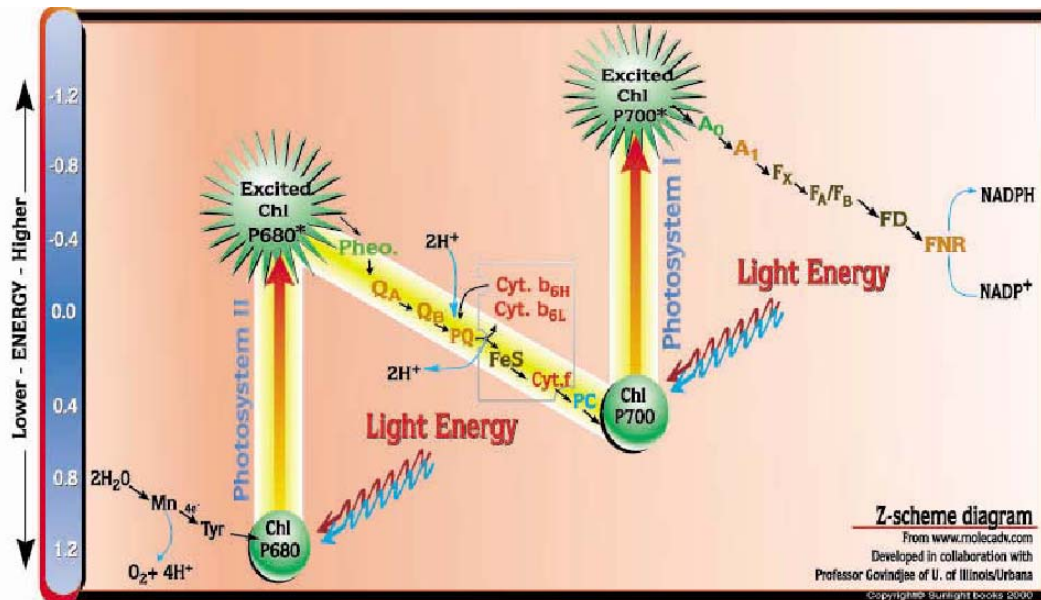


ANNEX D

Delayed Fluorescence – basics

Delayed fluorescence is the long-lived light emission from previously illuminated biological material. Delayed fluorescence of chlorophyll is correlated with chlorophyll content, photosynthetic activity, and taxonomic group.



The following text is modified from <http://pcphy4.physik.uni-regensburg.de/dfinfo.html>

The effect

All green plants show a dark red afterglow when they are put from illumination into dark. This effect was discovered in 1951 by *Strehler and Arnold* [1]. This light emission is extraordinary weak and could not be discovered before the availability of the photomultiplier tube as sensitive light detector. The typical experimental setup for the study of delayed Fluorescence (DF) of algae is shown in figure 1. Pre-illuminated algae are pumped from the excitation cell to the measurement cell. The flow is stopped abruptly and the registration of the light emitted by the algae starts. A slow decay of the light intensity within 2 minutes can be observed (Fig.2).

Origin of the delayed fluorescence

During illumination the plants convert sunlight to chemically stored energy by the process of photosynthesis. The first step of this complex chain of reactions is the absorption of light by the chlorophyll within the Photosystem II, a huge enzyme that catalyzes the first steps of the light reactions of photosynthesis. Several hundred chlorophyll molecules are arranged within a protein matrix surrounding the core of the photosystem. Light energy absorbed by any of this antenna chlorophyll molecules is transferred to the reaction center of the photosystem. This reaction center consists of a pair of chlorophyll_a molecules, the so called special pair. When this special pair is excited by the absorbed energy, it undergoes a fast charge transfer reaction. One electron is separated from the special pair and transferred to the primary acceptor Quinone A. The electrons flow via the photosynthetic reaction chain to the dark reactions of photosynthesis, the Calvin cycle where they help to reduce the carbon dioxide from the air to glucosis.

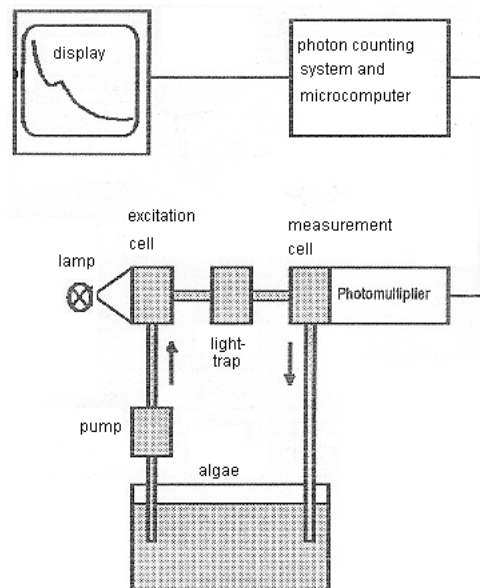


Fig.1 Experimental setup used to measure DF from algae

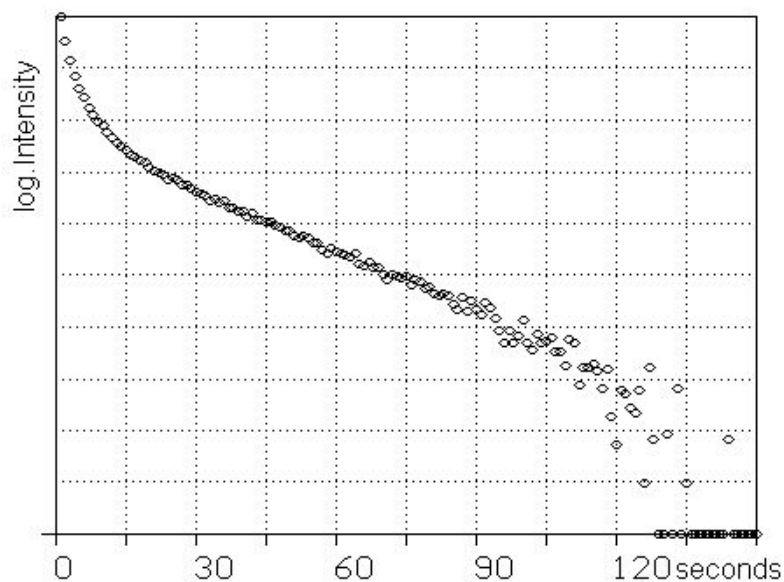


Fig. 2 Decay curve of DF from green algae

All chemical reactions can run in both directions, however one direction is normally preferred. Photosynthesis prefers the formation of glucosis which serves as nutrient for the plant. However if the light is switched off suddenly, some electrons can flow back to the reaction center and form an excited state of the chlorophyll again. The light emission from this excited molecules is the delayed fluorescence.

References

[1] Strehler B. and Arnold W.A. , 1951, Light production by green plants. Fed Am Soc Exp Biol Fed Proc 10: 255

The text which follows in German originates from: <http://limnotronic.com> and is slightly modified

Verzögerte Fluoreszenz

1. Anwendungen

Das DF-Kinetikphotometer dient der Bestimmung des photosynthetisch aktiven Chlorophyllgehalts von Wasserproben. Hauptanwendungsgebiet ist die Dauerüberwachung des Phytoplanktongehalts von Gewässern. Es lassen sich jedoch auch einzelne Wasserproben im Labor untersuchen zum Beispiel zur Durchführung des Zellvermehrungshemmtests mit Algen nach DIN38412. Da die verzögerte Fluoreszenz an das Vorhandensein eines intakten Photosyntheseapparates in den Zellen gebunden ist, werden fluoreszierende Fremdstoffe und abgestorbenes Phytoplankton nicht registriert.

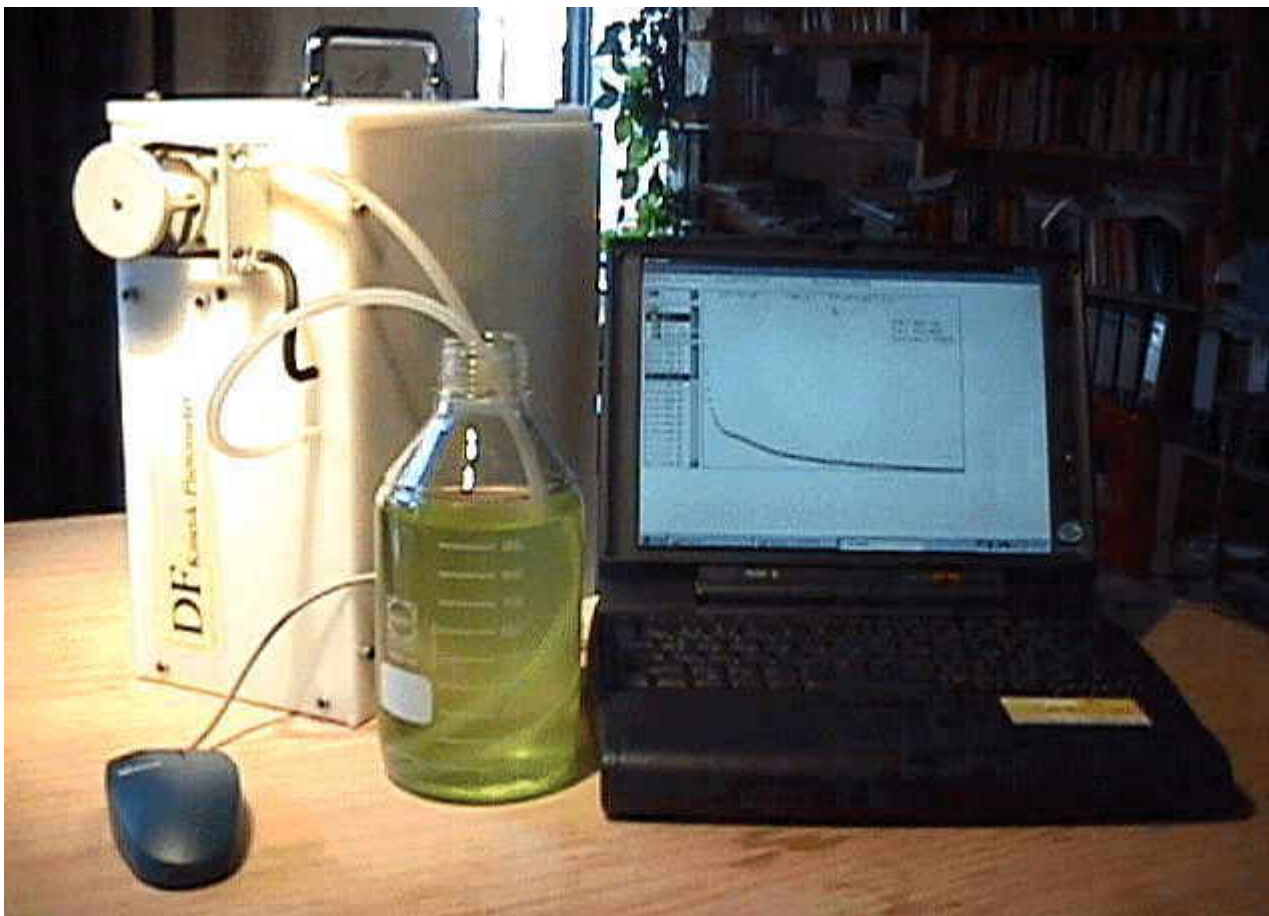


Abb.1 Das DF-Kinetik Photometer saugt die Probe selbst über eine Schlauchpumpe an. Es ist somit für den Online-Betrieb am Gewässer geeignet. Das Photometer wird über eine serielle Schnittstelle mit dem Rechner verbunden.

2. Meßprinzip und Funktionsweise

Bringt man belichtete Algenzellen vom Hellen ins Dunkle, so kann ein im Verlauf von einigen Minuten abklingendes dunkelrotes Nachleuchten gemessen werden, die sogenannte verzögerte Fluoreszenz. Dieses schwache Nachleuchten ist eine intrinsische Eigenschaft aller photosynthetisch aktiven Pflanzenzellen. Die Probe wird von einer Schlauchpumpe in eine Anregungsküvette gefördert. Dort findet eine Belichtung mit weißem Licht der Intensität 100 W/m^2 statt. Nach 30 Sekunden Adaption wird die Probe in die Abklingküvette weitertransportiert. Dort wird das Abklingen der verzögerten Fluoreszenz durch Zählen einzelner Photonen mit einem

Photomultiplier registriert. Dadurch besitzt die Meßapparatur eine hohe Empfindlichkeit und einen großen dynamischen Bereich, d.h. es werden sowohl bei hohen als auch bei relativ niedrigen Algenkonzentrationen noch gut auswertbare Signale erhalten. Ein angeschlossener Computer berechnet den Chlorophyllgehalt der Probe als Produkt des Integrals über die Abklingkurve mit dem Kalibrierfaktor. Der Kalibrierfaktor wird durch eine Referenzmethode (Bestimmung des Chlorophyllgehalts durch Extraktion) ermittelt. Der lineare Meßbereich erstreckt sich von etwa $0.5\mu\text{g/l}$ bis $1000\mu\text{g/l}$ (Abb.2).

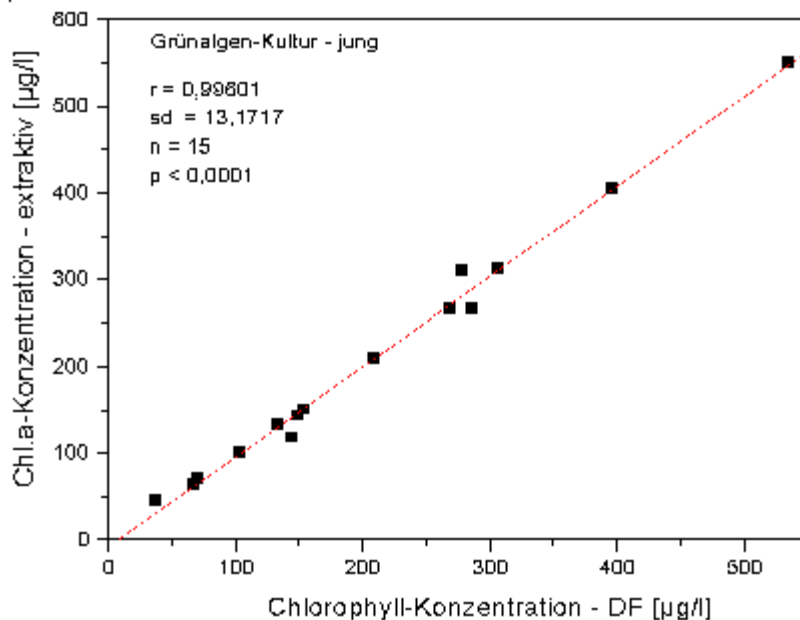


Abb. 2: Korrelation zwischen der Chlorophyll-Konzentrationsbestimmung mit dem DF-Kinetik-Photometer und der DIN -Extraktionsmethode. (aus: Gerhardt, V. und Bodemer, U.: Indirekte Biomassebestimmung des Phytoplanktons durch in-vivo-Fluoreszenz, in: Tümping, W.v. und Friedrich, G. (Hrsg.): Methoden der biologischen Wasseruntersuchung, Band 2: Biologische Gewässeruntersuchung, G. Fischer Verlag, Frankfurt, April 1998)

3. DF Anregungsspektrometrie (DFS)

Mißt man die Intensität der verzögerten Fluoreszenz (DF) als Funktion der Wellenlänge des Anregungslichtes, so erhält man das Anregungsspektrum der verzögerten Fluoreszenz. Das DF-Anregungsspektrometer (Abb.1) belichtet die Gewässerprobe mit Licht variabler Wellenlänge aus einem Monochromator. Die Algen in der Probe antworten mit einem Fluoreszenzsignal dessen Höhe den Wirkungsgrad, mit dem die Algenzellen die jeweilige Wellenlänge zur Photosynthese nutzen können, widerspiegelt. Nicht nur die Chlorophylle, sondern auch die akzessorischen Pigmente wie etwa das Phycocyanin der Blaualgen speisen Lichtenergie in die Photosynthesereaktionen ein. Das Anregungsspektrum ist somit die Summe der Anregungsspektren der einzelnen Pigmente. Um die einzelnen Pigmente quantitativ erfassen zu können, ist daher eine Entfaltung des Spektrums, zum Beispiel durch einen Gaußkurvenfit, nötig. Die Abbildungen 2 zeigt typische Anregungsspektren von Grün-Kiesel-und Blaualgen.

Im Gewässer kommen diese verschiedenen Farbklassen von Algen in der Regel als Gemisch vor. Durch Entfaltung des Summenspektrums nach den einzelnen Farbklassen kann unser DF-Anregungsspektrometer den Prozentsatz der einzelnen Klassen bestimmen (Abb.3). Auf diese Weise wird eine automatische Populationsanalyse des Phytoplanktons ermöglicht. Damit kann die Abfolge von Algenpopulationen im Jahresverlauf untersucht werden (Abb.4).

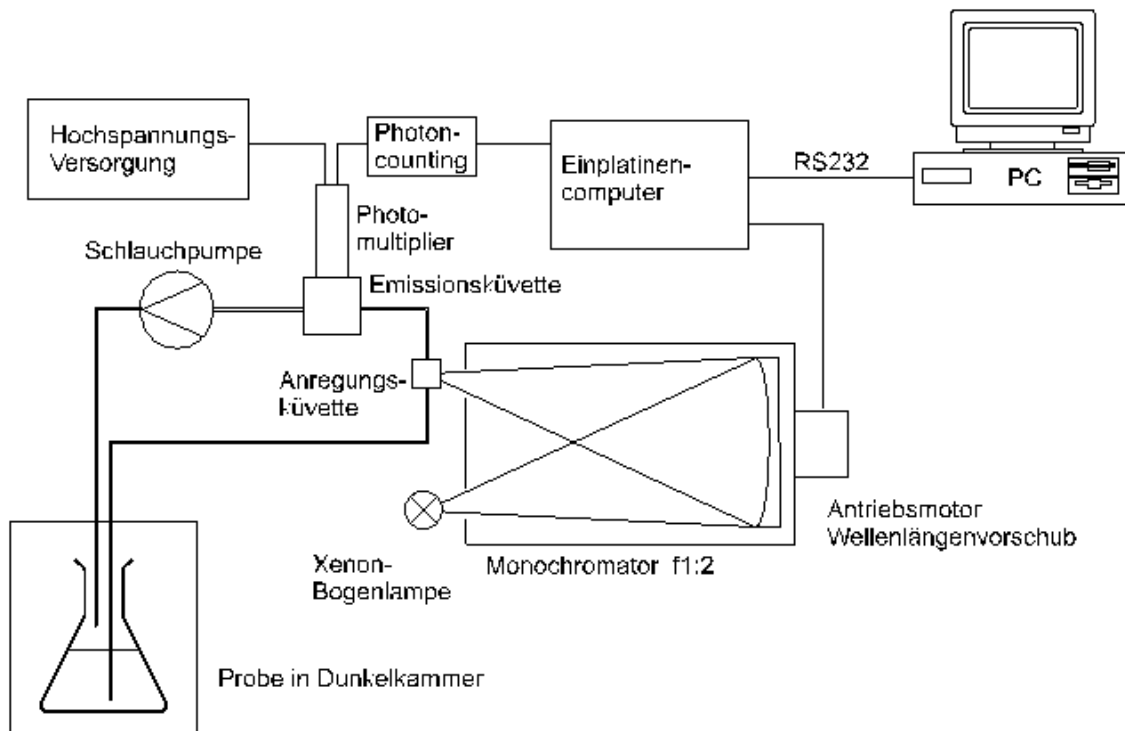


Abb.1 Schema des DF-Anregungsspektrometers. Die Probe muß vor der Messung dunkeladaptiert werden. Sie wird dann von einer Schlauchpumpe zuerst durch die Anregungsküvette und danach durch die Emissionsküvette gepumpt. In der Anregungsküvette wird die Probe durch Licht verschiedener Wellenlängen angeregt. Die von dieser Anregung verursachte verzögerte Fluoreszenz wird anschließend in der Emissionsküvette gemessen. Die DF-Intensität aufgetragen über der Anregungswellenlänge ergibt das Anregungsspektrum der DF.

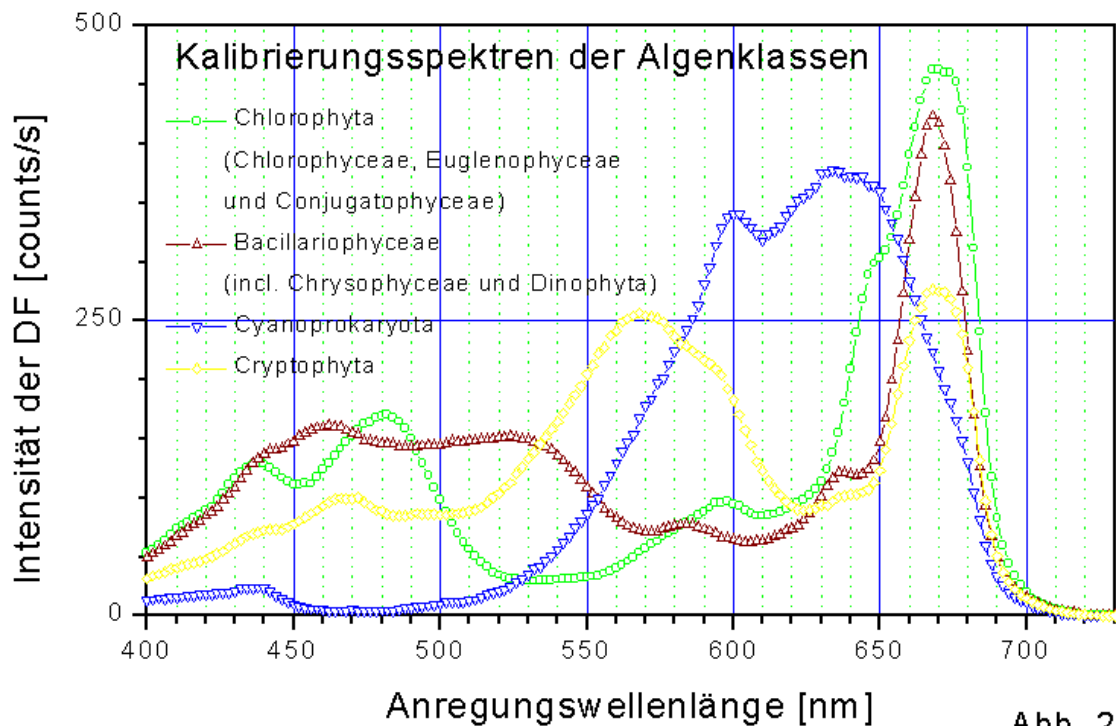


Abb. 2

Abb. 2 Spektren verschiedener "Algenfarbklassen". Diese unterscheiden sich durch ihre Pigmentzusammensetzung. So besitzen Grünalgen (Chlorophyta) Chlorophyll a (435 nm-Peak) und Chlorophyll b (480 nm-Peak). Blaualgen (Cyanoprokaryota) dagegen besitzen nur Chlorophyll a, dafür aber zusätzliche akzessorische Pigmente (Phycocyanin und Phycoerythrin), die das Spektrum zwischen 600 und 650 nm dominieren.

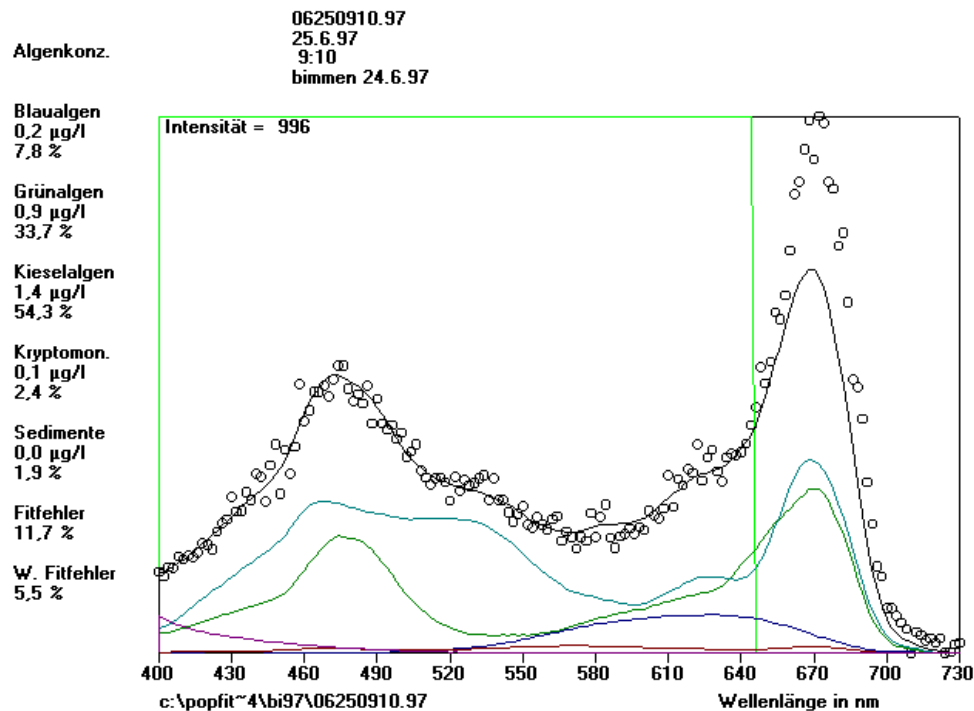


Abb. 3 Beispiel für die Bestimmung der Populationszusammensetzung im Rhein am 25.06.1997 (2,6 µg/l Gesamt-Chl.-Konzentration) - Meßstation Kleve-Bimmen. Messungen durch das Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, (Prof. Dr. Friedrich, Frau Pohlmann). Da alle Algen-Farbklassen Chlorophyll a enthalten und sich daher im Bereich von 670 nm nicht unterscheiden, wird bei der Entfaltung nur das Anregungsspektrum zwischen 400 und 647 nm berücksichtigt. (siehe senkrechte Linie unteres Bild bei 647 nm).

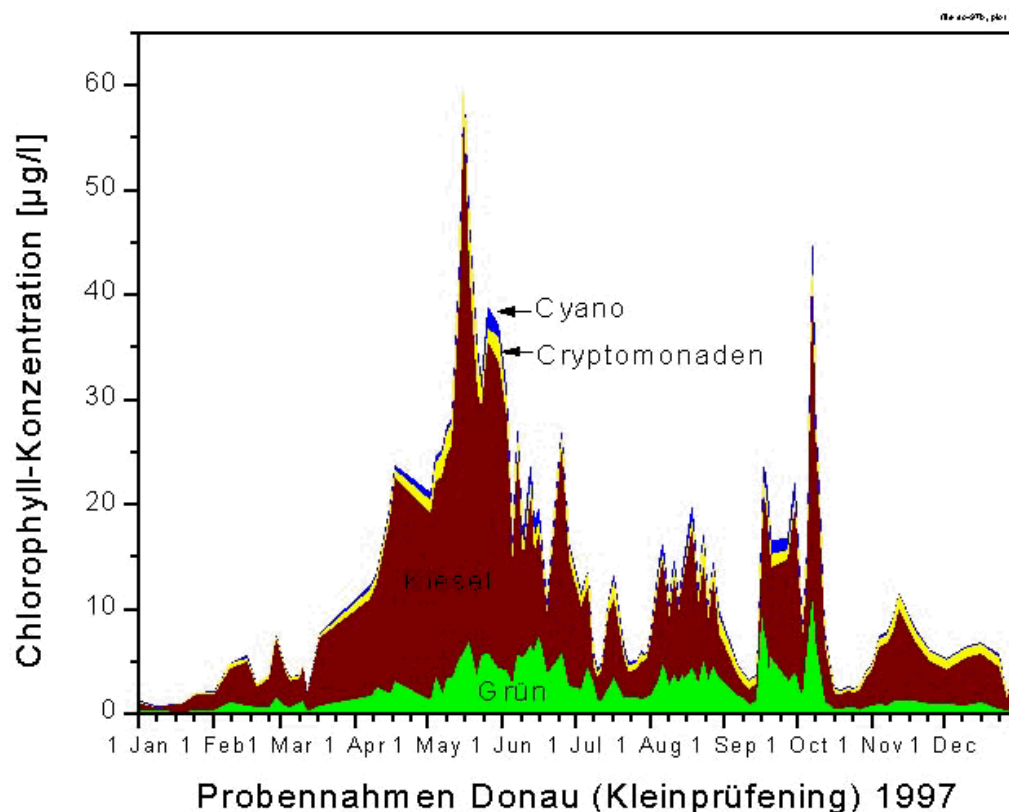


Abb.4 Beispiel für eine mittels der DF-Anregungsspektroskopie gemessene Populationsabfolge an der Donau 1997 bei Regensburg: Algenblüte im Frühjahr, hoher Kieselalgenanteil.