

EINFÜHRUNG

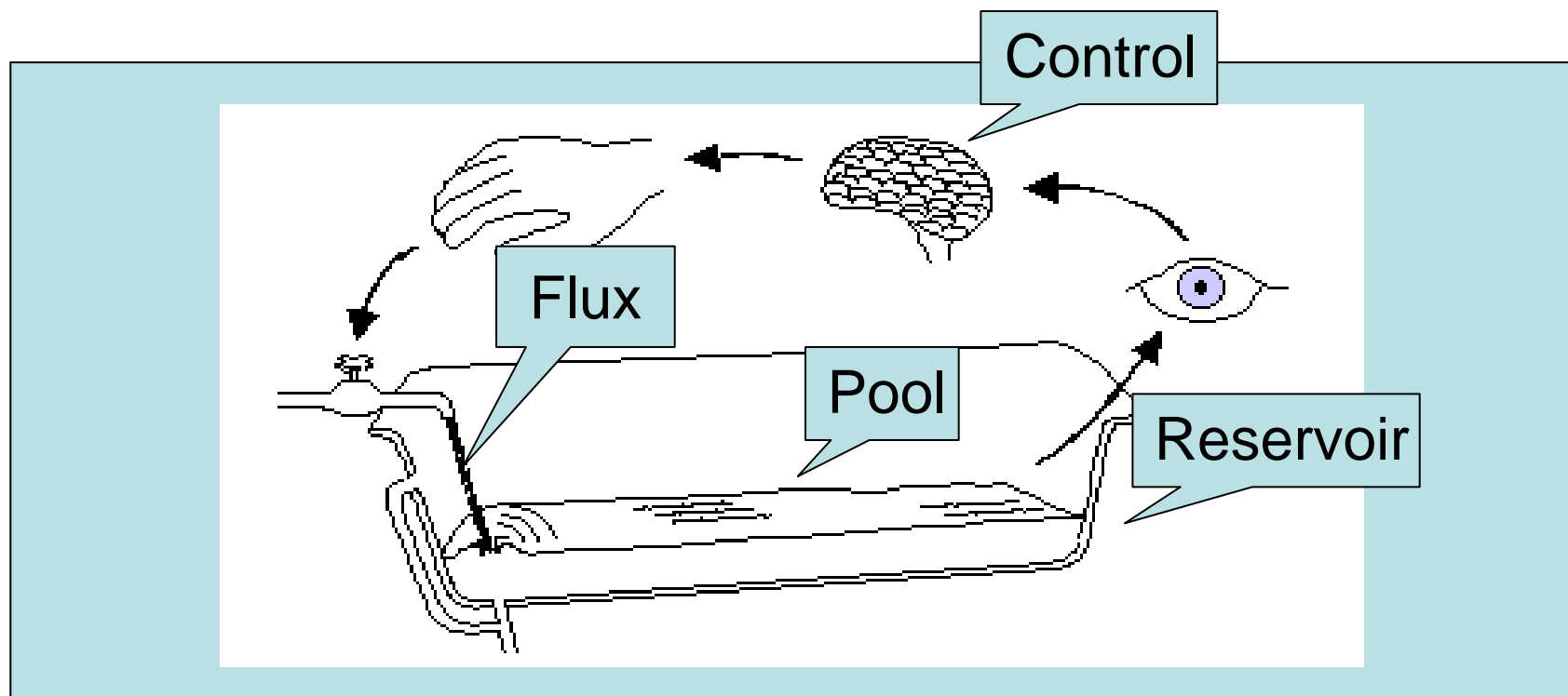
Chemische Methoden der Ökologie: Analyse ökosystemarer Prozesse und Funktionen

Andreas Richter
andreas.richter@univie.ac.at
Dept Chemische Ökologie & Ökosystemforschung
<http://www.ecosystem-research.net>

SYSTEME

Was ist ein System?

"A system is a collection of matter, parts, or components which are included inside a specified, often arbitrary, boundary."



POOLS and FLUXES

- Was ist ein "Pool"?
"An amount of matter or energy defined by certain physical, chemical, or biological characteristics that can be considered as reasonably homogenous"
- Pool (contained in a Reservoir = Bestand)
eines Elementes (z.B. Biogeochemie, Ökologie,...)
eines Moleküls (z.B. Biochemie, Physiologie,...)
eines Organismus, etc. (z.B. Ökologie,...)
- Was ist ein "Flux"?
"The amount of matter or energy transferred from one reservoir to another per unit time"

POOLS and FLUXES

Die Größe der *Pools* wird kontrolliert:

durch die *Input Fluxes* und *Output Fluxes*

und

durch die Transformationen im Reservoir

POOLS and FLUXES

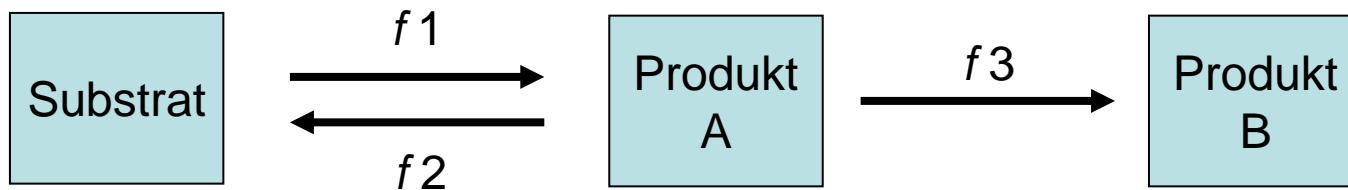


Source
(input) fluxes

Element or
Metabolite Pool

Sink (output)
fluxes

BRUTTO- vs NETTO-FLÜSSE



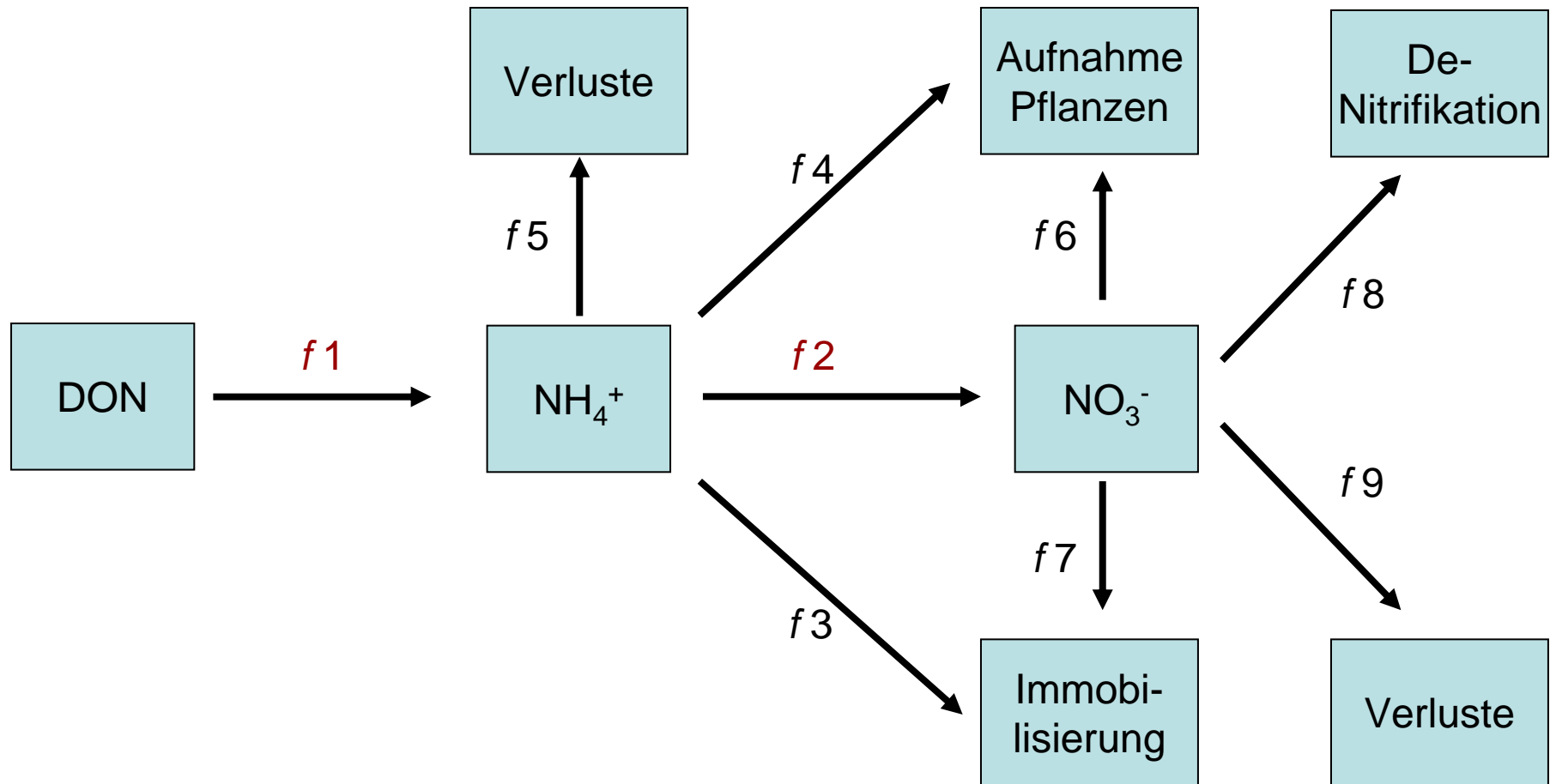
f_1

$f_1 - f_2$

Brutto-Fluß (gross flux)

Netto-Fluß (net flux)

BRUTTO- vs NETTO-FLÜSSE



f_1

$f_1 - (f_2 + f_3 + f_4 + f_5)$

f_2

$f_2 - (f_6 + f_7 + f_8 + f_9)$

Brutto-Mineralisierung (Ammonifizierung)

Netto-Mineralisierung

Brutto-Nitrifizierung

Netto-Nitrifizierung

Teil 1

DESIGN VON UNTERSUCHUNGEN UND STUDIEN

Experiment, Beobachtung, Variable, Replikation, Beprobung

Wichtige Fragen

1. Was ist der Zweck der Studie?
Ist das Ziel der Studie klar definiert?
2. Wie und wozu sollen die Daten der Studie verwendet werden können?
3. Welche Qualität müssen die Daten haben um den Zweck der Studie zu erfüllen?

Wichtige Schritte des SAP ^{1,2}

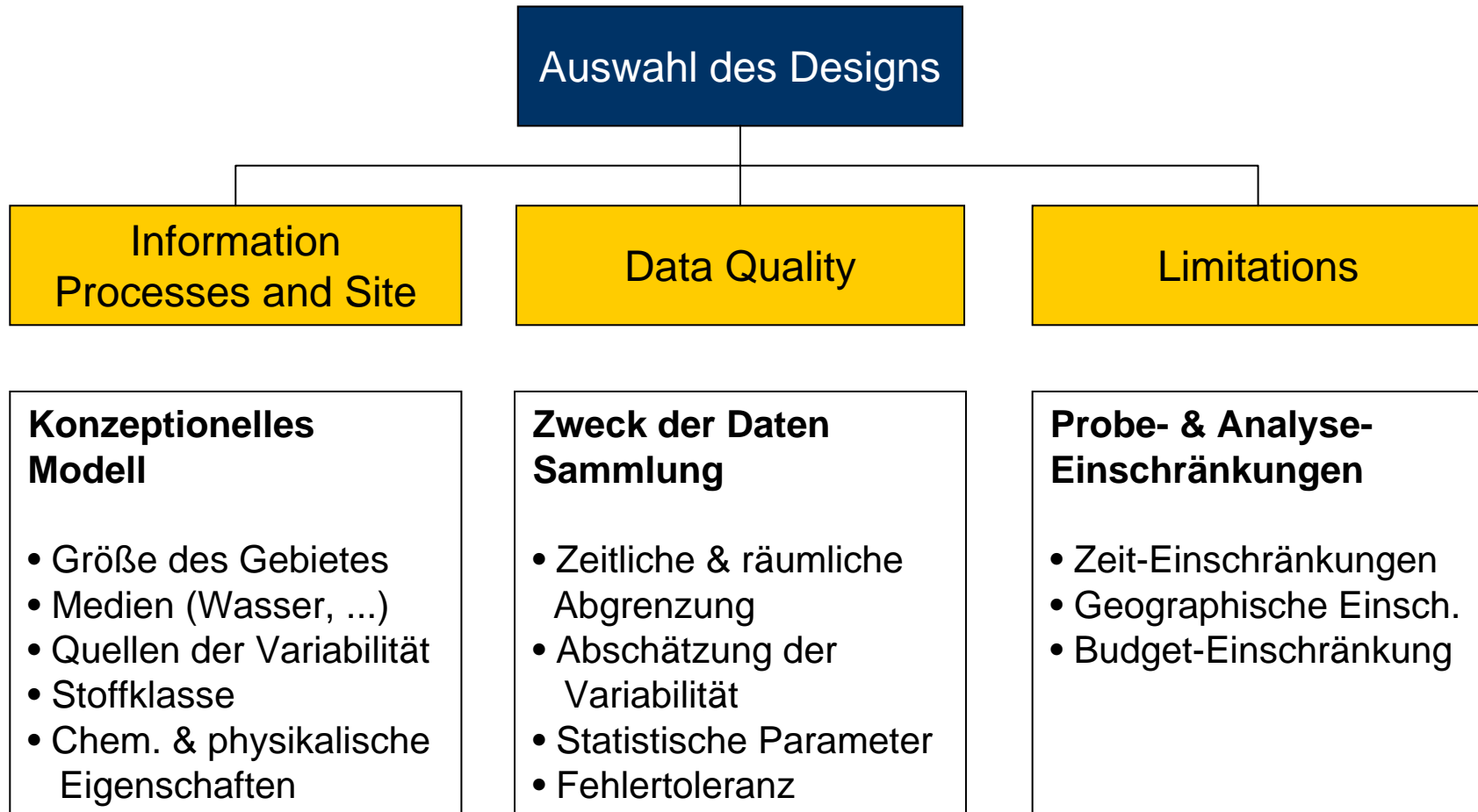
SAP = Sampling & Analysis Plan

1. Definition des Problems
2. Identifikation der zu treffenden Entscheidung
3. Identifikation der notwendigen Inputs
4. Entwicklung von Entscheidungs-Regeln
5. Spezifizierung von tolerierbaren Fehlern
6. Design der Studie

1 B. Lesnik & D. Crumbling (2001) Guidelines for preparing SAPs using systematic planning.
Environmental Testing & Analysis

2 EPA QA/G-5S (2002) Guidance on choosing a sampling design for environmental data collection

Auswahl des *Sampling Design*



Design - Typen

Experiments

- + Beobachtung des Systems unter kontrollierten Bedingungen
- + Replikation
- + Randomisierung

Quasi-Experiments

- + Strikte Kontrolle nicht möglich
- + Strikte Randomisierung nicht möglich

Observation

- + Keine Manipulation des Systems, daher keine Kontrolle
- + Keine a priori Hypothesen möglich

Variable

+ **Response Variable**
(Aussage-Variable;
abhängige Variable)

+ **Explanatory Variable**
(Erklärende Variable)

+ **Disturbing Variable**
(Stör-Variable)

+ **Controlling Variable**
(Kontroll-Variable)

- Variable, die vorhergesagt werden soll
(zB: Auswirkung N-Deposition auf *Nitrifikation*)
- Erklärender **FAKTOR** für die "response" Variable
(zB: Physiologie der MO, Exposition)
- **FAKTOR**, die zu einer Maskierung der Zusammenhänge führen kann
- **FAKTOR**, die kontrolliert wird
(zB: Art des Standortes, Zeitpunkt der Aufsammlung)

Statistische und Biologische Populationen

Population = die Gesamtheit der zu untersuchenden Elemente
[kann endlich, aber auch unendlich groß sein]

Target Population
[Grundgesamtheit]

Sampled Population
[Stichprobe]

Sample
[Probe]

Alle Elemente eines Systems für das die Aussagen der Studie gültig sein sollen

Subpopulation der Grundgesamtheit, die tatsächlich gemessen wird

Tatsächlich gemessene Probe; das Replikat

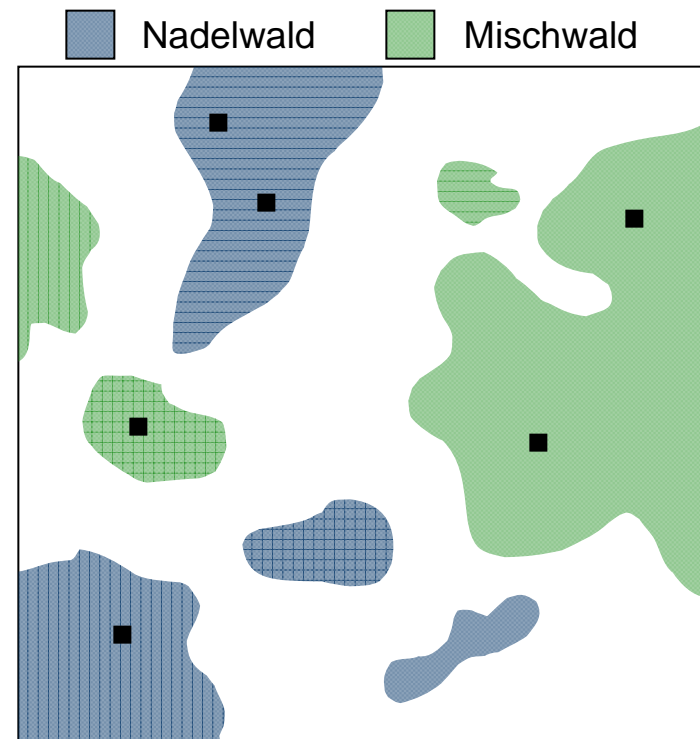
Beispiel für Populationen

Nitrifikation in Streu von Waldböden:

- 2 Waldtypen
- 4 Fragmente
- 6 Plots
- 60 Bodenproben

Was ist hier:

- + Target Population?
- + Sampled Population?
- + Samples?



Replikation 1

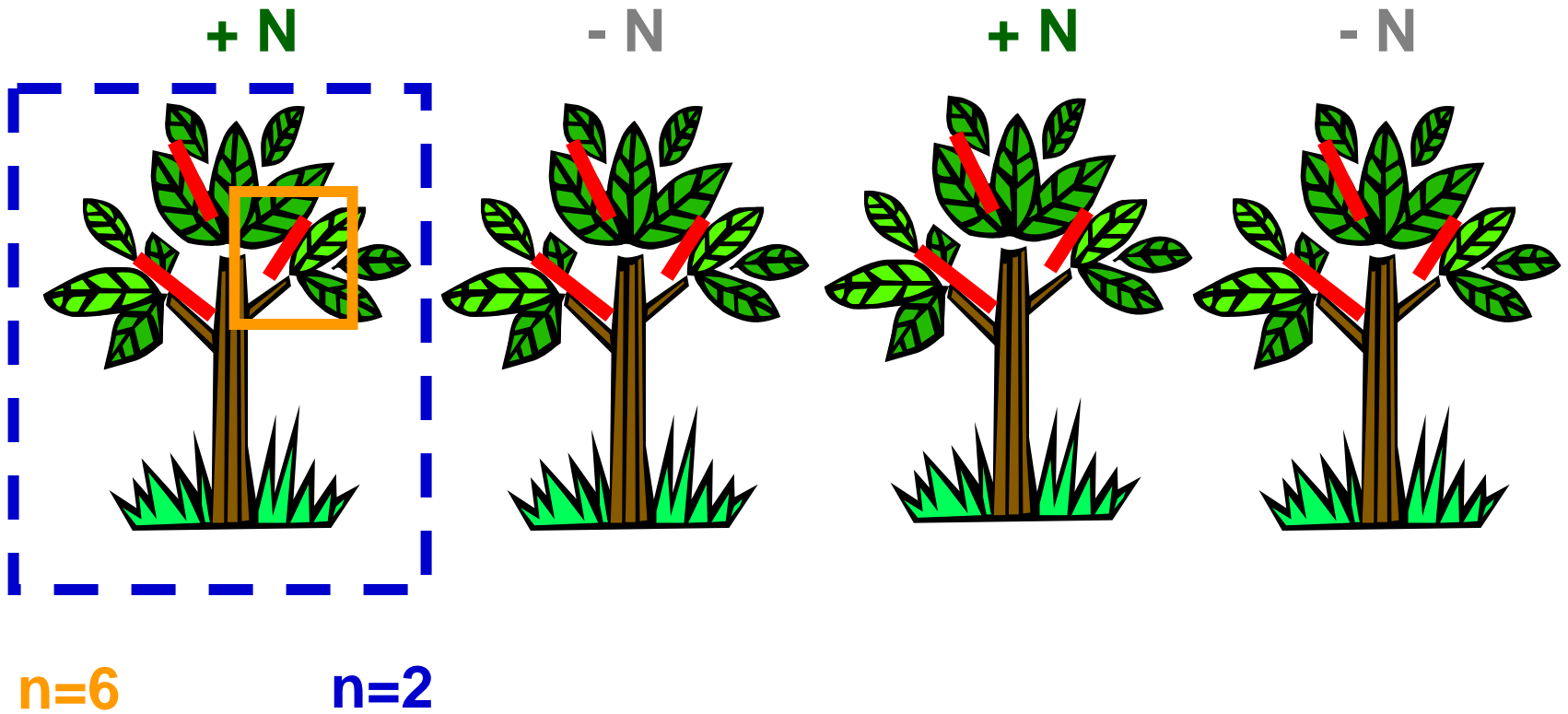
REPLIKAT = Experimentelle Einheit

Skalierung, auf der eine unabhängige Wiederholung einer bestimmten Behandlung erfolgt

Beispiel:

Auswirkung von N-Deposition auf das Blatt-Wachstum einer bestimmten Baumart

Replikation 2



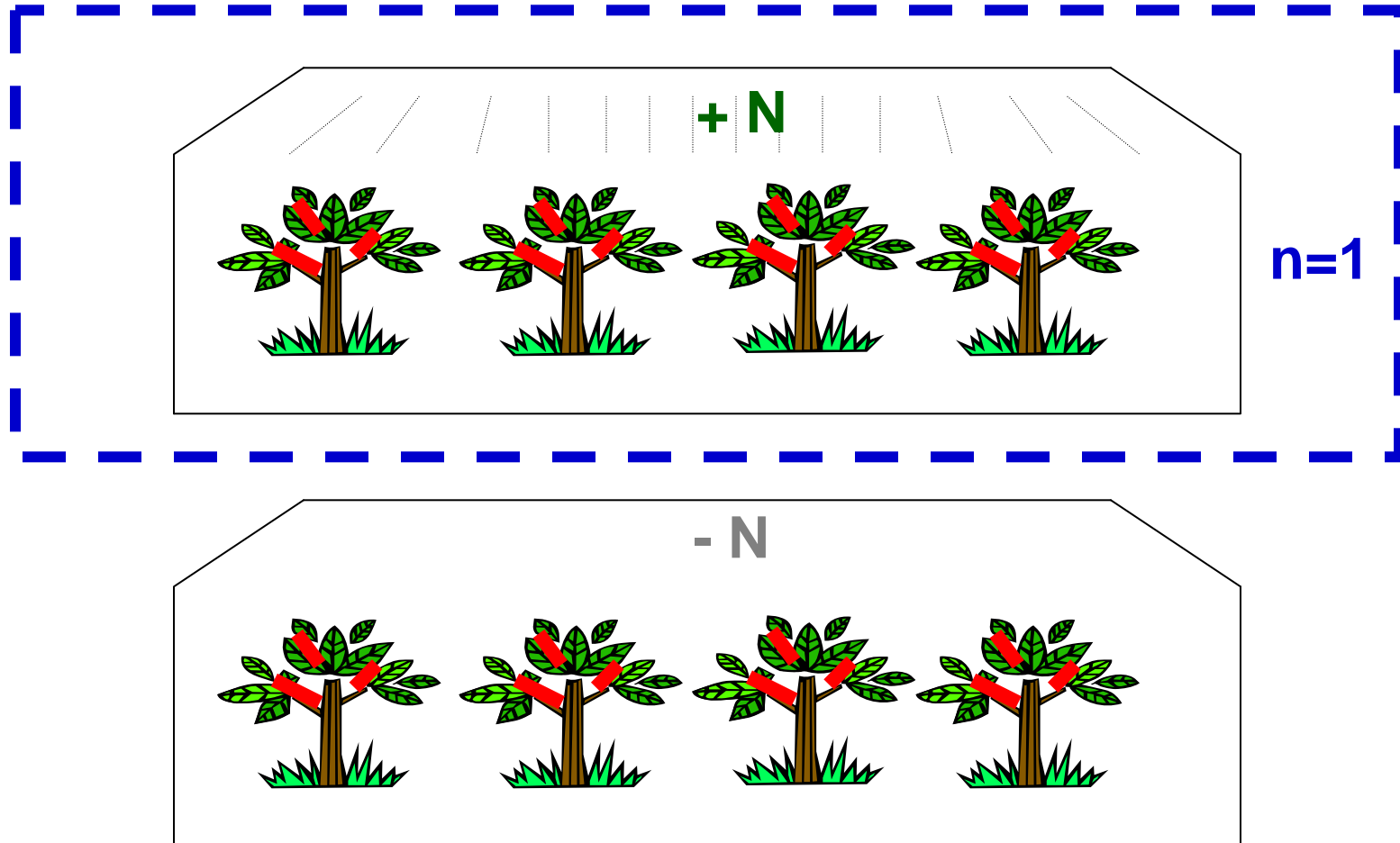
Pseudo-Replikation 1

Fehleinschätzung der Skalierung einer experimentellen Einheit:

- die angenommenen Replikate sind nicht unabhängig voneinander!
- n ist kleiner als gedacht

Sehr häufiges und ernstes Problem!

Pseudo-Replikation 2

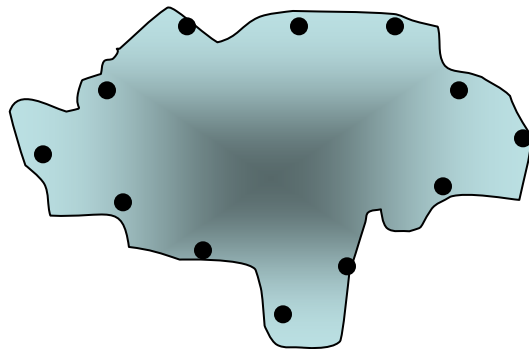


Autokorrelation 1

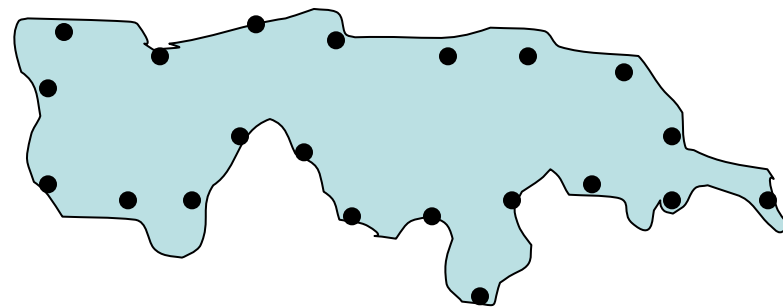
Hypothese: Flache Seen haben eine höhere Bakterien-dichte als tiefgründige Seen

Ansatz: alle 100 m ein Beprobungspunkt

Räumliche Autokorrelation



Tiefgründig



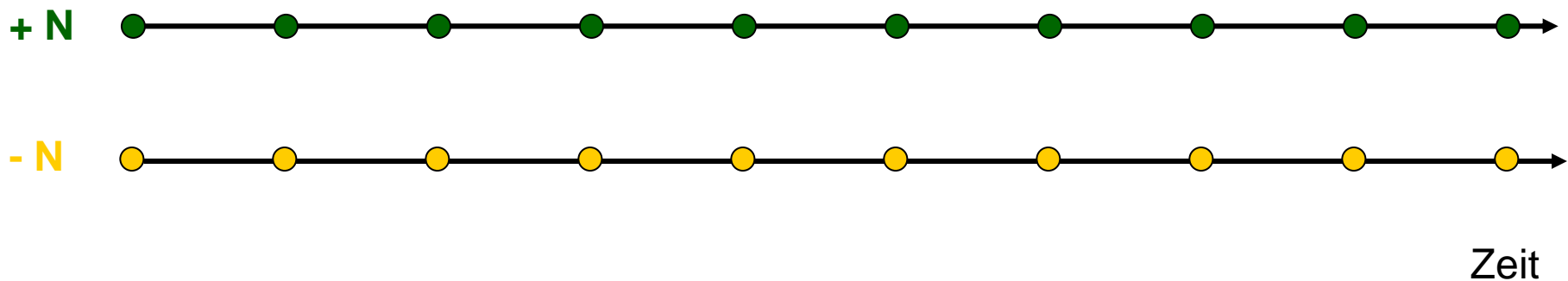
Flachgründig

Autokorrelation 2

Hypothese: Moose wachsen langsamer wenn sie hohen N
Depositionen ausgesetzt werden

Ansatz: Ein Moospolster wird gedüngt (+N) und einer als
Kontrolle 12 x im Jahr gemessen (-N)

Zeitliche Autokorrelation

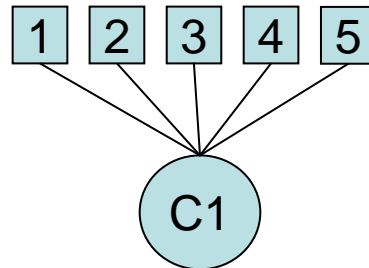


Composite Samples 1

Physisch gemischte Proben ("gepoolt")

- + Mittelwertbestimmung
- + keine Variabilität mehr sichtbar

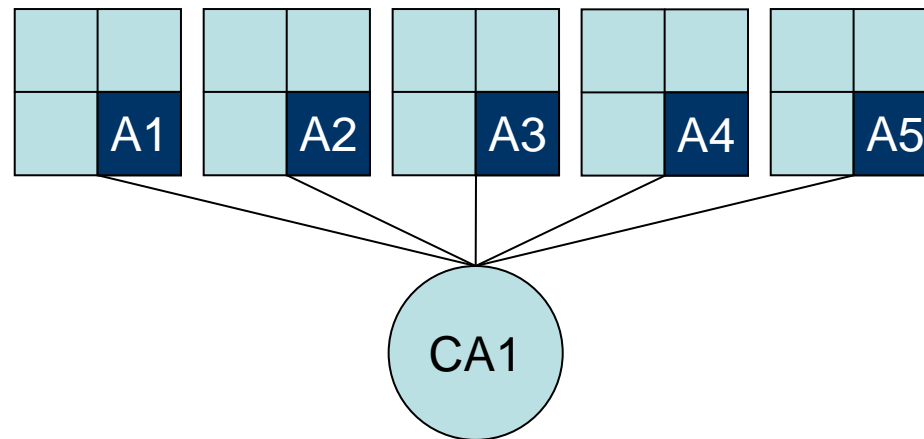
Individuelle Proben



"gepoolte" Probe

Composite Samples 2

Aliquote individueller Proben



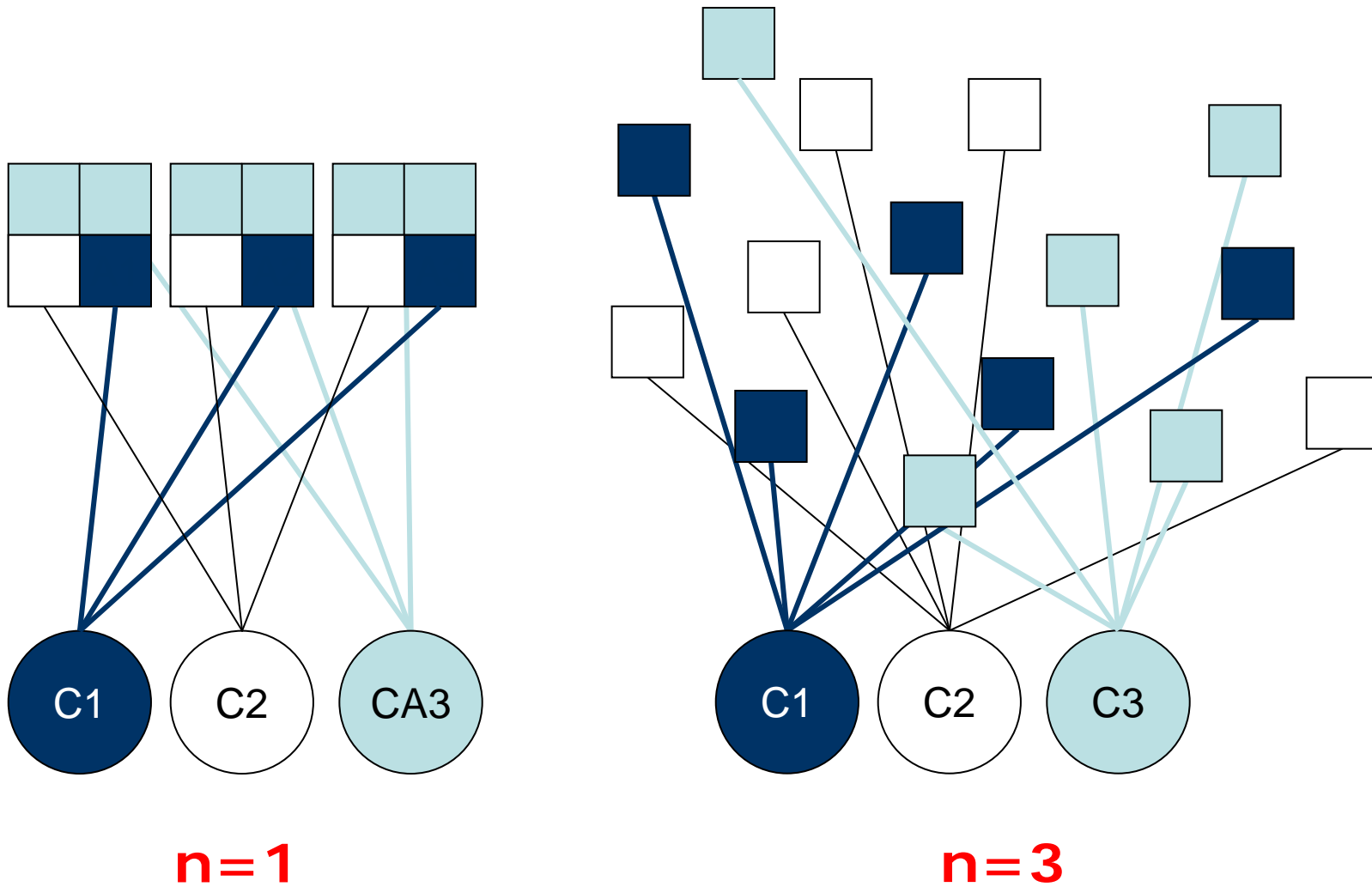
Binäre Information

+ / -

alle Individ.
testen!

alle Individ.
neg.

Composite Samples & Pseudoreplikation



Beprobungs-Strategien

1. Judgmental Sampling Design

2. Statistical (probability-based) Design

- Simple Random Sampling
- Stratified Sampling
- Systematic/Grid Sampling
- Ranked Set (Two Stage)
- Adaptive Cluster

Judgmental Sampling

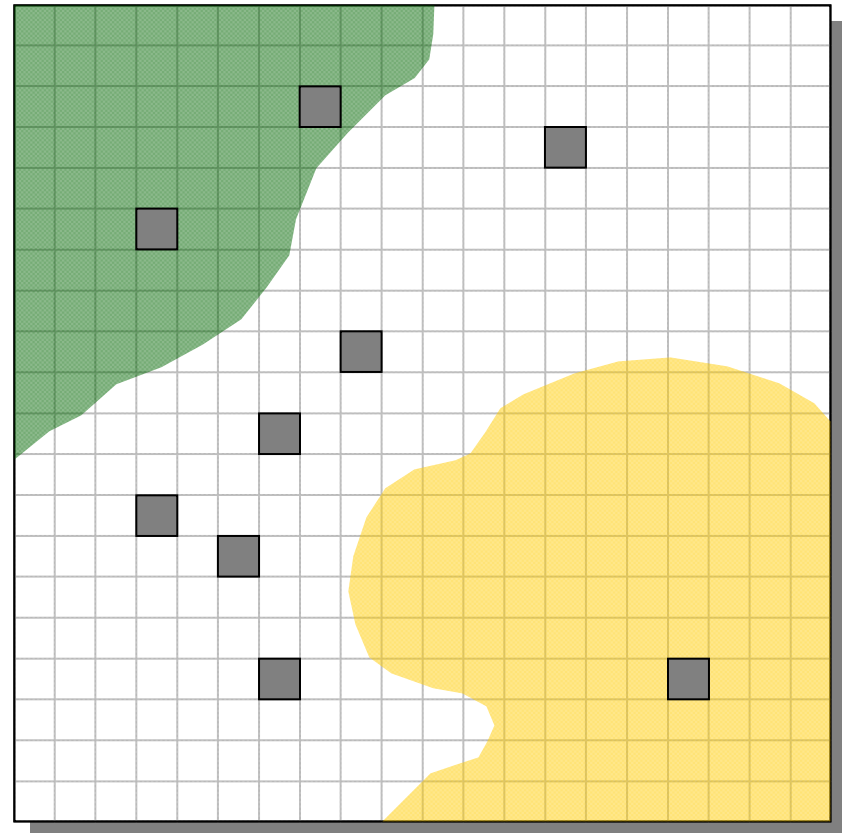
Experten-Beprobung

- Auswahl der Proben/Probeflächen durch Expertenwissen, ohne Randomisierung!
- Nur sinnvoll, wenn bereits substantielles biologisches, physikalisches und historisches Wissen vorhanden
- Nur sinnvoll in relativ kleinen Untersuchungsgebieten
- Die Repräsentativität der Untersuchungsergebnisse kann nicht genau bestimmt werden!

Random Sampling

Primitivstes Design

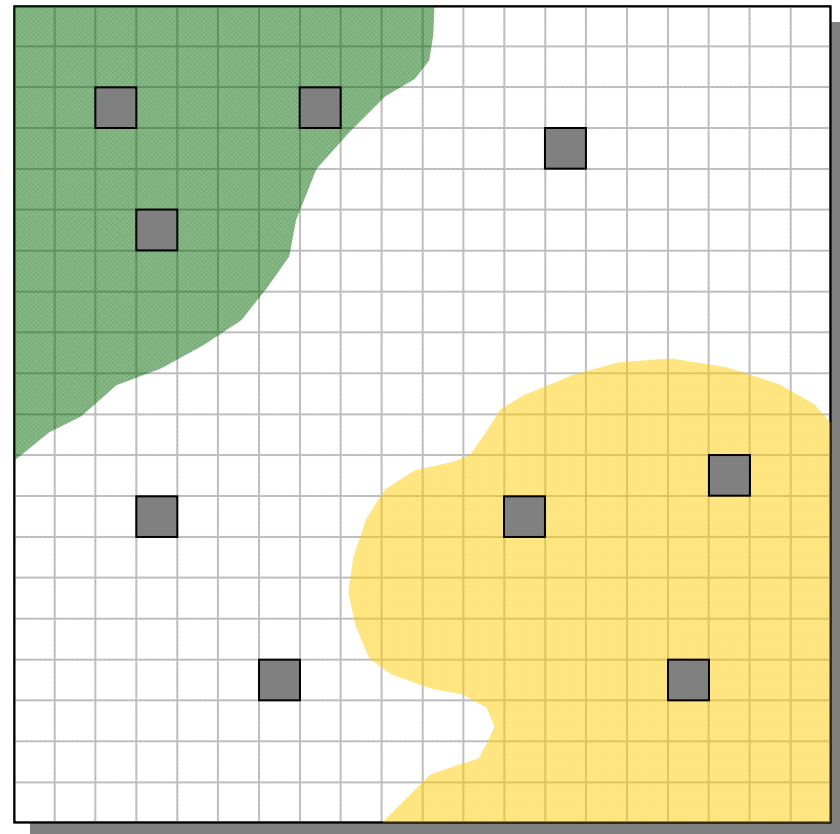
- Zufällige Auswahl
- Proben werden ohne Rücksicht auf Strukturen ausgewählt.
- Sinnvoll in homogenen Populationen
- Nur sinnvoll wenn ausreichend Replikate



Stratified Sampling

Block = Strata

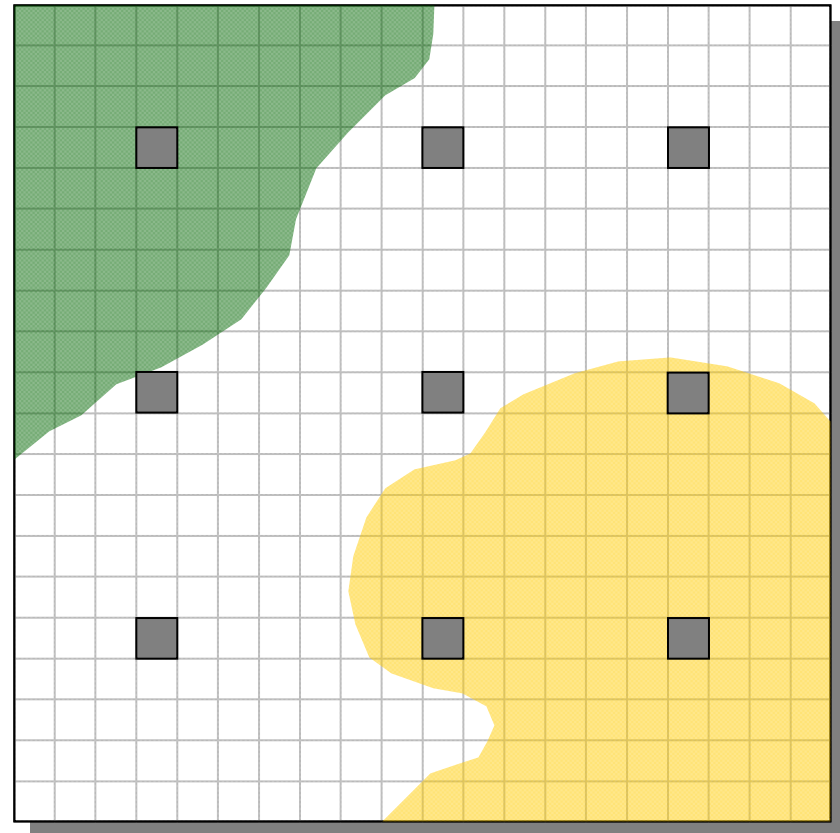
- Es werden Blöcke (Strata) gebildet
- Strata bestimmt von einer oder mehrer Variable(n)
- Zufällige Auswahl innerhalb eines Blocks
- Balanciertes Design (gleiche Anzahl von Proben/Stratum)
- Bessere Präzession & geringerer Fehler



Systematic/Grid Sampling

Räumliches/Zeitliches Design

- Systematische und gleichmäßige Verteilung der Proben (von einem zufälligen Startpunkt)
- Wenn Strukturen unbekannt sind
- Nicht genug Wissen um Strata zu bilden



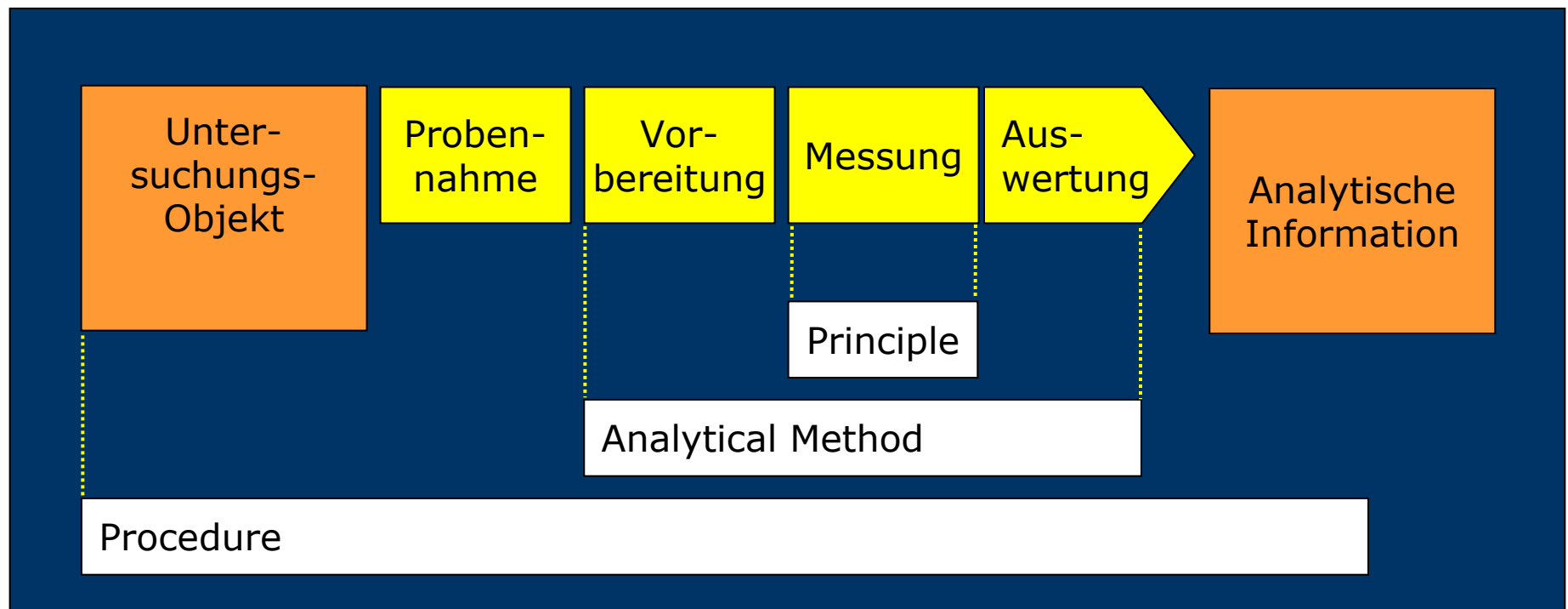
Teil 2

Analyseverfahren

Probenahme, Probearbeitung, Messung, Auswertung

Verfahren

Nach dem Studien-Design kommt das **Verfahren** (das Analyseverfahren)!



Probennahme ("Aufsammlung")

- **Was wird besammelt?**

Pflanzenteile:

Blatt, Blattstiel, Sproßachsen,...

Böden, Wasser:

Tiefe, Horizonte, Menge...

- **Wann wird besammelt?**

Viele biologische Systeme haben Rhythmen.

- **Wo wird besammelt?**

Exposition, Höhe, ...

- **Konservierung**

abhängig von Objekt und Substanz:

liq. N₂, sol. CO₂, kühlen, trocknen, erhitzen,

- **Beschriftung**

genaue Beschriftung notwendig

(#, was, wo, wann, wer)

- **Protokollierung**

genaues Protokollieren enorm wichtig!

Analytik

- Qualitative Analytik nennt man **Nachweis**
- Aufgabe der (Bio)Chemischen Analytik ist die **quantitative Bestimmung** von Stoffen (Analyten)
- Spurenanalytik (Kleinstmengenanalyse)
- Test (halbquantitative Analyse)

Sensitivität, Selektivität und Spezifität

Sensitivität

auch Empfindlichkeit

Kleinsten Unterschied zweier Proben, der noch mit ausreichender Genauigkeit detektierbar ist.

Beeinflusst auch die Darstellung der Ergebnisse (Anzahl der Stellen nach dem Komma).

Selektivität

gibt an wie "spezifisch" eine Methode für einen bestimmten Analyten ist.

Spezifität

Eine Methode ist spezifisch für eine Substanz, wenn keine anderen in der Matrix vorkommenden Stoffe mit der Bestimmung interferieren können. Es gibt keine absolut spezifischen Methoden.

Präzision, Richtigkeit und Genauigkeit

Präzision (precision)

ein Maß dafür wie gut Resultate unabhängiger Tests übereinstimmen.

Wiederholbarkeit: selbe Methode, Material, Operator und Labor während einer begrenzten Zeitspanne (Tage).

Reproduzierbarkeit: selbe Methode und Material, aber anderer Operator und anderes Labor oder im selben Labor während einer größeren Zeitspanne (Monate).

Richtigkeit

beschreibt wie gut der gemessene Wert mit dem wahren Wert übereinstimmt.

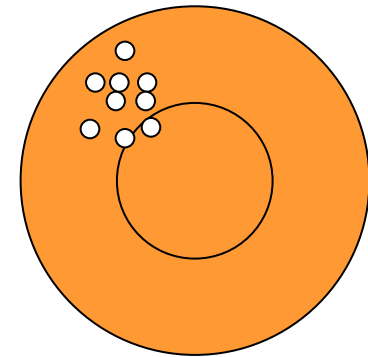
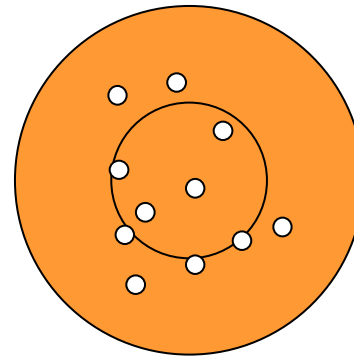
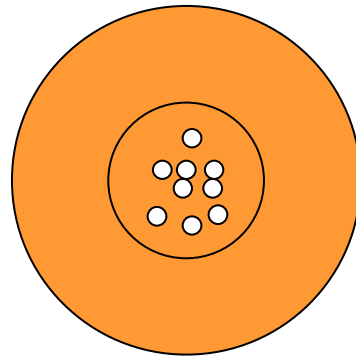
Genauigkeit (accuracy)

Ist ein Begriff der die Richtigkeit und die Präzision einer Methode beschreibt. Eine Methode ist nur dann genau wenn Richtigkeit **und** Präzision in Ordnung sind.

Systematischer & Zufälliger Fehler

Random
Error

Systematic
Error



Accuracy

optimal

gut

schlecht

Precision

optimal

schlecht

gut

Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Limit of Detection (XN)

ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die in der Probe (statistisch abgesichert) qualitativ nachgewiesen werden kann.

Limit of Quantification (XB)

ist die kleinste Konzentration eines Analyten, der in der Probe (statistisch abgesichert) quantitativ nachgewiesen werden kann.

Angaben

$X > X_B$	Quantitativ Nachweisbar (Angabe $X \pm V_B$)
$X_N < X < X_B$	Qualitativ Nachgewiesen (Angabe von X_B)
$X_N > X$	Nicht nachweisbar (Angabe der X_N)

Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Blindwertmethode

Allg. Formel (IUPAC)

$$XN = 1/b * Stdab_{blind} * 3$$

$$XB = 1/b * Stdab_{blind} * 9$$

Prolinbestimmung

Blindwerte {32, 36, 32, 32, 41}

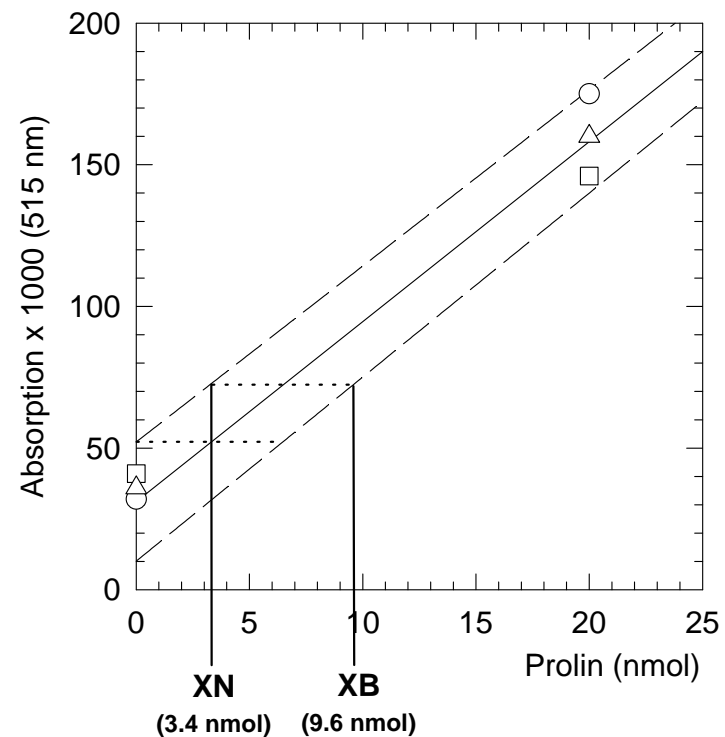
$$Stdab_{blind} = 3.97$$

$$b = 150/25 = 6 \text{ (nmol}^{-1}\text{)}$$

$$XN = 1/6 * 3.97 * 3 = 1.99 \text{ nmol}$$

$$XB = 1/6 * 3.97 * 9 = 5.96 \text{ nmol}$$

Nachweis und Bestimmungsgrenzen nach der Kalibrationsmethode



Die Kalibration

Prozess, mit welchem man die Gerätewerte mit den absoluten Mengen der zu bestimmenden Substanz in Übereinstimmung bringt.

- Leerwerte (blanks)
- Standards (externe, interne)
- Kalibrationsbereich
- Kontrollen

Leerwerte

- Leerwert ist Matrix ohne Analyt
- Nullwertbestimmung für jedes analytische Gerät notwendig
- Man unterscheidet:
 - Reagenzienleerwerte (z.B. Photometrie)
 - Blindwerte (Grundwert, z.B. Enzymatik)

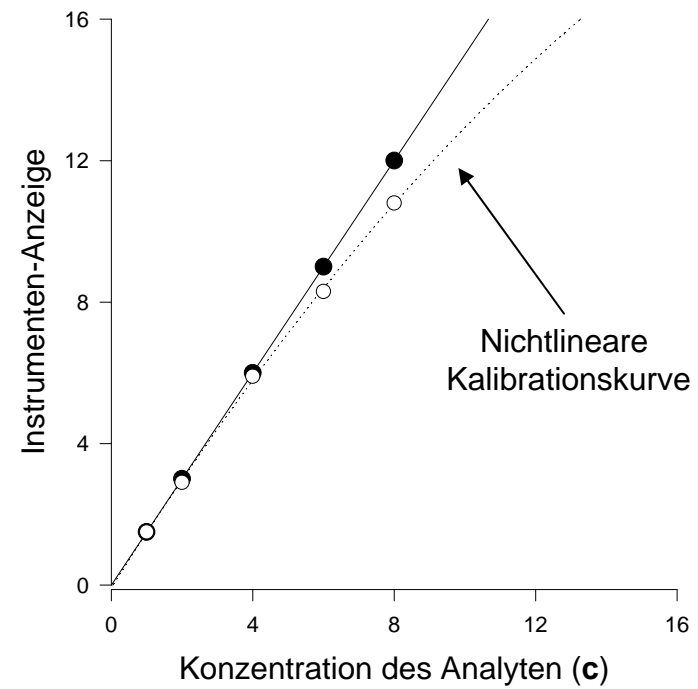
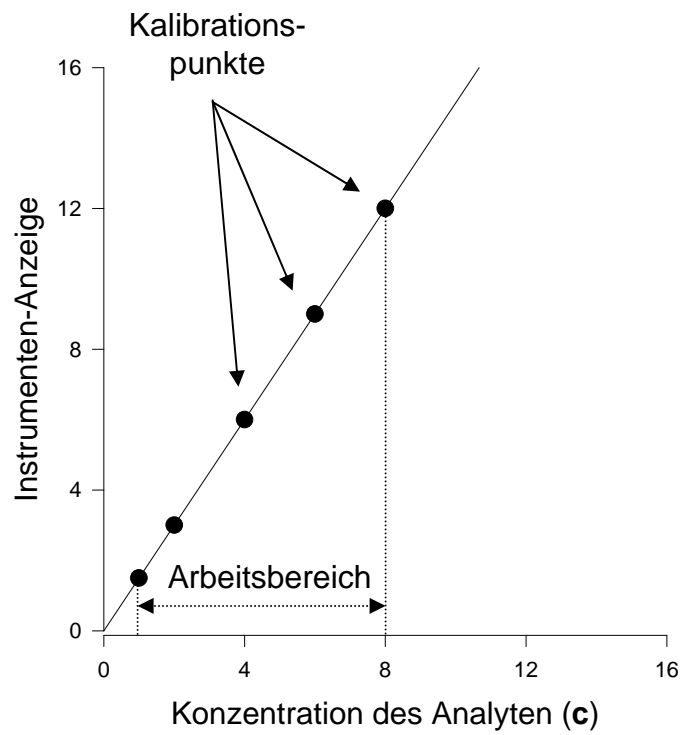
Standards

Proben bekannter Konzentration, die man zur Kalibrierung einer Methode einsetzt, nennt man Standards!

Standards sollten in Matrix hergestellt sein.

- **Externe Standards:** die zu bestimmende Substanz wird chemisch rein eingesetzt
- **Interne Standards:** eine ähnliche Substanz, die man zusetzt und die als Bezugsgröße verwendet wird

Kalibrationskurve



Kontrollen

- Um eine Methode zu überprüfen sollte regelmäßig eine Probe bekannter Konzentration gemessen werden.
- Biologische Referenzmaterialien
- Schwierig bei Methoden die keine Pool-Größen messen, sondern Prozesse (etwa Enzymaktivitäten)

Qualität in der Analytik

- **Charakterisierung der Methode**

- Eignung zur Verwendung ("*fit for purpose*")
- Leistungskriterien in realen Proben
- Überprüfung der Robustheit
- Meßunsicherheit

- **Nachvollziehbarkeit durch Dokumentation**

- Persönliche Verantwortlichkeit
- Integrität der Rohdaten
- Rückführbarkeit der Ergebnisse
- Nachvollziehbarkeit der Berechnungen

Teil 3

Praktische Hinweise

Berechnungen, Chemikalien, Wasser, Wägen, Zentrifugation

Konzentrationen

Masse (kg)

$c = m / v$ (Konzentration = Masse / Volumen)

z.B.: mg L^{-1} , $\mu\text{g cm}^{-3}$, mg mL^{-1} , etc

Stoffmenge (Mol)

$c = \text{Mol} / v$ (molare Konzentration = Mol / Volumen)

z.B.: mol L^{-1} (M), mmol L^{-1} (mM), $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (mM),
 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (μM)

Äquivalenzmenge (Val)

$c = \text{Val} / v$ (normale Konzentration = Val / Volumen)

z.B.: val L^{-1} (N), mval L^{-1} (mN), $\mu\text{val mL}^{-1}$ (mN),
 $\mu\text{val L}^{-1}$ (μN)

Verdünnungen

! Das Produkt aus Konzentration und Volumen vor der Verdünnung entspricht dem Produkt nach der Verdünnung!

$$C_{\text{vor}} \times V_{\text{vor}} = C_{\text{nach}} \times V_{\text{nach}}$$

z.B.: Aus einer 1M KCl-Lösung soll 250 mL einer 20mM Lösung hergestellt werden.

$$1 \text{ M} \times X \text{ mL} = 0.02 \text{ M} \times 250 \text{ mL}$$

$$X = (0.02 \times 250) / 1 = 5 \text{ mL}$$

Lösung: 5 mL einer 1M KCl sind notwendig um 250 mL einer 20 mM Lösung herzustellen

Verdünnungsfaktor

- Z.B.: 10-fache Verdünnung (1 zu 10, 1:10)
1 mL **auf** 10 mL oder
1 mL + 9 mL oder
1 mL in einem Gesamtvolumen von 10 mL
- Mischt man also gleiche Volumina miteinander hat man eine Verdünnung von 1:2 (nicht 1:1!).

Chemikalien

- Gefahrensymbole



Giftig

Mindergiftig
Reizend

Ätzend

Explosions-
gefährlich

Brand-
fördernd

Hoch/Leicht
Entzündlich

- Qualitäten
p.a. (pro analysis), zur Synthese, ACS, OEAB, chemisch rein,
Suprapur, Biochimica select
- Beschriftungen von abgefüllten Chemikalien
Inhalt, Konzentration, Datum, Benutzer

Chemikalien

Guarantee analysis

Assay	min. 37 %	
Non-volatile matter	max. 0,005 %	
Residue on ignition (as sulfates)	max. 0,0005 %	
Ammonium (NH ₄)	max. 0,0001 %	
Al max. 0,000005 %	Cu max. 0,000002 %	Pb max. 0,000002 %
As max. 0,000001 %	Fe max. 0,00002 %	Sr max. 0,000001 %
Ba max. 0,000002 %	Ge max. 0,000005 %	Tl max. 0,00001 %
Be max. 0,000002 %	K max. 0,00001 %	Ti max. 0,000005 %
Bi max. 0,00001 %	Li max. 0,000001 %	V max. 0,000001 %
Ca max. 0,00005 %	Mg max. 0,00001 %	Zn max. 0,000005 %
Cd max. 0,000001 %	Mn max. 0,000001 %	Zr max. 0,00001 %
Co max. 0,000001 %	Na max. 0,00005 %	
Cr max. 0,000002 %	Ni max. 0,000002 %	
Bromide (Br) max. 0,005 %	Free chlorine (Cl) max. 0,00005 %	
Phosphate (PO ₄) max. 0,00005 %	Sulfate (SO ₄) max. 0,0001 %	
Sulfite (SO ₃) max. 0,0001 %	Heavy metals (as Pb) max. 0,0001 %	
Appearance of the substance	complying	
APHA	max. 10	
Extractable org. substances	max. 0,0005 %	

HCl M = 36,46 g/Mol 1 l = 1,19 kg

CAS-Nr. 7647-01-0 EG-Nr.: 231-595-7

EG-KENNZEICHNUNG **UN-No: 1789**

Lot / Charge

00450

2,5 l



S 060499

Riedel-de Haën®

30721

Hydrochloric acid min. 37 %, Analytical Reagent
Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.

Salzsäure min. 37 %, für Analyse,
Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.

Acide chlorhydrique min. 37 %, pour analyses,
Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.

Acido cloridrico min. 37 %, per analisi,
Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.



Corrosive
Ätzend
Corrosif
Corrosivo
Bijtend
Ætsende

Riedel-de Haën®: trademark under licence from Riedel-de Haën GmbH

R 34-37

Causes burns. Irritating to respiratory system. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Verursacht Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Provoque des brûlures. Irritant pour les voies respiratoires. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

Provoca ustioni. Irritante per le vie respiratorie. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico. In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Veroorzaakt brandwonden. Irriterend voor de ademhalingswegen. Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspülen en deskundig medisch advies inwinnen. Bij een ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk hem dit etiket tonen).

Ætsningsfare. Irriterer åndedrætsorganerne. Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Ved ulykkestilfælde eller ved ikkebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten, hvis det er muligt).

S 26-45

RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG · D-30926 Seelze · Tel.: ++49 (0)5137/8238-0

Wasserqualitäten

- **Demineralisiertes Wasser**
(Reversosmose, Hausleitung)  Geschirrspüler
- **Deionisiertes Wasser**
(Ionentauscher, allg. Labor)  Abwaschen,
anorg. Analytik
- **Destilliertes Wasser**
(Quarzdestillationsanlage)  Enzymaktivitäten
- **Milli Q-Wasser**
(Reinstwasser $>18.2 \text{ MOhm cm}^{-1}$)  Reinstwasser,
Chromatographie

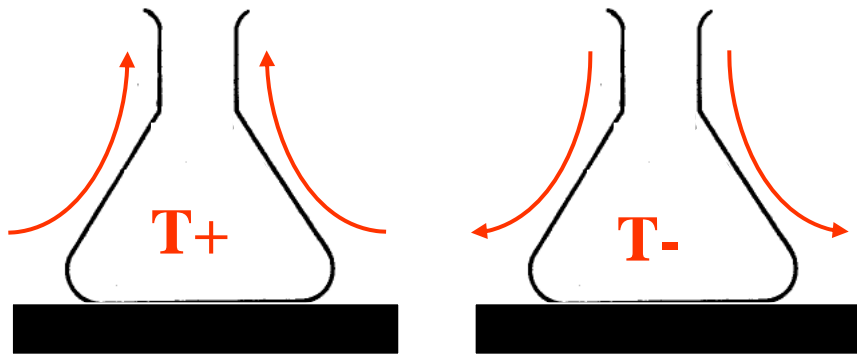
WÄGEN

- Wägebereich der Waage beachten!
- Störungen: Offene Türen, Heizung, Erschütterungen
- Nivellieren (Libelle) und Kalibrieren (Auto)

- Wägegefäß sollte möglichst klein sein
- Statische Aufladungen vermeiden (kein Kunststoff)
- Mitte der Waagschale (Ecklasteffekt)
- Waage vorbelasten (Erstwägeeffekt)
- Indirekte Handhabung (Zange; T- und RH-Effekte)
- Wägegut sollte Umgebungstemperatur haben

Einflüsse beim Wägen

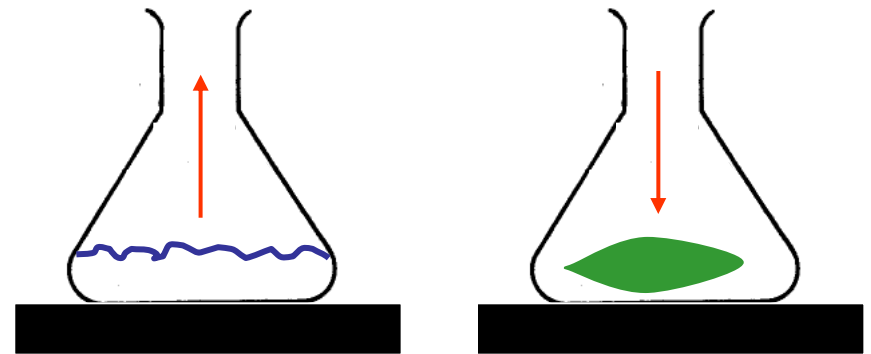
Temperatur



Wägegut
erscheint leichter

Wägegut
erscheint schwerer

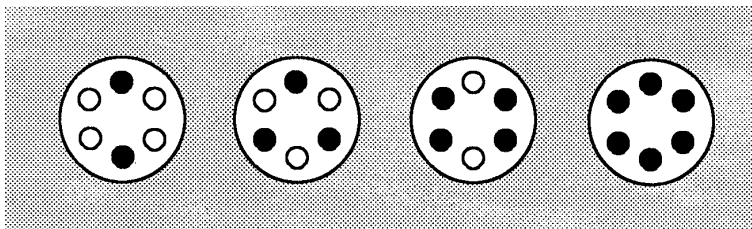
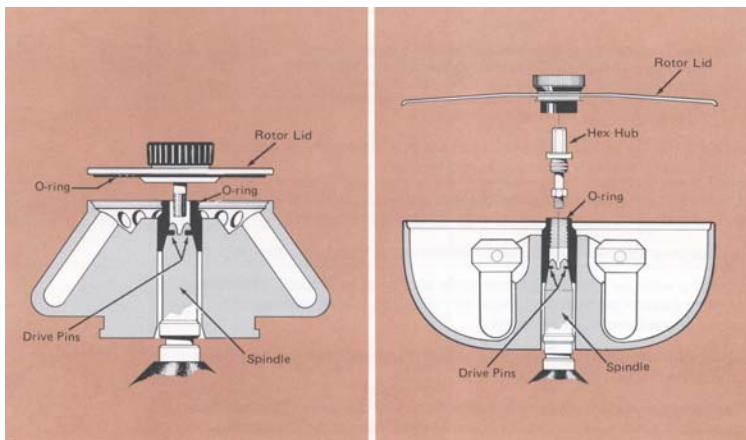
Luftfeuchte



Verdunstung
erscheint leichter

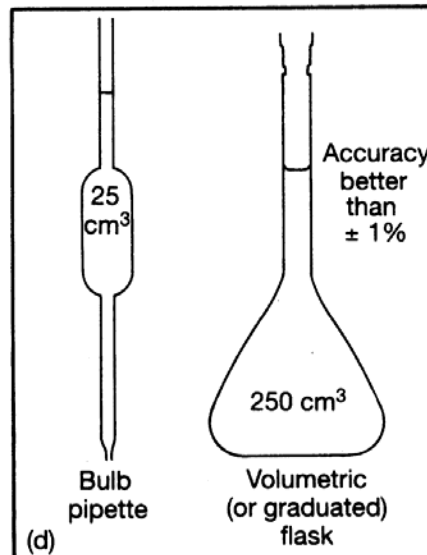
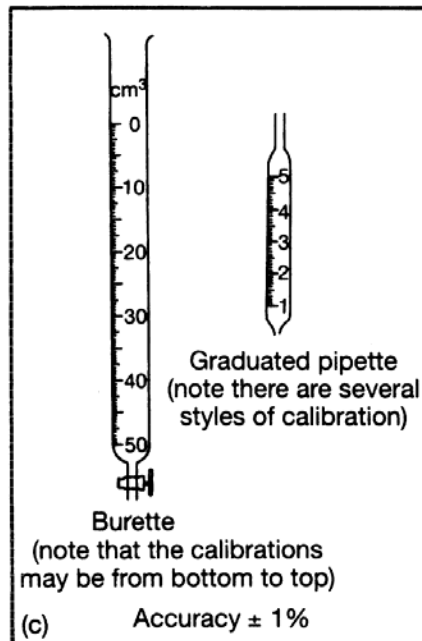
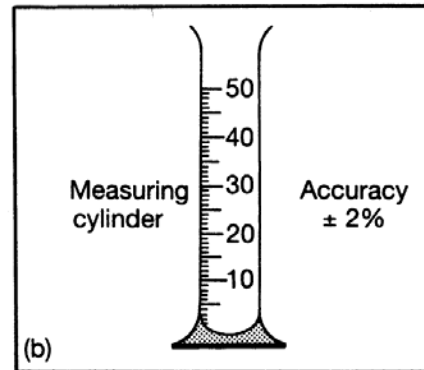
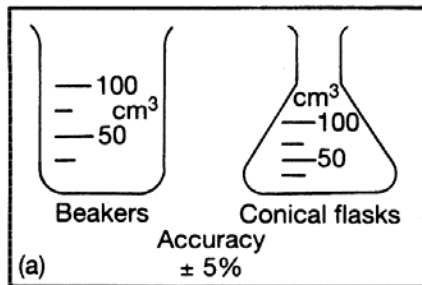
Wasseraufnahme
erscheint schwerer

Zentrifugation



- Relative Beschleunigung ($\times g$) statt Drehzahl (rpm)
- Max. Drehzahl beachten
- Bremsen (je nach Anwendung)
- Austarieren der GefäÙe
- Beladung:
 - 2 x gegenüber (180°)
 - 3 x im Winkel 120°

Volumsmessungen



- Glaspipetten
(Ex, 20°, $\pm 1\%$)
Voll-, Meß-, Präzisionspipetten
- Luftpilsterpipetten
- Meßzylinder
- Büretten
- Meßkolben (In!)
Enghals, Weithals