

Respirationsraten in Abhängigkeit von der Temperatur (van't Hoff'sche Regel)

Einleitung

Die Respiration ist für aerobe Organismen (Pflanzen, Tiere und viele Mikroorganismen) der Prozess zur Energiebereitstellung. Dabei wird organische Substanz unter Sauerstoffverbrauch abgebaut. Die Respiration unterliegt dabei wie alle Lebensvorgänge einer direkten Abhängigkeit von der Temperatur. Näherungsweise verdoppelt sich die Aktivität bei einer Temperaturerhöhung um 10 K (van't Hoff'sche oder RGT-Regel). Damit ist der Q₁₀-Wert ca. 2. Darüber hinaus charakterisiert die Respiration die momentane physiologische Leistung bzw. den Zustand des Organismus und ist artspezifisch.

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff ist deshalb für die meisten Organismen lebensnotwendig. Die Bestimmung des gelösten Sauerstoffes ist daher u. a. auch in der Gewässerkunde die wichtigste und am häufigsten durchgeführte chemische Messung. Der größte Teil des Sauerstoffs gelangt durch den Austausch mit der Atmosphäre über die Oberfläche in das Wasser. Die im Wasser gelöste Menge eines Gases hängt - im Rahmen des Gefüges von Druck, Temperatur und Salzgehalt - von der stoffspezifischen Löslichkeit und dem Partialdruck ab. Dabei stellt sich nach dem Henry'schen Gesetz ein Lösungsgleichgewicht bzw. eine Sättigungskonzentration ein (Tab. 1). Die Veränderungen der physikalischen Bedingungen, insbesondere der Temperatur, können zu einer vorübergehenden Übersättigung des Wassers mit Sauerstoff oder zu einem Sauerstoffdefizit führen, weil sich das Gleichgewicht mit der Atmosphäre nur zögernd einstellt.

Tab. 1. Sättigungskonzentrationen des Sauerstoffs im Wasser (Druck: 1 bar, Salinität: 0 PSU)

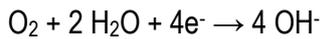
Temperatur (°C)	Sättigungskonzentration ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
5	408
15	315
16	308
17	301
18	295
19	289
20	283
21	278
22	273
23	267
24	262
25	257
30	227

Wesentlich stärker wird der Sauerstoffgehalt durch Assimilation und Respiration beeinflusst. So werden im Verlauf der Assimilation der Algen große Sauerstoffmengen frei, die zu einer starken Sauerstoffübersättigung in der euphotischen Zone der Gewässer führen können. Sauerstoffproduktion und -verbrauch (die Respiration) aquatischer Organismen können direkt über die Konzentrationsveränderung mit der Zeit gemessen werden.

Ausgewählte Methoden zur Sauerstoffbestimmung

Polarographie: Sauerstoffelektroden (Clark-Elektrode)

Bei diesem Verfahren wird molekularer O₂ an der Oberfläche einer Edelmetallelektrode (Arbeitselektrode) chemisch reduziert, wobei Elektronen verbraucht werden:



Es entsteht ein elektrischer Strom, der das Messsignal des Verfahrens ist. Bei der "Clark-Elektrode" sind Anode und Kathode in einer elektrolytgefüllten Messzelle, die mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran verschlossen ist. Kalibriert werden die Elektroden in 100% sauerstoffgesättigter Luft und in Wasser, in dem der Sauerstoff chemisch eliminiert wurde (mit Dithionit). Clarkelektroden werden heute eher in Spezialfällen angewendet (miniaturisiert, schnelle Ansprechzeit...), während im Feld überwiegend mit Optoden gemessen wird.

Optode



Abb. 1 Optode mit blauem Fluoreszenzanregungsblitz (Markierung)

Optoden haben anstelle der Membran eine Beschichtung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird durch Licht zum Fluoreszieren angeregt, wobei das Signal in Sauerstoffabwesenheit maximal ist (Abb. 1). Sauerstoff übernimmt die Energie vom Farbstoff, so dass die Fluoreszenz verringert wird (Quenching). Der Zusammenhang folgt der Stern-Vollmer-Gleichung, ist also nicht linear. Außerdem wird nicht direkt die Fluoreszenz gemessen, sondern deren Abklingzeit. Auch bei anderen Fluoreszenzmessgeräten wird nicht direkt die Fluoreszenz gemessen, weil diese für sehr kurzfristige Ereignisse bei gepulster Anregung (Lichtblitz) zu ungenau ist. Allerdings wird die Sauerstoffsättigung im Gerät berechnet.

Beide Verfahren bestimmen die **Sauerstoffsättigung**. Die Umrechnung in Konzentration ist stark von der Temperatur und der Salinität abhängig. Deshalb darf sich die Proben temperatur bis zur Messung nicht verändern. Die Salinitätskorrektur kann im Gerät eingegeben werden.

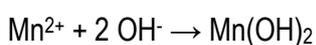
Chemisch-titrimetrisches Verfahren (Winkler-Methode)

Für Organismen im aquatischen Milieu stellt die chemische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs mittels Winkler-Methode immer noch eine der genauesten Methoden dar. Besonders für parallele Messungen, die ein konstantes Zeitraster (Simultanität) und hohe Genauigkeit erfordern, bleibt das Verfahren bis heute die Methode der Wahl. Sie ist sowohl für Untersuchungen im marinen und limnischen Bereich als auch für die meisten Abwasserarten geeignet.

Hier wird die Winkler Methode (Winkler, 1888) in der Modifikation von Carritt und Carpenter (1966) angewandt. Die Methode beruht auf der Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{4+} durch den gelösten O_2 des Wassers in alkalischer Lösung. In saurer Lösung reagiert Mn^{2+} und Mn^{4+} zu Mn^{3+} und letztere Ionen mit Jodid unter Freisetzung von Jod. Die Menge des Jods ist der Menge des O_2 äquivalent und kann titrimetrisch bestimmt werden.

Die chemischen Reaktionen im Einzelnen:

1. Durch Zugabe von KJ-haltiger NaOH und MnSO_4 zu einer Wasserprobe entsteht $\text{Mn}(\text{OH})_2$ als weißer Niederschlag:



2. Der im Wasser gelösten O_2 wird Mn^{2+} zu Mn^{4+} oxidiert (brauner Niederschlag, Abb. 2), wobei der O_2 vollständig aufgebraucht wird:

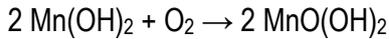
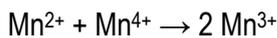


Abb. 2 Niederschlag nach Zugabe von Winkler I und II. Linke Probe ohne Sauerstoff (entspricht der Reaktion NUR mit Winkler I). Rechte Probe stark untersättigt (ca. 40%). Je mehr Sauerstoff enthalten war, desto dunkler wird der Niederschlag.

3. Durch Ansäuern mit H_2SO_4 wird der Niederschlag unter Bildung von $Mn(SO_4)_2$ aufgelöst. Die 2- und 4-wertigen Oxidationsstufen von Mn disproportionieren unter Bildung 3-wertiger Mn-Ionen.



4. Mn^{3+} -Ionen reagieren sofort mit dem vorher zugegebenen Jodid und Jod wird frei (Braunfärbung des Wassers, Abb. 3):

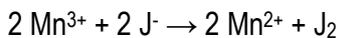
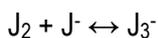
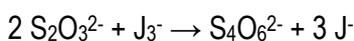


Abb. 3 Mit Schwefelsäure aufgelöster Niederschlag. Von links nach rechts: übersättigte Probe ist sehr dunkel, Niederschlag braucht 10-15 min zum Auflösen, leicht untersättigte Probe, sauerstofffreie Probe (muss nicht titriert werden).

5. Da KJ im Überschuss vorliegt, stellt sich folgendes Gleichgewicht ein:



6. Das freie Jod wird mit Natriumthiosulfat titriert, bis sich Jod vollständig zu NaJ umgesetzt hat (Entfärbung des Wassers). Der genaue Endpunkt wird durch Zugabe eines Indikators für Jod (Stärke) deutlicher. Der Umschlag erfolgt von blau zu farblos (Abb. 4).



Dabei ist 1 ml 1N Na-Thiosulfatlösung äquivalent zu 8 mg Sauerstoff.



Abb. 4 Kurz vor dem Farbumschlag (links), nach einem (!) Tropfen Titrierlösung (rechts)

Abb. 5 Titration von links nach rechts: vollständige Probe nach Überführung in den Erlenmeyerkolben = dunkelgelb, wenn hohe Sauerstoffkonzentration, Titration mit einigen ml Thiosulfat bis zur Färbung, 1 ml Stärke wird durch das restliche Jod dunkelviolett gefärbt, weiter titrieren – jetzt tropfenweise, bis zur hellvioletten Färbung. Dann ist der Umschlagpunkt sehr nahe, siehe Abb. 4



Aufgaben

1 kontinuierliche Messung der Sauerstoffzehrung

- Die Bestimmung der Sauerstoffzehrung wird elektrochemisch mit einer Sauerstoffoptode zeitlich verfolgt.

2 Respiration verschiedener Organismen in Abhängigkeit von der Temperatur

- Chemische Bestimmung der Sauerstoffabnahme aus 2 Zeitpunkten t_0 und t_x .
- Jede Gruppe bekommt eine der folgenden Proben:
 - Unterwasserpflanze mit Aufwuchs,
 - Mikroalgenkultur,
 - Hefe,
 - Sedimentsuspension.
 - *Andere Proben sind möglich, werden dann entsprechend beschriftet.*
- Sofortige Fixierung des Sauerstoffs in der jeweiligen t_0 Probe.
- Inkubation aller Proben t_x für ca. **2 h** bei 5, 15, 20 (Raumtemperatur) und 30°C, wobei jede(r) Student(in) 2 Titrations (t_0 und t_x) einer Probe für eine Temperatur durchführt. Danach Fixierung des Sauerstoffs dieser Probe.

3 Auswertung

- Beschreibung der kontinuierlichen Sauerstoffabnahme (Umrechnung der Sättigung in Konzentration unter Beachtung des Temperatureinflusses, Tab. 1).
- Berechnung der Sauerstoffzehrung für jede Temperatur a) als Anstieg aus der kontinuierlichen

- Messung und b) als Differenz aus t_0 und t_x und dann auf 1 Stunde beziehen.
- Zusammentragen der Ergebnisse für jede Gruppe, d.h. alle Respirationen einer Probe incl. der Elektrodenmessung über alle Temperaturen.
- Umrechnung der Sauerstoffkonzentration der t_0 Probe in Sättigung (für Kontrollfragen)

Durchführung

1 Sauerstoffzehrung (kontinuierlich)

- Alle Proben werden kontinuierlich gemessen und brauchen keine weiteren Manipulationen.
- Jeder notiert in regelmäßigen Abständen von 10-15 min die Sauerstoffsättigung (und Temperatur) einer ausgewählten Probe (passend zu den Winklerproben).
- Die Sättigung wird mit einer Optode gemessen.

2 Respiration verschiedener Proben/Organismen in Abhängigkeit von der Temperatur (t_0 und t_x)

- Das gesamte Probenmaterial wurde in Sauerstoffflaschen zu Beginn des Praktikumstages gefüllt und unter den vier verschiedenen Temperaturen ca. 30-60 min (vor)inkubiert, damit die Proben temperiert sind und sich der Sauerstoff entsprechend gelöst (eingestellt) hat (Tab. 2).

Tab. 2 Probenübersicht und Zuordnung. Grau hinterlegt das Beispiel eines Probenpaares für eine(n) Student(en)/in

Probe/Temperatur	Hefe		Mikroalgen		Bakterien		Unterwasserpflanze	
5°C	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x
15°C	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x
20°C (Raumtemp.)	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x
30°C	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x	t_0	t_x
Optode	alle 15 min.		alle 15 min.		alle 15 min.		alle 15 min.	

- Jede(r) Student(in) wählt ein Probenpaar, fixiert SOFORT die t_0 Probe und trägt sich in die Liste ein. Zeitpunkt notieren. In einem dunklen Schrank aufbewahren. Achtung: Verschachtelt arbeiten! Die niedrigen Temperaturen beginnen, anschließend werden ca. die wärmeren Proben entnommen und fixiert.
- Danach gibt es noch eine mündliche Einführung. Fragen stellen!
- Für die Titration stehen ca. 4 (+1 Ersatz) Arbeitsplätze zur Verfügung. Bitte auf- und einteilen! Die Aufbewahrungsdauer der fixierten Proben ist ohne Einfluss auf den Sauerstoffgehalt.
- Inkubationsende nach ca. 2 h mit der Fixierung der t_x -Flaschen. Achtung: Wieder absprechen, verschachtelt arbeiten! Diesmal mit den höheren Temperaturen beginnen! D.h. kältere Proben mit geringer Respiration sollen die längste Inkubationsdauer haben. Die wärmsten Proben respirieren stärker und inkubieren entsprechend kürzer.
- Weitere Bearbeitung: Titration nach Ausfällung der Niederschläge (detaillierte Anleitung aller Arbeitsschritte 3.)

3 Messung der Sauerstoffkonzentration

- *Notieren der Sauerstoffflaschenvolumens.* Die Sauerstoffflaschen wurden luftblasenfrei mit Probenwasser und den Organismen gefüllt und verschlossen. Im Protokoll müssen Flaschennummer und vor allem das Flaschenvolumen vermerkt werden. Aus dem Volumen und der Sauerstoffmenge wird zum Schluss die Sauerstoff-Konzentration berechnet.
- *Fixierung des Sauerstoffs.* 1 ml Manganreagenz (Winkler I) und 1 ml alkalische Jodidlösung

- (Winkler II) mit für Winkler I und II jeweils unterschiedlichen Büretten oder Fortuna-Pipetten (Glas!) zugeben. Flasche erneut luftblasenfrei verschließen. Anschließend langsam aber gut schütteln (über Waschbecken). Fixierte Proben werden im Dunkeln (in einem Schrank) aufbewahrt. Nach Absetzen des Niederschlags kann Bestimmung fortgesetzt werden.
- *Ansäuern der Sauerstoffproben zur Titration.* Der braune Niederschlag muss abgesetzt sein, dann im Abzug 2 ml (für große Winklerflaschen) bzw. 1 ml (für kleine Winklerflaschen) H_2SO_4 zugeben (Schutzbrille tragen!), wobei ein Aufwirbeln des Niederschlages vermieden werden muss. Flaschen schließen und vorsichtig schütteln. Vorsicht: Stopfen dabei sichern! Nicht spritzen, sehr sauer! Ggf. etwas länger stehen lassen bis zur Lösung des Niederschlages.
 - *Titration.* Angesäuerte Probe vollständig in das Titriergefäß (Erlenmeyer-Weithalskolben) füllen. Dafür wird die Flasche nebst Stopfen einmal zügig mit etwa 20 ml Reinstwasser ausgespült. Danach sofort titrieren. Titration (zunächst schnell, später tropfenweise) mit 0,02 N Na-Thiosulfatlösung bis bräunliche Färbung fast verschwunden ist (strohgelb). Dann Zugabe von 1 ml Stärkelösung (Blaufärbung). Dann zügig und tropfenweise bis zum farblosen Endpunkt titrieren. Vorsichtig arbeiten, da Umschlagpunkt dann schnell eintritt. Den Verbrauch an Na-Thiosulfatlösung auf 1 Dezimalstelle genau notieren (nach ca. 20 Sekunden färbt sich die Probe wieder leicht blau; falls nicht, wurde „übertitriert“ – protokollieren!).
 - *Blindwert.* Ein Reagenzblindwert darf nicht vorhanden sein. Dies wird geprüft, indem etwa 45 ml dest. Wasser nacheinander unter Vermischung mit 1 ml 50%iger Schwefelsäure, 1 ml alkalischer Jodidlösung und 1 ml Mangan-Reagenz versetzt werden. Im verschlossenen Kolben darf nach Zugabe von Stärke in 5 Minuten keine oder nur eine ganz geringe Blaufärbung eintreten, die durch weniger als 1 Tropfen 0,02 N Na-Thiosulfatlösung entfärbt wird. (In diesem Praktikum nicht durchführen.)
 - *Titrationfaktor.* 10 ml 0,02 N Kaliumjodatlösung mit ca. 35 ml dest. Wasser, 2 ml 50 %iger Schwefelsäure und 1 ml alkalischer Jodidlösung versetzen, vorsichtig umschwenken, Jod scheidet aus, schnell ca. 9 ml Thiosulfatlösung zufügen, unter Umschwenken 3 Tropfen Stärkelösung zusetzen, bis zum Farbumschlag von blau nach farblos titrieren. Durch diese Verfahrensweise sollen Jodverluste vermieden werden. (Je Gruppe 1x bestimmen.)

4 Berechnung der Sauerstoffkonzentration

- nach folgender Gleichung (A):

$$(A) \quad O_2 \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{n \cdot f \cdot T \cdot 8000}{V_1 - V_2}$$

n Verbrauch an Na-Thiosulfatlösung (ml)

f Normalität der Na-Thiosulfatlösung (0,02 N)

T Titrationfaktor der Na-Thiosulfatlösung (siehe 5.)

8000 1ml 1N Na-Thiosulfatlösung ist äquivalent zu 8 mg O_2 . Volumenfaktor x 1000 für Flaschenvolumen in ml auf l

V_1 Volumen der O_2 -Flaschen (ml)

V_2 Gesamtvolumen der Zusätze von Winkler I und II (ml, hier also 2,0 ml)

- Fehler der Methode: 2-5%. Bei sehr genauem Arbeiten kann dieser auf 0,1% reduziert werden.

5 Ermittlung des Titrationfaktors T

- 10 ml der Kaliumjodatlösung werden mit etwa 35 ml dest. Wasser und 2 ml 50%iger Schwefelsäure vermischt.
- Mit 1 ml der alkalischen Jodidlösung (Winkler II) versetzen, wobei nach vorsichtigem Umschwenken

die Jodausscheidung erfolgt.

- Sofort mit 9 ml der 0,02 N Na-Thiosulfatlösung versetzen.
- Erst dann wird unter vorsichtigem Umschwenken und Zusatz von 1 ml Stärkelösung bis zum Farbumschlag von blau nach farblos titriert.
- Der Titrationsfaktor T wird wie folgt errechnet (B):

$$(B) \quad T = V3/V4$$

V3 Menge Kaliumjodatlösung (ml, hier also 10 ml)
V4 verbrauchte Menge Na-Thiosulfatlösung (ml).

- Der Ermittlung des Titrationsfaktors erfolgt täglich bei frisch angesetzter Na-Thiosulfatlösung.

6 Umrechnung von Konzentrationen in % Sättigung und umgekehrt

- Aus den Sauerstoffkonzentrationen kann die prozentuale Sauerstoffsättigung unter Berücksichtigung der von Temperatur und Luftdruck abhängenden Sättigungskonzentration (Tab. 1) berechnet werden (C). Beachten Sie die unterschiedlichen Einheiten (Umrechnen!).

$$(C) \text{ Sättigung [\%]} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ in Probe}}{\text{Sättigungskonzentration [\text{mg l}^{-1}]}} \cdot 100$$

- Mit Gleichung (D) die Sättigung der Elektrodenergebnisse in Konzentration umrechnen.
- Sättigungskonzentration passend zur Temperatur aus Tab. 1 entnehmen. In mg O₂ l⁻¹ umrechnen.

$$(D) \text{ Konzentration [\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}]} = \frac{\text{Sättigung(\%)} \text{ in Probe}}{100\%} \cdot \text{Sättigungskonzentration}(\text{mgO}_2 \text{ l}^{-1})$$

7 Berechnung der Respiration

- Nach Gleichung (E) die Respiration aus der Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Zeitintervall berechnen.

$$(E) \text{ Respiration [\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}]} = \frac{\text{O}_2 \text{ Konzentration}_x - \text{O}_2 \text{ Konzentration}_0 (\text{mgO}_2 \text{ l}^{-1})}{\Delta t(\text{h})}$$

- Aus den Sauerstoffkonzentrationen (alle 15 min) eine lineare Abnahme berechnen. Der mittleren Temperatur dieser Messung zuordnen. In die Gruppenergebnisse dieser Probe eintragen.
- Im 2. Diagramm (siehe 8.) kann für eine einfachere Diskussion auch der Betrag der Sauerstoffabnahme je Zeit (positiver Wert als Respiration) angegeben werden.

8 Auswertung

- Xy-Diagramm (nicht Liniendiagramm!) erstellen für die **Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit** (kontinuierliche Messung mit Elektrode). Die Linearität der Abnahme prüfen. Ggf. als (negativen) Anstieg berechnen. Einheit des Anstiegs beachten! In sinnvolle und passende Einheit umrechnen. =Respiration der Probe x bei Temperatur y
- Erstellen eines xy-Diagramms für die **Respiration** einer Probe **in Abhängigkeit von der Temperatur** aus dem Elektrodenergebnis, dem eigenen Messwert (Winkler) und den 3 weiteren Ergebnissen aus der Gruppe (Winkler).
- Geben Sie für 2 verschiedene 10K-Temperatursprünge die Erhöhung der Respiration an.

Kontrollaufgaben

1. Wie funktionieren Clark-Elektrode und Optode? Welchen Wert genau bestimmen sie?
2. Wovon wird die Sauerstoffsättigung in Wasser beeinflusst?
3. Ab welcher Untersättigung treten Schädigungen von Organismen auf und wie hoch können Übersättigungen werden? (1/3 Seite)
4. Wovon hängt die Respiration einer Art unter konstanten externen abiotischen Bedingungen ab? (1/3 Seite)
5. Was ist der Q_{10} Wert und wie kann man ihn abschätzen oder berechnen? (1/2 Seite)
6. Was ist der Respiratorische Quotient RQ? (2 Zeilen)

Anhang

Reagenzien

- Winkler I = Manganreagenz: 3 M $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ ($197,91 \text{ g mol}^{-1}$), d.h. 178,12 g mit dest. Wasser in 300 ml lösen. Reagenz ist nahezu unbegrenzt haltbar. Andere gut lösliche Mn-Salze, wie Chlorid, sind auch möglich.
- Winkler II = Alkalische Jodidlösung: 12,5 M NaOH ($40,0 \text{ g mol}^{-1}$) und 1,8 M KJ ($166,01 \text{ g mol}^{-1}$), d.h. 150 g NaOH + 90 g KJ mit dest. Wasser in 300 ml lösen. Reagenzien zunächst separat in wenig dest. Wasser lösen, dann mischen und auf 300 ml auffüllen. Sollte sich dabei oder einige Zeit später ein Niederschlag bilden, so wird die überstehende Lösung abdekantiert. Dunkel und kühl gelagert ist das Reagenz einige Monate haltbar.
- Schwefelsäure: 50%ige H_2SO_4 , d. h. 150 ml dest. Wasser und 150 ml konzentrierte H_2SO_4 gekühlt mischen, insgesamt 300 ml. Erst das Wasser, dann die Säure, sonst passiert das Ungeheure! Die Säure vorsichtig unter Rühren in das Wasser geben. Andere starke Säuren, wie Salz- oder Phosphorsäure, sind in entsprechend geringerer Verdünnung auch geeignet.
- Natriumthiosulfat-Lösung: 0,02 N Lösung ($248,21 \text{ g mol}^{-1}$): 4,96 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$ werden unter Zugabe von 10 ml Isobutanol in 1000 ml dest. Wasser gelöst.
- Kaliumjodat-Lösung: 0,00334 N Lösung ($214,00 \text{ g mol}^{-1}$), d. h. 0,14268 g KJO_3 , das zuvor 1 Stunde lang bei $130-150^\circ C$ getrocknet wurde, werden in 200 ml dest. Wasser gelöst. In einer dunklen Flasche kühl aufbewahrt, ist die Lösung 1 bis 2 Monate titerstabil.
- Stärkelösung: 1 g lösliche Stärke wird in 100 ml dest. Wasser unter Erwärmung gelöst. Im Kühlschrank aufbewahrt ist diese Lösung 5 bis 10 Tage haltbar.

Literatur

- Carritt, O.E. & Carpenter, J.H. (1966): Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in sea water. J. Mar. Res. 24: 286-318.
- Winkler, L.W. (1888): Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. Ber. dtsh. chem. Ges. 21:2843-2855.