more holistic approaches are lacking. Nevertheless, when properly applied, fluorescence probes demonstrate significant potential, for instance as early-warning systems in risk management or as components of cyanobacteria forecasting models.

Moreover, this work establishes an experimental and conceptual foundation for the further development of an optical probe into a fluorescence-based probe for in situ cyanobacteria measurements. It focuses on systematic initial development steps, in particular the evaluation of the fundamental suitability of existing optical probe systems for fluorescence excitation and detection. For this purpose, prototypes are tested under laboratory conditions using the fluorophores Rhodamine WT, Uranine and Pyranine. The results show that, in its current configuration, Sensor 1, which utilises a broadband xenon flash lamp, is not suitable for the intended application, as the weak fluorescence signal is likely masked by the lamp spectrum, rendering it indistinguishable. Sensor 2 uses an LED as light source and, in combination with an external detector, enables reliable excitation and detection of fluorescence. This work demonstrates the pronounced influence of the light source and measurement geometry on fluorescence detectability and provides an outlook on further steps required in sensor development.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methodik	4
2.1	Literaturreview	4
2.2	Sensorentwicklung	5
2.2.1	Spezifikationen der Versuche mit Sensor 1	5
2.2.2	Spezifikationen der Versuche mit Sensor 2	8
3	Funktionsweise von Fluoreszenzsonden	11
4	Potentielle Störquellen	17
4.1	Variationen im Spektrum	17
4.2	Störungen durch Eigenschaften von Cyanobakterien und anderen Arten	17
4.2.1	Intra- und interspezifische Variationen im Pigmentprotein- gehalt einer Zelle	17
4.2.2	Variierende Zellgrößen	18
4.2.3	Lichtexposition	18
4.2.4	Verhältnis von intra- und extrazellulärem PC	19
4.2.5	Morphologische und ökologische Eigenschaften	20
4.2.6	Vorhandensein von Chl-a von anderen Phytoplanktongruppen	20
4.2.7	Vorhandensein von anderen PBP enthaltenden Arten	21
4.2.8	Verschmutzungen	21
4.3	Störungen durch die optischen Eigenschaften der Wassersäule und die Wasserqualität	22
4.3.1	Trübung	22
4.3.2	Wassertemperatur	22
4.4	Bias aufgrund der verwendeten Methodik	22
4.4.1	Kalibrierung	22
4.4.2	Interpretation der Fluoreszenzmessung	23

5	Grenzen der in situ Fluoreszenzmessung von Cyanobakterien	24
6	Kompensationsmethoden	25
7	Prognosemodelle für Cyanobakterien	27
7.1	Prozessbasierte Modelle	30
7.2	Datengetriebene Modelle	30
8	Ergebnisse - Sensorentwicklung	32
8.1	Sensor 1 - Referenz: Interne Lampe	32
8.2	Sensor 1 - Referenz: Taschenlampe	34
8.3	Sensor 2 - 180°-Messgeometrie	36
8.3.1	1. Bereich	39
8.3.2	2. Bereich	41
8.3.3	3. Bereich	41
8.3.4	4. Bereich	42
8.3.5	5. Bereich	43
8.4	Sensor 2 - 90°-Messgeometrie	44
9	Diskussion - Sensorentwicklung	46
9.1	Sensor 1	46
9.2	Sensor 2	47
10	Fazit und Ausblick	50
	Abkürzungsverzeichnis	52
	Abbildungsverzeichnis	54
	Tabellenverzeichnis	56
	Literaturverzeichnis	57

Kapitel 1

Einleitung

Cyanobakterien haben in den letzten Jahrzehnten verstärkt Aufmerksamkeit erhalten [Rouso et al. 2019], denn diese Mikroorganismen können unter bestimmten Bedingungen die Wasserqualität und Wassernutzung beeinträchtigen. Beeinträchtigungen entstehen, wenn es zu einem rapiden Wachstum der Cyanobakterien und dadurch zur Entstehung von sogenannten Algenblüten (ABs) kommt [Rouso et al. 2022b]. Des Weiteren sind manche Cyanobakterienarten in der Lage, Gifte (sogenannte Cyanotoxine) zu produzieren, die für Menschen, Tiere oder Pflanzen gefährlich sind. Damit stellen sie ein Risiko für die menschliche Gesundheit, die Wirtschaft und das Ökosystem dar [Rouso et al. 2019]. Sofern Toxine produzierende Cyanobakterien in ABs enthalten sind, werden diese Events als schädliche Algenblüten (SABs) bezeichnet [Clements et al. 2024]. Die Berichte über ABs haben stark zugenommen [Rouso et al. 2019], denn die zunehmenden Nährstoffanreicherungen [Park et al. 2024] der Gewässer aufgrund anthropogener Aktivitäten in Kombination mit steigenden Temperaturen durch die globale Erwärmung haben zu optimalen Bedingungen für ein verstärktes Wachstum von Cyanobakterien geführt [Fournier et al. 2024]. Es wird davon ausgegangen, dass der Klimawandel die Häufigkeit, Dauer und Stärke von ABs einerseits verstärken, andererseits auch abschwächen kann. Das hängt von den jeweiligen Effekten des Klimawandels auf ein spezifisches Gewässer ab sowie von den lokalen Gegebenheiten, wie z.B. Nährstoffverfügbarkeit und Arten [Chorus et al. 2021]. Außerdem können Cyanobakterien Geschmacks- und Geruchsstoffe (G&G-Stoffe) produzieren, die die Wasseraufbereitung und Nutzung der Ressource durch die Bevölkerung zusätzlich beeinträchtigen [Rouso et al. 2019]. Die Cyanobakterien-Biomasse und Zusammensetzung der Artengemeinschaft sind räumlich und zeitlich sehr variabel, manche Cyanobakterien haben bspw. Gasvesikel, mit denen sie sich schnell innerhalb der Wassersäule bewegen können [Zamyadi et al. 2016].

Aus diesen Gründen ist für Managementzwecke das Monitoring von Cyanobakterienpopulationen in Gewässern sehr wichtig [Rouso et al. 2022b]. Dafür müssen effiziente und zeitlich hochauflösende Methoden entwickelt werden, um möglichst zeitnah und effektiv auf entsprechende Situationen reagieren zu können [Rouso et al. 2019]. Die fluoreszenzbasierte in situ Echtzeitmessung von Cyanobakterien stellt eine solche Methode [Rouso et al. 2019; Zamyadi et al. 2016] mit moderaten Kosten dar [Rouso et al. 2021, 2022a]. Die Technologie wird sehr häufig zum Zwecke der Echtzeit-Wasserqualitätsüberwachung eingesetzt [Bertone et al. 2018; Chorus et al. 2021; Rouso et al. 2019, 2020, 2021]. Fluoreszenzsonden können somit ein wichtiger Bestandteil des Risikomanagements in Bezug auf Cyanobakterien (und damit verbunden Cyanotoxine und G&G-Stoffe) sein. Darüber hinaus können Fluoreszenzsonden auf vertikalen Profilersystemen, in Kombination mit anderen Sensoren, installiert werden, um Echtzeitdaten über die gesamte Wassersäule zu erfassen [Rouso et al. 2020]. Allerdings bestehen zahlreiche Herausforderungen bzw. Störquellen, die bei der Messung und Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Bislang fehlen allerdings holistische, interdisziplinäre und kritische Reviews zur fluoreszenzbasierten in situ Messung von Cyanobakterien. Des Weiteren liegt der Fokus in der Literatur häufig auf der Validierung und Anwendung fertiger Produkte bzw. Sonden. Detaillierte Darstellungen iterativer Entwicklungsschritte einschließlich technischer Herausforderungen, Limitierungen und experimenteller Randbedingungen sind hingegen selten, obwohl sie für die Reproduzierbarkeit und Weiterentwicklung solcher Systeme von zentraler Bedeutung sind.

Vor diesem Hintergrund verfolgt diese Arbeit zwei wesentliche Ziele. Zum einen eine umfassende und systematische Beschreibung des Stands der Technik der fluoreszenzbasierten in situ Messung, insbesondere um aktuelle Limitierungen und prioritäre Aspekte der Weiterentwicklung zu identifizieren. Der Fokus liegt dabei auf der umfassenden Identifizierung und Quantifizierung potentieller Störquellen sowie ihrer Klassifizierung und der Ermittlung von Kompensationsmethoden. Des Weiteren werden mögliche Anwendungsbereiche und das vorhandene Potential dieser Messtechnologie dargestellt, insbesondere in Kombination mit Prognosemodellen. Gleichzeitig werden die Grenzen dieser Messtechnik aufgezeigt.

Zum anderen wird eine experimentelle und konzeptionelle Grundlage für die Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Sonde zur in situ Messung von Cyanobakterien geschaffen. Im Mittelpunkt steht dabei die gezielte Weiterentwicklung einer bestehenden optischen Sonde, mit der zentrale erste Entwicklungsschritte systematisch durchgeführt und analysiert werden. Darunter fällt insbesondere die experimen-

telle Überprüfung, inwieweit mit der bestehenden technischen Ausstattung eine zuverlässige Anregung und Detektion von Fluoreszenz realisierbar ist. Darüber hinaus werden Versuche mit unterschiedlichen Messgeometrien und Lichtquellen durchgeführt. Hierzu werden Sensorprototypen unter Laborbedingungen getestet, wobei die experimentellen Untersuchungen unter Verwendung der ausgewählten Fluorophore Rhodamin WT, Uranin und Pyranin erfolgen.

Hinweis: Diese Arbeit ist in Kooperation mit einem Unternehmen entstanden. Aus Gründen des Datenschutzes und der Geheimhaltung werden Firmen- und Produkt-namen unkenntlich gemacht. Zudem werden die genauen technischen Spezifikationen der eingesetzten Sensoren nicht im Detail erläutert.

Kapitel 2

Methodik

2.1 Literaturreview

Der Literaturreview wird in der Datenbank Scopus durchgeführt. Die Recherche erfolgt unter dem Reiter „Documents“ unter Verwendung der Sucheinstellungen „Search within Article title, Abstract, Keyword“. Der betrachtete Zeitraum umfasst die Jahre 2016 bis 2025. Zu Beginn werden gezielt Reviews identifiziert und anschließend alle weiteren Dokumenttypen berücksichtigt. Als Suchbegriffe werden die folgenden Schlagwörter verwendet: Cyanobacteria, Machine learning, Phycocyanin, Fluorescence, Phycobiliprotein, Phycobilisome, optical detection of cyanobacteria und compensation. Die Suchwörter werden dabei in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt und mit Hilfe der logischen Operatoren „AND“ und „OR“ miteinander verknüpft.

Die Relevanz der jeweiligen Quelle wird basierend auf einem zweistufigen Prozess bewertet. Im ersten Schritt erfolgt eine Bewertung auf Grundlage des Titels. Alle Publikationen, die im ersten Schritt als relevant eingestuft wurden, werden im zweiten Schritt anhand des Abstracts und der Einleitung erneut bewertet und als relevant oder irrelevant klassifiziert. Zusätzlich wird innerhalb der als relevant eingestuften Literatur nach weiteren Quellen recherchiert, da bestimmte Aspekte teilweise nur erwähnt, jedoch nicht weiter erläutert werden.

Die in diesem Review dargestellten Informationen basieren auf einer systematischen Durchsicht der ausgewählten Literatur, wodurch relevante Themen, Gemeinsamkeiten, konträre Ergebnisse, Unterschiede sowie Trends identifiziert, extrahiert und anschließend thematisch synthetisiert werden.

2.2 Sensorentwicklung

Es werden Versuche mit zwei verschiedenen Sensoren durchgeführt, die im Folgenden als Sensor 1 und Sensor 2 bezeichnet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sowie einige ihrer spektralen Eigenschaften sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Sämtliche Proben werden in einer 10 mm Quarzglas-Küvette gemessen und wässrige Lösungen werden immer mit destilliertem Wasser hergestellt.

Tabelle 2.1: Eigenschaften der verwendeten Fluorophore [Smart et al. 1977]

Fluorophor	Anregungsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Rhodamin WT	555	580
Uranin	490	520
Pyranin	405; 455	515

2.2.1 Spezifikationen der Versuche mit Sensor 1

Bei dem Sensor 1 handelt es sich um eine Spektrometersonde mit einem 180°-Strahlengang, das bedeutet, die interne Lampe und der Detektor sind in einem 180°-Winkel zueinander positioniert. Bei der internen Lampe handelt es sich um eine breitbandige Xenon-Blitzlampe. Eine Messung mit dieser Sonde stellt dabei den Mittelwert mehrerer Einzelmessungen dar. Mit diesem Sensor werden Spektren von jedem in Tabelle 2.1 aufgeführten Fluorophor gemessen (siehe Abbildung 2.1), wobei Rhodamin WT und Uranin jeweils in einer 2 mg/l und Pyranin in einer 14 mg/l wässrigen Lösung vorliegen. Die Proben werden in einem Kühlschrank gelagert und unmittelbar nach ihrer Entnahme verarbeitet, um starke Temperaturänderungen zu vermeiden. Die Proben haben dementsprechend eine Temperatur von ungefähr 5°C.

Die Versuche erfolgen mit zwei unterschiedlichen Lichtquellkonfigurationen, einerseits mit der internen Lichtquelle des Sensors und andererseits mit einer externen Taschenlampe, wobei die interne Lichtquelle mit weißem Papier abgedeckt wird (siehe Abbildung 2.1). Bei der Taschenlampe handelt es sich um eine Ledlenser P6R Core, diese ist auf einem Stativ befestigt, um stationäre Beleuchtungsbedingungen sicherzustellen. Die Taschenlampe wird auf der höchsten Helligkeitsstufe und mit dem kleinstmöglichen Fokuspunkt (minimaler Strahldurchmesser) betrieben. Durch die Verwendung der Taschenlampe als Lichtquelle, verändert sich die Messgeometrie zu einem 90°-Aufbau. Bei beiden Versuchskonfigurationen werden identische Messungen durchgeführt: Zuerst werden Dunkelmessungen durchgeführt, also Messungen ohne aktive Bestrahlung der Probe. Dafür wird ein schwarzes Tuch über

den Versuchsaufbau gelegt, um externe Einflüsse (z.B. Tageslicht, Raumbeleuchtung) zu minimieren. Diese Messungen dienen der Quantifizierung und Analyse des Rauschens. Anschließend werden spektrometrische Messungen der Fluorophore mit den jeweiligen Lichtquellen – der internen Lampe oder der Taschenlampe – durchgeführt (siehe Abbildung 2.1).

Die Absorptionsspektren bzw. die Extinktion (A) werden auf Basis der Gleichung 2.1 berechnet und dargestellt.

$$A_\lambda = \log \left(\frac{I_{0,\lambda}}{I_\lambda} \right) = -\log(T_\lambda) \quad (2.1)$$

Dabei beschreibt $I_{0,\lambda}$ die Intensität des eingestrahlt Lichts, I_λ die Intensität des transmittierten Lichts und T_λ die Transmission, jeweils für eine spezifische Wellenlänge λ . Die Extinktion ist in der Photometrie von großer Bedeutung, weil sie proportional zur Konzentration (c) des Analyten und zur Schichtdicke (d) ist.

$$A_\lambda = c d \varepsilon_\lambda \quad (2.2)$$

Dieser Zusammenhang wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 2.2) beschrieben. ε_λ ist der sogenannte Extinktionskoeffizient, welcher stoff- und wellenlängenspezifisch ist [Harris 2014; Ritgen 2019, 2020].

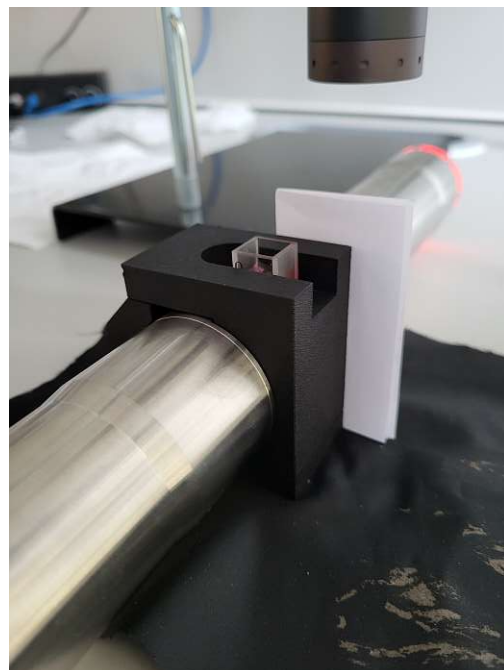


Abbildung 2.1: Versuchsaufbauten mit Sensor 1

2.2.2 Spezifikationen der Versuche mit Sensor 2

Die Versuche mit Sensor 2 basieren auf einem optischen Sensor mit einem 90°- und 180°-Messpfad. Der Sensor verfügt über mehrere LEDs, wobei im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die LED mit einer Emissionswellenlänge von 405 nm verwendet wird. Die LED-Stromstärke beträgt bei allen Versuchen 30 mA und die LED ist jeweils für 45 Sekunden eingeschaltet, innerhalb dieses Zeitraums erfolgt eine Messung. Eine Messung bzw. ein Spektrum stellt dabei den Mittelwert von 500 Einzelspektren dar. Die Integrationszeit für ein Einzelspektrum beträgt bei allen Versuchen 14 ms. Als Detektor wird nicht der im Sensor integrierte Detektor verwendet, sondern ein Thorlabs CCS200 Spektrometer. Es wird ein externes Spektrometer und nicht die interne Photodiode des Sensors verwendet, um ein Spektrum zu messen und dadurch einen höheren spektralen Informationsgehalt zu erzielen.

Es werden zwei unterschiedliche Messaufbauten verwendet. Eine Messung erfolgt im 180°-Winkel unter Verwendung einer bikonvexen Linse mit einer Brennweite von 30 mm, während die zweite Messung im 90°-Winkel mit einer bikonvexen Linse mit einer Brennweite von 35 mm durchgeführt wird (siehe Abbildung 2.2). Um das Spektrometer zwischen den beiden Messpositionen zu wechseln, wird die Probe jeweils einmal angeregt, um das Spektrometer korrekt im Brennpunkt der entsprechenden Linse zu positionieren. Als Fluorophor wird ausschließlich Pyranin verwendet, weil die Anregungswellenlängen der übrigen Fluorophore nicht mit den im Sensor verbauten LEDs kompatibel sind. Es wird eine wässrige Verdünnungsreihe mit Pyranin hergestellt und spektrometrisch gemessen, die entsprechenden Konzentrationen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die wässrigen Lösungen bzw. Proben haben alle Raumtemperatur. Zur Minimierung von externen Störeinflüssen wird während der Messung die Raumbeleuchtung ausgeschaltet und ein schwarzes Tuch über den Versuchsaufbau gelegt, um den Einfluss nahegelegener Monitore zu reduzieren. Der Küvettenhalter für diese Versuche wird mittels 3D-Druck hergestellt (siehe Abbildung 2.2).

Tabelle 2.2: Konzentrationen der wässrigen Pyranin-Verdünnungsreihe

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Konzentration [mg/l]	40	35	30	25	20	15	10	5	3	1

Im Rahmen der Auswertungen werden die folgenden Berechnungen durchgeführt: Die Summe der Intensitäten I_S über einen definierten Spektralbereich wird basierend auf Gleichung 2.3 berechnet. I_λ stellt dabei die gemessene Intensität bei einer bestimmten Wellenlänge dar.

$$I_S = \sum_{\lambda} I_{\lambda} \quad (2.3)$$

Die Absorption innerhalb eines bestimmten Spektralbereichs A_S kann basierend auf unterschiedlichen Annahmen berechnet werden. Die Berechnung nach Gleichung 2.4 basiert auf der Annahme, dass ein Detektor mit spektraler Auflösung bzw. ein Spektrometer vorliegt. Durch die spektrale Auflösung des Spektrometers ergeben sich Informationen für jede einzelne Wellenlänge (bzw. für bestimmte Spektralbereiche je nach Auflösung des Spektrometers).

$$A_S = \sum_{\lambda} A_{\lambda} = \sum_{\lambda} \log\left(\frac{I_{0,\lambda}}{I_{\lambda}}\right) = \log\left(\prod_{\lambda} \frac{I_{0,\lambda}}{I_{\lambda}}\right) \quad (2.4)$$

Die zweite Möglichkeit der Berechnung orientiert sich am Verhalten einer Photodiode und wird durch Gleichung 2.5 beschrieben. Diese Berechnung integriert die Energie über einen bestimmten Spektralbereich, wodurch wellenlängenspezifische Informationen verloren gehen.

$$A_S = \log\left(\frac{\sum_{\lambda} I_{0,\lambda}}{\sum_{\lambda} I_{\lambda}}\right) \quad (2.5)$$

Die Bildung von Summen, also die Betrachtung von mehr als einer bestimmten Wellenlänge wurde gewählt, um den Einfluss von Rauschen und Ausreißern auf die Auswertungen zu reduzieren. Für die späteren Auswertungen wurde Gleichung 2.5 verwendet, weil Sensor 2 auch mit Photodioden ausgestattet ist. Als Referenz (I_0) wird die Intensität bzw. das Spektrum von destilliertem Wasser mit der 405 nm LED des Sensors verwendet.

Des Weiteren werden lineare Regressionsanalysen basierend auf der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Diese dienen dazu, den statistischen Zusammenhang zwischen zwei Variablen zu beschreiben und zu bewerten.



Abbildung 2.2: Versuchsaufbau mit Sensor 2

Kapitel 3

Funktionsweise von Fluoreszenzsonden

Bei der Fluoreszenz wird ein Molekül durch elektromagnetische Strahlung (z.B. Licht) angeregt. Anschließend kommt es üblicherweise zu Energieverlusten und der Emission eines Photons. Das emittierte Photon ist also energieärmer als das Anregungsphoton. Die Anregungswellenlänge des Moleküls ist demzufolge kürzwelliger als die Emissionswellenlänge, dieses Phänomen wird auch als Stokes-Shift bezeichnet. Des Weiteren führt nicht jede Anregung zur Emission eines Photons bzw. zur Fluoreszenz, sondern nur ein bestimmter Anteil. Die sogenannten Fluoreszenzquantenausbeute beschreibt die Größe dieses Anteils [Lakowicz 2006; Ritgen 2019, 2020]. In der Fluoreszenzspektroskopie wird demzufolge die vom Analyten emittierte Strahlung gemessen, welche üblicherweise langwelliger als die Anregungsstrahlung ist und eine geringere Intensität aufweist. Im Unterschied dazu, wird bei der Absorptionsspektroskopie die Absorption durch den Analyten bei einer spezifischen Wellenlänge betrachtet.

Die Fluoreszenzsonden basieren grundlegend auf der Fluoreszenz bestimmter Pigmente [Staniszewski et al. 2024; Zamyadi et al. 2016]: Die Fluoreszenz von Chlorophyll (Chl) wird als Indikator für die gesamte Phytoplankton-Biomasse herangezogen [Chorus et al. 2021; Staniszewski et al. 2024]. Als Indikator für die Biomasse von Cyanobakterien wird die Fluoreszenz der Phycobiliproteine (PBPs) verwendet [Staniszewski et al. 2024].

PBPs sind wasserlösliche Pigmentproteine [Chen et al. 2023], welche u.a. in Cyanobakterien, Rotalgen, Cryptophyten und Glaucophyten vorkommen [Begum et al. 2016; Chen et al. 2023; Ji et al. 2023; Margulis et al. 2009; Zamyadi et al. 2016]. Sie bilden lichtabsorbierende Antennen, kommen meistens in der Form von Phycobilisomen (PBS) vor und spielen eine wichtige Rolle in der Photosynthese der

Organismen [Chen et al. 2023], wie u.a. bei Cyanobakterien [Ji et al. 2023]. Im PBS der Cyanobakterien wird Licht von den Antennen bzw. Stäbchen absorbiert und über den Kern zum Reaktionszentrum übertragen (siehe Abbildung 3.1). Währenddessen können die Chromophore in den Stäbchen und im Kern Fluoreszenz emittieren. Ein Teil der absorbierten Energie wird also zu den Reaktionszentren weitergeleitet und ein weiterer Teil wird als Fluoreszenz emittiert [Xie et al. 2022]. Cyanobakterien besitzen auch Chl-a [Zamyadi et al. 2016], welches nach entsprechender Anregung Fluoreszenz emittieren kann [Bertone et al. 2018; Campbell et al. 1998; Staniszewski et al. 2024].

Basierend auf ihren spektralen Eigenschaften können PBPs in vier Klassen eingeordnet werden: Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE), Phycocyanin (PC) und Phycoerythrocyanin (PEC). PE ist das am häufigsten vorkommende PBP in vielen Rotalgen und einigen einzelligen Cyanobakterien [Chen et al. 2023]. PC kommt hauptsächlich in Cyanobakterien, Rotalgen [Ji et al. 2023], Glaucophyten und einigen Cryptophyten vor [Chen et al. 2023]. Für blau-grüne Cyanobakterien ist PC spezifisch und für rote Cyanobakterien PE, letztere sind hauptsächlich in marinen Umgebungen zu finden [YSI 2012; Zamyadi et al. 2016].

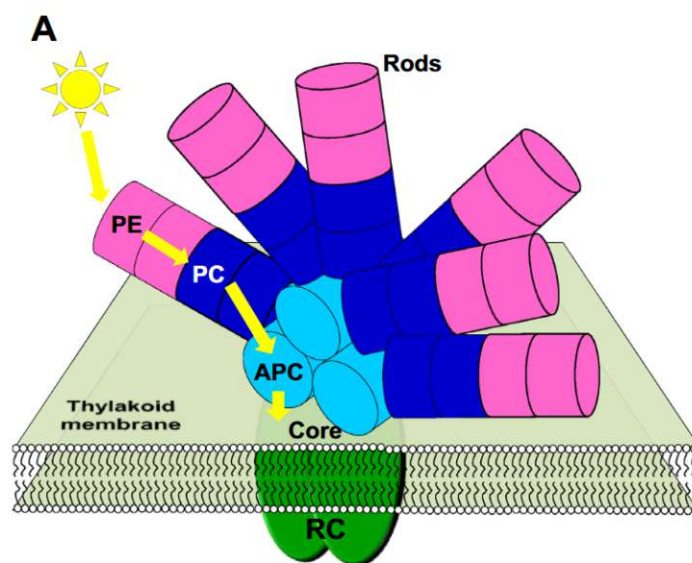


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines PBS und seiner Energieabsorption und -übertragung (gelbe Pfeile) [Sonani et al. 2018]

Die Messung der Pigment-Fluoreszenz bietet eine schnelle und effiziente Methode, um Cyanobakterienkonzentrationen zu bestimmen, da eine positive Korrelation zwischen beiden Parametern in einem bestimmten Konzentrationsbereich besteht [Chen et al. 2023]. Die in situ Fluoreszenzsonden arbeiten i.d.R. mit einer LED-Lichtquelle, die ein definiertes Wasservolumen vor dem optischen Fenster beleuchtet. Mit Hilfe der LED werden die Pigmente des Phytoplanktons bzw. der Cyanobakterien angeregt und anschließend wird die emittierte Fluoreszenz der jeweiligen Pigmente gemessen (siehe Abbildung 3.2). Die Messung wird mit einem häufig senkrecht zur Anregungsquelle positionierten Filter und Detektor durchgeführt [Bertone et al. 2018].

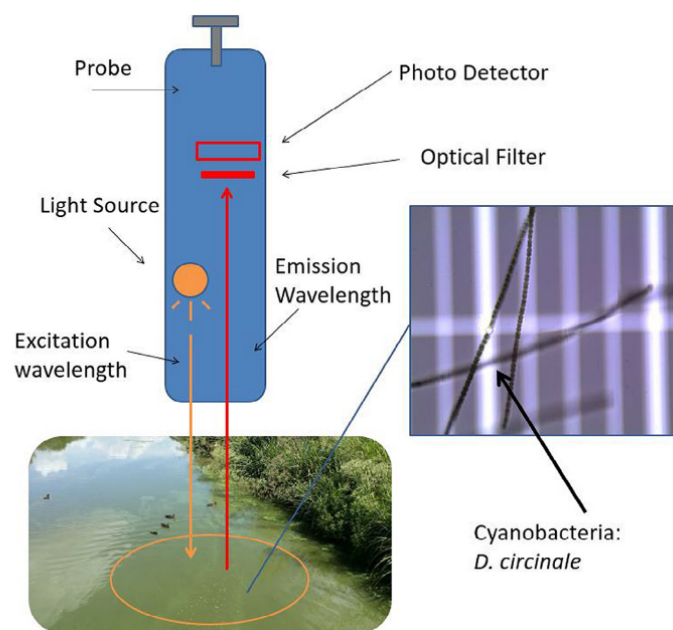


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der in situ Fluoreszenzmessung [Zamyadi et al. 2016]

Es existieren jedoch auch Sensoren, bei denen die Anregungsquelle und der Detektor nicht orthogonal zueinander ausgerichtet sind. Ein Beispiel ist der YSI 6131 Sensor, bei dem der Detektor direkt neben der Lichtquelle positioniert ist (siehe Abbildung 3.3) [YSI 2012].

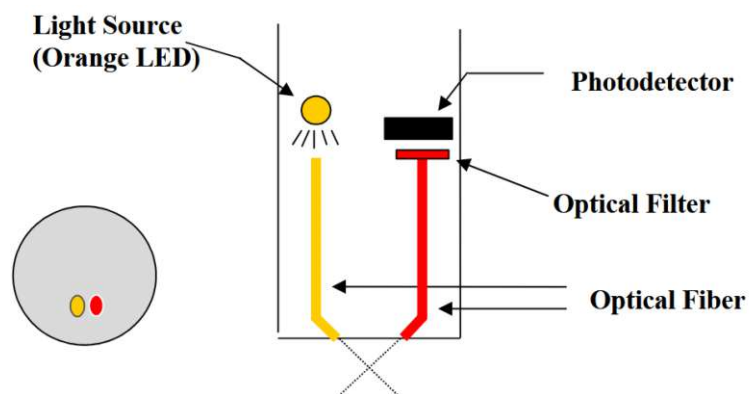


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines YSI 6131 [YSI 2012]

Die in situ Fluoreszenzmessung ermöglicht die Quantifizierung von Biomasse, -volumen oder Zelldichte und das Vorhandensein bestimmter Phytoplanktonklassen – aufgrund der spektralen Signatur ihrer Fluoreszenzpigmente – nachzuweisen. Die Sonden erlauben durch kontinuierliches Echtzeitmonitoring die Beobachtung schneller räumlich-zeitlicher Variationen in der Cyanobakterienkonzentration, im Gegensatz zu den konventionellen niederfrequenten Messmethoden [Zamyadi et al. 2016]. Abbildung 3.4 zeigt mögliche Absorptionsspektren verschiedener Pigmente bzw. Proteine.

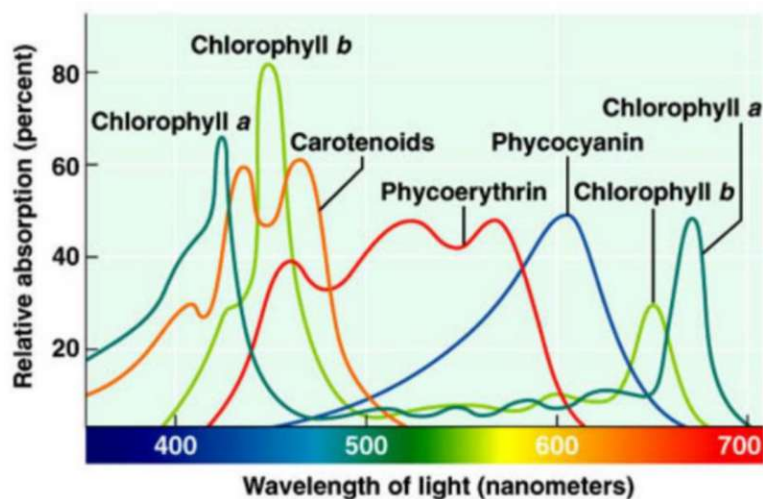


Abbildung 3.4: Absorptionsspektren verschiedener Pigmente und Proteine [Ledang et al. 2019]

Das Spektrum der Cyanobakterien kann allerdings variieren (siehe Kapitel 4), dies könnte erklären, warum Studien oftmals leicht unterschiedliche Angaben zu den spektralen Eigenschaften (z.B. Absorptions- und Emissionspeaks) machen, vor allem weil sich der experimentelle Aufbau zwischen Studien häufig unterscheidet. Tabelle 3.1 beschreibt beispielhaft die Angaben einiger Studien zu den Absorptions- und Emissionseigenschaften der PBPs.

Tabelle 3.1: Absorptions- und Fluoreszenzpeaks [nm] der PBPs

PBP	Absorption	Emission	Quelle
PE	550-570	578	Zamyadi et al. 2016
		568-575	Chen et al. 2023
PC	620	650	Zamyadi et al. 2016
		640-660	Xie et al. 2022
		630-650	Chen et al. 2023
APC	650	660-665	Chen et al. 2023
		680-690	Xie et al. 2022
PEC		600-610	Chen et al. 2023

Die Absorptions- und Emissionsspektren der PBPs überlappen sich [Chen et al. 2023], wie auch die Emissionsspektren von Chl und PBPs [Campbell et al. 1998]. Des Weiteren nutzen kommerzielle Sensoren häufig relativ breite spektrale Messbandbreiten (siehe Tabelle 3.2), sodass nicht die Fluoreszenz eines spezifischen Pigments detektiert wird, sondern die überlagerten Emissionen mehrerer Pigmente, was unter Umständen zu Messfehlern führen kann [Almuhtaram et al. 2021].

Tabelle 3.2: Anregungs- und Detektionsbandbreiten bestimmter kommerzieller Sensoren [Rouso et al. 2021]

Parameter Wellenlänge [nm]	EXO2	Fluoroprobe (BBE)	Aqua TROLL 500	Aqua TROLL 600
Chl-a Anregung	470 ± 15	450	430	430
Chl-a Emission	685 ± 20	685	675-750	675-750
PC Anregung	590 ± 15	610	590	590
PC Emission	685 ± 20	685	640-690	640-690

Cyanobakterien können eine große Dynamik aufweisen, das bedeutet, Messungen innerhalb eines Wasserkörpers können um mehrere Größenordnungen innerhalb kurzer Zeit (einige Stunden) oder Distanz variieren [Chorus et al. 2021]. Das bedeutet, dass der Ort und Zeitpunkt der Probenahme bzw. Messung sehr wichtig

sind, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, auch weil es nicht nur planktonische, sondern auch benthische Cyanobakterien gibt [Chorus et al. 2021; WHO 2022]. Es gibt allerdings mehrere Herausforderungen bzw. Störeinflüsse, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen, wie bspw. Variationen in den Spektren der Cyanobakterien, Störungen durch Eigenschaften von Cyanobakterien und andere Arten, Wasserqualität und optische Eigenschaften der Wassersäule, sowie Bias aufgrund der verwendeten Methodik (siehe Kapitel 4).

Kapitel 4

Potentielle Störquellen

4.1 Variationen im Spektrum

Das Spektrum der Cyanobakterien variiert in Abhängigkeit von Umweltbedingungen [Staniszewski et al. 2024] (z.B. Temperatur [Xie et al. 2022], pH-Wert, Metalionen, organische Lösungsmittel [Chen et al. 2023], Schwermetalle [Bellamy-Carter et al. 2022]), Cyanobaktérienspezies und Zellalter [Bertone et al. 2018], Aufbau und Struktur des PBS [Xie et al. 2021, 2022]. Unterschiede in den spektralen Eigenschaften, wie etwa bei Absorptions- und Emissionspeaks, könnten sich u.a. auf die variierenden experimentellen Bedingungen einzelner Studien zurückführen lassen, was auch erklärt, warum die Angaben in der Literatur nicht immer übereinstimmen.

4.2 Störungen durch Eigenschaften von Cyanobakterien und anderen Arten

4.2.1 Intra- und interspezifische Variationen im Pigmentproteingehalt einer Zelle

Alle Cyanobakterienarten weisen einen spezifischen Bereich an Chl-a- und PC-Gehalten pro Zelle – dieser ist normalerweise proportional zum Zellvolumen – und unterschiedliche Pigmentverhältnisse auf [Bertone et al. 2018]. Die Pigmentgehalte und -verhältnisse variieren aufgrund von Zellcharakteristiken (z.B. Geometrie, Größe), dem Einfluss von Umweltfaktoren (z.B. vorherige Lichtexposition, Nährstoffe) und dem physiologischen Status (z.B. Wachstumsstadium) zwischen und innerhalb von Arten [Bertone et al. 2018; Ji et al. 2023]. Diese intra- und interspezifischen Variationen des Pigmentgehalts [Chorus et al. 2021; Ji et al. 2023] führen dazu,

dass der Zusammenhang zwischen der gemessenen relativen Fluoreszenz (RFU) und der Zielgröße der Messung (z.B. Biovolumen, -masse oder Zelldichte) instationär ist [Zamyadi et al. 2016], wodurch die Kalibrierung erschwert wird [Bertone et al. 2018].

Der PC-Gehalt pro Zelle kann sich während der Wachstumsphasen verändern, allerdings kommen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen, zu welchem Zeitpunkt der PC-Gehalt wahrscheinlich größer bzw. kleiner ist, was auf Arten- und methodische Unterschiede hindeutet [Bertone et al. 2018]. Des Weiteren kann auch die Nährstoffverfügbarkeit den Pigmentgehalt pro Zelle beeinflussen [Bertone et al. 2018; Ji et al. 2023]: Ein Mangel an Stickstoff kann bspw. zu einer PC-Degradation in Cyanobakterien führen, wohingegen steigende Phosphat- und Nitratkonzentrationen zu einem Anstieg des PC/Chl-a Verhältnisses führen können [Bertone et al. 2018].

4.2.2 Variierende Zellgrößen

Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich die Zellgrößen innerhalb und zwischen Spezies, Wachstumsphasen und Umweltfaktoren. Das kann allerdings zu unterschiedlichen RFU-Signalen bezogen auf die gleiche Anzahl an Zellen führen [Zamyadi et al. 2016]. Aus diesem Grund sinkt die Genauigkeit der Sonden bei der Bestimmung der Zelldichte im Gegensatz zum Biovolumen, weil häufig heterogene Mischungen von Spezies mit unterschiedlichen Zellgrößen in Gewässern vorhanden sind [Bertone et al. 2018]. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, Korrelationen zwischen RFU und bspw. Biomasse oder -volumen anstelle der Zelldichte zu bestimmen. Des Weiteren wird eine ortsspezifische Kalibrierung empfohlen [Zamyadi et al. 2016].

4.2.3 Lichtexposition

Der PBP-Gehalt pro Zelle kann durch die vorher stattgefundene Lichtexposition beeinflusst werden, denn dieser ist häufig größer nach Lichtexposition mit geringerer Intensität [Ji et al. 2023]. Das liegt daran, dass die Zellen in Umgebungen mit schwachen Lichtverhältnissen photosynthetisch aktive Antennenpigmente akkumulieren, um mehr Licht absorbieren zu können. Hingegen bei Umgebungen mit stärkeren Lichtverhältnissen werden die Antennenpigmente reduziert, um übermäßige Anregungsenergien und Zellschäden zu vermeiden [Bertone et al. 2018]. Das bedeutet bspw., dass bei hoher Lichtintensität Cyanobakterien an der Oberfläche weniger PC produzieren können, sodass eine in situ Fluoreszenzmessung zu einer Unterschätzung der Cyanobakterienkonzentration führen kann. Allerdings ist die Studienlage zur Auswirkung der Lichtexposition auf die PBP-Produktion nicht

einheitlich, da mehrere andere Studien keine signifikanten Auswirkungen durch die vorherige Lichtexposition festgestellt haben [Bertone et al. 2018; Zamyadi et al. 2016]. Das deutet darauf hin, dass die Auswirkungen der Lichtexposition auf die Pigmentproduktion artspezifisch sind [Bertone et al. 2018]. Des Weiteren wurden auch Unterschiede im PC-Gehalt zwischen künstlichem und natürlichem Licht festgestellt, das bedeutet, Laborergebnisse mit Kulturen können je nach verwendeter Intensität und Spektrum der Lichtquelle ungenau sein [Bertone et al. 2018].

Bei starker Lichtintensität kann es zum Schutz der Zelle zu nicht-photochemischem Quenching (NPQ) kommen, was die Fluoreszenzausbeute reduziert [Bertone et al. 2018; Rouso et al. 2021]. Hierbei wird überschüssige und potentiell schädliche Energie in Form von Wärme abgegeben [García-Oneto et al. 2024; Muzzopappa et al. 2020; Sonani et al. 2018]. Rouso et al. 2021 haben ein Quenching von bis zu 79% für Chl-a (bei einer Grünalge) und 59% für PC (bei einer Cyanobakterie) bei maximaler Lichtintensität (im Vergleich zu Messungen in Dunkelheit) festgestellt. Allerdings wurde in dieser Studie nicht die spezifische Fluoreszenz des bestimmten Pigments gemessen, sondern die Emission in verschiedenen spektralen Bandbreiten (siehe Tabelle 3.2). Andere Studien berichten allerdings von unterschiedlichen Werten (z.B. 20-25% [Rouso et al. 2021], 80% [Bertone et al. 2018]). Es gibt grundsätzlich wenige Studien, welche die Auswirkungen von NPQ auf die PC-Fluoreszenz und das in situ Monitoring bewerten. Messungen tagsüber oder oberflächennah können dadurch allerdings stark fehlerbehaftet sein [Rouso et al. 2021].

4.2.4 Verhältnis von intra- und extrazellulärem PC

In der Natur kann PC sowohl zellgebunden als auch extrazellulär vorkommen [Zamyadi et al. 2016]. Das PC kann bspw. während und nach einer SAB in das Wasser freigesetzt werden, wird dort aber relativ schnell abgebaut [Bertone et al. 2018]. Rouso et al. 2019 haben festgestellt, dass die Fluoreszenz nach dem Ende einer SAB weiter ansteigt und für eine bestimmte Zellenanzahl das RFU-Signal nach der SAB höher als vor der Blüte ist. Die Autoren stellen dafür die folgende Hypothese auf: Durch die einsetzende Zellyse wird intrazelluläres Pigment freigesetzt, was zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals führt. Aufgrund des zusätzlichen Signals des extrazellulären PC, zu dem eigentlichen in vivo Signal, kann es zu Messfehlern kommen. Das genaue Ausmaß des Fehlers ist abhängig vom Verhältnis des zellgebundenen und gelösten PC. Zu dieser Störquelle gibt es allerdings bisher nur wenige Studien, es bedarf also noch weiterer Forschung, um Kompensationsmethoden zu entwickeln [Zamyadi et al. 2016]. Die Stabilität des gelösten PC spielt dabei auch eine wichtige Rolle, Ji et al. 2023 beschreiben die Stabilität von PBPs in Abhängigkeit verschiedener Umweltfaktoren.

4.2.5 Morphologische und ökologische Eigenschaften

Die Morphologie von Zellen und Zellagglomeraten bestimmt die relative Position einzelner Zellen in Bezug auf die Sensoroptik und beschränkt die Exposition der einzelnen Zellen. Dies kann somit zu Messfehlern führen [Rouso et al. 2021; Zamyadi et al. 2016]. Zellagglomerationen können weniger Fluoreszenz pro Zelle emittieren als einzelne Zellen [Bertone et al. 2018; Chorus et al. 2021; Zamyadi et al. 2016]. Eine andere Studie stellt allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen der Fluoreszenz einer Kolonie und der disaggregierten Kolonie fest. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen im Innern der Kolonie keiner abgeschwächten Lichtexposition ausgesetzt sind. Allerdings ermittelt diese Studie bei manchen kommerziellen Sensoren dennoch eine schwächere Korrelation zwischen Biovolumen und PC-Fluoreszenz bei einem kolonialen Cyanobakterium. Die Autoren beschreiben, wenn größere Zellagglomerate sich durch den Messbereich bewegen, die Fluoreszenz stark ansteigt und somit die Heterogenität der Probe vermutlich für Variationen in der Fluoreszenz sorgt [Hodges et al. 2018].

Dieser Aspekt ist allerdings sehr wichtig, denn viele Süßwasser- und marine Cyanobakterienarten formen Kolonien oder Filamente während ihrer Wachstumsphasen [Zamyadi et al. 2016]. Des Weiteren gibt es nicht nur planktonische, sondern auch benthische Cyanobakterien [Chorus et al. 2021; WHO 2022]. Diese können schwierig zu messen sein [Bertone et al. 2018; Chorus et al. 2021], u.a. weil ihr Vorkommen räumlich sehr heterogen ist. Sie kommen häufig in räumlich begrenzten Bereichen bzw. Stellen mit relativ hoher Dichte neben Stellen ohne Vorkommen vor und es gibt nur wenige Richtlinien für benthische Probenahmen [Chorus et al. 2021]. Es gibt aber bestimmte Sonden, die für die Messung benthischer Cyanobakterien geeignet sind. Des Weiteren ist es wichtig Effekte bei Messungen in der Nähe von Begrenzungen (z.B. der Gewässersohle) zu berücksichtigen [Bertone et al. 2018; Brient et al. 2008], denn das Signal ist abhängig von der Distanz der Sonde zu der entsprechenden Begrenzung [Brient et al. 2008]. Gründe hierfür könnten Interaktionen der Anregungsstrahlung mit der Begrenzung oder die Exposition unterschiedlich großer Volumina bzw. Flächen in Abhängigkeit der Distanz zur Begrenzung sein.

4.2.6 Vorhandensein von Chl-a von anderen Phytoplanktongruppen

Chl-a und PC emittieren Fluoreszenz jeweils um ca. 685 und 650 nm. Die Fluoreszenzsonden verwenden z.T. LEDs, welche nicht PC spezifisch in der Anregungswellenlänge sind [Zamyadi et al. 2016]. Das bedeutet, die Genauigkeit der in situ Fluoreszenzmessung ist abhängig von den verwendeten Emissionsfiltern. Denn wird

bspw. ein breiterer Bandpassfilter verwendet, wird ggf. auch Chl-a-Fluoreszenz mitgemessen, was zu einem Messfehler führen kann, sofern dies nicht berücksichtigt wird [Roussio et al. 2021; Zamyadi et al. 2016]. Vor allem, wenn nur geringe PC- aber große Chl-a-Mengen vorhanden sind, können dadurch große Überschätzungen entstehen (laut Bertone et al. 2018 kann durch Chl-a-Fluoreszenz ein Fehler von bis zu 600% entstehen).

4.2.7 Vorhandensein von anderen PBP enthaltenden Arten

PBPs kommen nicht nur in Cyanobakterien vor, sondern auch in Rotalgen, Cryptophyten und Glaucophyten. Wenn diese Arten auch in dem zu beprobenden Gewässer auftreten, kann es bei der Verwendung von in situ Fluoreszenzsonden zu Überschätzungen der Cyanobakterienkonzentration kommen. Die PBP enthaltenden Arten (exklusive Cyanobakterien) können in bestimmten Gewässern bis zu 63% des gesamten Phytoplanktons ausmachen. Es wurden höhere Anteile beobachtet, wenn Cyanobakterien nur in geringerer Anzahl vorhanden waren. Der Einfluss dieser Störkomponente wurde bisher wenig erforscht, jedoch scheint bei geringem Vorkommen von Cryptophyten (unter 3% der gesamten Phytoplanktonpopulation) kein signifikanter Einfluss auf die in situ Cyanobakterienmessung zu bestehen. Hier sollten weitere Studien durchgeführt werden, um den genauen Einfluss dieser Störquelle besser quantifizieren zu können und um kritische Schwellenwerte für das Auftreten anderer PBP enthaltenden Arten zu identifizieren [Zamyadi et al. 2016].

4.2.8 Verschmutzungen

Ein sehr wichtiger Aspekt ist die regelmäßige Reinigung optischer Sensoren, um bspw. Biofouling [Chorus et al. 2021] oder andere Verschmutzungen des Sensors zu vermeiden, welche die Messungen potentiell beeinflussen können. Die Sonden benötigen aus diesem Grund ein geeignetes Reinigungssystem, um langfristig eine gleichbleibende Genauigkeit und Zuverlässigkeit gewährleisten zu können [Bertone et al. 2018; Chorus et al. 2021].

4.3 Störungen durch die optischen Eigenschaften der Wassersäule und die Wasserqualität

4.3.1 Trübung

Die Trübung des Wassers kann zu Messfehlern führen [Chorus et al. 2021; Rousso et al. 2019, 2021; Staniszewski et al. 2024], das tatsächliche Fehlerausmaß ist allerdings abhängig von der Stärke der Trübung, sowie der Charakteristik der Partikel (z.B. Größe) und der verwendeten Sonde. Durch die Trübung kommt es zu einer Beeinflussung der Transmission der Anregungswellenlängen oder der Fluoreszenz der Zellen zum Detektor. Des Weiteren können DOM [Cremella et al. 2018] und der Detritus die in situ Fluoreszenzmessungen beeinflussen. Der Detritus beinhaltet Chl-Abbauprodukte, welche in ähnlichen spektralen Bereichen wie Chl fluoreszieren [Zamyadi et al. 2016]. Auch fDOM emittiert z.T. Fluoreszenz in ähnlichen Wellenlängenbereichen wie PBPs oder Chl [Zamyadi et al. 2016].

4.3.2 Wassertemperatur

Mit zunehmender Temperatur steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein angeregtes Elektron strahlungslos in den Grundzustand zurückfällt [Zamyadi et al. 2016], die Fluoreszenz ist also in diesem Fall umgekehrt proportional zur Temperatur [Bertone et al. 2018; Rousso et al. 2021]. Bei fDOM-Messungen wurden Abnahmen der Fluoreszenz im Bereich von 0,8-1,5% pro 1°C festgestellt und bei der in situ Chl-a-Messung 1,4% pro 1°C. Der genaue Zusammenhang zwischen Temperatur und Fluoreszenz kann jedoch in Abhängigkeit der vorkommenden Phytoplanktonarten variieren [Zamyadi et al. 2016].

4.4 Bias aufgrund der verwendeten Methodik

4.4.1 Kalibrierung

Wenn sich das beobachtete System verändert (z.B. in der Artenzusammensetzung), kann eine neue Kalibrierung erforderlich sein [Bertone et al. 2018; Staniszewski et al. 2024]. Es sollten Kalibrierungen mit mehreren Arten und verschiedenen Biovolumina durchgeführt werden, im optimalen Fall mit einer für das zu beobachtende System repräsentativen Biozönose, um eine ortsspezifische Kalibrierung zu erhalten [Bertone et al. 2018]. Des Weiteren spielt die Temperatur auch hier eine wichtige Rolle, denn Kalibrierungstemperaturen, die von den Feldtemperaturen abweichen, sind eine häufige Quelle für Bias. Um die Genauigkeit zu erhöhen, sollte eine ortsspezifische Kalibrierung im zu erwartenden Messbereich durchgeführt werden.

Stellt die Werkskalibrierung nicht den tatsächlichen statistischen Zusammenhang vor Ort dar, kann die Verwendung dieser Kalibrierung zu Bias führen. Für eine Kalibrierung vor Ort muss eine repräsentative Stichprobe entnommen und im Labor analysiert werden, was wiederum zeit- und arbeitsintensiv ist [Zamyadi et al. 2016].

Ein weiterer wichtige Aspekt ist der Kalibrierungsbereich bzw. der Bereich, in dem gemessen werden soll. Ist der Kalibrierungsbereich sehr groß, kann dies zu großen relativen Fehlern bei kleinen Konzentrationen führen. Eine Extrapolation über den Kalibrierungsbereich kann ebenfalls zu Messfehlern führen. Ein kleinerer Bereich limitiert hingegen das Potential und den Anwendungsbereich der Sonden. Es ist also sehr wichtig, angemessene Kalibrierungspunkte zu wählen [Zamyadi et al. 2016].

4.4.2 Interpretation der Fluoreszenzmessung

Die Sonden messen i.d.R. die RFU bestimmter Pigmente. Die Messwerte werden häufig in gebräuchlichere Einheiten überführt (z.B. Zellen/ml, $\mu\text{g Chl-a/l}$, $\mu\text{g PC/l}$). Das bringt jedoch mehrere Probleme mit sich: Die RFU-Werte sind instrumentenspezifisch, es kann also zu unterschiedlichen Ergebnissen bei Sonden gleichen Typs kommen [Zamyadi et al. 2016], ein möglicher Grund könnte eine Alterung der Sonde bzw. Lichtquelle sein. Des Weiteren ist die Fluoreszenz pro Zielgröße der Messung (z.B. Zellen, Masse, Volumen) instationär, somit kann die Kalibrierung nach einer Änderung des beobachteten Systems fehlerbehaftet sein [Zamyadi et al. 2016]. Dadurch wird es schwierig die genaue Fehlerquelle zu identifizieren, denn es ist schwer nachzuvollziehen, ob der Fehler auf einen fehlerhaften RFU-Wert oder Umrechnungsfaktor (oder eine Kombination) zurückzuführen ist. Das führt dazu, dass die Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowie die universelle Quantifizierung von Störungseinflüssen nicht gegeben sind [Zamyadi et al. 2016].

Kapitel 5

Grenzen der in situ Fluoreszenzmessung von Cyanobakterien

Eine Differenzierung der Cyanobakterienspezies mit Fluoreszenzsonden ist aktuell nicht möglich, weil keine eindeutigen Unterschiede in den Fluoreszenzspektren verschiedener Spezies bestehen [Rousso et al. 2019, 2022a]. Des Weiteren verändern sich die Spektren von Cyanobakterien in Abhängigkeit bestimmter Faktoren (siehe Kapitel 4). Die Sonden messen lediglich die Pigmentsignatur der Cyanobakterien bzw. ihr quantitatives Vorhandensein, jedoch keine Cyanotoxine oder G&G-Stoffe. Es gibt allerdings Ansätze, die zelluläre Produktion dieser Stoffe zu modellieren, dies eröffnet einen weiteren Anwendungsbereich der Sonden, wie z.B. die Bewertung des Bildungspotentials und das Management von Cyanotoxinen und G&G-Stoffen [Zamyadi et al. 2016].

Verschiedene Institutionen schreiben Schwellenwerte für Cyanobakterien vor, diese sind allerdings z.T. in unterschiedlichen Einheiten. Um die Messergebnisse der Sonden mit den entsprechenden Schwellenwerten vergleichen zu können, werden Umrechnungsfaktoren benötigt. Diese Faktoren sind, wie bereits beschrieben, orts- und zeitabhängig, wodurch die Entwicklung von universellen und gleichzeitig akkuraten Umrechnungsfaktoren unmöglich wird. Das bedeutet, die Unsicherheiten in der Interpretation der in situ Messungen stellen ein großes Problem bei der Nutzung der Sonden dar [Zamyadi et al. 2016].

Kapitel 6

Kompensationsmethoden

Es werden zusätzliche in situ Messungen benötigt, um die Parameter zu messen, die Störungen verursachen und um die entsprechenden Effekte kompensieren zu können [Bertone et al. 2018; Zamyadi et al. 2016]. Unabhängig davon, werden regelmäßige standortspezifische Kalibrierungen empfohlen [Rouso et al. 2021].

Mehrere Studien beschäftigen sich mit der Kompensation von Chl-a-Störungen: Eine Möglichkeit, den Einfluss zu minimieren, ist die Verwendung schmalere Bandpassfilter [Zamyadi et al. 2016], was jedoch mit höheren Kosten verbunden ist [Bertone et al. 2018]. Die simultane Messung der Fluoreszenz von eukaryotischen Algen ist eine weitere Möglichkeit, um falsch positive Ergebnisse in Gegenwart von Chl-a-haltigem Phytoplankton zu vermeiden [Zamyadi et al. 2016]. Chang et al. 2012 beschreiben eine solche Kompensationsmethode für Chl-a, aber auch für Trübung und Kolonien, allerdings auf Zellbasis [Chang et al. 2012]. Die Fluoreszenzsonden können auch in Kombination mit einem Ultraschallgerät betrieben werden, um Kolonien zu disaggregieren [Bertone et al. 2018]. Auch Zamyadi et al. 2012 und Choo et al. 2019 beschreiben Kompensationsmöglichkeiten für Chl-a.

Einige Fluoreszenzsonden emittieren Licht im Bereich von 370 nm, um den DOM-Einfluss zu kompensieren [Bertone et al. 2018; Kring et al. 2014]. Cremella et al. 2018 beschreiben weitere Ansätze zur Kompensation von DOM-Einflüssen. Hodges et al. 2018 hingegen beschreiben u.a. den Einfluss der Temperatur auf die Fluoreszenzmessung, siehe hier auch Kapitel 4.3.2.

Das NPQ kann große Auswirkungen auf die emittierte Fluoreszenz haben und sollte dementsprechend kompensiert werden, um verlässliche und akkurate Messungen zu erhalten [Rouso et al. 2021]. In der Literatur werden mehrere Kompensationsmöglichkeiten beschrieben. Es ist allerdings schwierig ein angemessenes Kompensationsmodell zu entwickeln, weil das NPQ von Umweltbedingungen (z.B.

Nährstoffgehalten, Lichtintensität) und der jeweiligen Art abhängt und ein Hystereseverhalten (unterschiedlich starkes Quenching bei gleicher Bestrahlungsstärke) zeigt [Rouso et al. 2021]. Eine Möglichkeit dieses Problem zu vermeiden ist es, nur Messungen in der Nacht durchzuführen [Bertone et al. 2018]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Definition von Schwellenwerten für die Bestrahlungsstärke, ab denen NPQ einsetzt, um Messungen während dieser Zeit zu verwerfen. Allerdings ist die Bestimmung eines universellen Schwellenwerts schwierig, weil wie vorher beschrieben, das NPQ von unterschiedlichen Faktoren abhängt [Rouso et al. 2021]. Gleichzeitig würden diese Methoden das Potential dieser Messtechnologie als hochfrequenter Echtzeit-Datenlieferant reduzieren. Eine weitere Kompensationsmöglichkeit stellt die Verwendung einer polynomialen Regression dar, um die Messwerte über einen Tag zu interpolieren, basierend auf den Messungen der vorangegangenen und der folgenden Nacht. Es werden also im Prinzip die Nachtmessungen verwendet, um die Tagesmessungen zu kalibrieren und durch einen Vergleich mit den Sensormessungen zu einem entsprechenden Zeitpunkt, lässt sich das NPQ-Ausmaß bestimmen. Darüber hinaus ist es auch möglich, durch folgende Modifikationen des Sondendesigns den Fehler zu kompensieren: Die Probe bzw. das Phytoplankton kann bspw. in Dunkelheit gebracht und gemessen werden, denn die Zeit bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz liegt im Sekunden- bis Stundenbereich, je nach vorheriger Bestrahlungsstärke und Art [Rouso et al. 2021]. Sackmann et al. 2008 führen weitere Kompensationsmöglichkeiten für die NPQ-Störung auf.

Es wurden auch andere technische Modifikationen an Sonden vorgenommen, um bspw. eine Sättigung des PC-Fluoreszenzsignals während der SAB zu vermeiden. Hierfür wurde die Sonde mit einem Verschluss ausgestattet, um das von der Sonde emittierte Licht zu reduzieren [Bertone et al. 2018].

Kapitel 7

Prognosemodelle für Cyanobakterien

Eine Differenzierung der Cyanobakterienspezies mit Fluoreszenzsonden ist aktuell nicht möglich [Rousso et al. 2020], weil keine eindeutigen Unterscheide in den Fluoreszenzspektren verschiedener Spezies bestehen [Rousso et al. 2019, 2022a]. Aus Sicht des Risikomanagements ist es jedoch von Interesse, die genauen Spezies bzw. ihre Zusammensetzung während einer AB zu kennen, um das Bildungspotential von Cyanotoxinen oder G&G-Stoffen bewerten zu können [Rousso et al. 2019]. Rousso et al. 2019, 2022a haben aus diesem Grund ein Modell entwickelt, um die Artenzusammensetzung einer Cyanobakterienblüte vorherzusagen. Das Modell besteht aus drei Teilen:

1. Wahrscheinlichkeitsmodell der dominierenden Arten während der Algenblüte
2. Speziesspezifisches Fluoreszenz Kompensationsmodell
3. Vorhersage der Cyanobakterienspezies in Echtzeit (Zusammenführung von Teil 1 und 2)

Die dominanten Spezies werden dabei, basierend auf Routineüberwachungsdaten, mit Hilfe von Machine Learning (ML) vorhergesagt. Abschließend wird eine speziesspezifische Kompensation der gemessenen Signale durchgeführt [Rousso et al. 2019, 2022a].

SABs stellen ein erhebliches wirtschaftliches, ökologisches und gesundheitliches Risiko dar [Park et al. 2024; Rousso et al. 2019, 2020]. Herkömmliche Überwachungsmethoden (z.B. Mikroskopie, Pigmentanalytik) weisen zwar eine höhere Präzision auf [Rousso et al. 2020], sind aber zeit- und arbeitsintensiv und benötigen eine ausreichende analytische Erfahrung [Park et al. 2024; Rousso et al. 2020]. Dementsprechend sind die Entwicklung und Implementierung effizienter Überwachungs-

und Vorhersagemethoden [Park et al. 2024; Rouso et al. 2019] sowie die Identifizierung treibender Kräfte von ABs ausschlaggebend, um die Bewirtschaftung von Wasserressourcen zu optimieren [Rouso et al. 2020].

Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedenen Typen von Prognosemodellen unterschieden, das sind zum einen prozessbasierte (PB)-Modelle und zum anderen datengetriebene (DD)-Modelle [Rouso et al. 2019, 2020]. Seit den 1980er-Jahren wird in diesem Themenfeld intensiv geforscht, wobei das Interesse [Rouso et al. 2019] sowie auch die Anzahl der Publikationen im vergangenen Jahrzehnt noch einmal deutlich zugenommen haben. Dies ist u.a. auf die großräumige Einführung und Weiterentwicklung neuer Monitoringtechnologien zurückzuführen, wie z.B. die fluoreszenzbasierte in situ Messung oder Fernerkundungsmethoden (siehe Abbildung 7.1) [Rouso et al. 2020].

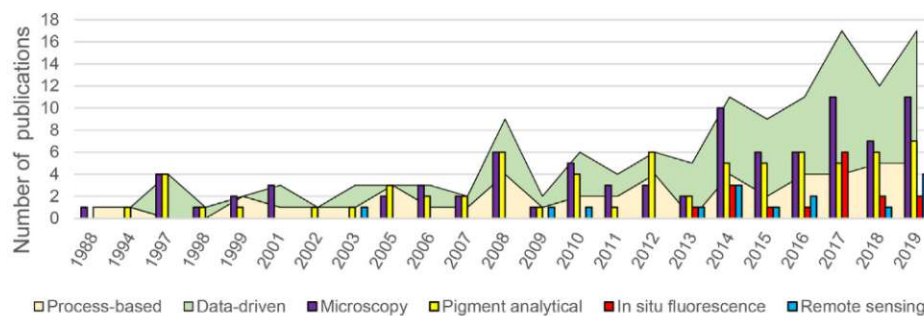


Abbildung 7.1: Zeitreihe der Publikationen klassifiziert nach Messmethode (Histogramme) und Modellierungsansatz (durchgehende Linien) [Rouso et al. 2020]

Die Fernerkundungsmethoden basieren u.a. auf der Beobachtung spezifischer optischer Eigenschaften der Cyanobakterien mittels Satelliten, Flugzeugen und Drohnen. Es existieren zahlreiche empirische, semi-empirische und analytische Algorithmen, um aus Satellitenbildern bestimmte Frequenzbänder zu extrahieren und basierend darauf Konzentrationen von Chl-a und PC an der (gesamten) Wasseroberfläche zu schätzen. Die Erreichung einer hinreichenden Qualität der Aussagen ist allerdings aktuell noch herausfordernd, weil diese von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, bspw. Wetterbedingungen (u.a. Wolkenbedeckung), Mangel an Daten mit ausreichender zeitlicher- und räumlicher Auflösung. Darüber hinaus erfordern diese Methoden ortsspezifische Kalibrierungen [Rouso et al. 2020].

In situ Fluoreszenz- und Fernerkundungsmethoden werden zunehmend in Prognosemodellen eingesetzt, da sie kosteneffizienter sind und eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung als herkömmliche Methoden bieten [Roussio et al. 2020], wodurch sie auch zu einem verbesserten Prozessverständnis führen können [Chorus et al. 2021; Roussio et al. 2020]. PB-Modelle werden dabei häufig für langfristige Szenarioanalysen eingesetzt, während DD-Modelle häufiger für kurzfristige Vorhersagen verwendet werden [Roussio et al. 2020]. Komplexere Modelle sind dabei nicht zwangsläufig besser und es existiert kein universelles Modell [Park et al. 2024]. Eine fehlende Standardisierung bei der Evaluierung der Modellleistung erschwert zudem die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Modellansätze. Modelle existieren auf verschiedenen Ebenen: Zum einen auf Phylumebene (alle Cyanobakterien) sowie auf Gattungs- bzw. Artenebene. Die Modelle sind häufig standort- oder artenspezifisch ausgeführt und zeigen eine höhere Leistung im Vergleich zu verallgemeinerten Modellen (mehrere Orte oder Arten). Die verwendeten Input-Daten variieren je nach Modell und umfassen häufig physikalische, chemische und biologische Wasserqualitätsparameter sowie Meteorologische- und Landnutzungsdaten [Roussio et al. 2020].

Für die Entwicklung und Validierung von Modellen werden Daten aus Zeiträumen mit und ohne ABs benötigt. Da die Datenerfassung mit herkömmlichen Methoden mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden ist, kann eine höher frequente Überwachung häufig nur während ABs durchgeführt werden. Die Nutzung von Daten mit unterschiedlichen Auflösungen für die Modellvalidierung oder die Entwicklung von DD-Modellen, kann zu Bias führen [Roussio et al. 2019, 2020]. Des Weiteren haben Studien festgestellt, dass sich die Vorhersageleistung von DD-Modellen verbessern würde, wenn größere Datenmengen für die Entwicklung der Modelle zur Verfügung stehen, allerdings nicht ausschließlich in Form von längeren Zeitreihen, sondern auch in Form einer höheren Eventauflösung. Fluoreszenzsonden können dieses Probleme lösen, denn sie bieten schnelle, hochfrequente Messungen, bei moderaten Kosten [Roussio et al. 2019].

Aktuell wird das Interesse an erklärbarer künstlicher Intelligenz größer, um den relativen Einfluss einzelner Parameter auf den Modelloutput bzw. ABs zu analysieren und besser zu verstehen. Dies soll dabei helfen, effizientere Maßnahmen zu konzipieren und dadurch das Gewässermanagement zu optimieren. Die Faktoren, die ABs beeinflussen, sind vielfältig und unterscheiden sich standortabhängig. Des Weiteren variiert der Einfluss von Input-Variablen auf die Modellleistung in Abhängigkeit vom gewählten Modell [Park et al. 2024].

7.1 Prozessbasierte Modelle

Die Grundlage dieser Modelle bilden eine Reihe mathematischer Vorhersagegleichungen für die Dynamik der Cyanobakterien. Vor Anwendung der Modelle werden standortspezifische Daten benötigt, um die Modellparameter zu kalibrieren und zu validieren. Auch wenn sich die Rahmenbedingungen und Annahmen von unterschiedlichen PB-Modellen unterscheiden, beschreiben diese Modelle im Allgemeinen die Veränderungen der Cyanobakterienbiozönose basierend auf internen und externen Stressfaktoren, wie z.B. Nährstoffverfügbarkeit, physiologische Präferenzen, Konkurrenzen, horizontaler und vertikaler Transport, thermische Schichtung oder Lebenszykluseigenschaften einzelner Arten [Rouso et al. 2020].

Ein Großteil dieser Modelle wurde eingesetzt, um Szenarioanalysen für zukünftige ABs im Zusammenhang mit Veränderungen von Wasserschichtung, Temperatur, Niederschlag und Abfluss aufgrund des Klimawandels durchzuführen. Ein großer Nachteil der PB-Modelle ist, dass sie eine große Anzahl an Parametern benötigen. Die Messung dieser Parameter ist z.T. schwierig und teuer bzw. erfordert Fachwissen aus unterschiedlichen Disziplinen [Rouso et al. 2019, 2020]. Das führt dazu, dass diese Modelle in Bezug auf die Parameter sehr komplex sein können, was zu Unsicherheiten und Fehlern führen kann [Rouso et al. 2020].

7.2 Datengetriebene Modelle

DD-Modelle basieren auf statistischen und Data Mining Methoden, um Informationen aus historischen Daten zu extrahieren und das Verhalten einer beliebigen abhängigen Variable – in diesem Fall Cyanobakterien – zu erklären und vorherzusagen [Rouso et al. 2019]. Ein wesentlicher Vorteil dieser Modelle ist es, dass für ihre Entwicklung weniger Vorwissen erforderlich ist als für PB-Modelle. Dennoch kann Wissen über die zugrunde liegenden Phänomene im Zusammenhang mit AB-Vorkommen die Leistung von DD-Modellen durch eine optimierte Auswahl der Input-Variablen verbessern [Rouso et al. 2020]. Es wird u.a. eine Vielzahl von ML-Modellen eingesetzt, deren Entwicklung einen geringeren Bedarf an experimentell ermittelten Werten aufweist und die somit eine kostengünstige und effiziente Alternative für die AB-Überwachung darstellen. Darüber hinaus kommen auch bildbasierte ML-Ansätze zum Einsatz, um Algen in Bildern (mikroskopische Aufnahmen, Bilder von Schiffs- und Küstenüberwachungskameras, UAV- oder Satellitenbilder) und Videos zu detektieren oder klassifizieren [Park et al. 2024].

Die Leistungsfähigkeit von DD-Modellen hängt sehr stark von der Verfügbarkeit und Qualität der Daten ab, weil die Vorhersageregeln ausschließlich aus den vorhandenen Daten abgeleitet werden. Des Weiteren erlauben die aus DD-Modellen abgeleiteten Vorhersageregeln und Muster dem Nutzer nicht immer ein tieferes Prozessverständnis, z.B. eine Analyse der treibenden Kräfte. Der Grund hierfür ist, dass die Variablen zwar statistische Zusammenhänge aufweisen, die für Vorhersagezwecke sinnvoll eingesetzt werden können, diese aber nicht zwangsläufig in einem kausalen Zusammenhang mit ABs bzw. SABs stehen müssen [Rousso et al. 2020].

Kapitel 8

Ergebnisse - Sensorentwicklung

8.1 Sensor 1 - Referenz: Interne Lampe

In Abbildung 8.1 ist das Absorptionsspektrum einer wässrigen Rhodamin WT-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/l dargestellt. Das Absorptionsmaximum des Analyten liegt bei etwa 555 nm und im UV-Bereich zeigt sich mit abnehmender Wellenlänge eine zunehmende Absorption.

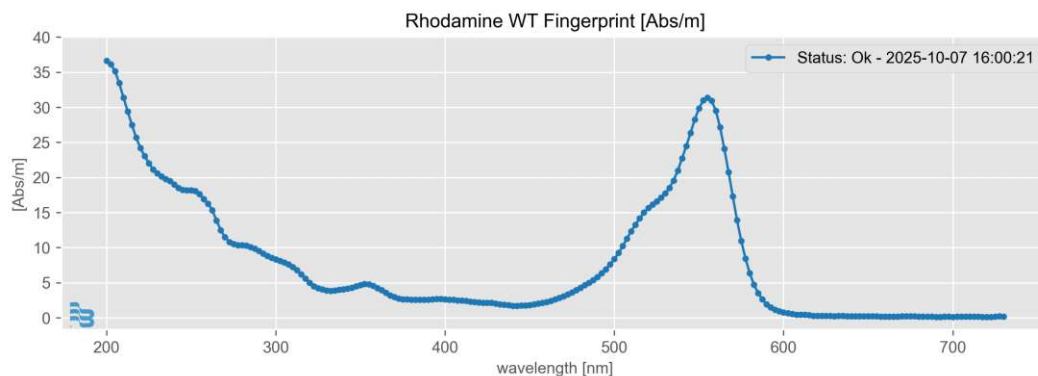


Abbildung 8.1: Absorptionsspektrum von Rhodamin WT gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)

Die Abbildung 8.2 zeigt das Absorptionsspektrum einer wässrigen Uranin-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/l. Es ist ein Absorptionspeak bei etwa 478 nm erkennbar, dem ein vorgelagerter Sattelpunkt bei ca. 458 nm vorausgeht. Im UV-Bereich zeigt sich eine zunehmende Absorption mit abnehmender Wellenlänge, sowie ein ausgeprägtes lokales Maximum bei ungefähr 233 nm.

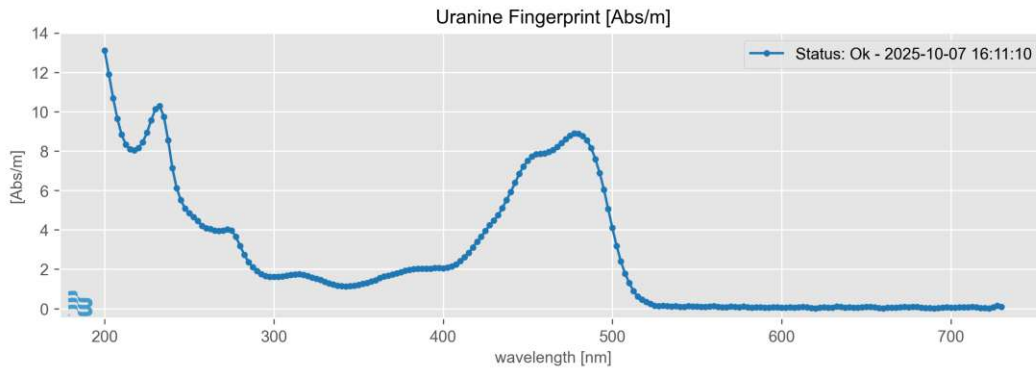


Abbildung 8.2: Absorptionsspektrum von Uranin gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)

In Abbildung 8.3 ist das Absorptionsspektrum einer wässrigen Pyranin-Lösung mit einer Konzentration von 14 mg/l dargestellt. Es zeigt sich ein lokales Absorptionsmaximum bei etwa 403 nm, das mit einem relativ breiten lokalen Maximum bei ca. 370 nm verbunden ist. Im UV-Bereich sind zwei lokale Maxima bei ca. 245 und 290 nm sowie ein globales Maximum am Rand des gemessenen Spektralbereichs bei 200 nm erkennbar.

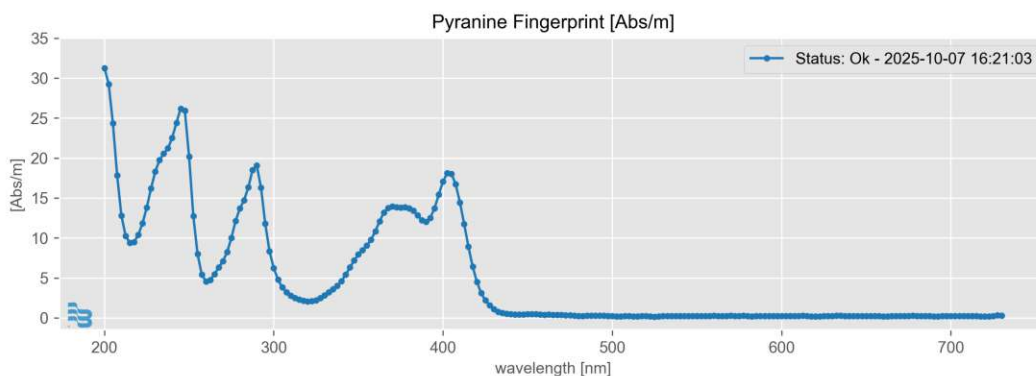


Abbildung 8.3: Absorptionsspektrum von Pyranin gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)

8.2 Sensor 1 - Referenz: Taschenlampe

Das Spektrum von destilliertem Wasser in einer 10 mm Quarzglas-Küvette ist in Abbildung 8.4 dargestellt, wobei eine Taschenlampe sowohl als Lichtquelle als auch als Referenz verwendet wird. Das Spektrum weist im Wellenlängenbereich unterhalb von 425 nm ein vergleichsweise starkes Rauschen auf, während sich auch im Bereich oberhalb von 575 nm das Rauschen deutlich zeigt. Im eingeschlossenen Bereich zwischen 425 und 575 nm ist das Signal relativ gering verrauscht und nimmt einen Wert von ca. 0 Abs/m an.

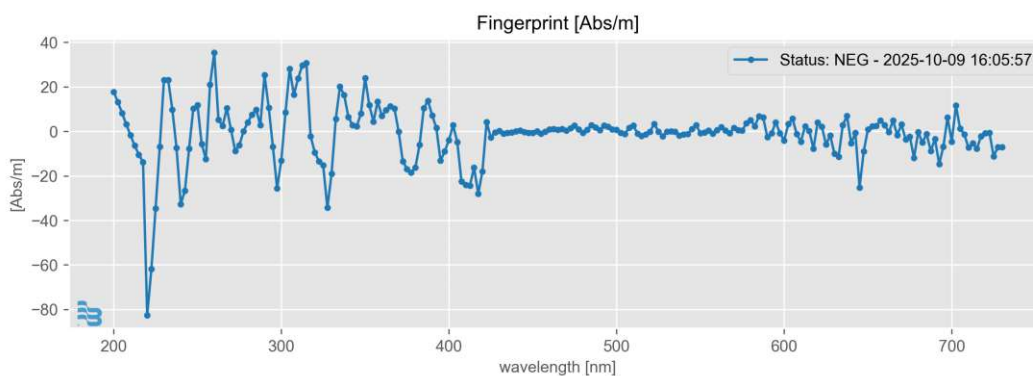


Abbildung 8.4: Spektrum von destilliertem Wasser gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Taschenlampe)

Die Abbildungen 8.5, 8.6 und 8.7 zeigen die Spektren der drei verwendeten Fluorophore unter Anwendung einer Taschenlampe als Lichtquelle und Referenz, wobei es sich dementsprechend um eine 90°-Messung handelt (siehe Abbildung 2.1). In blauer und oranger Farbe ist jeweils das Rauschen von zwei Dunkelmessungen dargestellt, während in grüner und roter Farbe zwei aufeinanderfolgende Messungen der jeweiligen Fluorophore in wässriger Lösung dargestellt sind. In den Spektren sind die Fluoreszenzemissionen der einzelnen Analyten in Form einer negativen Absorption erkennbar, wobei diese für Rhodamin WT im Bereich von etwa 580 nm, für Uranin bei ca. 513 nm und für Pyranin bei ungefähr 505 nm erkennbar sind (siehe Abbildungen 8.5, 8.6 und 8.7). Diese Spektralbereiche zeichnen sich durch ein relativ geringes Rauschen aus und unterscheiden sich deutlich von den jeweiligen Dunkelmessungen und dem Spektrum von destilliertem Wasser (siehe Abbildung 8.4). Des Weiteren zeigen jeweils beide Messungen in diesen Bereichen übereinstimmende Messergebnisse, im Gegensatz zu den übrigen dargestellten Spektralbereichen.

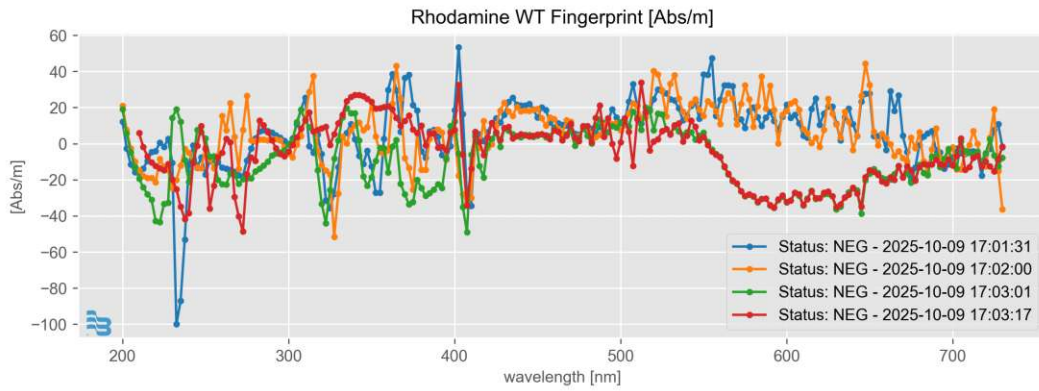


Abbildung 8.5: Spektrum von Rhodamin WT (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)

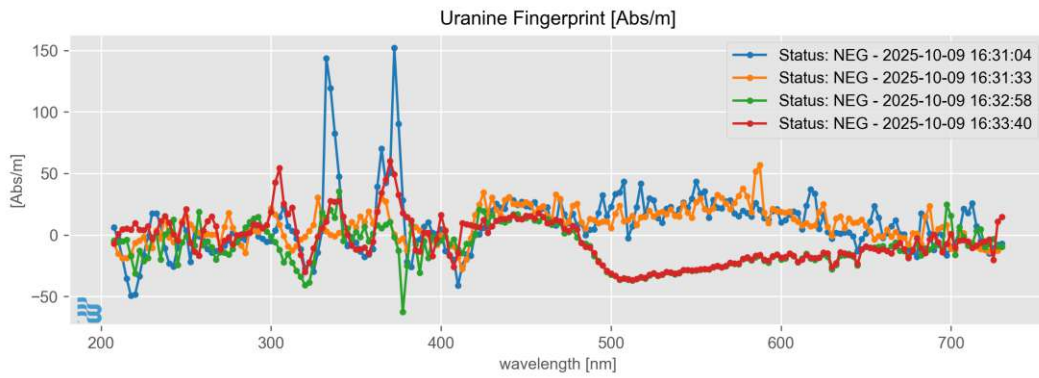


Abbildung 8.6: Spektrum von Uranin (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)

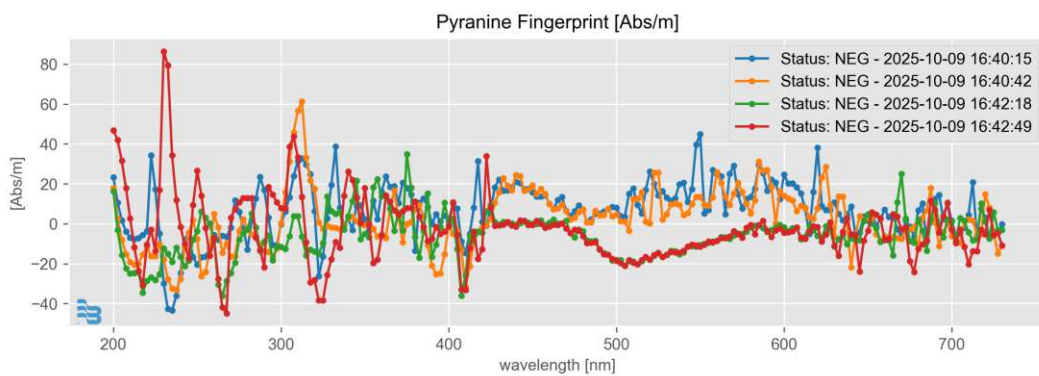


Abbildung 8.7: Spektrum von Pyranin (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)

8.3 Sensor 2 - 180°-Messgeometrie

Das Spektrum von destilliertem Wasser in einer 10 mm Quarzglas-Küvette ist in Abbildung 8.8 dargestellt. Als Lichtquelle dient die 405 nm LED des Sensors. Dieses Spektrum wird als Referenz für die Berechnung der Absorption (Gleichung 2.1) herangezogen. Das Spektrum weist einen relativ langen Ausläufer bis etwa 650 nm in Richtung größerer Wellenlängen auf.

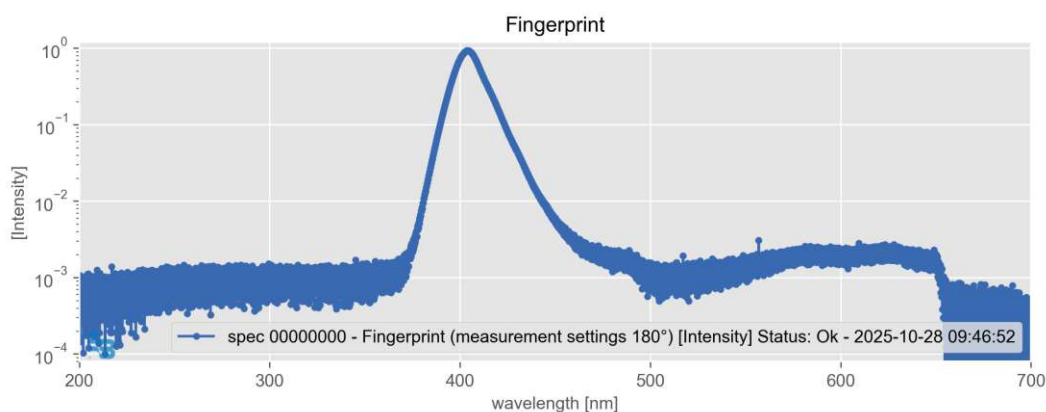


Abbildung 8.8: Referenzspektrum für die Berechnung der Absorption (Sensor 2)

Die Abbildungen 8.9, 8.10 und 8.11 zeigen die Spektren von Pyranin in Abhängigkeit der Konzentration. Die Absorption des Analyten im Bereich um 405 nm ist dabei deutlich anhand der abnehmenden Intensität mit steigender Pyraninkonzentration zu erkennen. Im Bereich von etwa 517 nm ist die Fluoreszenz von Pyranin in Form eines Intensitätsanstiegs deutlich zu sehen.

In Abbildung 8.12 sind die Ergebnisse mehrerer linearer Regressionsanalysen dargestellt, wobei für jede gemessene Wellenlänge jeweils die Konzentration mit der Intensität korreliert wird. Das entsprechende Bestimmtheitsmaß ist in Abhängigkeit der Wellenlänge in Abbildung 8.12 dargestellt. Grundsätzlich zeichnen sich Bereiche mit geringeren Intensitäten – also einem kleineren Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) – durch ein relativ großes Rauschen der R^2 -Werte aus.

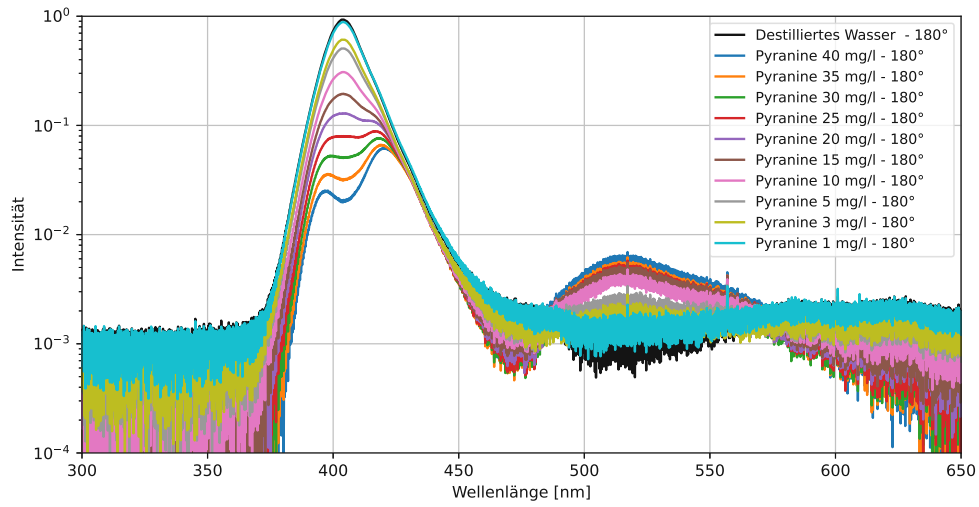


Abbildung 8.9: Pyranin-Spektren in Abhängigkeit der Konzentration (Sensor 2)

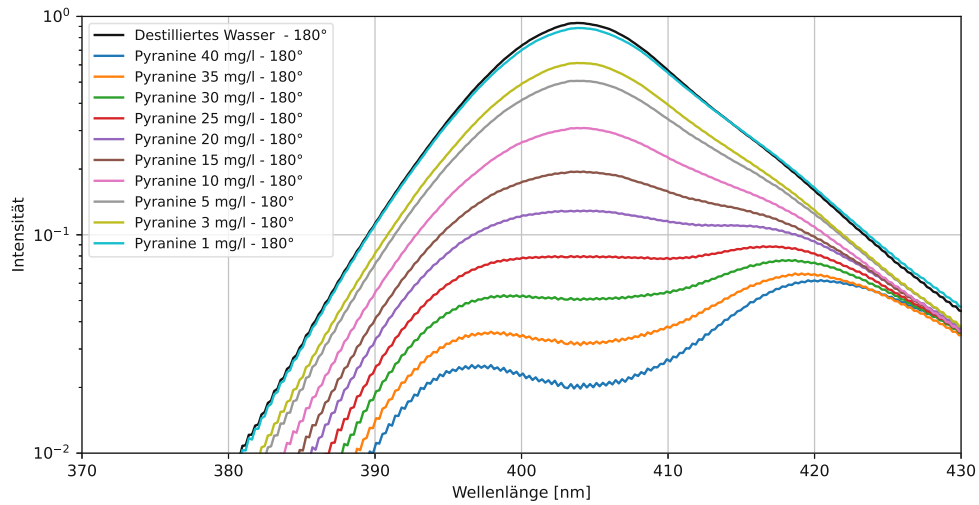


Abbildung 8.10: Ausschnitt aus Abbildung 8.9

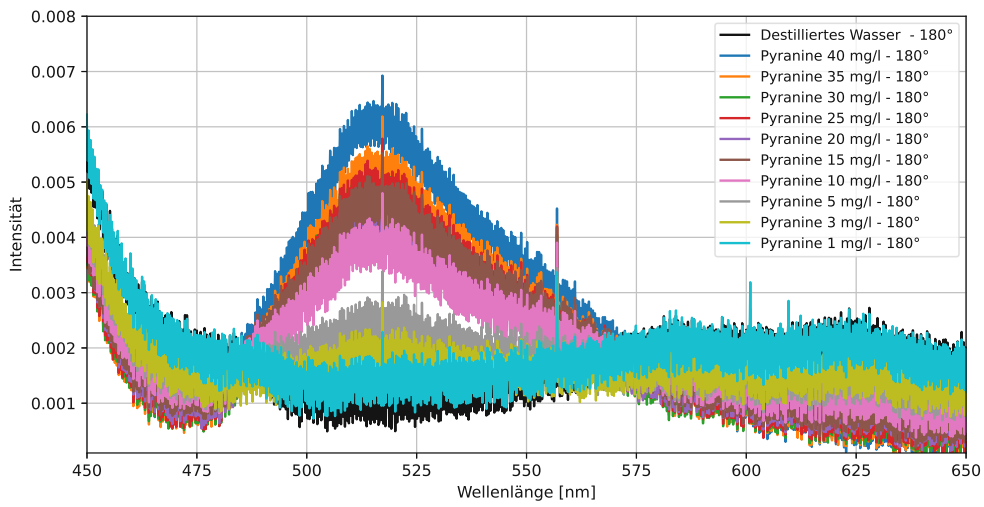


Abbildung 8.11: Ausschnitt aus Abbildung 8.9

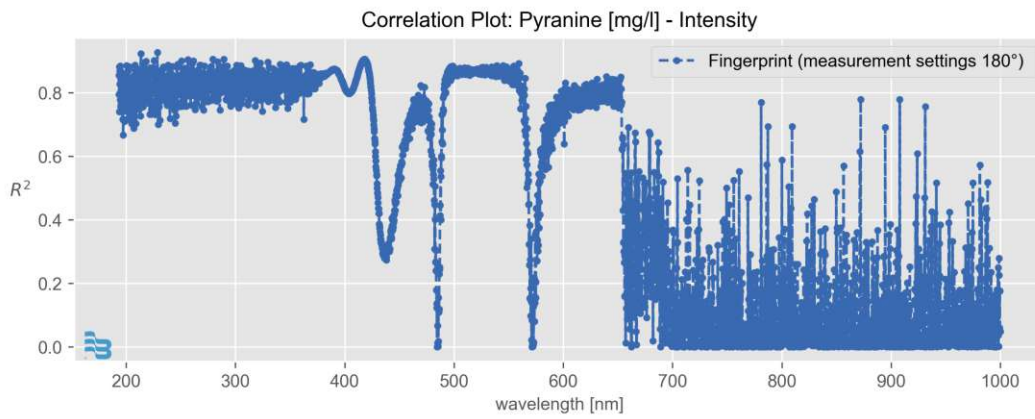


Abbildung 8.12: Regressionsanalysen in Abhängigkeit der Wellenlänge

Für die weitere Analyse wird das Spektrum in folgende Bereiche unterteilt:

1. Bereich: $\lambda < 375$ nm und um 470 nm
2. Bereich: Absorptionsbereich um 405 nm
3. Bereich: $600 < \lambda < 650$ nm
4. Bereich: Fluoreszenzbereich um 517 nm
5. Bereich: $\lambda > 650$ nm

In weiterer Folge werden für jeden dieser Bereiche repräsentative Ergebnisse dargestellt und erläutert.

8.3.1 1. Bereich

Für Wellenlängen kleiner 375 nm ergeben sich relativ hohe Bestimmtheitsmaße, allerdings mit einer ausgeprägten Variabilität. Auch im Bereich um etwa 470 nm werden vergleichsweise hohe R^2 -Werte erreicht. Beide Teilbereiche sind durch ein relativ starkes Rauschen im Bestimmtheitsmaß gekennzeichnet (siehe Abbildung 8.12).

Das detektierte Signal im Bereich kleiner 375 nm setzt sich größtenteils aus Rauschen und einer sehr geringen Intensität der LED zusammen. Dies führt zu sehr kleinen und teilweise negativen Intensitäten, wie in Abbildung 8.13 beispielhaft dargestellt wird. Mit steigender Konzentration nimmt die detektierte Intensität ab und erreicht teilweise negative Werte. Bei dem rot eingefärbten Bereich in Abbildung 8.13 handelt es sich um das 95%-Konfidenzintervall und die gestrichelten Linien stellen das 95%-Prognoseintervall dar.

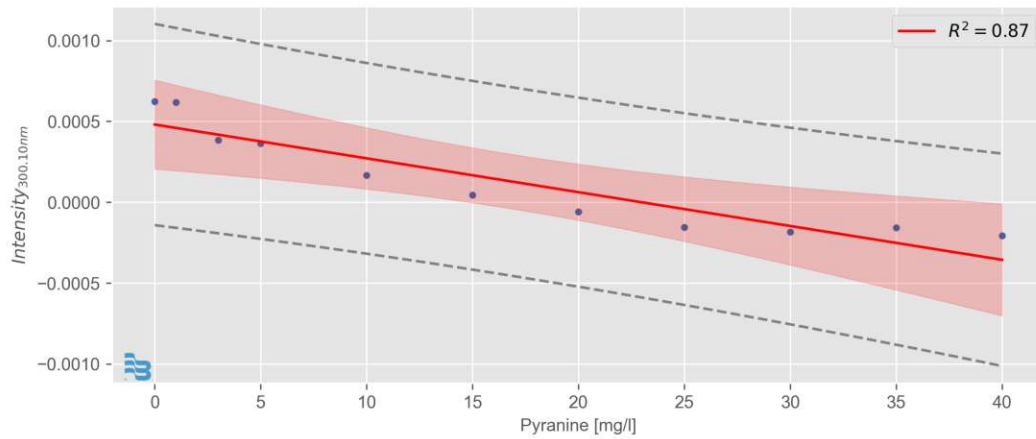


Abbildung 8.13: Lineare Regression bei 300,1 nm

Wie in Abbildung 8.14 dargestellt, nimmt die Intensität im Bereich um 470 nm mit steigender Konzentration bis etwa 30 mg/l ab. Für Konzentrationen oberhalb dieses Werts stagniert die Intensität. Die in Abbildung 8.14 dargestellten Summen der Intensitäten werden basierend auf Gleichung 2.3 berechnet.

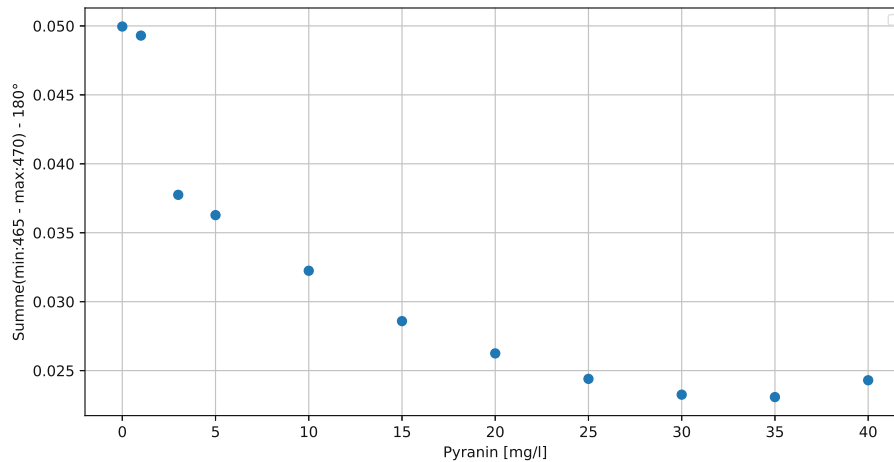


Abbildung 8.14: Zusammenhang zwischen den summierten Intensitäten im Bereich 465 bis 470 nm und der Konzentration

8.3.2 2. Bereich

Für den zweiten Bereich ergeben sich ebenfalls relativ große R^2 -Werte, allerdings mit einer deutlich geringeren Änderungsrate pro Wellenlänge als im ersten Bereich. Das Bestimmtheitsmaß ist im Maximum des LED-Spektrums geringer als in den unmittelbar angrenzenden Spektralbereichen (siehe Abbildung 8.12). Wie in Abbildung 8.10 dargestellt, nimmt die gemessene Intensität mit zunehmender Konzentration ab, wobei sie im LED-Maximum teilweise stärker abnimmt als in den angrenzenden Bereichen. Dieses Verhalten ist beispielhaft für eine Pyraninkonzentration von 40 mg/l in Abbildung 8.10 erkennbar.

In Abbildung 8.15 ist die Absorption basierend auf Gleichung 2.5 in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt sowie das Ergebnis einer linearen Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von 1. Wie in der Abbildung dargestellt, steigt die Absorption (linear) mit der Analytkonzentration an.

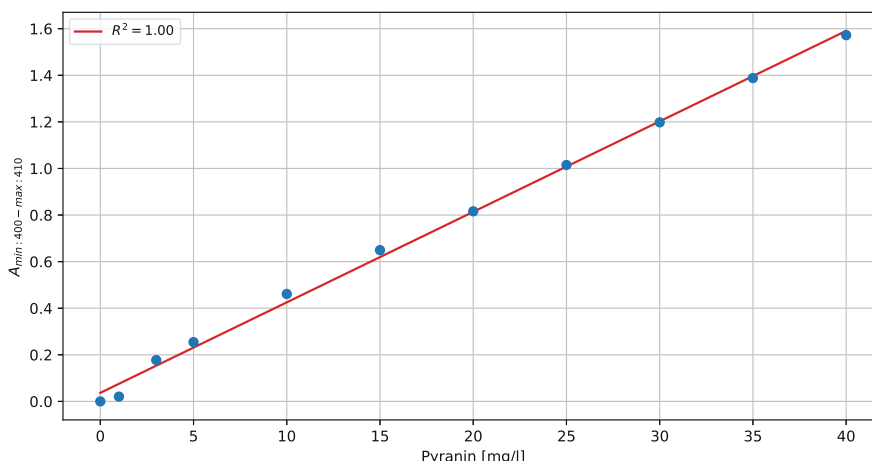


Abbildung 8.15: Absorption im 2. Bereich

8.3.3 3. Bereich

Lineare Regressionen in diesem Bereich ergeben relativ hohe Bestimmtheitsmaße, sind allerdings auch durch relativ starkes Rauschen in den R^2 -Werten gekennzeichnet. Abbildung 8.16 zeigt die Summe der Intensitäten gemäß Gleichung 2.3 in einem definierten Spektralbereich in Abhängigkeit der Konzentration. Wie in dieser Abbildung und 8.11 dargestellt, nimmt die Intensität mit steigender Konzentration ab.

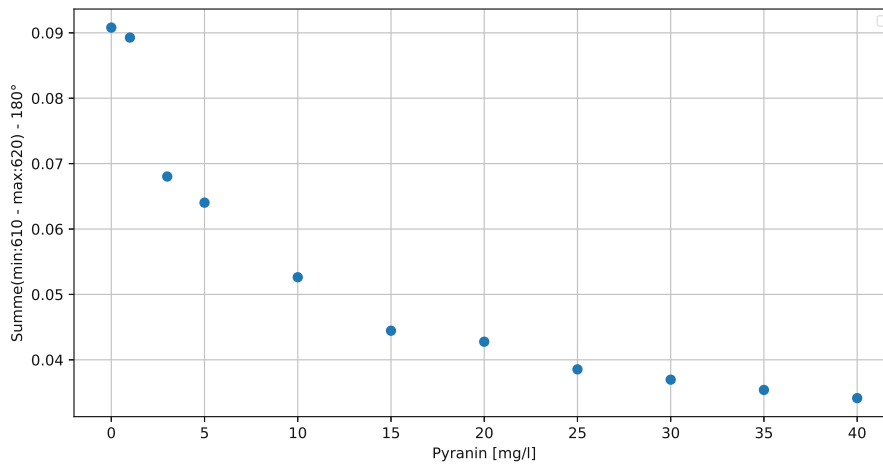


Abbildung 8.16: Zusammenhang zwischen den summierten Intensitäten im Bereich 610 bis 620 nm und der Konzentration

8.3.4 4. Bereich

Im vierten Bereich sind über einen relativ breiten Wellenlängenbereich hinweg hohe R^2 -Werte erkennbar. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei ca. 517 nm. Abbildung 8.17 zeigt die summierte Intensität basierend auf Gleichung 2.3 für einen definierten Spektralbereich in Abhängigkeit der Konzentration. Zusätzlich werden mehrere lineare Regressionen mit den jeweils zugehörigen Bestimmtheitsmaßen dargestellt. Jede Regression inkludiert einen zusätzlichen Datenpunkt, beginnend bei einem Minimum von drei Datenpunkten. Die Anzahl der verwendeten Punkte ist durch den entsprechenden Index in der Legende in Abbildung 8.17 gekennzeichnet. Mit steigender Anzahl verwendeter Datenpunkte zur Berechnung der linearen Regression nimmt das Bestimmtheitsmaß zu und erreicht bei fünf inkludierten Punkten ein Maximum von 1. Nach Erreichen des Maximums nimmt das R^2 mit zunehmender Anzahl an Datenpunkten wieder ab, mit Ausnahme des letzten Schritts von 10 auf 11 Datenpunkte.

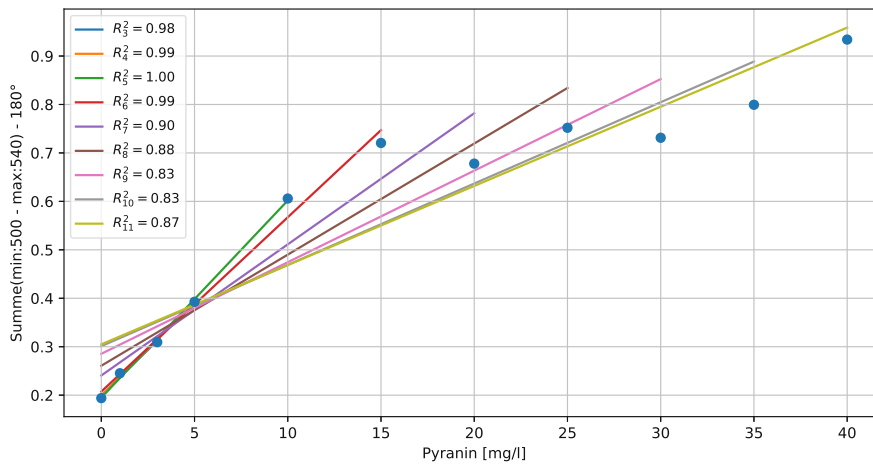


Abbildung 8.17: Lineare Regressionen im Fluoreszenzbereich

8.3.5 5. Bereich

In diesem Bereich setzt sich das detektierte Signal ausschließlich aus Rauschen zusammen. Die resultierenden R^2 -Werte zeigen hier eine große Dynamik und Variabilität. Die teilweise hohen Bestimmtheitsmaße deuten darauf hin, dass das Rauschen bei einzelnen Wellenlängen ein lineares Verhalten oder zumindest Ansätze davon zeigt.

8.4 Sensor 2 - 90°-Messgeometrie

Abbildung 8.18 zeigt die Fluoreszenzspektren in einer 90°-Messanordnung für verschiedene Pyraninkonzentrationen. Die Daten zeichnen sich durch ein relativ kleines SRV aus. Das Emissionsmaximum liegt bei etwa 517 nm.

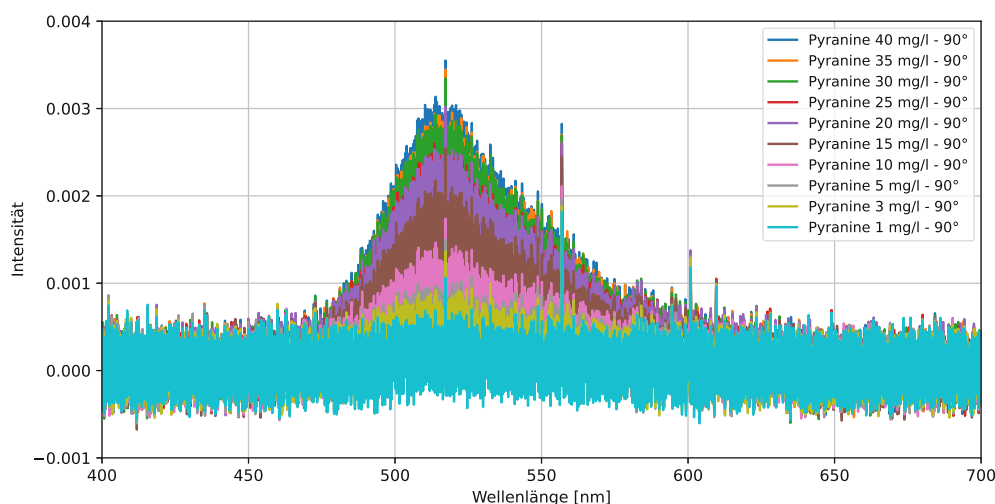


Abbildung 8.18: Fluoreszenzspektren (Sensor 2)

In Abbildung 8.19 sind die Ergebnisse mehrerer linearer Regressionsanalysen dargestellt, bei denen jeweils für jede Wellenlänge die gemessene Intensität mit der Konzentration korreliert wird. Das zugehörige Bestimmtheitsmaß ist in Abbildung 8.19 in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt. Im Spektralbereich zwischen etwa 480 und 600 nm weisen die Regressionen relativ hohe R^2 -Werte auf. Für Wellenlängen kleiner als 450 und größer als 630 nm zeigen die Bestimmtheitsmaße hingegen eine ausgeprägte Dynamik und Variabilität. In diesen Bereichen setzt sich das detektierte Signal ausschließlich aus Rauschen zusammen, wobei die teilweise hohen R^2 -Werte darauf hindeuten, dass das Rauschen bei einzelnen Wellenlängen ein lineares Verhalten oder zumindest Ansätze davon zeigt.

Die summierten Intensitäten (basierend auf Gleichung 2.3) für einen definierten Spektralbereich sind in Abbildung 8.20 in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt. Zusätzlich werden mehrere lineare Regressionen und ihre entsprechenden Bestimmtheitsmaße gezeigt. Jede Regression umfasst dabei einen zusätzlichen Datenpunkt, beginnend bei einem Minimum von drei. Die Anzahl der jeweils verwendeten Datenpunkte ist durch den entsprechenden Index in der Legende gekennzeichnet.

Das Bestimmtheitsmaß steigt mit zunehmender Anzahl verwendeter Datenpunkte an und erreicht bei sechs inkludierten Punkten ein Maximum von 0,99. Werden mehr als sechs Datenpunkte für die lineare Regression berücksichtigt, nimmt das R^2 wieder ab und erreicht bei der Verwendung aller zehn Messungen ein Minimum von 0,93.

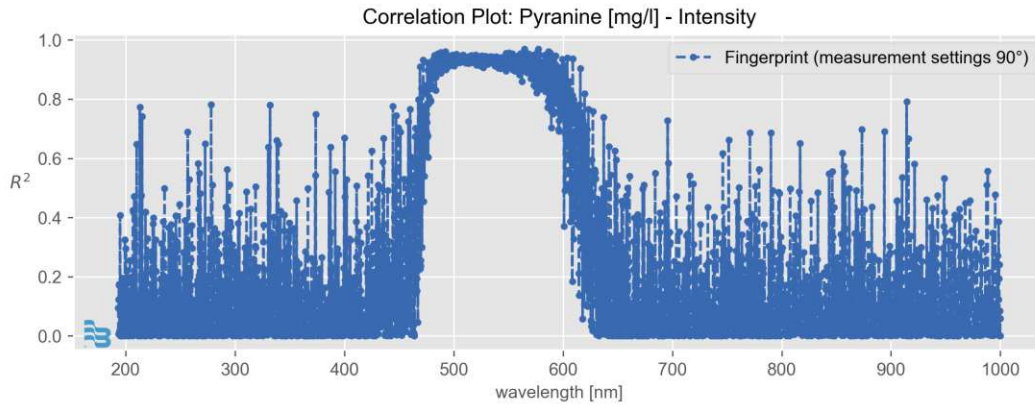


Abbildung 8.19: Regressionsanalysen in Abhängigkeit der Wellenlänge

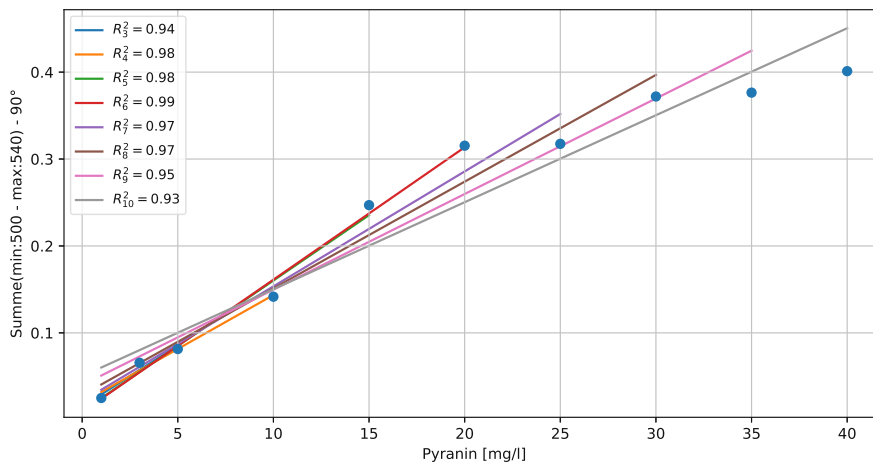


Abbildung 8.20: Lineare Regressionen im Fluoreszenzbereich

Kapitel 9

Diskussion - Sensorentwicklung

9.1 Sensor 1

Es gibt mehrere potentielle Störquellen, die zu Messfehlern oder Unsicherheiten führen können. Dazu zählen die Bildung kleiner Luftblasen innerhalb der Küvette während der Messung. Zudem kann es zu einem Beschlagen der Küvettenscheiben kommen, weshalb die Küvette vor jeder Messung mehrfach gesäubert wird. Temperatureinflüsse stellen eine weitere potentielle Fehlerquelle dar, aus diesem Grund werden die Proben unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Kühlschrank analysiert, um starke Temperaturänderungen zu vermeiden und die Reproduzierbarkeit zu verbessern. Des Weiteren entstehen Unsicherheiten durch die Probenvorbereitung, insbesondere durch das Wiegen und Pipettieren.

Mit dem Sensor 1 lässt sich keine Fluoreszenz messen, zumindest nicht die Fluoreszenz der verwendeten Fluorophore. In keinem der aufgenommenen Absorptionsspektren, dargestellt in den Abbildungen 8.1, 8.2 und 8.3, ist eine Fluoreszenzemission erkennbar. Auch bei Analyten mit einem vergleichsweise großen Stokes-Shift, wie z.B. Pyranin, ist keine Fluoreszenz detektierbar. Erst durch den Wechsel der Referenz auf eine Taschenlampe und die damit verbundene Änderung der Messgeometrie von einem 180°- auf einen 90°-Aufbau erlaubt die Detektion der Fluoreszenz. Diese ist in den Abbildungen 8.5, 8.6 und 8.7 in Form einer negativen Absorption sichtbar, das bedeutet, dass im Vergleich zur Referenz eine höhere Strahlungintensität am Detektor registriert wird. Die gemessenen Signale unterscheiden sich in diesen Bereichen deutlich vom Rauschen der Dunkelmessungen sowie dem Spektrum von destilliertem Wasser (siehe Abbildung 8.4). In den Fluoreszenzbereichen zeigen die Messergebnisse eine gute Überlagerung, beide Messungen liefern also identische Messwerte, während in den übrigen Spektralbereichen keine Überlagerung auftritt und das Rauschen dominiert. Die Lage der Fluoreszenzmaxima

stimmt dabei näherungsweise mit den in Smart et al. 1977 beschriebenen Werten überein (vgl. Tabelle 2.1). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei den beobachteten Signalen um die Detektion der Fluoreszenz handelt.

Das SRV ist jedoch eher klein und das Fluoreszenzsignal liegt in derselben Größenordnung wie das Rauschen in den übrigen Spektralbereichen. Das Rauschen bei Sensor 1 kann durch Mehrfachmessungen und anschließende Mittelung reduziert werden. Durch die Mittelung verringert sich die Dynamik des Rauschens. Die Fluoreszenzbereiche hingegen sind relativ gering verrauscht und die Messergebnisse bei Mehrfachmessungen sind sehr ähnlich, wodurch die Mittelwertbildung das Fluoreszenzsignal nicht stark negativ beeinflussen sollte. Beim Spektrum von Rhodamin WT zeigt sich im Bereich um 600 nm ein erhöhtes Rauschen (siehe Abbildung 8.5), das u.a. auf das Rauschen der spektralen Referenz zurückzuführen ist, denn in Abbildung 8.4 ist in diesem Bereich auch ein gewisses Rauschen zu erkennen. Da die Extinktion basierend auf Gleichung 2.1 berechnet wird und die Referenz somit direkten Einfluss auf das Ergebnis hat, kann sich das Rauschen in der spektralen Referenz auf die resultierenden Messwerte fortpflanzen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Sensor 1 in der derzeitigen Konfiguration keine Fluoreszenz gemessen werden kann. Das liegt vermutlich daran, dass im Sensor eine breitbandige Xenon-Blitzlampe verbaut ist. Die Fluoreszenz ist, wie in Kapitel 3 beschrieben, in Relation zur Anregungsquelle (z.T. deutlich) kleiner. Aus diesem Grund wird das relativ schwache Fluoreszenzsignal vermutlich von dem breitbandigen Lampenspektrum überlagert und lässt sich nicht von der deutlich größeren Lampenintensität differenzieren. Erst durch einen Wechsel der Lichtquelle und die Anpassung der Messgeometrie wird die Fluoreszenz detektierbar (zumindest bei den verwendeten Fluorophoren). Sensor 2 ist hingegen grundsätzlich für die Fluoreszenzmessung geeignet, allerdings wird im Rahmen dieser Arbeit ein externer Detektor verwendet. Dieser Sensor nutzt jedoch keine breitbandige Lichtquelle, sondern eine LED. Dadurch erfolgt die Anregung des Fluorophors deutlich spezifischer und der Einfluss der Lichtquelle auf das detektierte Spektrum nimmt deutlich ab. Dies wird im folgenden Kapitel 9.2 detailliert beschrieben.

9.2 Sensor 2

Bei den Versuchen mit Sensor 2 werden Temperatureinflüsse berücksichtigt, indem die wässrigen Lösungen der Verdünnungsreihe sowie alle Proben Raumtemperatur haben. Dadurch soll sichergestellt werden, dass die Proben unter gleichen Bedingungen gemessen werden und bspw. nicht innerhalb der Zeit des Umbaus der Messstrecke von 90° auf 180° und vice versa signifikante Temperaturänderungen

entstehen. Auf diese Weise soll der Einfluss der Temperatur möglichst gering gehalten und die Reproduzierbarkeit der Messungen verbessert werden.

Messunsicherheiten können sich u.a. durch die Probenvorbereitung ergeben, bspw. Unsicherheiten durch das Wiegen oder Pipettieren. Des Weiteren kann es während der Messung zur Bildung kleiner Luftblasen innerhalb der Küvette kommen. Außerdem ist der Versuchsaufbau nicht stationär, da durch den Umbau der Messstrecke minimale Änderungen in der Geometrie entstehen, die zu Messfehlern führen können. Darüber hinaus kann die photochemische Stabilität eine Rolle spielen, da nach jedem Umbau der Messstrecke das Spektrometer erneut im Brennpunkt der Linse fokussiert werden muss. Hierfür erfolgt jeweils eine Probemessung, wodurch es durch photochemischen Zerfall zu geringen Messfehlern kommen kann. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt tatsächlich relevant ist, sind weitere Versuche erforderlich.

Im ersten Bereich der 180°-Daten setzt sich das detektierte Signal für Wellenlängen kleiner 375 nm nahezu ausschließlich aus Rauschen zusammen. Dies erklärt die teilweise negativen Intensitäten in diesem Bereich (vgl. Abbildung 8.13). Die relativ hohen R^2 -Werte in diesem Bereich deuten darauf hin, dass das Rauschen statistisch betrachtet einen linearen Trend zeigt. Da in diesem Spektralbereich jedoch kein signifikantes LED-Signal mehr detektierbar ist, um bspw. die Absorption zu analysieren, ist dieser Bereich für weitere Auswertungen nicht relevant. Im Bereich um 470 nm ist in Abbildung 8.8 ein sehr schwaches Referenzsignal erkennbar. Aus dem Absorptionsspektrum von Pyranin (vgl. Abbildung 8.3) geht hervor, dass der Analyt in diesem Bereich – wenn auch nur geringfügig – absorbiert. Mit zunehmender Pyraninkonzentration wird das Signal daher vermutlich zunehmend abgeschwächt, bis eine vollständige Dämpfung erreicht ist. Bei höheren Konzentrationen dominiert folglich das Rauschen, was die Stagnation der Summen in Abbildung 8.14 erklärt.

Im zweiten Bereich der 180°-Daten bilden sich, wie in Abbildung 8.10 dargestellt, mit steigender Pyraninkonzentration zwei neue Intensitätspeaks unmittelbar um den LED-Peak aus. Das liegt an dem in Abbildung 8.3 dargestellten Absorptionsverhalten des Analyten. Durch das Absorptionsmaximum bei ungefähr 403 nm wird der LED-Peak mit zunehmender Konzentration stärker abgeschwächt, als die benachbarten Spektralbereiche. Dadurch kommt es bei größeren Konzentrationen zur Bildung von zwei neuen Intensitätspeaks unmittelbar neben dem LED-Peak. Dies ist im Spektrum der 40 mg/l Pyraninkonzentration in Abbildung 8.10 deutlich zu erkennen. Des Weiteren ergeben sich in diesem Bereich relativ hohe R^2 -Werte von größer 0,8, sodass statistisch betrachtet das lineare Modell die abhängige Va-

riable bzw. deren Varianz gut beschreibt. Physikalisch und chemisch ist dieses Ergebnis jedoch nicht plausibel, da nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 2.2) die Konzentration und die Intensität nicht in einem linearen Zusammenhang stehen. Die entsprechende Absorption – dargestellt in Abbildung 8.15 – zeigt hingegen über den gesamten betrachteten Konzentrationsbereich einen stark linearen Verlauf ($R^2 = 1$). Dies deutet darauf hin, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz für den gesamten Konzentrationsbereich gilt. Es sei hier allerdings noch einmal explizit darauf hingewiesen, dass dieses Gesetz nur für eine spezifische Wellenlänge gilt.

Im dritten Bereich der 180° -Daten wird mit zunehmender Konzentration ein abnehmender Trend beobachtet, wie in Abbildung 8.16 dargestellt. Die Ursache für dieses Verhalten muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Im Absorptionsspektrum (Abbildung 8.3) ist in diesem Bereich keine Absorption nachweisbar, weshalb zusätzliche Experimente notwendig sind, um dieses Phänomen genauer zu analysieren und mögliche Ursachen zu identifizieren.

Im vierten Bereich der 180° -Daten sowie im Fluoreszenzbereich der 90° -Daten führt die Verwendung einer geringeren Anzahl an Datenpunkten für die lineare Regression zu höheren R^2 -Werten und somit zu einer besseren Beschreibung der Daten durch das lineare Modell. Mit zunehmender Einbeziehung von Datenpunkten höherer Konzentrationen beschreiben die Regressionen das Verhalten bei niedrigen Konzentrationen jedoch zunehmend schlechter. Es empfiehlt sich daher nicht, ein lineares Modell für den gesamten Konzentrationsbereich zu verwenden, sondern ein Modell für einen kleineren Bereich oder mehrere Modelle für unterschiedliche Konzentrationsbereiche zu entwickeln. Ein möglicher Grund für das Abflachen des linearen Trends bei größeren Konzentrationen könnte der innere Filtereffekt sein. Da die Pigmentkonzentrationen von Cyanobakterien üblicherweise im $\mu\text{g/l}$ -Bereich liegen, sollten weitere Schritte in der Sensorentwicklung auch Versuche mit niedrigeren Konzentrationen einbeziehen.

Bei den beiden Punkten in Abbildung 8.12 mit einem Bestimmtheitsmaß von null (bei etwa 490 und 575 nm) handelt es sich um Umschlagpunkte zwischen Bereichen mit entgegengesetzten Phänomenen. Diese Punkte markieren jeweils den Übergang vom ersten in den vierten Bereich sowie vom dritten in den vierten Bereich.

Bei der Verwendung des 180° -Messpfads weist das detektierte Spektrum im Vergleich zum 90° -Messpfad einen höheren Informationsgehalt auf, da Absorption und Fluoreszenz gleichzeitig beobachtet werden können. Im 90° -Messpfad hingegen tritt das Fluoreszenzsignal weitgehend isoliert auf, sodass der Einfluss der Lichtquelle auf das detektierte Spektrum deutlich geringer ist.

Kapitel 10

Fazit und Ausblick

Mit dem Sensor 2 lässt sich ein Fluoreszenzsignal zuverlässig anregen und (mit einem externen Spektrometer) detektieren. Der Sensor 1 erlaubt dies in der derzeitigen Konfiguration nicht. Die folgenden Aspekte geben einen Ausblick auf weitere notwendige Schritte in der Sensorentwicklung. Die Ergebnisse und Probleme, die sich aus jedem Schritt ergeben, sind dabei jeweils kritisch zu bewerten.

- Bautechnische Aspekte
 - Systematische Auswahl geeigneter Anregungs- und Detektionswellenlängen unter Berücksichtigung der optischen Eigenschaften von Cyanobakterien
 - Auswahl und Optimierung eingesetzter Komponenten, wie z.B. die Lichtquelle, die optischen Filter und weitere relevante Bauteile
 - Analyse der Eignung des sensoreigenen Detektors (Photodiode) für die vorgesehene Anwendung
 - Entwicklung von Prototypen
- Anwendungsspezifische Aspekte
 - Versuche mit niedrigeren anwendungsbezogenen Analytkonzentrationen
 - Versuche mit Cyanobakterien im Labor und unter praxisnahen Bedingungen
 - Validierung der Messergebnisse
 - Bestimmung messtechnischer Größen (Genauigkeit, Präzision, etc.)
 - Entwicklung und Validierung von Kalibrierungskurven und Kompensationsmethoden
 - Analyse der messbaren Konzentrationsbereiche

Grundsätzlich besitzt die fluoreszenzbasierte in situ Messung von Cyanobakterien ein großes Potential als Echtzeit-Datenlieferant und als Frühwarnsystem innerhalb des Risikomanagements der Ressource Wasser. Allerdings existieren, wie in dieser Arbeit dargestellt, zahlreiche Störquellen, die die Messung bzw. Genauigkeit und Präzision negativ beeinträchtigen. Dies führt dazu, dass Fluoreszenzsonden teilweise nur Schätzungen der Cyanobakterienkonzentration, anstelle akkurater Messergebnisse, liefern.

Ein Ranking der Störquellen lässt sich jedoch aus der Literatur nicht ableiten, da Störquellen zwar genannt, aber quantitativ nicht eingeordnet werden und häufig nur einzelne Störquellen untersucht werden, ohne sie in Relation zu anderen zu setzen. Ferner unterscheiden sich die experimentellen Aufbauten in Studien. Zudem kann keine quantitative Aussage getroffen werden, denn es bestehen Unterschiede innerhalb und zwischen Spezies und das genaue Ausmaß einzelner Störquellen hängt immer von den genauen Gegebenheiten vor Ort ab und kann räumlich und zeitlich stark variieren.

Zukünftige Ziele sollten also die weitere Optimierung der Robustheit und Selektivität dieser Messmethode sein sowie die Entwicklung von holistischeren Kompensationsansätzen, um so das Potential weiter auszuschöpfen und das Vertrauen in die in situ Fluoreszenzmessung zu erhöhen.

Abkürzungsverzeichnis

AB Algenblüte

SAB schädliche Algenblüte

G&G-Stoffe Geschmacks- und Geruchsstoffe

Chl Chlorophyll

PBP Phycobiliprotein

PBS Phycobilisom

RFU relative Fluoreszenz

NPQ nicht-photochemisches Quenching

PB prozessbasierte

DD datengetriebene

APC Allophycocyanin

PE Phycoerythrin

PC Phycoocyanin

PEC Phycoerythrocyanin

ML Machine Learning

SRV Signal-Rausch-Verhältnis

Abbildungsverzeichnis

2.1	Versuchsaufbauten mit Sensor 1	7
2.2	Versuchsaufbau mit Sensor 2	10
3.1	Schematische Darstellung eines PBS und seiner Energieabsorption und -übertragung (gelbe Pfeile) [Sonani et al. 2018]	12
3.2	Schematische Darstellung der in situ Fluoreszenzmessung [Zamyadi et al. 2016]	13
3.3	Schematische Darstellung des Aufbaus eines YSI 6131 [YSI 2012]	14
3.4	Absorptionsspektren verschiedener Pigmente und Proteine [Ledang et al. 2019]	14
7.1	Zeitreihe der Publikationen klassifiziert nach Messmethode (Histogramme) und Modellierungsansatz (durchgehende Linien) [Rouso et al. 2020]	28
8.1	Absorptionsspektrum von Rhodamin WT gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)	32
8.2	Absorptionsspektrum von Uranin gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)	33
8.3	Absorptionsspektrum von Pyranin gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Interne Lampe)	33
8.4	Spektrum von destilliertem Wasser gemessen mit Sensor 1 (Referenz: Taschenlampe)	34
8.5	Spektrum von Rhodamin WT (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)	35
8.6	Spektrum von Uranin (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)	35
8.7	Spektrum von Pyranin (Sensor 1, Referenz: Taschenlampe)	35
8.8	Referenzspektrum für die Berechnung der Absorption (Sensor 2)	36
8.9	Pyranin-Spektren in Abhängigkeit der Konzentration (Sensor 2)	37
8.10	Ausschnitt aus Abbildung 8.9	37
8.11	Ausschnitt aus Abbildung 8.9	38
8.12	Regressionsanalysen in Abhängigkeit der Wellenlänge	38

8.13	Lineare Regression bei 300,1 nm	40
8.14	Zusammenhang zwischen den summierten Intensitäten im Bereich 465 bis 470 nm und der Konzentration	40
8.15	Absorption im 2. Bereich	41
8.16	Zusammenhang zwischen den summierten Intensitäten im Bereich 610 bis 620 nm und der Konzentration	42
8.17	Lineare Regressionen im Fluoreszenzbereich	43
8.18	Fluoreszenzspektren (Sensor 2)	44
8.19	Regressionsanalysen in Abhängigkeit der Wellenlänge	45
8.20	Lineare Regressionen im Fluoreszenzbereich	45

Tabellenverzeichnis

2.1	Eigenschaften der verwendeten Fluorophore [Smart et al. 1977] . . .	5
2.2	Konzentrationen der wässrigen Pyranin-Verdünnungsreihe	8
3.1	Absorptions- und Fluoreszenzpeaks [nm] der PBPs	15
3.2	Anregungs- und Detektionsbandbreiten bestimmter kommerzieller Sensoren [Rouso et al. 2021]	15

Literaturverzeichnis

- Husein Almuhtaram et al. (2021). „State of knowledge on early warning tools for cyanobacteria detection“. In: *Ecological Indicators* 133.
- Hasina Begum et al. (2016). „Availability and Utilization of Pigments from Microalgae“. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56.13.
- Jeddiah Bellamy-Carter, Jaspreet K. Sound und Aneika C. Leney (2022). „Probing heavy metal binding to phycobiliproteins“. In: *The FEBS Journal* 289.15.
- Edoardo Bertone, Michele A. Burford und David P. Hamilton (2018). „Fluorescence probes for real-time remote cyanobacteria monitoring: A review of challenges and opportunities“. In: *Water research* 141.
- Luc Brient et al. (2008). „A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies“. In: *Journal of Environmental Monitoring* 10.2.
- Douglas Campbell et al. (1998). „Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation“. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62.3.
- De-Wei Chang et al. (2012). „Measurement of cyanobacteria using in-vivo fluoroscopy—Effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies“. In: *Water research* 46.16.
- Huaxin Chen et al. (2023). „Recent Progress of Natural and Recombinant Phycobiliproteins as Fluorescent Probes“. In: *Marine Drugs* 21.11.
- F. Choo et al. (2019). „Enhanced real-time cyanobacterial fluorescence monitoring through chlorophyll-a interference compensation corrections“. In: *Water research* 148.
- Ingrid Chorus und Martin Welker, Hrsg. (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water*. 2. Aufl. On behalf of the World Health Organization, Geneva, CH. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Emily Clements et al. (2024). „Classification machine learning to detect de facto reuse and cyanobacteria at a drinking water intake“. In: *Science of the Total Environment* 948.
- Bruno Cremella, Yannick Huot und Sylvia Bonilla (2018). „Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorome-

ters, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter“. In: *Limnology and Oceanography: Methods* 16.12.

Claudia Fournier et al. (2024). „LSTM networks provide efficient cyanobacterial blooms forecasting even with incomplete spatio-temporal data“. In: *Water Research* 267.

Teresa M. García-Oneto, Claudia Moyano-Bellido und M. Agustina Domínguez-Martín (2024). „Structure and function of the light-protective orange carotenoid protein families“. In: *Current Research in Structural Biology* 7.

Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda (2022). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva: World Health Organization.

Daniel C. Harris (2014). *Lehrbuch der Quantitativen Analyse: Mit einem Vorwort von Werner, Gerhard*. Vieweg+Teubner Verlag.

Caroline M. Hodges et al. (2018). „Sensor manufacturer, temperature, and cyanobacteria morphology affect phycocyanin fluorescence measurements“. In: *Environmental Science and Pollution Research* 25.

Liang Ji et al. (2023). „Phycobiliproteins from algae: Current updates in sustainable production and applications in food and health“. In: *Food Research International* 167.

Stefanie A. Kring et al. (2014). „Rapid in situ measures of phytoplankton communities using the bbe FluoroProbe: evaluation of spectral calibration, instrument intercompatibility, and performance range“. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 71.7.

Joseph R. Lakowicz (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. edition. Springer. ISBN: 978-0-387-31278-1.

Anna Birgitta Ledang, Therese Harvey und Sabine Marty (2019). *Performance and applications of satellite remote sensing data for water quality in Norwegian lakes. Evaluation of MERIS, Sentinel-2 and Sentinel-3 products*. Technical Report 7443-2019. Norwegian Institute for Water Research und Norwegian Environment Agency.

Lynn Margulis und Michael J. Chapman (2009). *Kingdoms and Domains: An illustrated guide to the phyla of life on Earth*. 4th edition. Academic Press/Elsevier. ISBN: 978-0-12-373621-5.

Fernando Muzzopappa und Diana Kirilovsky (2020). „Changing Color for Photoprotection: The Orange Carotenoid Protein“. In: *Trends in Plant Science* 25.1.

Jungsu Park, Keval Patel und Woo Hyoung Lee (2024). „Recent advances in algal bloom detection and prediction technology using machine learning“. In: *Science of The Total Environment* 938.

Ulf Ritgen (2019). *Analytische Chemie I*. 1st ed. 2019. Springer Berlin Heidelberg.

- Ulf Ritgen (2020). *Analytische Chemie II*. 1st ed. 2020. Springer Berlin Heidelberg.
- Benny Zuse Rousso et al. (2019). „Optical sensors and machine learning for optimised cyanobacteria bloom management“. In: *E-proceedings of the 38th IAHR World Congress*.
- Benny Zuse Rousso et al. (2020). „A systematic literature review of forecasting and predictive models for cyanobacteria blooms in freshwater lakes“. In: *Water Research* 182.
- Benny Zuse Rousso et al. (2021). „Light-induced fluorescence quenching leads to errors in sensor measurements of phytoplankton chlorophyll and phycocyanin“. In: *Water Research* 198.
- Benny Zuse Rousso et al. (2022a). „Automation of species-specific cyanobacteria phycocyanin fluorescence compensation using machine learning classification“. In: *Ecological Informatics* 69.
- Benny Zuse Rousso et al. (2022b). „Chlorophyll and phycocyanin in-situ fluorescence in mixed cyanobacterial species assemblages: Effects of morphology, cell size and growth phase“. In: *Water Research* 212.
- B.S. Sackmann, M.J. Perry und C.C. Eriksen (2008). „Seaglider observations of variability in daytime fluorescence quenching of chlorophyll-a in Northeastern Pacific coastal waters“. In: *Biogeosciences Discussions* 5.
- Peter L. Smart und I.M.S. Laidlaw (1977). „An Evaluation of Some Fluorescent Dyes for Water Tracing“. In: *Water resources research* 13.1.
- Ravi R. Sonani et al. (2018). „Site, trigger, quenching mechanism and recovery of non-photochemical quenching in cyanobacteria: recent updates“. In: *Photosynthesis Research* 137.
- Ryszard Staniszewski et al. (2024). „Recent Issues and Challenges in the Study of Inland Waters“. In: *Water* 16.9.
- Mingyuan Xie et al. (2021). „Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Study of Energy Transfer Dynamics in Phycobilisomes from Cyanobacteria *Thermosynechococcus vulcanus* NIES 2134 and *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Crystals* 11.10.
- Mingyuan Xie et al. (2022). „Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Study of Energy Transfer Dynamics in Phycobilisomes of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* NIES 2134“. In: *Spectroscopy* 37.4.
- YSI (2012). *6-Series Multiparameter Water Quality Sondes User Manual*. Revision J. User manual. URL: <https://www.ysi.com/file%20library/documents/manuals/069300-ysi-6-series-manual-revj.pdf> (besucht am 6. Okt. 2025).
- Arash Zamyadi et al. (2012). „Cyanobacterial detection using in vivo fluorescence probes: Managing interferences for improved decision-making“. In: *Journal-American Water Works Association* 104.8.

Arash Zamyadi et al. (2016). „A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction“. In: *Trends in Analytical Chemistry* 85.