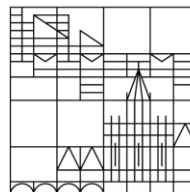

**Regulation der Photosynthese für die Stickstoff-Fixierung
in *Trichodesmium* – Regulation of Photosynthesis
for Nitrogen Fixation in *Trichodesmium***

**Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Biologie**

**vorgelegt von
Sven Seibert**

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Biologie

Tag der mündlichen Prüfung: 12. September 2012

1. Referent: Hendrik Küpper

2. Referent: Wolfram Welte

3. Referent: Wolfgang Bilger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen / Übersetzungen.....	4
1. Einleitung	5
1.1. Cyanobakterien als Modelsystem.....	5
1.1.1. Systematik von <i>Trichodesmium</i> spp.	5
1.1.2. Vorkommen von <i>Trichodesmium</i>	6
1.1.3. Struktur und Aufbau von <i>Trichodesmium</i>	7
1.1.4. Genom-Organisation von <i>Trichodesmium</i>	8
1.1.5. Kultivierbarkeit von <i>Trichodesmium</i> im Labor	9
1.1.6. Photosynthese von <i>Trichodesmium</i>	9
1.1.7. Photopigmente und Phycobilisomen in <i>Trichodesmium</i>	12
1.1.8. Stickstofffixierung von <i>Trichodesmium</i>	13
1.1.9. Probleme beim Arbeiten mit <i>Trichodesmium</i>	18
1.1.10. Vorteile beim Arbeiten mit <i>Trichodesmium</i>	20
1.2. Cyanobakterien unter Eisen-Mangelstress	21
1.2.1. Bedeutung des Eisens	21
1.2.2. Physiologie von Cyanobakterien unter Eisen-Stress	22
1.3. Cyanobakterien unter Licht-Stress	24
1.3.1. Licht und Cyanobakterien.....	24
1.3.2. Physiologie und Adaption von Cyanobakterien unter Licht-Stress.....	24
1.4. Aktivitätszustandsänderungen von <i>Trichodesmium</i>	27
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Kultivierung von <i>Trichodesmium</i>	31
2.1.1. Nährmedium und Kultivierungsbedingungen.....	31
2.1.2. Kultivierung als Batch-Kultur.....	31
2.1.3. Axenische Kultivierung von <i>Trichodesmium</i>	33
2.1.4. Kultivierung als Chemostat-Kultur.....	35
2.2. Messungen am Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskop	38
2.2.1. Vorbereitungen der Proben für die FKM-Messungen	38
2.2.2. Fluoreszenz-Kinetik-Messungen von ChlorophyllA auf Einzelzellebene.....	39
2.2.3. Räumlich aufgelöste („bildgebende“) Fluoreszenz-Kinetik-Parameter auf Einzelzellebene.....	40

2.2.4. Spektral aufgelöste Einzelzell-Fluoreszenz-Kinetik.....	42
2.3. Messung der Stickstofffixierung via Acetylen-Reduktion und Gas-Chromatographie	44
2.4. Analyse der primären und akzessorischen Photopigmente	45
2.4.1. <i>In vivo</i> -Absorptionsspektren einzelner Zellen	45
2.4.2. <i>In vivo</i> -Fluoreszenzspektren einzelner Zellen	45
2.4.3. HPLC von <i>Trichodesmium</i> -Extrakten zur Aufreinigung von Pigmentstandarts für das „Gaus-Peak-Fitting“	45
2.4.4. <i>In vitro</i> -Analyse der Photopigment-Komposition via Absorption von <i>Trichodesmium</i> -Extrakten und „Gauss-Peak-Fitting“	47
3. Ergebnisse	51
3.1. Eisen-Mangelstress bei <i>Trichodesmium</i>	51
3.1.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen bei blauem bzw. grünem Anregungslicht mit 20-facher Vergrößerung	51
3.1.2. Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen bei blauem Anregungslicht und 40-facher Vergrößerung.....	55
3.1.3. Verhältnis der variablen Fluoreszenz F_v , bzw. des Nicht-photochemischen Quenchings Q_{NP} zur Grundfluoreszenz F_0 einzelner Fe-Mangel-gestresster Zellen	58
3.1.4. Spektrale Eigenschaften von <i>Trichodesmium</i> in den verschiedenen Aktivitätszuständen	60
3.1.5. <i>In vivo</i> -Absorptionsspektren von <i>Trichodesmium</i> zu verschiedenen Tageszeiten	65
3.1.6. Analyse von <i>in vitro</i> -Absorptionsspektren mit der Gauss-Peak-Spektren Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Pigmentkomposition.....	69
3.1.7. Tageszyklus der Pigmentverteilung ungestresster <i>Trichodesmium</i> -Filamente	71
3.2. Starklicht-Stress bei <i>Trichodesmium</i> aus Batch-Kulturen.....	73
3.2.1. Grundfluoreszenz F_0 vitaler Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung.....	73
3.2.2. Grundfluoreszenz F_0 nicht-vitaler Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung	78
3.3. Starklicht-Stress bei <i>Trichodesmium</i> aus Chemostat-Kulturen.....	80
3.3.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung	80
3.3.2. Variable Fluoreszenz F_v einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung.....	85
3.3.3. Nicht-photochemisches Quenching Q_{NP} einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung	88

3.3.4. Spektral aufgelöste Kinetiken Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung	95
3.3.5. Messung der Stickstofffixierung via Acetylenreduktion und Gaschromatographie.....	101
3.3.6. <i>In vivo</i> -Absorptionsspektren Starklicht-gestresster Zellen	104
3.3.7. <i>In vitro</i> -Absorptionsspektren Starklicht-gestresster Zellen	108
3.3.8. Konzentrationsbestimmung der Photopigmentgruppen durch „Gauss-Peak-Fitting“ von <i>in vitro</i> -Absorptionsspektren	110
4. Diskussion	117
4.1. Tageszyklus der Stickstofffixierung Starklicht-gestresster Chemostat-Kulturen	117
4.2. Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskopie.....	119
4.2.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Batch-Zellen unter Fe-Mangel	119
4.2.2. ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Chemostat-Zellen unter Fe-Mangel	122
4.2.3. Fluoreszenzkinetikparameter einzelner Zellen unter Starklichtstress.....	126
4.3. Spektrale Eigenschaften	138
4.3.1. <i>In vivo</i> -Fluoreszenz und -Absorption von einzelnen ungestressten Zellen	138
4.3.2. <i>In vivo</i> -Fluoreszenz und -Absorption von einzelnen Zellen unter Fe-Mangel.....	141
4.3.3. <i>In vivo</i> -Absorptionsspektren von <i>Trichodesmium</i> unter Fe-Mangel- und Starklicht-Stress im Tagesverlauf.....	143
4.3.4. <i>In vitro</i> -Absorptionsspektren von <i>Trichodesmium</i>	149
4.3.5. Pigmentgehalt von <i>Trichodesmium</i> im Tagesverlauf	151
4.3.6. Pigmentgehalt von <i>Trichodesmium</i> im Tagesverlauf unter Starklicht-Stress.....	153
4.4. Axenische Kultivierung von <i>Trichodesmium</i>	159
5. Referenzen.....	160
6. Anhang	167
Zusammenfassung	167
Summary.....	169
Ergänzende Daten.....	171
Abbildungs- / Figurenverzeichnis	179
Danksagung	185
Addendum (nach mündlicher Prüfung hinzugefügt).....	186

Abkürzungen / Übersetzungen

APC	Allophycocyanin
Car	Karotinoide
ChlA	Chlorophyll <i>a</i> ; auch Mg-ChlA
Fe	Eisen
FKM	Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskop
g	Beschleunigung der Erdanziehung [$1g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$]
H ₂ O	Wasser
„HL“	„High Light“; unter Starklicht-Stress ($830 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) kultivierte Zellen
LED	„light emitting diode“; Licht-emittierende Diode
LHC II	„light harvesting complex“; Lichtsammelantenne in Chlorophyta
„LL“	„Low Light“; unter normaler Belichtung ($300 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) kultivierte Zellen; Niedriglicht-Kultur dient als Kontrolle zur Starklicht-gestressten Kultur.
μE	$\mu\text{Einstein}$; Einheit der Lichtintensität, auch $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
N-	Stickstoff-
N ₂	Molekularer Stickstoff, gasförmig
O ₂	Molekularer Sauerstoff
OD ₇₅₀	Optische Dichte bei 750 nm
PBP(s)	Phycobiliprotein(e)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung zum Lösen von PBPs
PC	Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
PheA	Pheophytin <i>a</i>
PS	Photosystem
PS II-RC	PS II-Reaktionszentrum
PUB	Phycourobilin
„Q“	Verhältnis $\text{Peakgröße}_{675 \text{ nm}} / \text{Peakgröße}_{575 \text{ nm}}$
λ	Lambda; Wellenlänge des Lichts

1. Einleitung

1.1. Cyanobakterien als Modelsystem

Der hier untersuchte Organismus *Trichodesmium erythraeum* (Stamm IMS101) ist ein Cyanobakterium der Gattung *Oscillatoria*. Cyanobakterien spielen in den Meeren der Welt eine entscheidende Rolle. Sie sind in der Lage den im Wasser gelösten molekularen Stickstoff (N_2) zu fixieren, d.h. für den eigenen weiteren Stoffwechsel verwertbar zu machen und ihn somit auch für höhere Organismen zur Verfügung zu stellen (Capone, Zehr *et al.* 1977; Capone and Carpenter 1982; Capone, O'Neil J *et al.* 1990; Capone, Ferrier *et al.* 1994; Capone 2001; Capone, Burns *et al.* 2005; Westberry and Siegel 2006).

Unter N-Fixierung versteht man allgemein jegliche Umwandlung des chemisch inerten, molekularen Stickstoffs (N_2 , Dinitrogen), zu reduzierten Verbindungen (wie hier z.B.: NH_4^+ = Ammonium). Ammonium ist deutlich reaktiver als molekularer N_2 und vor allem „bioverfügbar“, d.h. er ist für heterotrophe, nicht diazotrophe Organismen metabolisierbar. Der Prozess der N-Fixierung ist aufgrund der sehr stabilen Dreifachbindung des molekularen Stickstoffs (N_2) mit 946 kJ pro Mol äußerst energieaufwändig. Dadurch entstehen viele symbiontische Lebensgemeinschaften, in denen Cyanobakterien den fixierten N heterotrophen Organismen zur Proteinbiosynthese und zum Aufbau anderer N-haltiger Verbindungen bereitstellen, und im Gegenzug durch oxygene Photosynthese hergestellte Kohlenstoffverbindungen als Energiequelle für die N-Fixierung und ihr eigenes Wachstum erhalten. Als diazotropher Organismus spielt *Trichodesmium* eine wichtige Rolle im marinen N-Kreislauf. Es fixiert atmosphärischen N und stellt diesen somit als Grundbaustein des Lebens für die DNA-Synthese und Proteinbiosynthese bereit. (Carpenter and Romans 1991; Postgate 1998) (Capone, Zehr *et al.* 1977; Westberry and Siegel 2006)

1.1.1. Systematik von *Trichodesmium* spp.

Im Reich der Bakterien gehört die Art *Trichodesmium* spp. zum Stamm der Cyanobakterien. Diese maritim lebende filamentöse „Blualge“ gehört zur 2. Ordnung der Oscillatoriales, die zwar von anderen Cyanobakterien morphologisch abweichende Endzellen der Filamente aufweisen, jedoch keine differenzierten Zellen nach Art der Heterozysten. Das Wachstum erfolgt interkalar, die Vermehrung durch Hormogonien. Die Gattung ist *Oscillatoria* (Familie: *Oscillatoriaceae*). Weitere Gattungen sind *Phormidium*, *Schizothrix*, *Spirulina*, *Plectonema* und *Lyngbya*. (Bresinsky 2008). Unterarten sind *T. erythraeum*, *T. contortum*, *T.*

hildebrandtii, *T. tenue*, *T. havanum*, *T. pelagicum* und *T. thiebautii*. (Urania Pflanzenreich 1997).

1.1.2. Vorkommen von *Trichodesmium*

Trichodesmium wurde schon im Jahr 1770 von Captain Cook beschrieben. Es kommt in allen nährstoffarmen, tropischen und subtropischen Ozeanen vor, wie zum Beispiel an den Küsten von Florida und Israel oder um die Bahamas. *Trichodesmium* ist in der Lage, sehr große zusammenhängende Teppiche, frei umhertreibend an der Wasseroberfläche zu bilden, die eine Ausdehnung von über 100.000 km² erreichen können (Carpenter and Romans 1991; Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001; Zehr, Waterbury *et al.* 2001; Karl 2002).

Fig. 1.1.2.1



Figur 1.1.2.1: *Trichodesmium*-Blüte als Teppich an der Meeresoberfläche (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001).

1.1.3. Struktur und Aufbau von *Trichodesmium*

Fig. 1.1.3.1



Figur: 1.1.3.1: Bild links von Pernilla Lundgren (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001) zeigt *Trichodesmium*-Filamente, die in den Kolonieförmigen der kugelförmigen „Puffs“ und der bündelförmigen „Tufts“ organisiert sind. Das mittlere Bild zeigt eine im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Lichtmikroskopaufnahme (20-fache Vergrößerung) einer, in Agarose eingebetteten, *Trichodesmium*-Probe; das rechte Bild (40-fach vergrößert) zeigt die Mitte eines Filaments aus dem mittleren Bild.

Trichodesmium ist ein filamentöses, gram negatives Cyanobakterium mit einer inneren und einer äußerer Membran. Die innere Membran ist ins Lumen der Zelle zu Tylakoidmembranen eingeschnürt, bzw. organisiert, an denen die Photosynthese stattfindet. Die einzelnen, aus 20 - 200 Zellen (vital) bestehenden Filamente nennt man Trichome. Geitler *et al.* beobachtete ferner das die Enden der Trichome in den Kolonieförmigen niemals gekrümmt sind.

Trichodesmium kommt von der Wasseroberfläche bis in Tiefen von 50m vor (Van Baalen and Brown 1969; Chang, Chiang *et al.* 2000). Es ist in der Lage verschiedene Kolonieförmigen auszubilden. Capone beschreibt zwei Ausprägungen von *Trichodesmium*: Die kugelförmigen „Puffs“, sowie die bündelförmigen „Tufts“. Sie bestehen aus einigen zehn bis hundert Trichomen (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001) (Capone and Carpenter 1982). Beide Kolonieförmigen bilden die in Kapitel 1.1.2. näher beschriebene rötlich gefärbte *Trichodesmium*-Blüte aus, die als weite, mehrere cm dicke Teppiche auf der Wasseroberfläche treiben. Das Rote Meer soll ihr seinen Namen verdanken.

Die *Trichodesmium*-Blüte ist außerdem Lebensraum für viele andere Organismen. Es wurden kokkale und stäbchenförmige Bakterien beschrieben, die den Schleim zwischen den Trichomen-, sowie die Trichome selbst besiedeln (Nausch 1996). In Zehr (Zehr, Mellon *et al.* 1995) wurden diese adhärenenten Bakterien meist als Flavobakterien charakterisiert. Man kann annehmen, dass *Trichodesmium* eine Art „maritimen Wald“ und somit ein eigenes Biotop mit vielen symbiontisch lebenden Organismen bildet.

Die TEP („transparent exopolymeric particles“) werden korrelierend mit dem Zusammenbruch der Blüte produziert (Berman-Frank, Rosenberg *et al.* 2007). Sie sind eine Quelle für die Sedimentation von Biomasse mit wichtigen Spurenelementen und für das biochemische „Recycling“, als Nahrung für andere Protozoen, sowie Copepods und Tunicaten (Capone, Zehr *et al.* 1977; Westberry and Siegel 2006).

Nach der Endosymbionten-Theorie waren die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien Vorläufer der Chloroplasten von grünen Pflanzen. Dafür spricht sowohl die übereinstimmende Zellanatomie, als auch ein Satz sich deckender biochemischer Merkmale, durch den sich die Cyanobakterien, gleich den Chloroplasten, von den Eigenschaften der Eukaryontenzellen unterscheiden (Margulis 1975; Woese 1977).

Cyanobakterien können ein- bis mehrzellig sein. Bei mehrzelligen Cyanobakterien ist die Anordnung der Zellen hintereinander in langen Fäden (zum Beispiel *Anabaena* und *Oscillatoria*), flächig (zum Beispiel *Merismopedia*) oder räumlich (zum Beispiel *Pleurocapsa* oder *Microcystis*) organisiert.

1.1.4. Genom-Organisation von *Trichodesmium*

Das komplette Genom wurde vom Joint Genome Institute sequenziert. Das Ringchromosom besteht aus 7.750.108 Basenpaaren. Analysen des Genoms haben ergeben, dass 63,83% der DNA durch Gene kodiert sind. Der G-C Gehalt des Genoms liegt bei 34%. Die Gen-Sequenzen der Nitrogenasen von *T. erythraeum* und *T. thiebautii* zeigen 98% Homologie zueinander auf (Zehr, Mellon *et al.* 1995; Sroga, Landegren *et al.* 1996; Zehr, Harris *et al.* 1997). Dieser hohe Grad der Konservierung unterstreicht die zentrale Rolle der Nitrogenase, bzw. der N-Fixierung, in beiden Arten. Die relativ geringe Ähnlichkeit (ca. 75%) des sequenzierten Genoms im Vergleich mit anderen Cyanobakterien ist ein Hinweis, dass sich *Trichodesmium* schon relativ früh evolutiv abgespalten hat. 16S rDNA-Sequenzanalysen von *T. erythraeum* zeigten höchsten Verwandtschaftsgrad zur Gattung *Oscillatoria* (Capone and Carpenter 1982). Interessant ist, dass bisher keine spezifische Funktion der Plasmid-DNA in *Trichodesmium erythraeum* gefunden wurde (Stanley Falkow, Eugene Rosenberg *et al.* 2006).

1.1.5. Kultivierbarkeit von *Trichodesmium* im Labor

Die axenische Kultivierung von *Trichodesmium* im Labor ist mit Schwierigkeiten verbunden. Rammamurthy hatte bereits mit Antibiotikarezepturen experimentiert um das störende mikrobielle Wachstum in kontaminierten *Trichodesmium*-Proben zu vermindern (Rammamurthy 1970). Er verwendete in seiner Arbeit modifiziertes Erdschreiber-Medium (Schreiber 1927) als Meerwasserersatz.

In (Paerl and Bebout 1988) wurden physiologische Studien durch Schwierigkeiten beim aktiven Wachstum von *Trichodesmium* verhindert. Vorherige Erfolge bei der Kultivierung konnten nicht wiederholt werden. Trotz allem beschrieb die Arbeit eine Wachstumsrate von 0,23 Teilungen pro Tag, sowie allgemein eine lichtabhängige N₂-Fixierungsrate in der exponentiellen Wachstumsphase.

In einer Studie von Foster (Foster, Subramaniam *et al.* 2009) wurde unter Laborbedingungen („low light“ = Schwachlicht), im Vergleich zum Wildfang („high light“ = Starklicht), Abweichungen unter den jeweiligen Absorptionsspektren ersichtlich. Dies wird, durch die Phycourobilin/ Phycocerythrin (PUB/PE)-Änderung, als Anpassung an verschiedene Meerestiefen erklärt. Das Phycobiliprotein PUB scheint in dem Fall auch Schutzfunktionen gegen zu viel Licht übernehmen zu können.

1.1.6. Photosynthese von *Trichodesmium*

Die Photosynthese der Cyanobakterien findet an, bzw. in deren Tylakoidmembranen, statt. Dort läuft sie, ähnlich wie in den Tylakoiden der Chloroplasten eukaryotischer Algen, Moose, Farne und Samenpflanzen ab. Cyanobakterien nutzen nicht nur den Teil des Lichtspektrums, den auch andere grüne Pflanzen verwenden, sondern sie haben neben ChlA einen zusätzlichen Antennenkomplex in Form von Phycobilisomen, in denen die Protein-gekoppelten Phycobiline Phycourobilin (PUB) , Phycocerythrin (PE), Phycocyanin (PC) und Allo-Phycocyanin (APC) enthalten sind (MacColl 1998). Da das Verhältnis der einzelnen Pigmente zueinander stark schwanken kann, erscheinen Cyanobakterien in den verschiedensten Farben mitunter auch grün und schwarz (siehe Fig 1.1.7.1). Annette Hynes fand im Rahmen ihrer Doktorarbeit heraus, dass sich die 6 *Trichodesmium*-Arten anhand ihrer Pigmentkomposition (Farbe) und DNA-Homologien in zwei Gruppen unterteilen (Hynes 1998).

Fig. 1.1.7.1

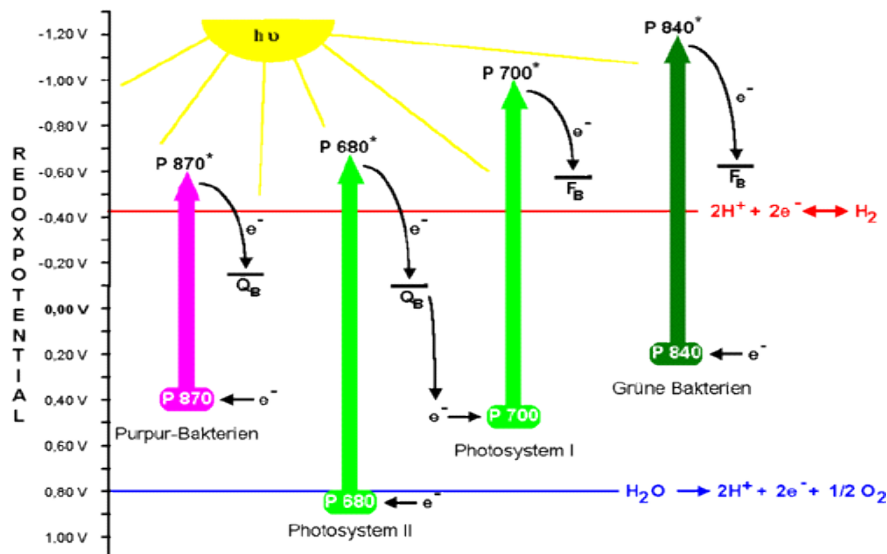


Figur: 1.1.7.1: Mögliche Erscheinungen der Pigmentkomposition verschiedener *Trichodesmium*-Kulturen (Bild von Annette Hynes, Woods Hole Oceanographic Institution).

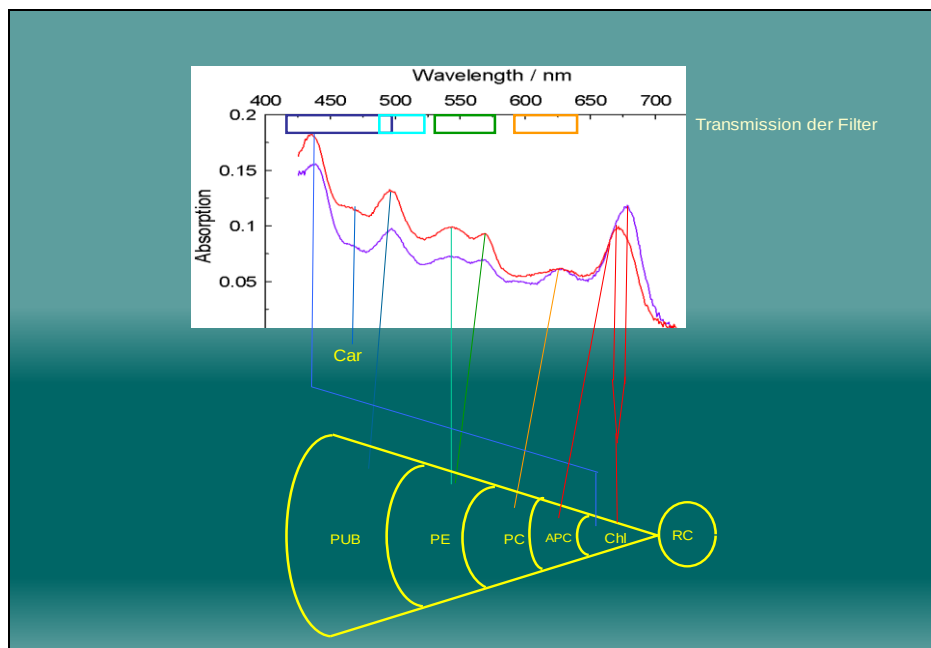
Prof. Dr. Röbbe Wünschiers (Wünschiers, Senger *et al.* 2001) beschreibt als Reduktionskraft die Fähigkeit einer Verbindung Elektronen zur Reduktion eines Akzeptormoleküls abzugeben. Als Maß für die Reduktionskraft einer Verbindung wird ihr Redoxpotential (Einheit: Volt) herangezogen. Unter Freisetzung von Energie folgen Elektronen einem Potentialgefälle von Verbindungen mit hoher-, zu Verbindungen mit geringerer Reduktionskraft. Zur Erhöhung der Reduktionskraft ist dagegen Energie notwendig. Sie muss beispielsweise in den Reaktionszentren der Photosysteme durch die Umwandlung von Lichtenergie aufgebracht werden (siehe Fig. 1.1.7.2). Bei Cyanobakterien sind zwei Photosysteme in Reihe geschaltet. Das Photosystem II (PS II oder P680) oxidiert nach der Lichtabsorption Wasser. Es kommt dabei zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff, weshalb man bei diesem Vorgang auch von oxygener Photosynthese spricht (Field, Behrenfeld *et al.* 1998).

Fig. 1.1.7.2

a)



b)



Figur 1.1.7.2: Unter a): Schematische Darstellung der photosynthetischen Lichtreaktionen bei Purpur-Bakterien (violett), Cyanobakterien, Algen und Höheren Pflanzen (hellgrün) und Grünen Bakterien (dunkelgrün). $h\nu$: Lichtenergie; P: Reaktionszentren der Photosysteme; QB: Chinon; FB: Fe-Schwefel-Protein; e^- : Elektronentransfer (Wunschiers, Senger *et al.* 2001). Unter b) sind die Peaks der Absorptionsspektren (rot und blau) zweier beliebiger *Trichodesmium*-Kulturen, den einzelnen Komponenten des Pycobilisomen-ChlA-Komplexes bzw. den Karotinoiden (gelb) zugeordnet. Zur Anregung mit verschiedenen Lichtfarben sind die Wellenlängenbereiche der Transmissionsfiltersets des Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskop (FKM) gezeigt.

1.1.7. Photopigmente und Phycobilisomen in *Trichodesmium*

Trichodesmium besitzt, wie die meisten Cyanobakterien, im Gegensatz zu den höheren Pflanzen und Algen nur Chlorophyll *a* („ChlA“), als zentrales, photosynthetisch aktives Pigment. Es befindet sich hauptsächlich in den Reaktionszentren. *Trichodesmium* ist dafür in der Lage, die Grünücke des Lichts (400 – 500 nm), d.h. den Absorptionsbereich zwischen den beiden Hauptpeaks von ChlA, effizient zur Energiegewinnung zu nutzen. Hierfür steht eine Reihe von Photopigmenten zur Verfügung. Zum einen absorbieren die Karotinoide in diesem Wellenlängenbereich. Sie dienen als Lichtschutzpigmente (mehr im Kapitel 1.3.2.).

Zum anderen gibt es die Phycobiline. Das sind Pigmente aus offenkettigen Tetrapyrrolen. Über Thioetherverbindungen an Cysteinreste der Apoproteine kovalent zu Phycobilliproteinen (PBPs) gebunden, bilden vier bestimmte speziell hintereinander geschaltet eine Art Lichtsammelantenne, den Komplex der Phycobilisomen aus. Schon 1974 wurden die PBPs in *Trichodesmium* von Fujita und Shimura untersucht. Im kurzwelligen Bereich zwischen 485 und 520 nm absorbiert PUB das Licht (im Maximum bei ca. 495 nm), und transferiert die aufgenommene Energie an PE weiter. PE (hat Kupfer als zentrales Atom in der chromophoren Gruppe) absorbiert Licht (hauptsächlich mit seinen beiden dominierenden Absorptionspeaks bei ca. 545-, bzw. 565 nm) im Wellenlängenbereich zwischen 520 und 580 nm. Sidler fand heraus, dass PUB eine modifizierte Form von PE ist (Ducret, Sidler *et al.* 1994).

PE ist der häufigste Bestandteil der Phycobilisomen. Daher rührt auch die gelblich braune bis tiefrote Färbung von *Trichodesmium*. Die Effizienz der Lichtverwertung von PE ist sogar größer als die von ChlA. Cyanobakterien können auf diese Weise ausgesprochene Schwachlichtbereiche erfolgreich besiedeln, wie z.B. die Unterseite von Flussgeröll oder tiefe Schichten in Seen.

Das nächste PBP „downstream“ in der Lichtsammelantenne, welches die Energie von PE aufnimmt ist das, so genannte PC. PC absorbiert Licht im Bereich von 590 – 640 nm im Maximum bei ca. 630 nm.

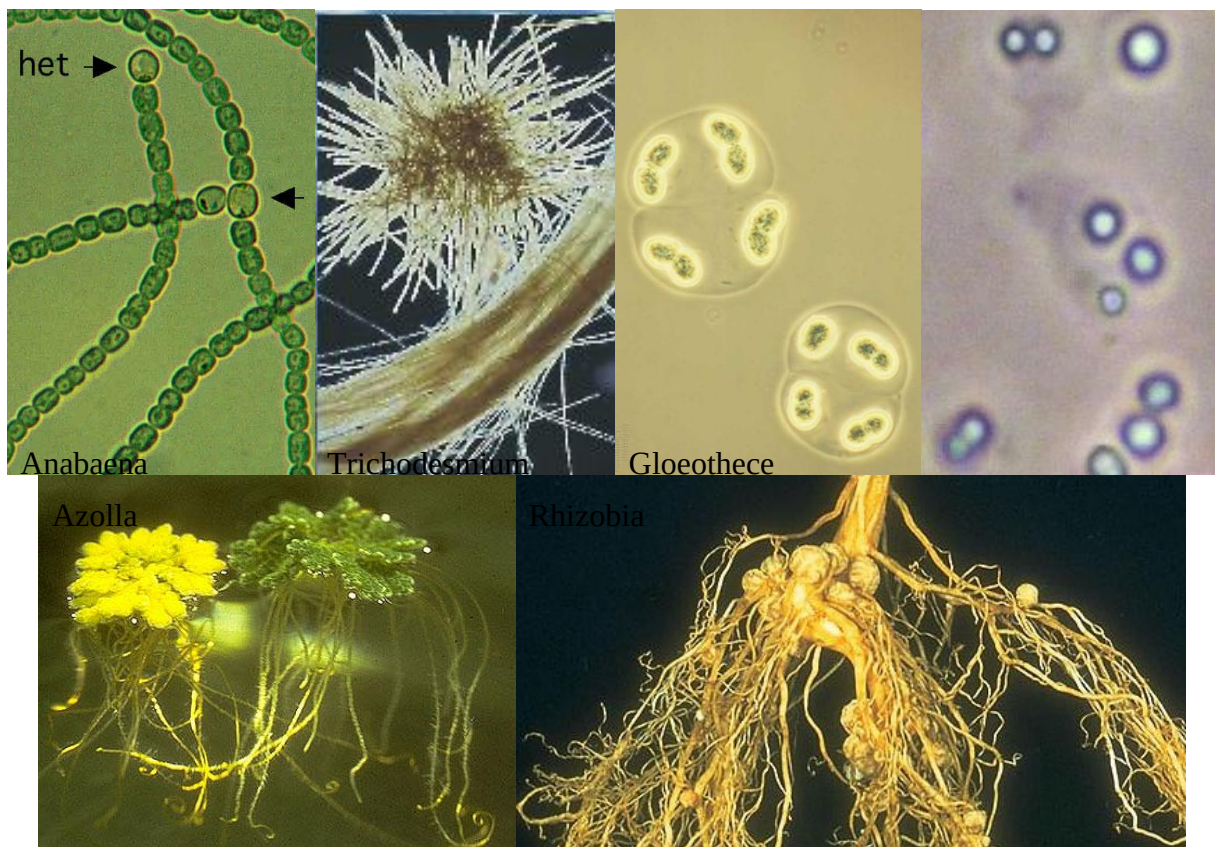
Das letzte PBP in der Antenne, was auch als „core“ (Kern, oder Basis der Phycobilisomen) bezeichnet wird ist APC. Sein Absorptionsmaximum liegt bei ca. 650 nm (rot-orange) und somit schon teilweise im Absorptionsbereich des Rotlicht-absorbierenden Peak von ChlA. APC hat außerdem noch wichtige Linkerfunktion. Es steht in Kontakt mit den Basalplatten, die die Antenne mit dem Reaktionszentrum verbinden. Es verbindet also die Phycobilisomen mit dem Chlorophyll der Thylakoidmembranen und transferiert somit die gesammelte

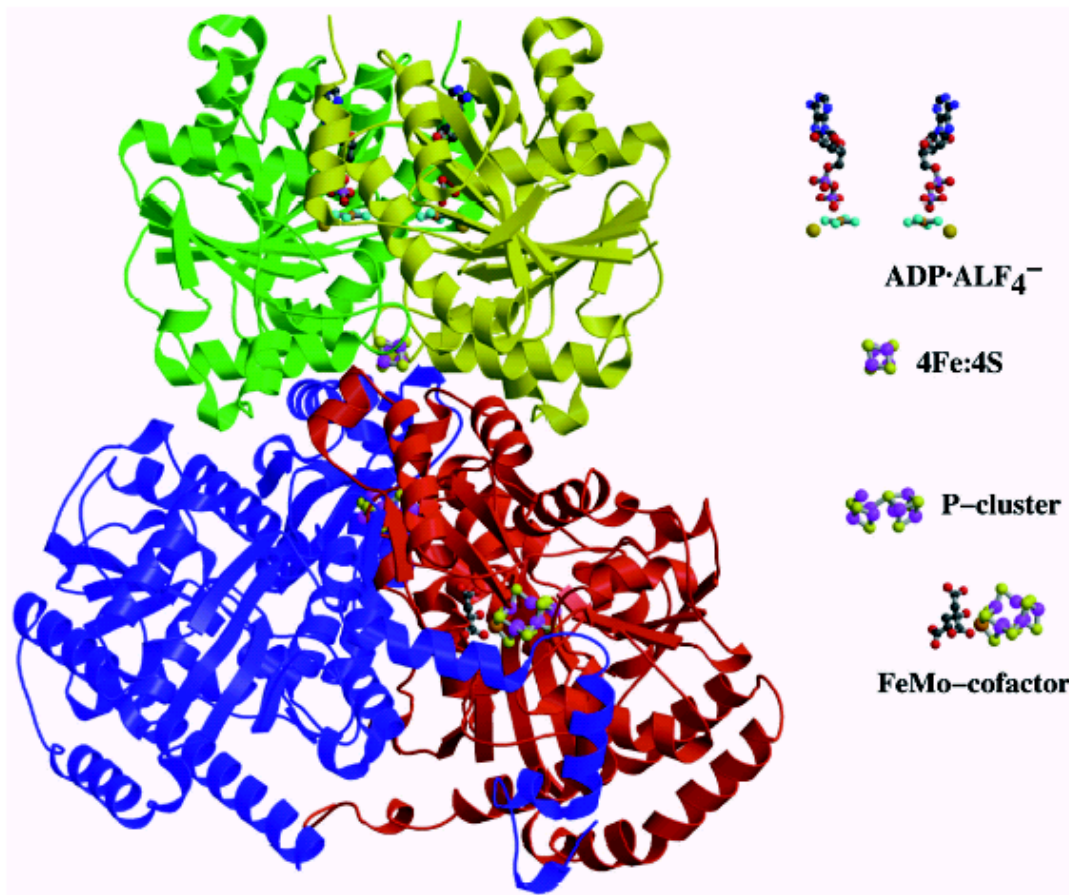
Lichtenergie der Grün-Lücke zu den Reaktionszentren (hauptsächlich PS II), um dort letztlich die Photosynthese zu unterstützen. Der Energietransfer bzw. die Verteilung innerhalb solcher Phycobilisomen-Chlorophyll-RC-Systeme in Bezug auf die Aktivitätszustandsänderungen wurde bereits von Biggins diskutiert (Biggins and Bruce 1989).

In Küpper (Kupper, Seibert *et al.* 2007) sind die Spektren aller Lichtsammelpigmente von *Trichodesmium*, sowie deren wichtigste Isomer-Formen und Abbauprodukte aufgeführt. Andere Arbeiten wie von Ogawa (Ogawa, Obata *et al.* 1966) oder Proufert-Bebout (Proufert-Bebout, Paerl *et al.* 1993) geben weiteren Aufschluss über das Verständnis der Pigmente von *Trichodesmium*. Capone (Capone 2001) stellte sogar die Hypothese auf, dass PBPs, aufgrund ihres hohen Gehalts-, auch als Vorratsreservoir für N dienen können.

1.1.8. Stickstofffixierung von *Trichodesmium*

Fig. 1.1.8.1





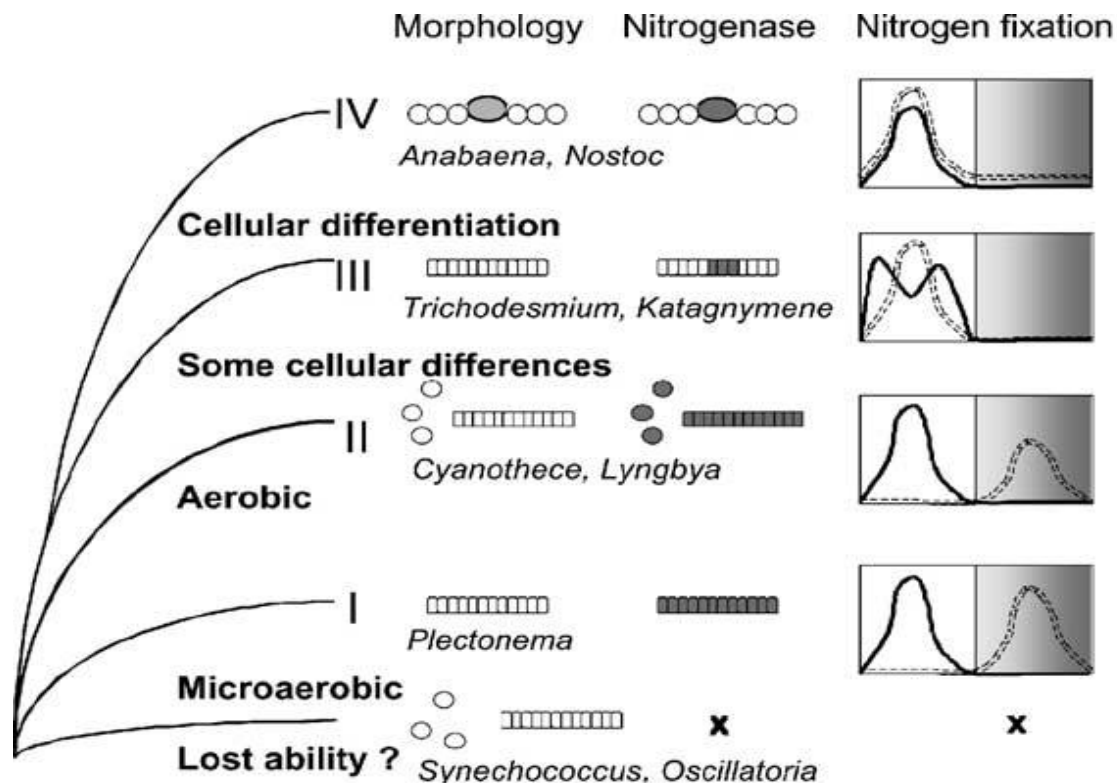
Figur 1.1.8.1: Der obere Teil zeigt verschiedene N₂-fixierende Organismen (aus Culture service of Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla, Spain) wie beispielsweise die Knöllchenbakterien (Rhizobia, Mitte rechts) oder Azolla (Mitte links). Cyanobakterien besitzen das Enzym Nitrogenase, jenes N₂-fixierende Schlüsselenzym, welches im unteren Teil der Figur als 3D-Elektronendichte-Modell schematisch dargestellt ist (Zehr, Wyman *et al.* 1993; Zehr, Harris *et al.* 1997).

Das Schlüsselenzym für die Fixierung des N ist die Nitrogenase, ein stark Fe-haltiger Proteinkomplex, dessen katalytische Funktion bei Kontakt zu molekularem Sauerstoff (O₂) irreversibel inhibiert ist. (Durner, Bohm *et al.* 1996; Postgate 1998)

Diazotrophe Cyanobakterien sind die einzigen Organismen die N-Fixierung und Photosynthese betreiben. Sie haben es also geschafft verschiedene Strategien (wie räumliche-, zeitliche Trennung (Chen, Dominic *et al.* 1999), oder Atmungsratenmodulation (Kana 1993)) zu entwickeln um die Nitrogenase vor den anfallenden Sauerstoff der oxygenen Photosynthese zu beschützen. (Gallon 1992; Carpenter and Roenneberg 1995; Bergman, Gallon JR *et al.* 1997; Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2003; Kupper, Ferimazova *et al.* 2004)

Trichodesmium-vermittelte N-Fixierung hat sehr großen Anteil an der weltweiten Gesamtproduktion bzw. dem Neueitrag von gebundenen Stickstoff in den tropischen und subtropischen Meeren (Capone, Zehr *et al.* 1977; Westberry and Siegel 2006).

Fig. 1.1.8.2



Figur 1.1.8.2: Schematische Einteilung der Nitrogenaseaktivität von Cyanobakterien nach Art der morphologischen Spezialisierung, nach Lokalisation im Zellverband, sowie nach Zeiträumen (Misra and Mahajan 2000; Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2003).

Die meisten Cyanobakterien wie *Cyanothece* fixieren N in der Nacht (hauptsächlich bei einzelligen Cyanobakterien). Da ohne Licht keine Photosynthese möglich ist, bzw. nur Sauerstoff veratmet werden kann, ist die interne Sauerstoffkonzentration gering genug, sodass die Nitrogenase ungehemmt arbeiten kann (Misra and Mahajan 2000).

Andere Arten der filamentösen Cyanobakterien wie zum Beispiel *Anabaena* haben spezielle Zellen entwickelt, in denen der Sauerstoff-bildende Teil der Photosynthese (PS II) herunter reguliert wird - die sogenannten Heterozysten. Diese Zellen werden gebildet sobald gebundener N (Nitrat, Ammonium) in der Umgebung fehlt und besitzen eine andere Morphologie als ihre photosynthetisch aktiven Nachbarzellen. Etwa jede zehnte vegetative Zelle eines Filaments wird in einem 10- bis 15-stündigen Entwicklungsprogramm irreversibel ausdifferenziert. Unter dem Mikroskop fallen diese, oft auch etwas größeren Zellen, durch ihre verdickte Zellwand und die hellgrüne bis fast gelblich-transparente Erscheinung auf. Am Ende des Zelldifferenzierungsprogramms der Heterozysten steht die Expression eines zelltypspezifischen N-Fixierungssystems (entwicklungsgesteuertes Nif1-System). In diesen nun spezialisierten Zellen werden ausschließlich die organischen N-Verbindungen aus

molekularem N für alle anderen Zellen des gesamten Filaments synthetisiert (Zahalak, Pratte *et al.* 2004; Masukawa, Zhang *et al.* 2009).

In vegetativen Zellen mancher Cyanobakterien kann zudem (schon nach circa zwei Stunden) ein eigenes N-Fixierungssystem angeschaltet werden. Dieses sogenannte Nif2 System läuft jedoch nur in Abwesenheit von gebundenem N und elementarem Sauerstoff ab (Kumar, Mella-Herrera *et al.* ; Adams 2000).

Trichodesmium erkennt man unter dem Lichtmikroskop hauptsächlich als einen einheitlichen Zelltyp. Immunolokalisation der Nitrogenase zeigt eine gleichmäßige Verteilung in weiten Zellenbereichen der Trichome (Lin, Henze *et al.* 1998). Über Gas-Chromatographie der Acetylen-Reduktion gemessene N₂-Fixierungsraten von *Trichodesmium* weisen auf eine Lichtintensität-abhängige N₂-Fixierung hin (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001). Weitere Studien zeigen das sich in solchen Zellen in der diazotrophen Phase photosynthetisch aktive Komponenten (wie z.B.: PS I; PS II; Rubisco und Carboxysomen) befinden (Janson, Carpenter *et al.* 1994; Fredriksson and Bergman 1997).

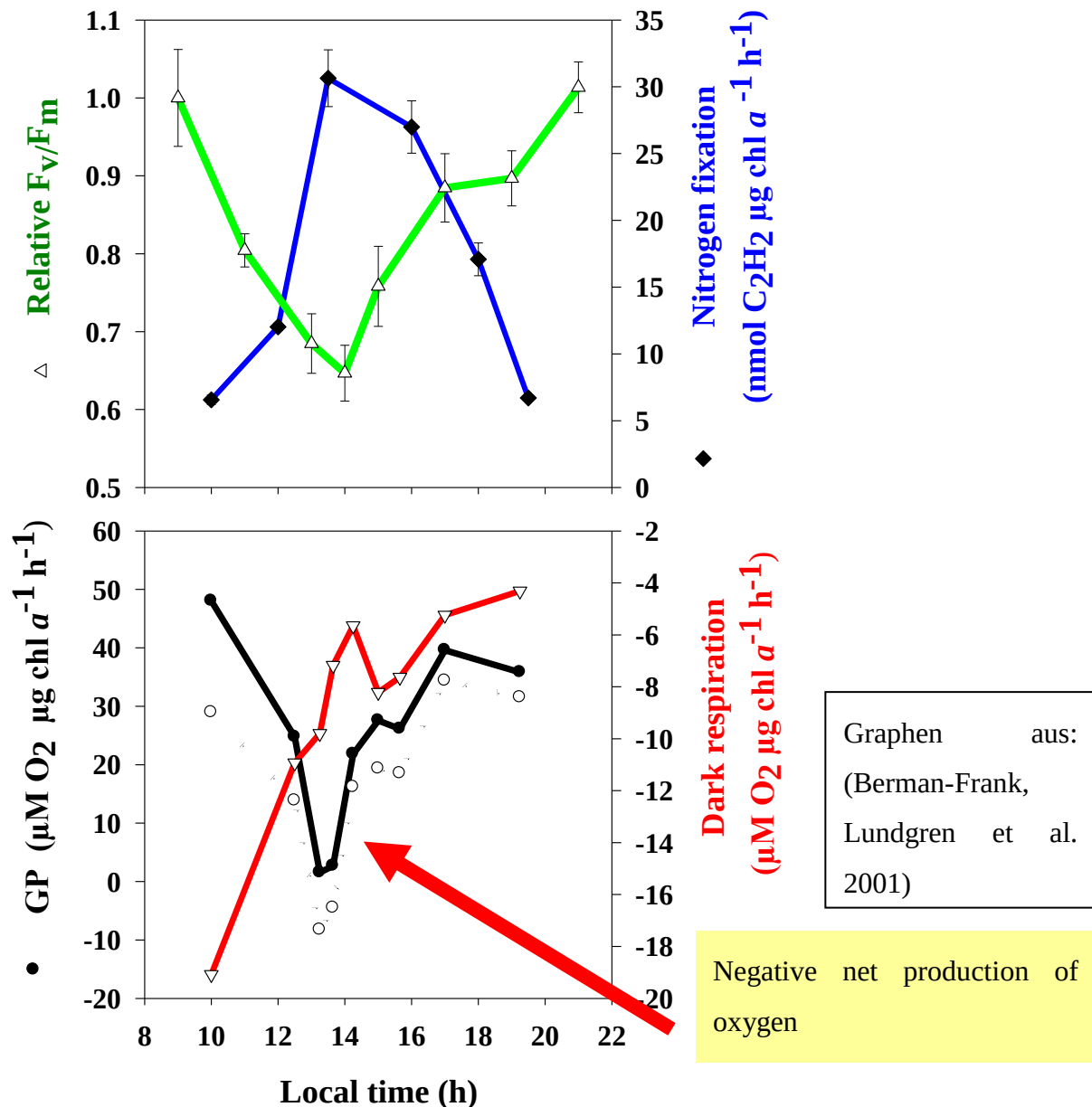
Maximale N-Fixierungsraten erscheinen in der Mitte des Tages, wenn das stärkste Kultivierungslicht vorhanden ist. Da auch der Gen-Abschnitt für die Nitrogenase wie bei allen Cyanobakterien hoch konserviert und homolog ist, muss es andere Mechanismen geben als eine spezielle, nicht Sauerstoff-sensitive Nitrogenase (Zehr, Wyman *et al.* 1993; Sroga, Landegren *et al.* 1996; Zehr, Harris *et al.* 1997), welche in Anwesenheit des anfallenden, molekularen Sauerstoffs zuverlässig N₂-Fixierung vermittelt.

Im Zuge vorangeschrittener Experimente wurde ein lichtabhängiger, DCMU sensibler O₂ – Verbrauch durch die Mehler Reaktion (Kana 1993), sowie eine ungewöhnlich hohe Dunkel-Atmungsrate während des Tages beobachtet (Kana 1993) (Carpenter and Roenneberg 1995; Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001). Die erhöhte Atmungsrate wurde über den zyklischen Elektronentransport vermittelt. Sie war besonders stark um die Mittagszeit erhöht, sodass in Kombination mit weiteren Anpassungen zur internen O₂-Reduzierung eine negative Netto-O₂-Bilanz erreicht werden könnte, die möglicherweise ein Zeitfenster für die ungehemmte Aktivität der Nitrogenase öffnet. Carpenter vermutete, dass es noch andere intrazelluläre Mechanismen neben der hohen Atmungsrate geben muss, um die Nitrogenase vor molekularem Sauerstoff zu schützen (Carpenter and Romans 1991). Ein optionaler Mechanismus zur Verminderung der O₂-Produktion wäre, wie in unserem Fall, die Regulierung der Energieversorgung auf Ebene der Phycobilisomen-Kopplung bzw. der Dissoziation der PBPs von den RCs. Immunolokalisationsversuche zeigten unterstützend,

dass die Nitrogenase nicht ganz gleichzeitig in allen Zellen eines Trichoms expremiert wird. Dieser Befund weist auf eine teilweise Differenzierung der Zellen, bei der N-Fixierungsstrategie von *Trichodesmium* hin (Lin, Henze *et al.* 1998).

Verschiedene Untersuchungen der Chlorophyll-Fluoreszenz von Cyanobakterien haben zur Entdeckung und zum Verständnis der verschiedensten Aktivitätszyklen des Tages geführt (Meunier, Colon-Lopez *et al.* 1997; Meunier, Colon-Lopez *et al.* 1998; Sherman, Meunier *et al.* 1998; Behrenfeld and Kolber 1999; Misra and Tuli 2000). Weitere umfassende Erkenntnisse über die Unterschiede bei der FKM-Messung von Cyanobakterien (mit PBPs) zu grünen Pflanzen und Algen (mit LHC II) wurden detaillierter von Campbell dargestellt (Campbell, Hurry *et al.* 1998). Eine putative tageszyklische Entkopplung von Phycobilisomenuntereinheiten bleibt mit diesem Hintergrund durchaus plausibel und theoretisch experimentell messbar.

Fig. 1.1.8.3



Figur 1.1.8.3: Oben ist relativ die Photosyntheseaktivität von ChlA (PS II) durch den Parameter der F_v/F_m (grün) dargestellt. Die N-Fixierungsraten von *Trichodesmium* (blau) wurden via alternativer Acetylen-Reduktion der Nitrogenase, mit anschließender quantitativer Gas-Chromatographie des produzierten Ethylens ermittelt. Das Bild macht das Zeitfenster deutlich, in dem die O_2 -sensitive Nitrogenase am aktivsten ist und die O_2 -Produktion, durch sinkende PS II-Aktivität relativ dazu ein lokales Minimum aufweist. Im unteren Graph ist die Sauerstoffproduktion (schwarz) sowie die Dunkelatmung (rot) gezeigt. Beide Graphen zeigen eine Übersicht der Veränderungen der Messwerte über den ganzen (belichteten; X-Achsen) Tag.

1.1.9. Probleme beim Arbeiten mit *Trichodesmium*

Die Blütenbildung von *Trichodesmium* kann sehr große Wasserflächen einnehmen (siehe Fig. 1.1.2.1 bzw. Fig. 1.2.1.1). Sie bilden dabei das Substrat für viele andere kleine adherente

Organismen, wie zum Beispiel Bakterien, Diatomeen, Dinoflagelaten, Protozoen und Krebstiere, den Copepods. Diese Organismen leben sozusagen alle in einem symbiotischen Verband, dessen Zusammenhänge toxikologisch bisher kaum umfassend untersucht wurden. *Trichodesmium*, bzw. die von ihnen vollzogene N-Fixierung, scheint allerdings der Ursprung des vielfältigen Lebens in den Blüteteppichen zu sein.

Die meisten Arten der Cyanobakterien sind in der Lage sehr unterschiedliche Toxine zu produzieren, die Cyano-Toxine. Lokale Symptome beim Menschen können Haut- und Schleimhautreizungen, Bindehautentzündungen und Ohrenschmerzen umfassen. Darüber hinaus werden auch schwerwiegendere gesundheitliche Beeinträchtigungen wie Übelkeit, Durchfall und Erbrechen, Gliederschmerzen, Atemwegserkrankungen und allergische Reaktionen auf den Kontakt mit Cyanobakterien zurückgeführt. Am bekanntesten sind die lebertoxischen Microcystine bei Vertretern der Gattungen *Microcystis* und *Planktothrix*. Seltener wurden auch Neurotoxine beobachtet. In Deutschland ist das ebenfalls leberschädigende Cylindrospermopsin zu nennen (Fastner, Heinze *et al.* 2003).

Die großen, von *T. thiebautii* und *T. erythraeum* ausgehenden *Trichodesmium*-Blüten wurden ebenso mit Toxizität für maritime Invertebraten-, sowie für Menschen in Verbindung gebracht. Während Isolate von *T. erythraeum* zwar außer in sehr hohen Dosen (500 g/kg Maus) nicht toxisch für Mäuse waren, wurden sie dennoch mit der Sterblichkeit verschiedener maritimer Organismen wie Copepods in Verbindung gebracht (Hawser, Codd *et al.* 1991; Guo and Tester 1994). Beim Menschen scheinen *Trichodesmium*-Blüten eine Atemwegserkrankung, namens Tamandare oder *Trichodesmium*-Fieber, hervorzurufen (Sudek, Haygood *et al.* 2006). Bis heute konnte aber noch kein bekanntes Toxin aus *Trichodesmium erythraeum* isoliert werden. Wahrscheinlich sind bestimmte Bakterienstämme oder auch Umweltfaktoren in der Lage die Ausbildung von Toxinen in *T. erythraeum* zu beeinflussen (Negri, Stirling *et al.* 2003).

Neben der Toxinproduktion kann *T. erythraeum* auch durch weitere verschiedene Mechanismen Schäden bei anderen Organismen verursachen. Wenn die Blütezeit der Cyanobakterien zu Ende geht und deren Zellmasse bakteriell zersetzt wird, verursachen sie starke Sauerstoffarmut in der Umgebung. Diese anoxischen Bedingungen werden mit dem Tod von Austernfarmen in Indien, sowie mit Todesfällen in Shrimp- und Fischzuchten in Thailand in Verbindung gebracht (Chellham and Alagarwami 1978; Suvapepun, Okaichi *et al.* 1989).

Ferner gibt es Hinweise, dass *T. erythraeum* benachbarte Organismen schädigt, indem es die Blütenbildung einer anderen Spezies fördert, und damit die schädliche Toxinproduktion hochreguliert (Sudek, Haygood *et al.* 2006).

1.1.10. Vorteile beim Arbeiten mit *Trichodesmium*

Für die hier vorgestellte Arbeit wurde *Trichodesmium erythraeum* aus folgenden Gründen gewählt: Ein Vorteil ist die hohe Teilungsrate der Zellen. Man ist in der Lage eine Verdopplung der Population innerhalb von 3 Tagen bei exponentiellem Wachstum zu erreichen. Dadurch lassen sich schnell und günstig ausreichende Mengen *Trichodesmium* anziehen. Da *Trichodesmium* in den Laboren praktisch kaum zu isolieren, bzw. axenisch zu züchten ist, weist es, scheinbar von Natur aus, eine hohe Toleranz zu Bakterienkontaminationen im Medium auf.

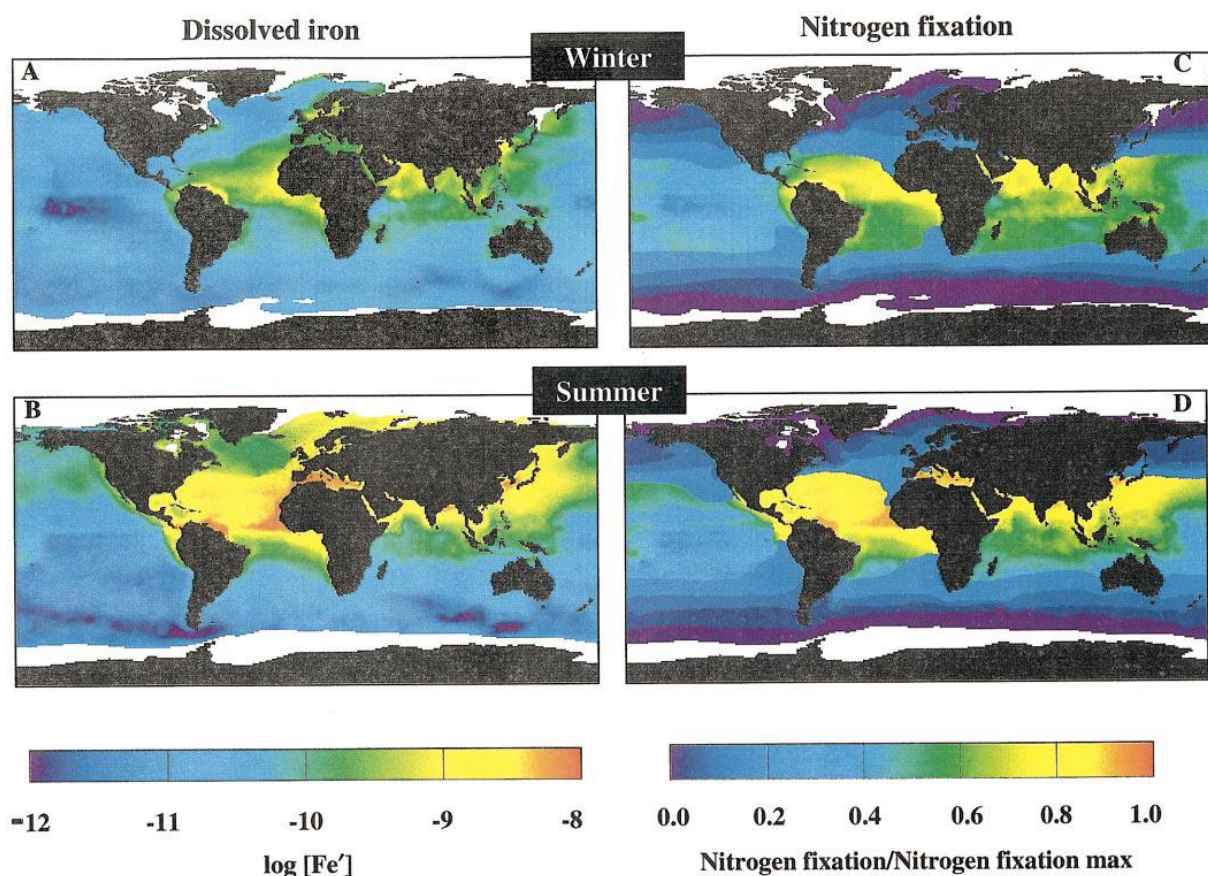
Der für das Wachstum hauptsächlich limitierende Faktor scheint nur die Konzentration von Abbauprodukten der Kultur zu sein. Bei Batch-Kulturen sinkt die Wachstumsrate bereits nach einer Woche. In Chemostat-Kulturen ist das Wachstum in der exponentiellen Phase praktisch uneingeschränkt über Wochen möglich.

1.2. Cyanobakterien unter Eisen-Mangelstress

1.2.1. Bedeutung des Eisens

Eisen ist ein wichtiger Bestandteil in den Meeren. Viele Studien lassen vermuten, dass Phosphor und besonders Eisen die wichtigsten limitierenden Faktoren für das Wachstum von *Trichodesmium* sind (Falkowski 1997; Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001; Morel and Price 2003). Die Konzentration von freien Eisen an der Wasseroberfläche beträgt oft weniger als 0,1 nM. Mit Konzentrationen von einigen nM ist allerdings gebundenes oder kolloides Eisen deutlich stärker (für *Trichodesmium*) verfügbar (Morel and Price 2003; Wang and Dei 2003). *Trichodesmium* kann nicht nur gelöstes Fe aufnehmen sondern ist auch in der Lage Fe aus atmosphärischem Staub nutzbar zu machen (Rueter, Ohki *et al.* 1990).

Fig. 1.2.1.1



Figur 1.2.1.1: Saisonale Weltkarten zeigen das Vorkommen von gelöstem Fe bzw. potentieller N₂-Fixierung in den Ozeanen der Welt. (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001) Die hohe Korrelation zeigt die Fe-Abhängigkeit von *Trichodesmium*, und unterstreicht die Wichtigkeit von gelöstem Fe für alle weiteren Organismen oberhalb der Nahrungskette.

Der Fe-Bedarf von Cyanobakterien, wie *Trichodesmium* ist ungefähr 10mal höher als bei anderen Arten des Phytoplanktons in oligotrophen tropischen Gewässern (19 Fe pro Nitrogenase und weitere stark Eisen-haltige Proteine des Photosyntheseapparats) (Rueter,

Ohki *et al.* 1990; Raven, Evans *et al.* 1999; Kustka, Sañudo-Wilhelmy *et al.* 2003; Tuit, Waterbury *et al.* 2004). Durch Experimente mit *Trichodesmium* im tropischen Atlantik zeigte Paerl (Paerl, Prufert-Bebout *et al.* 1994), dass nicht nur die N-Fixierung sondern auch die Photosynthese durch den Fe-Gehalt im Wasser (herunter-) reguliert wird. Das Verhältnis von PS I zu PS II beträgt $\sim 24:1$ (Subramaniam, Carpenter *et al.* 1999). Da jedes PS I 12 Fe-Atome enthält, erklärt sich somit dieser hohe Bedarf an Fe.

1.2.2. Physiologie von Cyanobakterien unter Eisen-Stress

In der Literatur haben verschiedene Forscher die Effekte von Fe-Mangels auf Süß- und Salzwasser-Cyanobakterien wie *Synechococcus spp.* und *Synechocystis sp.* (PCC6803) untersucht (Ghassemian and Straus 1996); (Katoh, Grossman *et al.* 2000); (Leonhardt and Straus 1992; Katoh, Hagino *et al.* 2001); (Michel, Thole *et al.* 1996; Michel, Exss-Sonne *et al.* 1998; Michel, Kruger *et al.* 1999); (Park, Sandstrom *et al.* 1999); (Reddy, Bullerjahn *et al.* 1988); (Webb, Troyan *et al.* 1994); (Trick, Wilhelm *et al.* 1995). Diese Arbeiten zeigten eine Reihe durch Fe-Stress induzierte phänotypische Änderungen, wie zum Beispiel reduzierte Wachstumsraten, Pigmentierung und Induktion von Fe-Stressproteinen. Andererseits fand Karl (Zehr, Waterbury *et al.* 2001), bei Fe-Konzentrationen von 0,2 bis 1,0 nM kein limitiertes Wachstum von *Trichodesmium*.

In manchen Arbeiten wurde die Produktion von Fe-bindenden Liganden (Siderophoren) untersucht (Goldman, Lammers *et al.* 1983); (Brown and Trick 1992). (Lammers and Sanders-Loehr 1982); (Trick, Wilhelm *et al.* 1995)). Ein Siderophor, das Schizokinen, konnte aus Fe-Mangel-gestressten Kulturen von *Anabaena sp.* (PCC7102) isoliert werden. Im Gegensatz zu den meisten Süßwasser-Cyanobakterien ist nichts über Fe-Stress-induzierte Siderophore in maritimen Cyanobakterien wie *Trichodesmium sp.* oder *Synechococcus* bekannt. Da diese aber vorwiegend in Fe-armen Gewässern vorkommen, liegt es nahe, dass ein bisher noch unbekanntes, hoch affines Antwortsystem für Fe-Mangel in diesen oligotrophen Cyanobakterien existiert.

Im Genom der Süßwasser-*Synechococcus sp.*-Stämmen PCC6301 bzw. PCC7942 wurden einige Fe-regulierte Gene, wie zum Beispiel *isiA*, *isiB* (Flavodoxin), *idiA*, *fur*, *irpA*, und *mapA* identifiziert (Ghassemian and Straus 1996); (Leonhardt and Straus 1992); (Michel, Thole *et al.* 1996); (Reddy, Bullerjahn *et al.* 1988); (Webb, Troyan *et al.* 1994). IsiA, IsiB, Fur, IdiA scheinen biochemisch Einfluss auf das Fe-Gleichgewicht in der Zelle zu haben. Katoh *et al.* fanden heraus (Katoh, Hagino *et al.* 2001) heraus, dass 15 Gene der vermuteten Komponenten

des Fe-Mangelsystems in *Synechocystis* sp. (PCC6803) systematisch inaktiviert werden. Die Arbeit bewies, dass die vier Gene *futA1*, *futA2*, *futB* und *futC*, die vermutlich ein periplasmatisches Bindeprotein-abhängiges ABC-Transportsystem kodieren, für einen effizienten Fe^{3+} -Transport in die Zelle nötig sind. Die FutA1/A2 Proteine sind homolog zum Fe-Mangel-induzierten Protein A (IdiA) des Süßwasser-*Synechococcus* sp.-Stamm PCC6301. Webb testete unter axenischen Bedingungen die Cyanobakterienarten *Trichodesmium* sp., *Synechococcus* sp. und *Crocospaera* sp. auf ihre Fe-Stressverträglichkeit und fand heraus, dass Fe-Mangel in einer Induktion bzw. Repression verschiedener Proteine resultierte (Webb, Moffett *et al.* 2001). Sie identifizierten eines der Fe-Stress-induzierten Proteine als ein IdiA-Homolog. IdiA (34 kDa) stellte sich als ein exzellenter Marker für intrazellulären Fe-Mangel bei Cyanobakterien heraus. IdiA wurde detailliert im *Synechococcus* sp.-Stamm PCC6301 untersucht, indem es unter Fe- oder Mn-Mangel vermutlich für die Beschaffung von Mn-Atomen für das PS II verantwortlich ist (Michel, Exss-Sonne *et al.* 1998).

1.3. Cyanobakterien unter Licht-Stress

1.3.1. Licht und Cyanobakterien

Licht ist, wie bei allen Cyanobakterien die einzige Energiequelle. Bei der oxygenen Photosynthese werden durch energiereiche Lichtstrahlen aus energiearmen Kohlenstoffverbindungen wie CO_2 und dem Reduktionsmittel Wasser (H_2O) energiereiche, organische Verbindungen (Kohlenhydrate, CH_2O) synthetisiert. Die Gesamtreaktion der oxidativen Photosynthese von *Trichodesmium* lässt sich vereinfacht wie folgt formulieren: $2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Manche photoaktive Bakterien verwenden H_2S und andere Stoffe als Reduktionsmittel und setzen somit molekularen Schwefel frei. Diese Form der Photosynthese wird deshalb anoxygene Photosynthese genannt.

Die Energie der Sonne kann aber auch schädlich für den Organismus sein. Wenn zu viel Licht dem Photosyntheseapparat zugeführt wird, entsteht die sogenannte Photoinhibierung (oder auch Photoinhibition (Kyle, Osmond *et al.* 1987). Darunter versteht man die Hemmung der Photosynthese durch hohe Beleuchtungsstärken über dem Lichtsättigungspunkt des Organismus. Die Ursachen der Photoinhibition liegen in der Energieübersättigung des Pigmentsystems (PBPs-Chla-RC). Betroffen ist vor allem das Reaktionszentrum des PS II. Absorbierte Lichtenergie wird dort stärker in Wärme als in Fluoreszenz umgewandelt, wobei es zur Verminderung des Elektronentransports kommt. Wenn diese überschüssige Anregungsenergie vom PS II nicht abgegeben werden kann, geht das angeregte Chlorophyll bevorzugt in den Triplettzustand (= durch Wärmeabgabe und Elektronen-Spinumkehr erreichtes Energieniveau der π -Elektronen des Chlorophylls) über, wodurch nach der Reaktion mit Sauerstoff, hoch reaktiver Singulett-Sauerstoff entsteht. Wenn diese beiden Zustände durch β -Carotin oder den Xanthophyllzyklus (Bilger and Björkman 1990) (Umwandlung der überschüssigen Anregungsenergie in Wärme) nicht mehr abgefangen werden können, kommt es zur Photooxidation des Chlorophylls und damit zu dessen Inaktivierung.

1.3.2. Physiologie und Adaption von Cyanobakterien unter Licht-Stress

Zur Aufrechterhaltung ihrer photosynthetischen Effizienz, insbesondere unter ständig wechselnden Lichtverhältnissen, haben photoautotrophe Organismen eine Reihe ineinander greifender molekularer Anpassungsmechanismen entwickelt, die sowohl kurz- als auch längerfristige Adaptionen für den Schutz des Photosyntheseapparates ermöglichen. Das

photosynthetische Membransystem höherer Pflanzen ist außerordentlich dynamisch. Dabei spielen reversible Phosphorylierungen von Thylakoidmembranproteinen, proteolytische Prozesse und komplexe Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung multifunktionaler, regulatorischer Proteine zentrale Rollen.

Für Cyanobakterien wurde vor längerem beschrieben, dass die Proteine des PS II-RC und der Phycobilisomenantennen nicht phosphoryliert sind. Serologisch wurden allerdings ca. 20 stark phosphorylierte Proteine in Thylakoidmembranen von *Synechocystis* mit Hilfe von Phosphothreonin-/Phosphoserin-Antikörpern identifiziert (Piven, Ajlani *et al.* 2005). Wie Radiomarkierungen zeigten, sind die Substrate in Cyanobakterien in der Regel wesentlich stabiler phosphoryliert als in höheren Pflanzen. Bisher konnten vier davon als „linker“-Proteine der Phycobilisomenstrukturen identifizieren werden.

In Cyanobakterien findet sich zwar Zeaxanthin und β -Carotin, jedoch fehlt ihnen die Möglichkeit Violaxanthin zu synthetisieren und somit auch der Xanthophyll-Zyklus, der bei höheren Pflanzen wichtige Schutzfunktion vor Licht-Stress hat. β -Carotin (cis-Isomere) wurde ursprünglich in den RCs von PS I und PS II von höheren Pflanzen und Cyanobakterien gefunden (Bialek-Bylka, T *et al.* 1995; Bialek-Bylka, T *et al.* 1996; Bialek-Bylka, R *et al.* 1998; Bialek-Bylka, B *et al.* 2003) wo sie vermutlich am Energiequenching zum Schutz vor Licht beteiligt sind. Kürzlich wurden sie außerdem im Cyt_{b₆/f}-Komplex von Cyanobakterien und grünen Algen gefunden (Wenk, Schneider *et al.* 2005) (Li, Mao *et al.* 2005; Li, Zuo *et al.* 2006). Dagegen bilden sie eine Reihe von Karotinoiden, die in grünen Pflanzen nicht vorkommen. Darunter findet sich Canthaxanthin. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass dessen Bildung durch hohe Lichtstärken (nicht jedoch durch UV-B) induziert wird. (Leisner, Millan *et al.* 1994; Ehling-Schulz, Bilger *et al.* 1997). Das Verhältnis von Canthaxanthin zu β -Carotin kann relativ stark von knapp über null bis hin zu 5 variieren.

Ein allgemeines Charakteristikum von Licht-Stress in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien ist die Licht-induzierte Schädigung des PS II-Komplexes, welcher die photosynthetische Oxidation von Wasser zu molekularem Sauerstoff verursacht. Der Reparaturzyklus der verschiedenen Untereinheiten des PS II bleibt noch relativ unverstanden. Durch Mutageneseexperimente am Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnten die DegP/HtrA-, und FtsH-Proteasefamilien als die einzigen Enzyme identifiziert werden, die beschädigtes D1-Protein degradieren können (Nixon, Barker *et al.* 2005).

Eine weitere Anpassung auf Lichtstress in Cyanobakterien wurde von Clarke gefunden. *Synechococcus* sp. PCC 7942 besitzt 2 Formen des PS II RC-Proteins D1 (D1:1 und D1:2).

Die Zellen wurden mit einer Beleuchtungsstärke von $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ adaptiert. Nach erhöhter Bestrahlung mit $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ wird die normalerweise vorherrschende D1 Form (D1:1) schnell mit der alternativen Form D1:2 ersetzt (Clarke, Hurry *et al.* 1993; Clarke, Soitamo *et al.* 1993).

Berman-Frank (Berman-Frank, Rosenberg *et al.* 2007) präsentierte den autokatalysierten, programmierten Zelltod in *Trichodesmium*. Der programmierte Zelltod scheint eine Antwort auf Phosphor-, und Fe-Mangel- (Kupper, Šetlík *et al.* 2008), ebenso wie auf Starklicht-, und oxidativen Stress zu sein. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie zeigte in dem Zusammenhang morphologische Degradation interner Komponenten wie Thylakoide und Carboxysomen auf, während dabei die Plasmamembran intakt blieb. Physiologisch gestresste Zellen zeigten auch erhöhte Endonukleaseaktivität. Der Grad der Nukleinsäuredegradation war mit der Immunoreaktion auf menschliches Caspase-3-polyklonales Antiserum, sowie mit der Spaltung des Caspase-spezifischen Substrats DEVD übereinstimmend erhöht. (Cyanobakterien und Pflanzen haben keine Caspasen. Sie besitzen zwar Enzyme die Metacaspasen heißen. Diese haben aber mit Caspasen und ihrer Funktion nichts zu tun.) Außerdem korrelierte die Degradation positiv mit der Sterblichkeitsrate und war durch den irreversiblen Caspase-Inhibitor Z-Vad-FMK inhibiert. Zusätzlich zeigten Genomanalysen konservierte Bereiche auf, die Caspasedomänen kodieren.

1.4. Aktivitätszustandsänderungen von *Trichodesmium*

Die, dieser Arbeit hauptsächlich zugrunde liegende Theorie, der Regulierung der Photosynthese für die N-Fixierung in *Trichodesmium* wurde von Prof. Dr. Kupper erarbeitet (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

Dabei wurde die Photosynthese auf Einzelzelebene durch zwei-dimensionale („imaging“, bildgebende) Messungen der ChlA-Fluoreszenz-Kinetik (Campbell, Hurry *et al.* 1998) an der Konstanzer Version des FKM (Küpper, Šetlík *et al.* 2001) untersucht. Die bei *Trichodesmium* typischerweise am Tag arbeitenden Nitrogenase ist dabei in sämtlichen photosynthetisch aktiven Zellen (im Gegensatz zu *Anabaena sp.* PCC 7120 (Ferimazova, Kupper *et al.* 2002) ohne spezielle Heterozystenbildung, oder interne Kompartimentierung) hauptsächlich um die Mittagszeit bei höchsten Belichtungsstärken aktiv (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001).

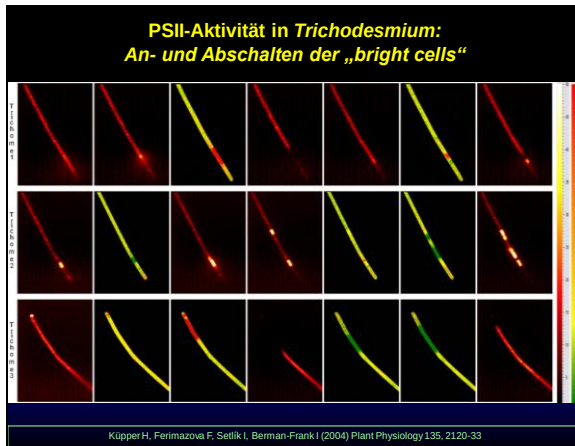
Die N-Fixierung ging stets mit dem Erscheinen von einzelnen Zellen, mit erhöhter Grundfluoreszenz (F_0) einher. Diese Zellen wurden „bright“ (hell) genannt (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001; Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

In Kulturen mit normaler Belüftung (O_2 -Gehalt der Luft) liefen beide Prozesse (N-Fixierung bzw. das Erscheinen von „bright“-Zellen) gleichzeitig in der Mitte des Tages ab. Bei einer Belüftung mit 5% Sauerstoff liefen sie auf niedrigem Level fast den ganzen Tag durchgehend ab. Ab einer Belüftungsrate mit 50% Sauerstoff fing die Nitrogenase in der frühen Lichtphase an zu arbeiten. Sie brach aber bald darauf bei höheren Lichtstärken absolut ein und erholte sich in der späten Lichtphase nur noch leicht (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

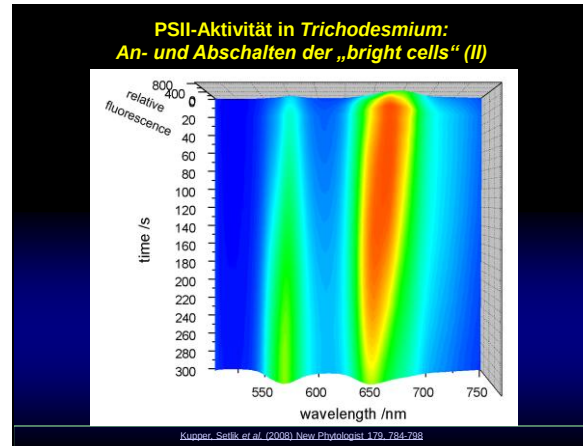
Es wurden außerdem schnelle Wechsel der F_0 -Level einzelner Zellen beobachtet (siehe Fig. 1.4.1a). Dies führte zu der Annahme, dass die erhöhte F_0 der „bright“-Zellen durch Entkoppeln der PS II-Antennenproteine (PBPs) von ihren PS II-RC verursacht wird (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Somit stände weniger Energie für die O_2 -Produktion bereit, was eventuell zusätzlich mit weiteren physiologischen Anpassungen (z.B. Steigerung der internen O_2 -Veratmung), die Bedingungen für aktive Nitrogenase schafft.

Fig. 1.4.1

a)



b)



Figur 1.4.1: Unter a) sind Fluoreszenzaufnahmen von Filamenten zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Die verschieden gefärbten Bereiche beschreiben die Veränderungen in der Fluoreszenzemission der Zellen im jeweiligen Filament (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Unter b) ist die Veränderung des emittierten Fluoreszenzspektrums einer Zelle (oder eines sich ähnelnden Filamentbereichs) über die Zeit dargestellt (Kupper, Šetlik *et al.* 2008).

Zwei physiologische, unterscheidbare „bright“-Zellzustandstypen wurden beschrieben (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Dabei hatte Typ I dunkeladaptiert, ca. die doppelte F_0 der „normalen“ Zellen. Die, als variable Fluoreszenz ($F_v = F_m - F_0$) gemessene PS II-Aktivität dieses Zelltyps war allerdings der, der „normalen“ Zellen (in der nicht-diazotrophe Periode) ähnlich. Korrelationen des Auftretens dieser „bright I“-Zellen mit der N-Fixierung und der Lichtintensität waren Gründe für die Annahme, dass dieser physiologische Aktivitätszustand, in Kombination mit der Hochregulierung der Mehlerreaktion bzw. mit dem daraus resultierend erhöhtem Sauerstoffverbrauch durch funktionelles PS II in Verbindung steht (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

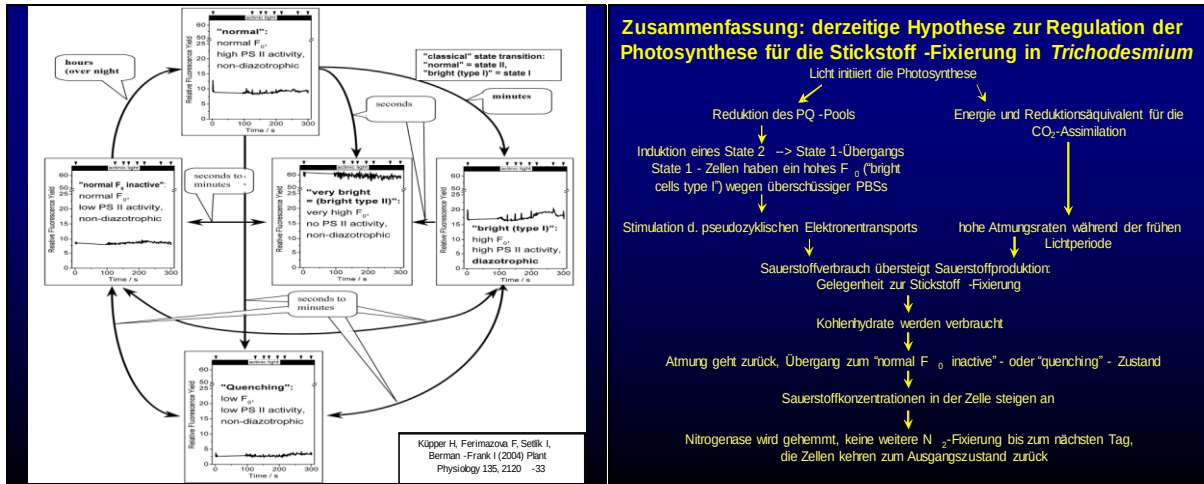
Die „bright“-Zellen vom Typ II wurden mit einer dreimal höheren F_0 als die, der „normalen“ Zellen charakterisiert. Sie wiesen dabei nur geringfügig PS II-Aktivität (durch F_v messbar) auf. Sie traten nicht bei der Belüftung mit den niedrigen Sauerstoffkonzentrationen auf, erschienen aber auch bei hohem O_2 -Level außerhalb der diazotrophen (N_2 -fixierenden) Periode. Dieser Sachverhalt weist darauf hin, dass der „bright II“-Zustand nicht zwangsläufig mit N-Fixierung in Verbindung steht, sondern vielmehr eine Antwort auf oxidativen Stress ist.

Ferner wurden Zellen detektiert, die reversibel einen niedrig fluoreszierenden („low F_0 “) Grundzustand aufwiesen. Beobachtet wurde dieser Aktivitätszustand hauptsächlich nachdem eine Zelle ihre „bright“-Phase durchlief. Er steht deshalb im Verdacht eine Fluoreszenz quenchende Erholungsphase zu sein (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

Fig. 1.4.2

a)

b)



Figur 1.4.2: Unter a) sind die Erscheinungen der Aktivitätszustände und deren Übergänge anhand der ungefähren Dauer und mit der entsprechenden Fluoreszenz-Kinetik schematisch dargestellt (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Unter b) ist die Hypothese (Schema von Hendrik Küpper), zur Regulation der Photosynthese für die N_2 -Fixierung zu Beginn dieser Arbeit vorgestellt.

Die letzten (1-5) Zellen der Filamentenden von *Trichodesmium* zeigen eine andere Struktur als die oben beschriebenen, photosynthetisch aktiven Zellen. Sie fluoreszieren ähnlich stark wie die „low F_0 “-Zellen scheinen aber eher sterische Puffer-Funktion (Endkappe oder „Bohrkopf“) für das Filament, anstatt Photosynthese und N_2 -Fixierung zu übernehmen und spielen deshalb in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle.

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Aktivitätszustandsänderungen in *Trichodesmium*, aufbauend auf den Studien und den daraus resultierenden Theorien (Kapitel 1.3.) von Prof. Dr. Hendrik Küpper (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004), genauer untersucht werden. Dies sollte die grundlegenden Mechanismen zur Regulation der Photosynthese für das Nicht-Inhibieren der Nitrogenase, durch verminderte O₂-Produktion, auf Einzelzellebene aufschlüsseln.

Ferner sollten die Effekte von abiotischen Stress, wie zum Beispiel Kultivierungsbelichtung mit Starklicht, oder Fe-Mangel im Kulturmedium untersucht werden. Die daraus resultierenden Stressantworten sollten tiefere Einblicke in die Regulierung der Photosynthese, bzw. N-Fixierung bieten.

Das Hauptaugenmerk der Studien sollte dabei auf das mikroskopische Arbeiten mit verschiedenen, kürzlich entwickelten Techniken von Prof. Dr. Hendrik Küpper liegen. Die Aktivität der Photosynthese wurde anhand von zwei-dimensionalen („imaging“, bildgebenden) Fluoreszenz-Kinetiken untersucht. Die verschiedenen Parameter der Kinetik werden dabei durch Mittelung der Fluoreszenzwerte aller Pixel innerhalb markierter Zellen errechnet. Die dafür nötigen Fluoreszenzaufnahmen der Zellen wurden durch ein FKM mit unterzellulärer Auflösung im Rahmen des Messprotokolls der Kinetik erstellt. Durch weitere neue Adaptionen am FKM können außerdem spektrale Studien über die UV/VIS-Fluoreszenz und Absorption von *Trichodesmium*-Filamenten durchgeführt werden, die noch zuvor für die Fluoreszenz-Kinetik-Messungen Verwendung fanden. Außerdem sollen spektral aufgelöste Fluoreszenz-Kinetiken auf Einzelzellebene erstellt werden. Zur Identifikation der, an einer Aktivitätszustandsänderung beteiligten Antennen-Komponenten, sollen entsprechend gemessene Spektren mit den Spektren von bekannten Pigment-Protein-Komplexen (Lantoiné and Neveux 1997; Subramaniam 1999; Li, Wang *et al.* 2004) verglichen werden.

Die Aktivität der N-Fixierung sollte außerdem begleitend via Acetylen-Reduktion und Gaschromatographie verfolgt werden, um die Korrelationen zur Aktivität der Photosynthese, bzw. der oben beschriebenen Aktivitätszustandsänderungen darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung von *Trichodesmium*

2.1.1. Nährmedium und Kultivierungsbedingungen

Trichodesmium IMS101 wurde in YBC-Medium kultiviert. Dieses enthält 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 25 mM MgSO₄, 2,5 mM NaHCO₃, 464 µM H₃BO₃, 780 µM KBr, 50 µM KH₂PO₄, 68 µM NaF, 25 µM LiCl, 2 µM RbCl, 1 µM Fe-EDTA, 450 nm NaIO₃, 80 nm Na₂MoO₄, 20 nm MnCl₂, 7 nm ZnSO₄, 7 nm NiSO₄, 2,5 nm CoCl₂, 1 nm CuSO₄ in destilliertem Wasser. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,2 eingestellt. Die Messkulturen mit Fe-Mangelstress wurden kontinuierlich mit Medium ohne Eisen verdünnt. Nach 9 Tagen lag die Fe-EDTA-Konzentration bei noch 100 nM, nach 16 Tagen 50 nM (Kupper, Šetlík *et al.* 2008).

Sämtliche Stamm- und Mess-Kulturen wurden in einem, auf 28 °C temperiertem Glasaquarium, vor einer Lichtleiste positioniert (siehe Fig. 2.1.2.1). Die Lichtperiode betrug 12 h/ 12 h (Tag/ Nacht). Die Lichtkurve beschreibt einen sinusoidalen Zyklus (wie in der Natur) um Photoinhibition beim plötzlichen Anschalten des Lichts zu verhindern. Die maximale Photonenflussdichte der OSRAM® Dulux L 55W/12-950 Leuchtstoffröhren betrug am Mittag 330 µmol.m⁻².s⁻¹ („Low Light“; „LL“) für Stamm- (bzw. Vor-) Kulturen, sowie für nicht-Starklicht-gestresste Mess-Kulturen. Starklicht-gestresste (Mess)-Kulturen („High Light“; „HL“) wurden am Rand des Aquariums positioniert und speziell mit einer Lichtintensität von maximal 830 µmol.m⁻².s⁻¹ bestrahlt.

Die Belüftung und Durchmischung der Kulturen erfolgte durch das Aufsteigen steril gefilterter Blasen Luft (~ 100 ml.min⁻¹) vom Boden der Kultur-Flaschen aus. Mess-Kulturen wurden stets mit Vor-Kulturen angeimpft, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, dass heißt eine optischen Dichte (OD_{750 nm}) von maximal 0,05 aufwiesen und vital aussahen.

2.1.2. Kultivierung als Batch-Kultur

In der Anfangsphase dieser Arbeit wurden Vor- und auch Mess-Kulturen in runden 250 ml-Glasröhren mit 3cm Innendurchmesser als Batch-Kultur gehalten. In Batch-Kulturen (auch statische oder diskontinuierliche Kulturen genannt) bleibt das Medium während der gesamten

Anzucht das Selbe. Es wird weder zeitweise ergänzt oder aufgefüllt (Fed-Batch-Kultur; Volumenzunahme), noch teilweise ausgewechselt (kontinuierliche Kultur; Volumenkonstanz).

Das Wachstum von *Trichodesmium* in einer Batch-Kultur steigt typischerweise nach anfänglicher kurzer Konstanz (lag-Phase) sehr stark an (exponentielle Phase), nimmt dann immer mehr ab (Übergangsphase), stagniert danach kurzzeitig (stationäre Phase) und wird gegen Ende auch negativ (Absterbephase), was an der abnehmenden OD₇₅₀ der Kultur zu erkennen ist. Als Ursachen für die Stagnation des Wachstums sind hauptsächlich die Erschöpfung des Nährmediums, und die Anhäufung toxischer Substanzen zu sehen.

Fig. 2.1.2.1



Figur 2.1.2.1: Temperiertes Glasaquarium zur Batch-Kultivierung von *Trichodesmium* vor einer Lichtleiste

Um Sterilität (der vermeintlich axenische *Trichodesmium*-Kulturen) über lange Zeit zu gewährleisten bzw. zur Steigerung der Lebensdauer- und Stabilität, als auch um Handhabbarkeit mit der Gerätschaft zu verbessern, kam in der späteren Phase dieser Arbeit ausschließlich die Chemostat-Kultivierung zum Einsatz.

2.1.3. Axenische Kultivierung von *Trichodesmium*

Trichodesmium IMS101 ließ sich als Batch-Kultur nur selten länger als 2 Wochen vital am Leben erhalten. Verschiedenste Mortalitätsarten der Vor-, und Mess-Kulturen führten häufig zu unvollständigen Messreihen, bzw. zum Sinken des Vertrauens in die Aussagekraft der vorangegangenen Experimente sowie der entsprechenden Kulturen. Dies führte zum Versuch, die vermeintlich axenische (Rein-)Kultur des *Trichodesmium*-Stamms IMS101 auf Kontamination mit anderen Bakterien hin zu untersuchen und gegebenenfalls *Trichodesmium* zu isolieren:

Zum Nachweis kolonial wachsender Bakterien wurden 1,5% (w/v)-Agarose-YBC-Platten (10 ml) gegossen. 100 µl einer älteren Kultur (leicht trüb) wurden steril ausplattiert und für 6 Tage im Brutschrank unter normalen Kultivierungsbedingungen ($\sim 100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 28 °C) inkubiert. Mittels eines gewöhnlichen Lichtmikroskops wurden die Platten anschließend begutachtet. Dabei wurden bis zu 4 verschiedene (visuell: eine große-, drei kleine-) bakterielle Kolonietypen (kein *Trichodesmium*, siehe Fig. 2.1.3.1b)) gefunden. Um wieder eine Reinkultur von *Trichodesmium* zu etablieren, wurden verschiedene Filter- und Vereinzelungsversuche angestrebt:

Zum einen wurden die *Trichodesmium*-Zellen aus 5 ml, einer vitalen (OD_{750} um 0,05) Batch-Kultur (Vorkultur) auf einem Whatman-Polycarbonatfilter (Durchmesser: 2 cm; Porengröße: 5 µm) langsam abgefiltert. Daraufhin wurde das *Trichodesmium*-Pellet dreimal in je 5 ml YBC-Medium (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.1.) resuspendiert und anschließend wieder abgefiltert. Nach diesen 3 Spül-Schritten wurde das Pellet erneut in 5 ml YBC-Medium aufgenommen und in eine frische Kulturflasche (250 ml YBC-Medium) überführt. Zum Vergleich wurden als Kontrolle 5 ml der vitalen Ausgangskultur (Vorkultur) zur direkten Inokulation in eine frische Kulturflasche (250 ml) überführt. Durch die Filterung konnten allerdings keine wesentlichen Verbesserungen bei der Fitness erzielt werden. Vielmehr schien der Stress bei der Filterung die Zellen zusätzlich zu schädigen, was durch eine schlechter heranwachsenden Kultur ersichtlich wurde.

Zusätzlich wurden jeweils 100 µl der gespülten- bzw. ungespülten 5 ml Vorkultur auf 1,5% (w/v)-Agarose-YBC-Platten ausplattiert, und für 6 Tage im Brutschrank unter normalen Kultivierungsbedingungen ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 28 °C) inkubiert.

Fig. 2.1.3.1

a) gefiltert



b) ungefiltert



Figur 2.1.3.1: Je 5 ml einer vitalen Batch-Kultur (OD_{750} um 0,05) wurden auf 1,5% (w/v)-Agarose-YBC-Platten ausplattiert und für 6 Tage im Brutschrank unter normalen Kultivierungsbedingungen ($330 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 28°C) inkubiert. Unter a) wurde die Probe über einen Whatman-Polycarbonatfilter (Durchmesser: 2 cm; Porengröße: $5 \mu\text{m}$) von bakteriellen Kontaminanten gereinigt. Unter b) ist die ungefilterte Probe ausplattiert.

Die Fig. 2.1.3.1 zeigt deutlich, dass die Filterung sämtliche Kontaminanten stark zu reduzieren vermag. Durch Auszählung der Kolonien der Platten konnte auf die Effizienz der einzelnen Filterschritte zurückgerechnet werden. Somit konnte die Anzahl der mindestens notwendigen Filterschritte für das sichere Erreichen einer axenischen *Trichodesmium*-Kultur ermittelt werden und ohne die Zellen dabei übermäßig zu stressen.

2.1.4. Kultivierung als Chemostat-Kultur

Um die Fitness und die Lebenszeit der Mess-Kulturen (in der exponentiellen Wachstumsphase) zu steigern, etablierten wir die Kultivierung von *Trichodesmium* in Chemostaten.

In Fig. 2.1.4.1 ist schematisch eine Chemostat-Kulturflasche dargestellt. In den Klammern hinter den Begriffen im Text ist die entsprechende Abkürzung, wie in der Legende dargestellt. Die Flasche ist bis zur Hälfte des Gesamt-Volumens mit 2l YBC-Medium gefüllt. Die Durchmischung-, bzw. die Belüftung der Kultur wurde durch einen löchrigen Schlauch (SL) am Boden der Kultur-Flasche gewährleistet. Knapp über der Mediums-Oberfläche befindet sich der Medium-Luft-Ausgangsschlauch (SgM), durch den das gebrauchte Medium mit Zellen und auch die gebrauchte Luft die Kulturflasche verlässt. Bald nachdem dieser Schlauch die Flasche verlässt, ist an ihm eine Durchfluss-regelbare Schlauch-Klemme (KgM) angebracht. Kurz dahinter ist ein T-Stück mit Sterilfilter (FEt) für Flüssigkeiten zwischen geschaltet. Die Anordnung ermöglicht, nach dem Schließen der KgM (+ Öffnung der entsprechenden KEt), das tägliche Spülen (bzw. die Desinfektion) des Medium-Luft-Ausgangsschlauchs (nach dem T-Stück möglichst lang: ~ 1m) mit Ethanol (20 ml durch den Sterilfilter injiziert), um Bakterienwachstum durch den Schlauch in die Kultur zu verhindern. Da während des Spülens weiterhin Luft (Über SL) in die Chemostat-Kultur-Flasche (CK) gepumpt wird, baut sich dort ein leichter Druck auf. Durch anschließendes Öffnen von KgM (davor entsprechende KEt schließen) nach der Ethanol-Spülung, wird der noch im Schlauch (SgM) befindende Rest-Alkohol schlagartig und rückstandsfrei ausgeblasen.

Auf Höhe des Ausgangs vom Belüftungs-Schlauch (SL) in der Kulturflasche befindet sich auch der Ausgang vom Schlauch für frisches Medium (SfM). Durch ihn wird das frische, sterile Kultur-Medium via Peristaltikpumpe (PM) in die Kulturflasche (CK) gepumpt. Die Chemostat-Kulturen wurden stets mit einer OD_{750} von 0,005 angeimpft. Sobald die Kultur auf eine OD_{750} von ca. 0,03 herangewachsen war, wurden die Pumpen mit einer Durchflussrate von ca. 1l pro Tag angeschaltet, um ein exponentielles Wachstum von *Trichodesmium* bei einer relativ konstanten OD_{750} um 0,05 einzustellen. Da sich die *Trichodesmium*-Dichte sehr schnell verändern kann, wurde die Durchflussmenge täglich bis zu 5-mal, via OD_{750} -Abgleich mit der Kultur, nachjustiert. Ein späteres, bzw. zu frühes Verdünnen der Kulturen führte häufig zu unverhältnismäßig hohen Verbrauch an Frischmedium, bzw. zu langsamer wachsenden Kulturen, welche die Synchronisierung mit der entsprechenden anderen Mess-

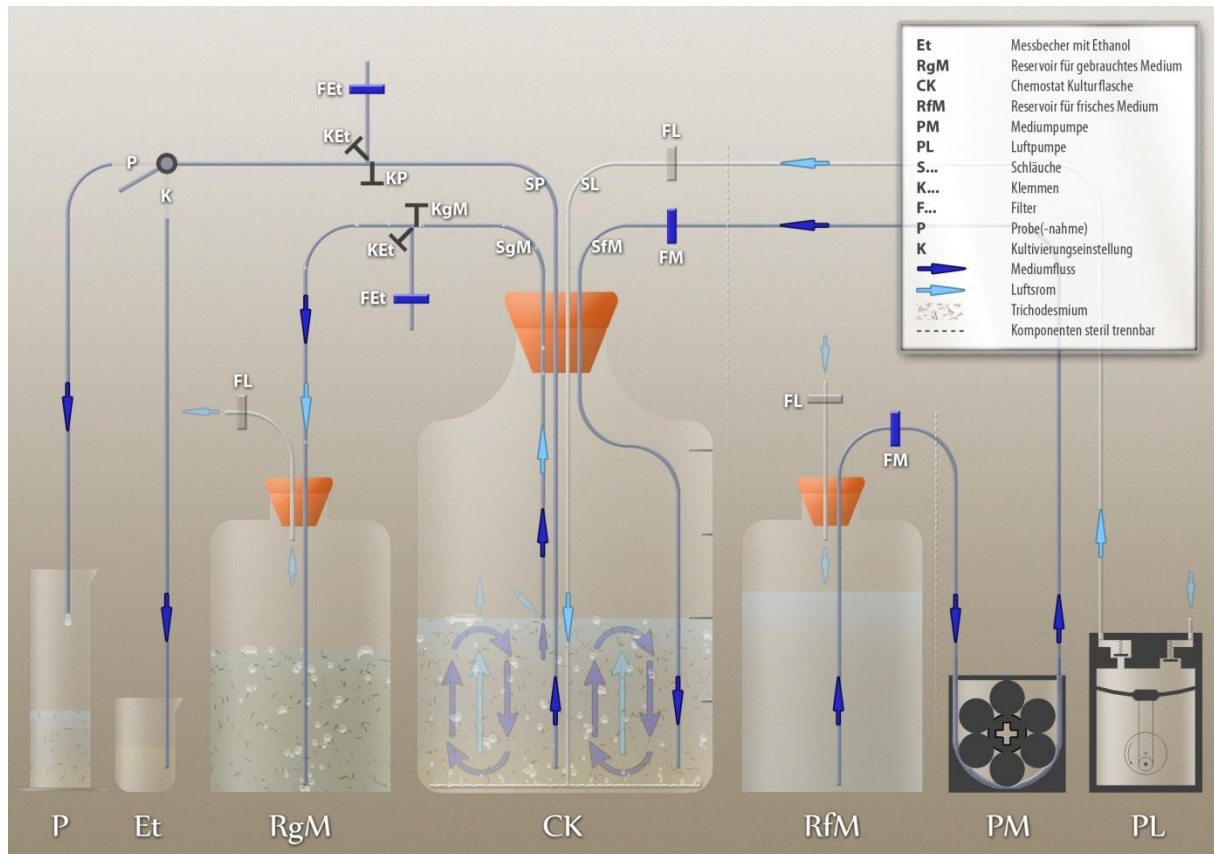
Kultur („LL“/„HL“; „normalFe“/„lowFe“) des jeweiligen Experiments, und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse störte.

Ungefähr 2 cm über dem Boden der Flasche befindet sich der Eingang des Schlauchs für die Probe-Entnahme (SP). Dieser lange Schlauch ist ebenso wie der Medium-Luft-Ausgangsschlauch (SgM), über die gleiche Anordnung (Klemme, Sterilfilter) mit Ethanol spülbar. Die Klemme (KP) ist im Normalfall (K) verschlossen, sodass das permanent zugeführte, frische Medium die Kultur-Flasche nur durch den Medium-Luft-Ausgangsschlauch wieder verlassen kann. Die, im verbrauchten Medium enthaltenen *Trichodesmium*-Filamente, sowie deren ausgedünnte Abbau-, und Stoffwechselprodukte wurden in transparenten 5l-Mediumflaschen (RgM) aus PET gesammelt. Bei Bedarf wurden die Filamente abgefiltert und bei -80 °C für spätere Pigment-Analysen, bzw. -Standardisierung gelagert.

Zur Probennahme (P) musste nun nicht mehr unter der Sterilbank (zusätzlicher Stress für die Zellen) gearbeitet werden. Dafür wurde zuerst die Klemme des Luft-Medium-Ausgangsschlauchs (KgM) verschlossen. Die einströmende Luft baut einen leichten Überdruck in der Kulturflasche auf, sodass durch das Öffnen der Klemme (KP) am Probenahme-Schlauch (SP) das gewünschte Volumen entnommen werden konnte. Der Probenahme-Schlauch wurde danach wieder verschlossen (KP zu) und der Medium-Luft-Ausgangsschlauch anschließend erneut geöffnet (KgM auf).

Zusätzlich wurde die Sterilisation der sperrigen Komponenten des Chemostat-Systems (CK+SgM+SP / RfM) einzeln möglich. Durch die speziellen Sterilfilteranordnungen ließen die Komponenten sich voneinander entkoppeln und unabhängig voneinander bearbeiten, sodass die Kontaminierungsgefahr (wie bei einem einzigen großen sterilen System) minimiert-, und das Handling verbessert wurde.

Fig. 2.1.4.1



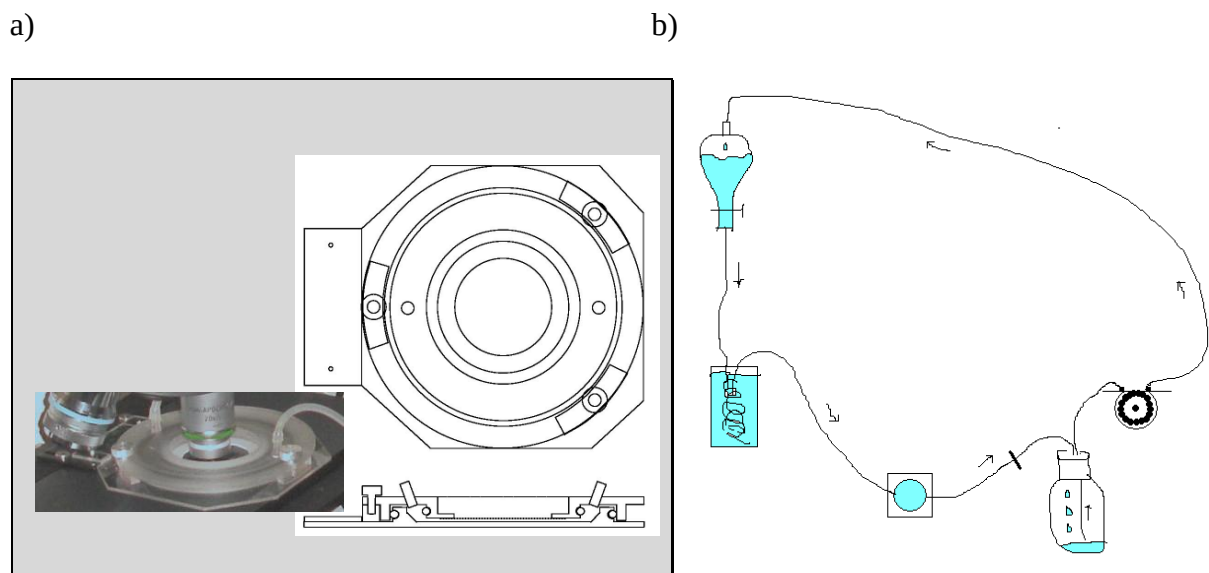
Figur 2.1.4.1: Schematische Darstellung der Chemostat-Kultivierung. Das Bild ist detailliert im Text erklärt. K = Kultivierungseinstellung: KP zu → KgM auf, SP-Ende in Et; P = Probenahme-einstellung: KgM zu → KP auf. Die Chemostat-Kulturflasche (CK) befindet sich in einem temperierten (28 °C) Glasaquarium vor einer Lichtleiste (an der Stelle der Batch-Kulturen wie in Fig. 2.1.2.1) positioniert.

2.2. Messungen am Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskop

2.2.1. Vorbereitungen der Proben für die FKM-Messungen

Um den Tagesrhythmus der Aktivitätszustands-Komposition zu untersuchen, wurden vor jedem Messzeitpunkt stets frische Proben der Mess-Kulturen entnommen. Diese Proben wurden in einer speziell hergestellten Kammer kultiviert und gemessen, wie es auch schon erfolgreich bei *Scenedesmus* gelang (Šetlíková, Šetlík *et al.* 2005).

Fig. 2.2.1.1



Figur 2.2.1.1: Unter a) ist ein Foto und eine technische Zeichnung (von Hendrik Küpper) der Messkammer gezeigt. Unter b) ist der an ihr angeschlossene Mediumskreislauf (Schema von Verena Rösch) schematisch dargestellt. Aus dem höher positionierten Hauptreservoir (Scheidetrichter) fließt das Medium Lageenergie-getrieben, zur Temperierung (28 °C) durch ein Wasserbad, und anschließend durch die Kammer. Limitiert durch eine einstellbare Klemme tropft das gebrauchte Medium in ein tiefer liegendes Reservoir. Aus ihm wird mittels einer Peristaltikpumpe das Medium wieder nach oben gepumpt und in das Hautreservoir getropft. Beim Tröpfeln des gebrauchten Mediums in die Reservoirs wird es mit Sauerstoff gesättigt. Bei konstanter Pumpen- und Klemmeinstellung stellt sich ein gleichmäßiger Mediumsstrom ($25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) durch die Kammer ein.

Ungefähr 2 ml einer Kultur-Probe wird durch vorsichtiges Abfiltrieren des Mediums stark ankonzentriert (Restvolumen: 100 μl). Die Filamente daraus werden resuspendiert und auf der Innenseite des Glasfensters mit 1% (w/v) SeaKem Gold Agarose (niedrigem Schmelzpunkt, $T_m = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; Cambrex BioScience Rockland, Inc.) in Medium eingebettet. Die Gelstärke von mehr als $1,8 \text{ g/cm}^2$ verhindert weitgehend Filamentbewegung während der Messung. Sofort nach dem Mischen der (ca. 100 μl -) Kultur-Probe mit 100 μl der (40 °C) warmen Agarose (je nach Fitness bzw. Bewegungsdrang der Filamente bis zu 150 μl) wird das so entstehende, noch flüssige Gel mit einem Gas-durchlässigen Cellophanpapier (zuvor in/mit YBC-Medium

eingeweicht) blasenfrei abgedeckt und dadurch flach ausgebreitet. Das Cellophanpapier wird anschließend mit einem passenden Gummiring am Rand um das Messfenster fixiert. Um die eingebetteten Zellen mit frischer Luft und Medium zu versorgen, wurde temperiertes (28 °C), und mit Luft gesättigtes YBC-Medium, mit einer Flussrate von 25 ml pro Minute durch die Kammer gepumpt. Diese Prozedur wurde detaillierter in Küpper *et al.* (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) erklärt.

2.2.2. Fluoreszenz-Kinetik-Messungen von Chlorophylla auf Einzelzellebene

Um die photosynthetische Performance auf Einzelzellebene zu messen, wurde das FKM der Firma „Photon Systems Instruments“ [Brno, Czech Republic] verwendet, welches ursprünglich von Küpper (Küpper, Šetlík *et al.* 2001) detailliert beschrieben wurde.

Das FKM wurde erweitert und verbessert von Küpper *et al.* (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) (Kupper, Seibert *et al.* 2007; Kupper, Šetlík *et al.* 2008) beschrieben. Es ermöglicht dadurch die selektive Bestrahlung von Objekten mit Licht verschiedener Wellenlängenbereiche-, sowie die Erkennung von Fluoreszenzkinetiken verschiedener Wellenlängen mit Hilfe eines PC-kontrollierten Filterrads.

Eine weitere Fähigkeit im Gegensatz zur bildgebenden Kinetik ist die Möglichkeit spektral aufgelöste Kinetiken mit einem hochempfindlichen Glasfaseroptik-Spektrometer aufzunehmen.

Fig. 2.2.2.1



Figur 2.2.2.1: In der Mitte im Bild ist das modifizierte FKM (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Via Glasfaserkabel verbunden, befindet sich rechts davon das Spektrometer. Die Geräte werden mittels PC durch die Programme Fluorcam6 (FKM), bzw. spectrum gesteuert. Die spezielle Messkammer (Fig. 2.2.1.1a) ist auf dem Objekttisch des FKM fixiert. An ihr ist ein Mediumkreislauf angeschlossen (Fig.

2.2.1.1b); rechts im Bild). Durch die spezielle Anordnung von Pumpe und Reservoiren wird ein gleichmäßiger Mediumdurchfluß gewährleistet.

Für die Bedienung des Mikroskops sowie für Analysen der ersten Daten wurde die Software „FluorCam6“ (*Photon Systems Instruments*) verwendet.

Die Lichtbestrahlung im Bereich ~ 410 bis 510 nm regt den blauen Absorptionspeak von ChlA, sowie einen Teil des Absorptionsbereichs der kürzeren Wellenlängen von PUB (auch „CU PE“ genannt), eine Untereinheit der Phycobilisomen an. Diese Einstellung wurde aufgrund der optischen Eigenschaften von *Trichodesmium* gewählt (Subramaniam 1999; Ferimazova, Kupper *et al.* 2002). In der Frühphase der FKM-Messungen wurde alternativ auch grünes Anregungslicht verwendet. Im Vergleich zum Blauen ist in dem Fall der Spektralbereichs des Filters noch stärker in Richtung Grün erweitert. Der Energiegehalt der Anregung beider Lichtfarben wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse, via Verrechnungsfaktoren auf den gleichen Wert eingestellt. 21% bzw. 30% des blauen aktinischen Lichts entspricht dabei 31% bzw. 44% des Grünen.

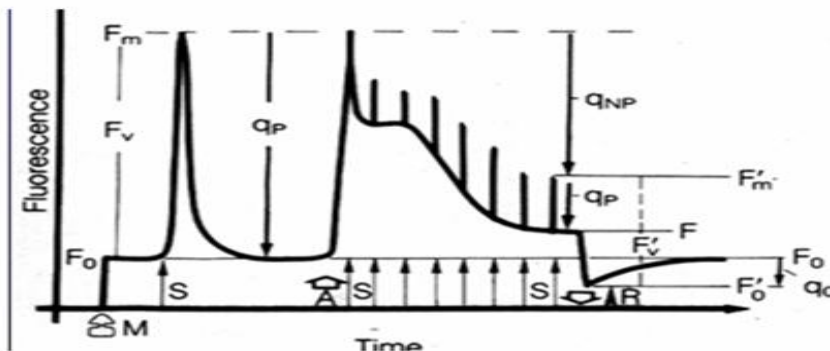
2.2.3. Räumlich aufgelöste („bildgebende“) Fluoreszenz-Kinetik-Parameter auf Einzelzellebene

Die Experimente wurden hauptsächlich mit blauem Anregungslicht ($410 - 510$ nm), zur selektiven Bestrahlung von ChlA und PUB, gemessen. Das Messprotokoll für die „bildgebenden“ Fluoreszenzkinetiken hat eine Dauer von 300 s. In der dritten Sekunde wird ein gesättigter Lichtpuls von 300 ms ($\sim 4.000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) für die Messung von F_v (variable Fluoreszenz) gegeben. Anschließend wird das Licht für 90s ausgeschaltet. Am Ende dieser Periode wird 5 Sekunden lang F_0 (die dunkel adaptierte Grundfluoreszenz vom ChlA) gemessen. Danach wird das aktinische Licht ($\sim 1.000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) für 100 s angeschaltet, um die Kautskyinduktion (Lazar 1999) zu analysieren. Anschließend wird das aktinische Licht ausgeschaltet, um die Dunkelerholung und F_0' zu untersuchen. Das nicht-aktinische Licht wurde in weiten Teilen der Arbeit durch eine Xenonflashlampe ($400 - 490$ nm via Filterset, $\sim 14 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) emittiert. Während der aktinischen-, und der Erholungs-Periode wurden gesättigte Lichtpulse von 600 ms Länge appliziert um das photochemische-, sowie das nicht-photochemische Quenching zu analysieren. Diese Fluoreszenz-Parameter (mit der konventionellen Normierung auf F_m') wurde bereits erfolgreich bei FKM-Messungen grüner Pflanzen charakterisiert und etabliert (Schreiber, Schliwa *et al.* 1986). In unseren Messungen wurde zur Verbesserung der Aussagekraft der Werte auf die erwähnte Normierung der

zusammengesetzten Quenching-Parameter (Q_{np} bzw. Q_p) wie auch von F_v verzichtet (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004).

Die Messungen wurden mit einer automatischen Subtraktion des Hintergrunds, sowie einer maximalen Zeitauflösung von 20 ms durchgeführt. Jedes Kamerabild [CCD-Kamera von FluorCam; Version 700M] der entstandenen Kinetiken hat eine Auflösung von 512 x 512 Pixel mit 4.096 Graustufen (12 bits).

Fig. 2.2.3.1



Figur 2.2.3.1: Schema des Kinetik-Messprotokolls, mit ChlA-Fluoreszenz (Y-Achse)-Parameter über die Zeit (X-Achse): F_0 : Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand; F_m : Maximale Fluoreszenz nach sättigendem Lichtblitz (S); F_v : $F_m - F_0$ = variable Fluoreszenz; F'_m : Maximale Fluoreszenz bei aktinischer Belichtung (A) zu bestimmtem Zeitpunkt; q_p : Photochemisches Quenching durch chemischen Energietransfer; q_{np} : Nicht-Photochemisches Quenching durch Wärmeabgabe (Lazar 1999)

In der folgenden Liste sind die Kinetikparameter in Bezug auf Fig. 2.2.3.1 erläutert

Fluoreszenzkinetik-Parameter:

F_0	Ertrag der Grundfluoreszenz einer dunkel-adaptierten Probe; Fluoreszenz im nicht-aktinischen Messlicht
F'_0	Ertrag der Grundfluoreszenz einer Licht-adaptierten Probe; z.B. Fluoreszenz im nicht-aktinischen Messlicht nach aktinischer Bestrahlung
F_m	Maximaler Ertrag der Fluoreszenz einer dunkel-adaptierten Probe
F'_m	Maximaler Ertrag der Fluoreszenz einer Probe während aktinischer Belichtung; z.B. durch nicht-photochemisches Quenching
F''_m	Maximaler Ertrag der Fluoreszenz einer komplett Licht-adaptierten Probe, am Ende der aktinischer Belichtungsphase der Kinetikmessung, durch nicht-photochemisches Quenching

F_t'	Fluoreszenz unter aktinischer Belichtung unmittelbar vor der F_m' -Messung
F_v	Variable Fluoreszenz; $F_v = F_m - F_0$; als Maß für PS II-Aktivität (Behrenfeld and Kolber 1999)
F_v/F_m	“Maximale Effizienz von dunkel-adaptierten PS II“; In dieser Arbeit wurde die Aktivität durch F_v ohne die gewöhnliche Normierung auf F_m (Maxwell and Johnson 2000; Roháček 2002) bestimmt, da hier die durch ungekoppelte PBPs emittierte Fluoreszenz zu höheren F_0 -Werten führen würde (Kupper, Ferimazova <i>et al.</i> 2004)
F_{qp}	“Photochemisches Quenching“ wurde als Differenz von F_m' und F_t' aber ohne Normierung (wie bei F_v vs. F_v/F_m beschrieben) gemessen
F_{qnp}	“Nicht-Photochemisches Quenching“ wurde als Differenz von dunkel-adaptierten F_m und Licht-adaptierten F_m' ($F_{qnp} = F_m - F_m'$) aber ohne Normierung auf F_m' (aus den Gründen wie bei F_v vs. F_v/F_m beschrieben) gemessen
$(F_m' - F_t') / F_m'$	F_{qp} normalisiert; Rate des Elektronentransports (Genty B 1989)

In den entstandenen Kinetikbildern (der verschiedenen Fluoreszenzparameter, meist F_0) wurden die einzelnen Zellen der Filamente an der Zellwand entlang markiert. Die Zellen der Messungen mit Fokusproblemen oder mit sich bewegenden Filamenten wurden nicht weiter ausgewertet. Von den immobilen aber vitalen Zellen wurde der Mittelwert der Intensität (bzw. des Parameters) jeder Zelle berechnet um ferner auch alle anderen zusammengesetzten Fluoreszenzparameter zu ermitteln.

Die Datenanalyse und die Kinetikparameter sind detaillierter in Küpper *et al.* (Küpper, Šetlík *et al.* 2001; Kupper, Ferimazova *et al.* 2004; Kupper, Šetlík *et al.* 2008) und (Bilger and Björkman 1990) beschrieben.

2.2.4. Spektral aufgelöste Einzelzell-Fluoreszenz-Kinetik

Während den Messungen der „bildgebenden“ Kinetik, wurden für die spektral aufgelösten Einzelzell-Fluoreszenzkinetiken vitale aber dennoch immobile *Trichodesmium*-Filamente ausgewählt. Das Anregungslicht liegt hierbei im Wellenlängenbereich von 410 - 500 nm, bzw. im Absorptionsbereich von ChlA und PUB.

Nur ein kleines Fenster des Sichtfeldes der Kamera erreicht das Spektrometer. Dieser technische Aufbau ist detaillierter in Küpper *et al.* (Kupper, Parameswaran *et al.* 2007) beschrieben. Der Fluoreszenzlichtstrahl wird in 10% für die Kamera- („bildgebende“ Kinetik), um Bewegungen des Filaments, sowie Probleme durch Schärfenänderungen der ausgewählten Zelle zu detektieren, und in 90% für das Spektrometer unterteilt. Dadurch konnten beide Eigenschaften derselben Zelle untersucht werden.

Die Messungen wurden mit der Software FluorCam6, bzw. einem speziellen Protokoll zur Synchronisierung des Mikroskops mit der Spektrometer-kontrollierenden Software (Spectrum) durchgeführt.

Das Timing der Messpulse, sowie die Intensität des aktinischen- und des gesättigten Lichts wurde vom Messprotokoll der „bildgebenden“ Kinetik übernommen. Weitere erklärende Details der spektral aufgelösten Kinetiken sind in (Kupper, Šetlík *et al.* 2008) beschrieben.

2.3. Messung der Stickstofffixierung via Acetylen-Reduktion und Gas-Chromatographie

Das Enzym Nitrogenase hat die Fähigkeit alternativ Acetylen als Substrat, anstatt molekularen N zu Ethylen zu reduzieren. Anhand des Grades Reduktion dieses Gases über eine bestimmte Zeit kann auf die Aktivität der Nitrogenase, zu den verschiedenen Tageszeiten geschlossen werden.

Bei jeder Probennahme des Tageszyklus („dawn“ bis „night“) wurden je 30 ml der zu messenden Kulturen, bzw. 30 ml YBC-Medium (als Kontrolle) in gasdichte 70 ml-Serumflaschen aus Glas gefüllt. Nach dem Schließen der Flaschen wurden mit einer Spritze jeweils 10 ml Acetylen durch das Septum hinein gepumpt. Das Gasvolumen in diesen Flaschen (40 ml) bestand nun aus 40 ml Luft und 10 ml Acetylen unter 120% des Normaldrucks. Die zu messenden Kulturen, sowie die Kontrolle wurden anschließend für genau 1 Stunde im Brutschrank (gleiche Temperaturbedingungen wie bei der Kultivierung) vorsichtig durch Drehen der Flaschen in Bewegung gehalten. Abhängig vom Zeitpunkt der Probennahme wurde die Proben am Morgen, Mittag und Abend (11:00, 14:30, 17:30) mit einer Leuchtstoffröhre belichtet ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dawn- und Night-Proben (8:30, 21:30) wurden ohne Licht inkubiert. Eine Stunde nach der Acetyleninjektion wurde stets mit derselben Spritze 3 ml der Gasphase jeder Probenflasche abgenommen, und in spezielle Vakuutainer (Serumfläschchen unter Vakuum) überführt.

Nach der Lagerung der Proben in Dunkelheit bei 4 °C wurden sie durch Gaschromatographie in Tschechien analysiert. Die Menge des produzierten Ethylens korreliert positiv mit der Aktivität der Nitrogenase.

2.4. Analyse der primären und akzessorischen Photopigmente

2.4.1. *In vivo*-Absorptionsspektren einzelner Zellen

Zu jedem der 5 Messzeitpunkte wurden jeweils einzelne *in vivo*-Absorptionsspektren von bis zu 6 Zellen verschiedener Filamente aufgenommen. Zur Messung der *in vivo*-Absorptionsspektren wurde das FKM als normales Transmissions-Lichtmikroskop genutzt. Das Licht hierfür wurde von einer weißen LED unter der Messkammer emittiert. Durch Teilung des transmittierten Lichtstrahls der das Objektiv erreicht, in 10% für die Kamera und 90% für das Spektrometer, konnten Absorptionsspektren mit Hilfe der Spektrometer-Software (Spectrum) aufgenommen werden. Der Strahlengang im Mikroskop, sowie eine ausführliche Beschreibung der Geräte ist detailliert in Küpper *et al.* (Kupper, Seibert *et al.* 2007; Kupper, Šetlík *et al.* 2008) beschrieben.

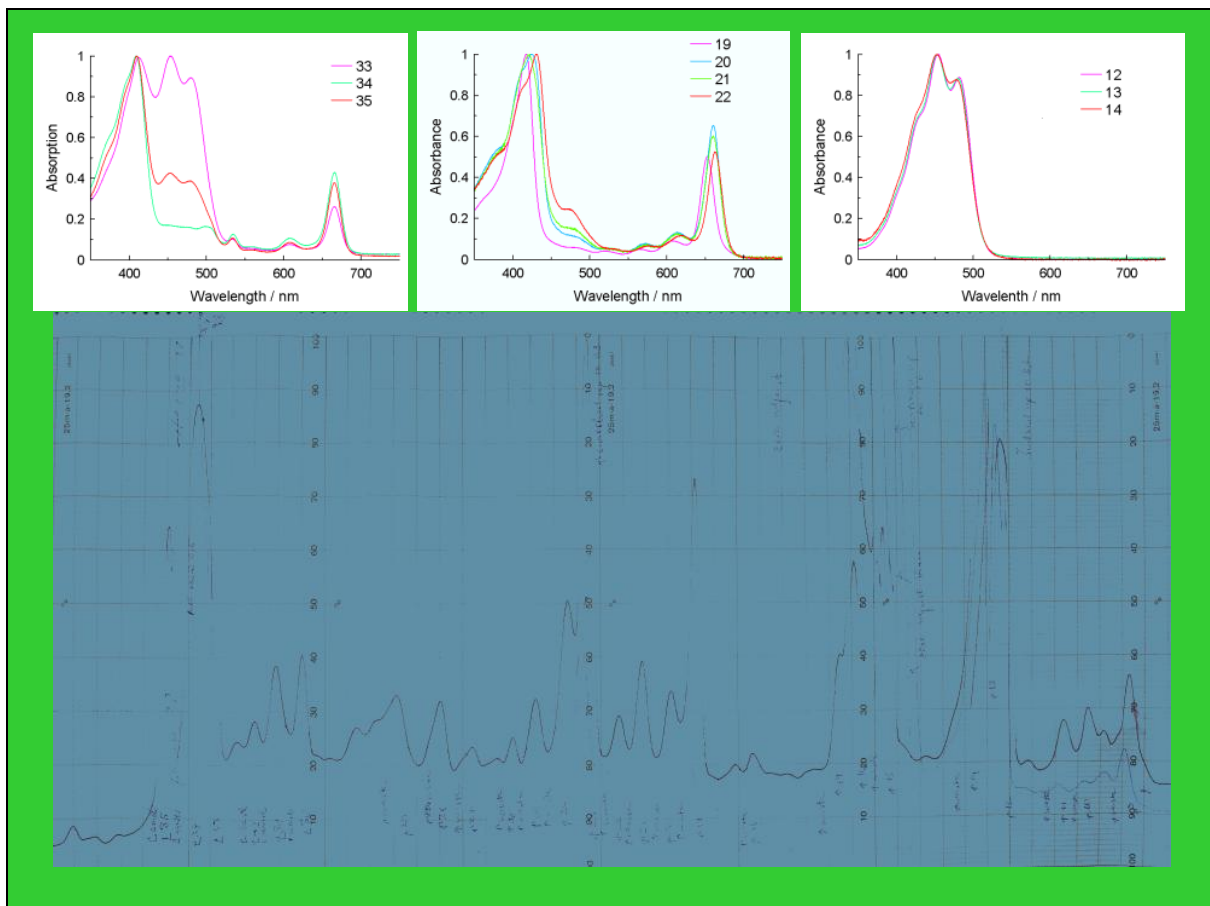
2.4.2. *In vivo*-Fluoreszenzspektren einzelner Zellen

Um *in vivo*-Fluoreszenzspektren einzelner Zellen zu untersuchen, wurde die Apparatur der normalen FKM-Messungen (für Fluoreszenz-Kinetiken, siehe 2.2.2.) verwendet. Aber anstatt der relativ breiten Wellenlängenbereiche der aktinischen Anregungslichtfarben (blau bzw. grün) wurden zur selektiven Anregung der verschiedenen Photopigmente (z.B. ChlA), bzw. der Phycobiliproteide (z.B. PUB; PE) spezielle ausgelegte Filtersätze verwendet, die weitgehend den Spektralbereich des Lichts transmittieren, indem das jeweilige Pigment hauptsächlich absorbiert. Das Phycobilisomen-Model in Fig. 1.1.7.2 beschreibt vereinfacht die Transmissionsbereiche dieser Filtersätze sowie die entsprechenden Anteile am *in vivo*-Gesamt-Absorptionsspektrum von *Trichodesmium*. Im Ergebnisteil (siehe Abb. 1.4.3) sind außerdem die Spektren des transmittierten Anregungslichts dieser Filtersätze (in rot) gezeigt.

2.4.3. HPLC von *Trichodesmium*-Extrakten zur Aufreinigung von Pigmentstandarts für das „Gaus-Peak-Fitting“

Um mit der Methode von Küpper (Kupper, Seibert *et al.* 2007) die Konzentrationen der verschiedenen Photopigmente, sowie deren Isomerformen und Abbauprodukte in *Trichodesmium*-Kulturen zu bestimmen, war einige Vorarbeit bei der Erstellung der „Pigment-Standarts von Nöten.

Fig. 2.4.3.1



Figur 2.4.3.1: Im unteren Teil der Figur ist das Gradienten-HPLC-Messprotokoll einer Aufreinigung (über eine Affinitätssäule) von *Trichodesmium*-Extrakten (in Aceton gelöst) dargestellt. Die kleinen Pfeile unterhalb der Schreibermitschriebe kennzeichnen die jeweils gesammelte Fraktion (durch senkrechte Schreiberstriche in Weinrot voneinander getrennt), sowie deren Verbleib als Müll oder für weitere Absorptionsmessungen. Die Schreiber detektieren im UV-Bereich (blau) für allgemein eluiertes Material, sowie im überschneidendem Absorptionsbereich der häufigsten Pigmente (bzw. deren Abbauprodukte) von *Trichodesmium*. Die markantesten Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert, bzw. in Aceton gelöst, spektral untersucht. Die entsprechenden Absorptionsspektren sind jeweils auf ihren Maximal-Peak normiert, im oberen Teil der Figur dargestellt.

Dafür wurden wie in Fig. 2.4.3.1 beschrieben die Aceton-löslichen Moleküle (wie die meisten Photopigmente, außer die PBPs) aus unterschiedlich alten (Wachstumsphasen), bzw. verschieden gestressten Kulturen (wie in Abb. 3.7.1), via Gefriertrocknung und Gradienten-HPLC, ihrer Ladung nach aufgetrennt, sodass letztlich sofern möglich, jede Pigmentvariante pur fraktioniert, bzw. isoliert vorlag. Zur weiteren Analyse dieser Fraktionen wurden die Absorptionsspektren aufgenommen. Nach Vergleich mit den bekannten Spektren in der Literatur wurden sie qualitativ-, und quantitativ zugeordnet. Anschließend wurden die so gewonnenen Standards (sofern nicht verunreinigt) jeweils mit einem bestimmten Set aus bis zu 5 verschiedenen „Gauss“-Peaks (Kombination verschiedener Glockenkurven mit Normalverteilung, als Summenformel aufaddiert), um letztlich dem neuen

Konzentrationsbestimmungsprogramm für Photopigmente zur Verfügung stehen zu können. Pigmente, die aufgrund ihrer physikalisch ähnlichen Eigenschaften hier nicht weiter aufgetrennt werden konnten, wurden als Gruppe standardisiert.

2.4.4. *In vitro*-Analyse der Photopigment-Komposition via Absorption von *Trichodesmium*-Extrakten und „Gauss-Peak-Fitting“

Zu jedem der 5 Messzeitpunkte wurden stets 80 ml der zu untersuchenden Kultur auf einen Glasfaserfilter (25 mm Durchmesser; GF/F glass fibre filters, Whatman) abgesaugt, der anschließend in flüssigem N eingefroren, und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

Die Filterproben wurden in Dunkelheit lyophilisiert, anschließend in 1 ml Aceton überführt und für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Dabei werden die Membranen solubilisiert und die Photopigmente, wie ChlA oder die Karotinoide in Lösung gebracht. Nach einem Zentrifugationsschritt um Filterreste zu pelletieren, wurde jeweils 1 ml Überstand im Absorptions-Spektrometer (350 – 750 nm) untersucht. Die daraus gewonnenen Spektren wurden durch das „Fitting“ mit den Standard-Spektren aller, in *Trichodesmium* enthaltenen Pigmente und Pigmentgruppen (mit sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften), in die entsprechende Pigment-Konzentration, bzw. -Komposition umgerechnet (siehe Fig.2.4.4.1.). Ein Pigment-Standard-Spektrum ist ein Additionsspektrum aus verschiedenen Gauss-Peaks definierter Kombination und bekannter Konzentration (Kupper, Spiller *et al.* 2000)) Die Pellets wurden für die anschließende Proteinextraktion weiter verwendet.

Fig. 2.4.4.1

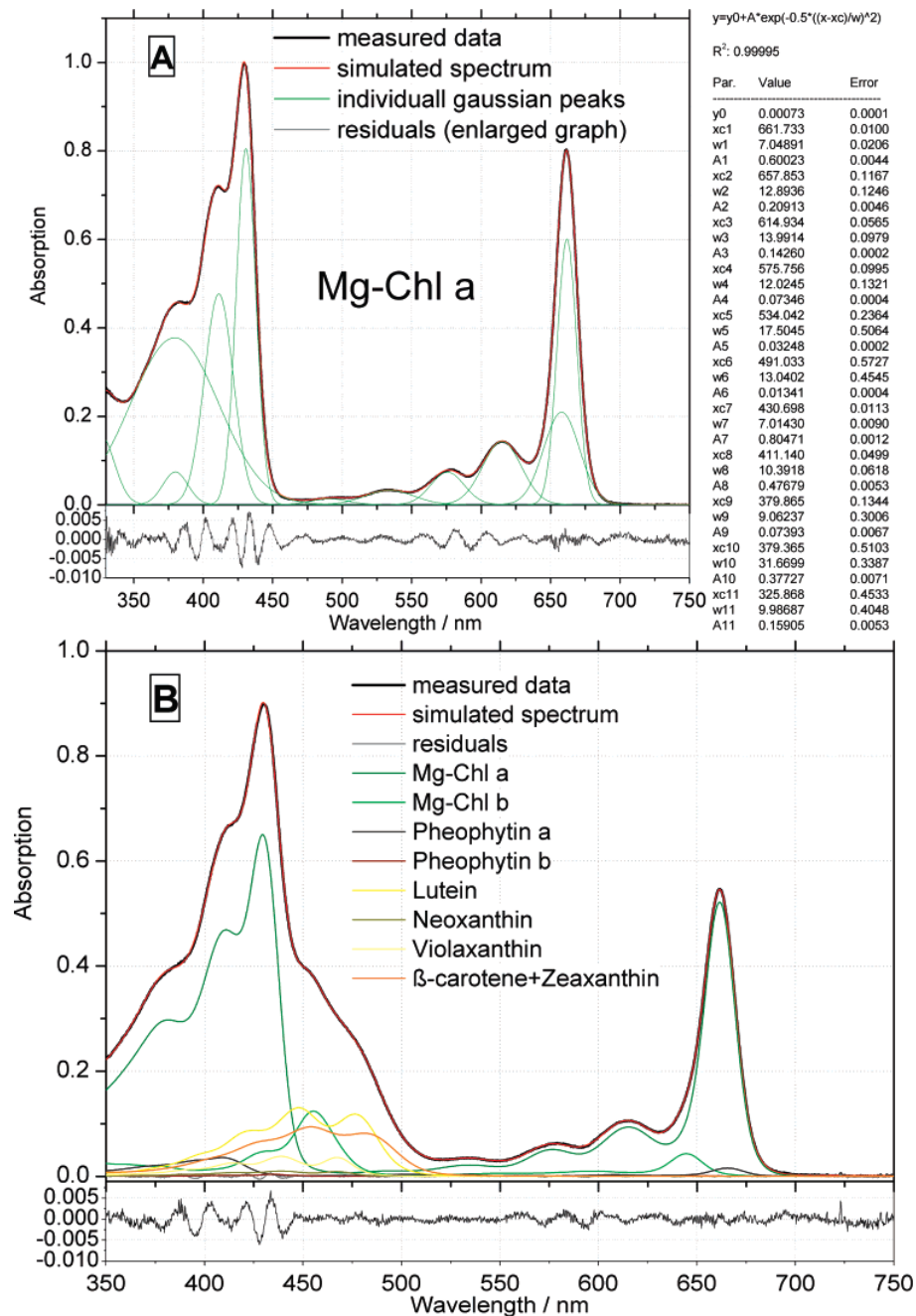


Figure 2.4.4.1: a) Mg-Chl a-Spektrum in Aceton mit Set aus 10 verschieden Gauss-Peaks mathematisch beschrieben (Mg-Chl a-Pigmentstandart). b) Pigmentstandart-beschriebenes *in vitro* Absorptionsspektrum eines Pigmentmixes in Aceton (Kupper, Seibert *et al.* 2007)

Um die Komposition Protein-assoziiierter Pigmente, wie die Phycobiliproteide der Phycobilisomen, zu quantifizieren, wurden die Filter-Pellets, durch eine weitere Gefriertrocknung vom Aceton befreit und anschließend in 1 ml 1xPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) resuspendiert, um die enthaltenen Proteine in Lösung zu bringen. Nach 24 Stunden (Dunkelinkubation, 4 °C) und einem Zentrifugationsschritt (bei 4 °C, 10 min, 4.000 g) wurden die Absorptionsspektren von jeweils

1 ml Überstand, mit dem gleichen Spektrometer, welches auch für die vorangehende Acetonmessung Verwendung fand, gemessen.

Mit der oben genannten Methode des „Gauss-Peak-Fitting“ dieser Spektren, kann anschließend ebenso auf die Konzentrationen der einzelnen PBPs zurückgerechnet werden. Das Verfahren wurde bis 2007 weiter verbessert und ausführlich dokumentiert (Kupper, Seibert *et al.* 2007).

3. Ergebnisse

3.1. Eisen-Mangelstress bei *Trichodesmium*

3.1.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen bei blauem bzw. grünem Anregungslicht mit 20-facher Vergrößerung

Die Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, zu den 3 Tageszeiten (morgens, mittags, abends) geerntet und für die bildgebenden Fluoreszenzkinetikmessungen in die Messkammer eingebettet. Die Fluoreszenzkinetiken der eingebetteten Zellen wurden mit blauem und alternativ grünem Anregungslicht (gleicher Energiegehalt) gemessen. Anschließend wurden die F_0 -Werte der Pixel jeder Zelle gemittelt und zur Übersicht als Histogramm dargestellt.

Abb. 1.1.1

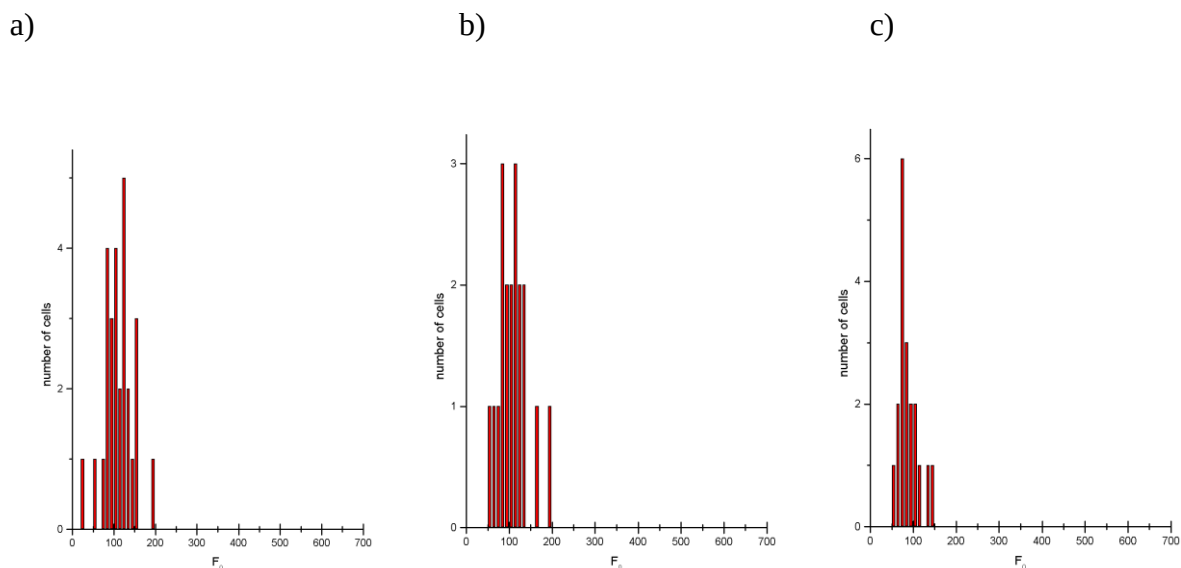


Abbildung 1.1.1: Histogramme der Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen der Kontrollkultur (normaler Fe-Gehalt) zu verschiedenen Zeitpunkten: a) Morgen; b) Mittag; c) Abend. X-Achse: Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 -Werte. Y-Achse: Anzahl der Zellen innerhalb definierter F_0 -Intervalle („number of cells“). Die Zellen wurden mit blauem Anregungslicht (30% aktinisches Licht) und 20-facher Vergrößerung gemessen.

Die Mehrzahl der F_0 -Werte zu den drei gemessenen Tageszeiten in Abb.1.1.1 liegt im Bereich um $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Alle 3 Histogramme zeigen Ähnlichkeit mit der Gauss'schen Normalverteilung. Die vermutete Gruppenbildung dieser Fluoreszenzparameterwerte, aufgrund von Aktivitätszustandsänderungen („state-transitions“) speziell um die Mittagszeit

(Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Am Morgen (unter a)) wurde eine besonders niedrig fluoreszierende Zelle detektiert.

Abb. 1.1.2

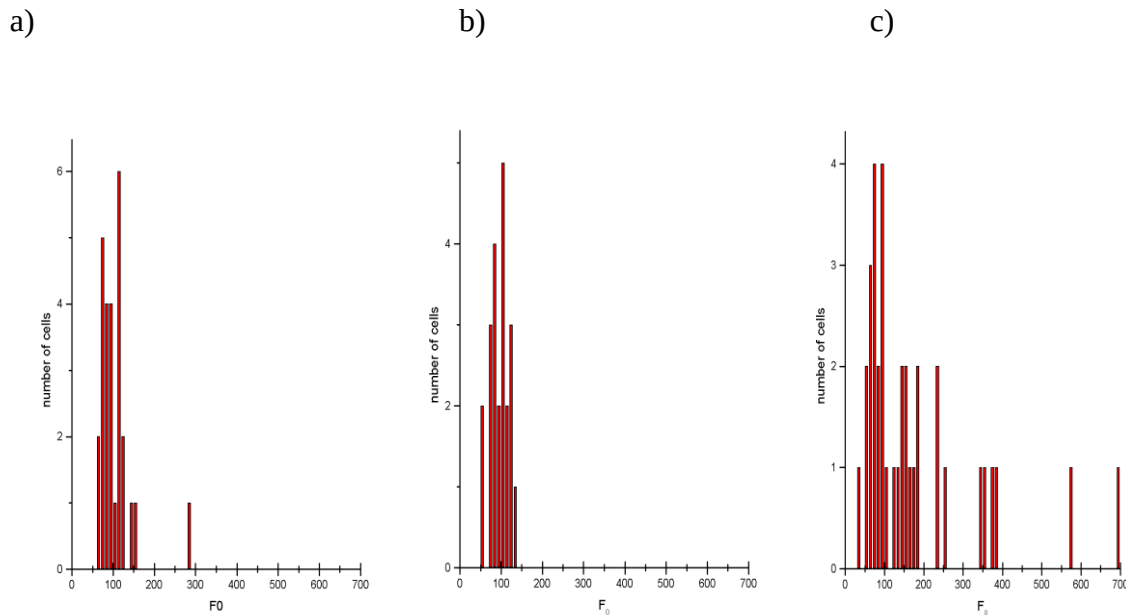


Abbildung 1.1.2: Histogramme der Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen der „lowFe“-Kultur (1/10 des normalen Fe-Gehalts) zu verschiedenen Zeitpunkten: a) Morgen; b) Mittag; c) Abend. X-Achse: Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 -Werte. Y-Achse: Anzahl der Zellen innerhalb definierter F_0 -Intervalle („number of cells“). Die Zellen wurden mit blauem Anregungslicht (30% aktinisches Licht) und 20-facher Vergrößerung gemessen.

Die Histogramme in Abb. 1.1.2 zeigen (ebenso wie in Abb.1.1.1) ein Maximum um $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Am Morgen unter a) hat eine Zelle einen F_0 -Wert um 300, also ca. dreimal so hoch wie die so genannten „normal“ Zellen. Die vermutete Gruppenbildung der F_0 -Werte um die Mittagszeit unter b) ist nicht zu sehen. Am Abend unter c) wurden allerdings viele verschiedene F_0 -Werte bis zu $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aufgezeichnet. Man könnte hier das Histogramm in 3 bis 4 Gruppen von Zellen unterteilen. Im Bereich $50\text{-}100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ könnten sich die postulierten normalen Zellen befinden. Im Bereich $125\text{-}180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine zweite Gruppe zu finden. Das könnten Zellen sein, deren PBPs teilweise von einander entkoppelt sind; die so genannten „bright I“-Zellen. Die höher fluoreszierenden Zellen sind wahrscheinlich die so genannten „very bright“-Zellen (auch „bright II“ genannt). Sie müssen nicht unweigerlich eine physiologische Funktion haben, da diese meistens bald nach den Messungen platzten und ausliefen, sodass im Filament nur noch eine leere fluoreszenzarme Zellhülle verblieb.

Alternativ zum blauen Anregungslicht (Abb. 1.1.1 bzw. Abb. 1.1.2) wurden die F_0 -Werte der Zellen mit grünem Anregungslicht gemessen.

Intervalle („number of cells“). Die Zellen wurden mit grünem Anregungslicht (44% aktinisches Licht) und 20-facher Vergrößerung gemessen.

In Abb. 1.1.4 wurden die F_0 -Werte der Fe-Mangel-gestressten Kulturen mit grünem Anregungslicht gemessen. Am Morgen (unter a)) ist wieder ein Maximum um $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu erkennen. Eine weitere kleine Gruppe könnte man um $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vermuten. Einzelne Zellen zeigen F_0 -Werte bis $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Am Mittag (unter b)) sind 2 Maxima im Histogramm bei 100 bzw. $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu erkennen. Die Trennschärfe der Gruppen ist allerdings nicht sehr hoch. Eine Zelle zeigt eine erhöhte Grundfluoreszenz mit $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Am Abend (unter d)) ist wieder die Hauptgruppe der F_0 -Werte um $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lokalisiert. Eine zweite Gruppe Zellen ist mit F_0 -Werten von 200 bis $480 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ relativ breit verteilt. Zwei stark fluoreszierende Zellen (bei 960 bzw. $1.180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) wurden außerdem detektiert.

Aufgrund der geringen Anzahl brauchbarer Zellen und um die postulierte Gruppenbildung deutlicher zu sehen, wurde unter Abb. 1.1.5a) die F_0 -Werte aller Tageszeiten der Kontroll-Kultur aus Abb. 1.1.1a)-c), bzw. unter Abb.1.1.5b) die F_0 -Werte aller Tageszeiten der Fe-Mangel-gestressten Kultur aus Abb. 1.1.2a)-c) zusammen addiert. Diese Werte und alle Kinetiken der späteren Starklicht-Versuche wurden mit blauem Anregungslicht gemessen.

Abb. 1.1.5

a)

b)

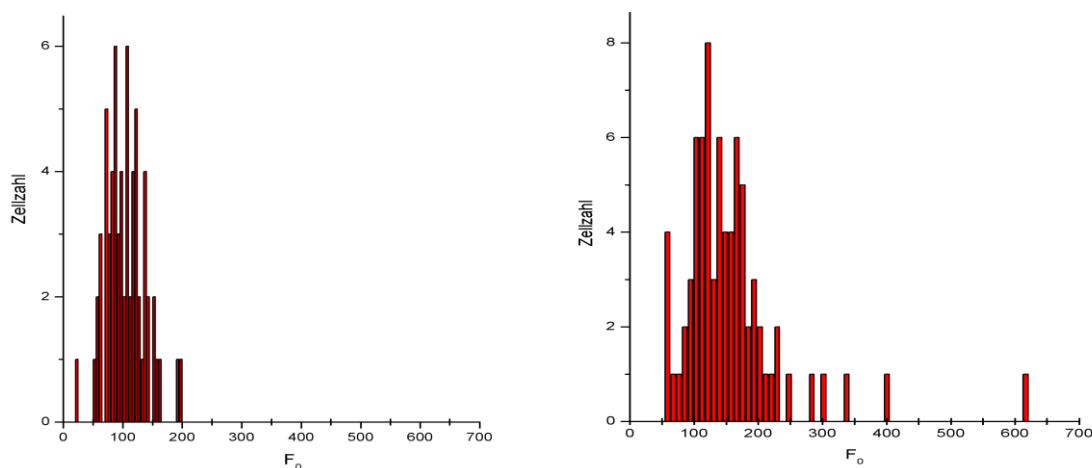


Abbildung 1.1.5: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. In a) wurden die Werte aller Tageszeiten aus Abb. 1.1.1a)-c) (normaler Fe-Gehalt) addiert um eine Tagesübersicht der Kontroll-Kultur zu bekommen. In b) wurden die Werte der Fe-Mangel-gestressten Kultur (1/10 des normalen Fe-Gehalts) aus Abb. 1.1.2a)-c) addiert. X-Achsen: ChlA-Grundfluoreszenz F_0 -Werte in nm.

Y-Achse: Anzahl der Zellen innerhalb definierter F_0 -Intervalle („number of cells“). Die Zellen wurden mit blauem Anregungslicht (30% aktinisches Licht) und 20-facher Vergrößerung gemessen.

Bei der Kontroll-Kultur unter Abb. 1.1.5a) ist eine relativ gleichmäßige Verteilung der F_0 -Werte, ähnlich einer Glockenkurve (Normalverteilung) zu erkennen. Das Maximum liegt bei $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Das Histogramm der Fe-Mangel-gestressten Kultur unter Abb. 1.1.5b) beschreibt ebenso eine Gauss'sche Glockenkurve mit allerdings zwei Maxima bei $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bzw. $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Fe-Mangel-Kulturen zeigen allerdings häufiger stärker fluoreszierende Zellen als die ungestressten Kulturen mit normalem Fe-Gehalt.

3.1.2. Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen bei blauem Anregungslicht und 40-facher Vergrößerung

Für diese und alle späteren Experimente wurde F_0 ausschließlich mit blauem Anregungslicht und 40-facher Vergrößerung gemessen. Außerdem wurden die „bildgebenden“ Kinetiken an 5 bestimmten Zeitpunkten über den Tag verteilt gemessen. Der erste Messzeitpunkt war kurz vor dem Anschalten des Lichts. Der nächste Messpunkt war am Morgen, wenn die Photosynthese hochfährt. Der Dritte lag um die Mittagszeit, wenn die Belichtungsstärke ihr Maximum erreicht. Am Abend, wenn es wieder dunkler wird und in der Nacht, wenn das Licht bereits eine halbe Stunde aus ist, wurden die letzten beiden Messungen vorgenommen.

Abb. 1.2.1

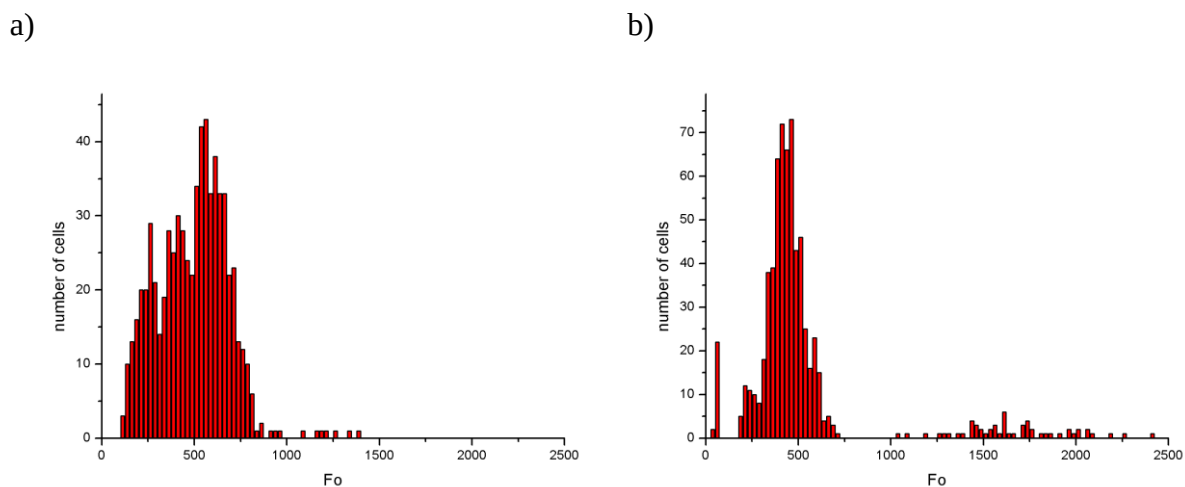


Abbildung 1.2.1: Histogramme der Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte wurden jeweils addiert um eine Tagesübersicht zu erreichen. X-Achse: Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 -Intervalle. Y-Achse: Anzahl der Zellen innerhalb definierter F_0 -Intervallwerte („number of cells“). a) Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt. b) Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts im Kultivierungsmedium.

Abb. 1.2.2

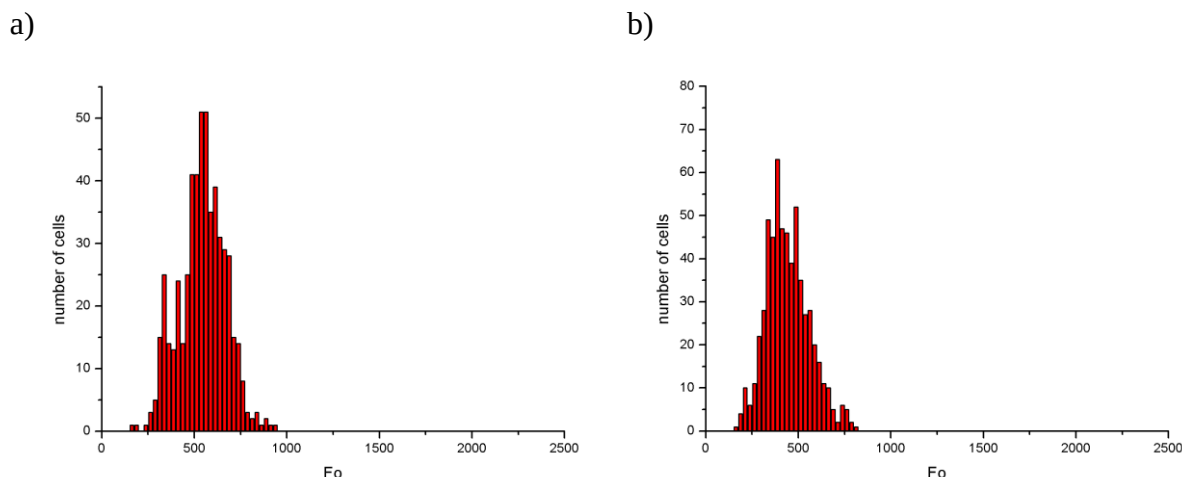


Abbildung 1.2.2: Histogramme der Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. Im Gegensatz zu Abb. 1.2.1 wurden die zu messenden Proben nach der Ernte für 1 Stunde bei 23 °C und schwacher Belichtung inkubiert und erst anschließend gemessen. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte wurden jeweils addiert um eine Tagesübersicht zu erreichen. X-Achse: Chlorophyll-Grundfluoreszenz F_0 -Intervalle. Y-Achse: Anzahl der Zellen innerhalb definierter F_0 -Intervallwerte („number of cells“). a) Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium. b) Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts im Medium.

In die Abbildungen 1.2.1 und 1.2.2 sind relativ viele Daten eingeflossen. Dies war notwendig, da in den vorangegangenen Messungen zu wenig auswertungsfähige Zellen für jeden der 5 Messzeitpunkte zur Verfügung standen. Außerdem wurden die Ergebnisse der entsprechenden Messpunkte in jeweils einem Histogramm zusammen gefasst. Die höheren F_0 -Werte sind hier, im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen (mit 20-facher Vergrößerung gemessen), auf den Einsatz des 40x-Objektivs (mit 40-facher Vergrößerung) zurückzuführen. Es erhöht zusätzlich noch die Schärfe auf den Kinetikbildern, was zu größerer Genauigkeit der F_0 -Werte ausgewählter Zellen führte.

Abb. 1.2.1a) zeigt die Kontroll-Kultur. Die F_0 -Werte der Zellen könnte man grob in 3 bis 4 Gruppen unterteilen. Die erste kleine Gruppe der schwach fluoreszierenden Zellen liegt im Bereich von $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Eine stärker fluoreszierende Gruppe liegt zwischen 300 und $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Danach kommt die größte Gruppe der F_0 -Werte. Sie liegt im Bereich von 500 bis $850 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Außerdem wurden wenige stark fluoreszierende Zellen im Bereich von 850 bis $1.400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ detektiert.

In Abb. 1.2.1b) sind die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte der Fe-Mangel-gestressten Zellen zusammengeführt. Im Vergleich zur Kontrolle (a)) fällt auf, dass fast nur noch die Gruppe im Bereich 300 bis $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ deutlich zu erkennen-, und sogar relativ gewachsen ist. Die Gruppen zwischen 100 und $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. 500 und $850 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind nur noch ansatzweise zu erkennen. In der schwach fluoreszierenden Region sind einige Zellen mit nur $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu sehen. Außerdem ist die stark fluoreszierende Gruppe der F_0 -Werte gewachsen und hat sich bis $2.400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ausgeweitet.

In Abb. 1.2.2 wurden die gleichen Kulturen wie in Abb. 1.2.1 gemessen. Im Gegensatz zu Abb. 1.2.1 wurden aber die zu messenden Proben nach der Ernte für 1 Stunde bei 23°C und schwacher Belichtung inkubiert und erst anschließend auf die Grundfluoreszenz F_0 hin untersucht. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte wurden jeweils addiert um eine Tagesübersicht zu erreichen.

Bei der Kontroll-Kultur unter Abb. 1.2.2a) fällt gleich die große Gruppe Zellen von 500 bis $850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf. Eine kleine schwächer fluoreszierende Gruppe von 350 bis $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist ebenso zu erkennen.

Die Verteilung der F_0 -Werte bei den Fe-Mangel-gestressten Zellen unter Abb. 1.2.2b) ist sehr gleichmäßig und ähnelt einer Glockenkurve. Es gibt eigentlich nur eine Gruppe im Bereich von 150 bis $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mit einem Peak bei $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, also leicht nach links verschoben. Es ist auffällig, dass weder in a) noch b) stark fluoreszierende Zellen mit über $1.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu sehen sind.

3.1.3. Verhältnis der variablen Fluoreszenz F_v , bzw. des Nicht-photochemischen Quenchings Q_{NP} zur Grundfluoreszenz F_0 einzelner Fe-Mangel-gestresster Zellen

Um mehr über die postulierte Gruppenbildung der Fluoreszenzparameterwerte zu erfahren, ist im folgendem die Abhängigkeit der verschiedenen Parameter untereinander aufgezeigt. Die Fluoreszenz wurde mit blauem Anregungslicht und mit 40-facher Vergrößerung gemessen

Abb. 1.3.1

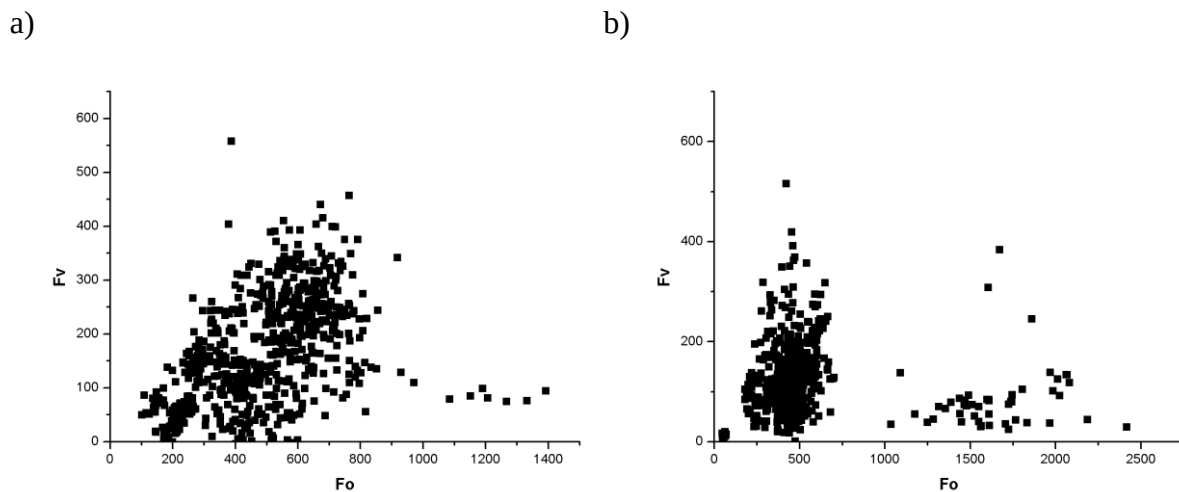


Abbildung 1.3.1: Scatterplots der Fluoreszenzparameterwerte der variablen Fluoreszenz F_v zur ChlA-Grundfluoreszenz F_0 (aus Abb. 1.2.1) von a) Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium, und b) Kulturen mit 1/10 des normalem Fe-Gehalts im Medium.

Die Abb. 1.3.1 zeigt die variable Fluoreszenz F_v in Relation zur ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen der Kontroll-Kultur unter a) und der Fe-Mangel-gestressten Kultur unter b). Die Zellen der Kontroll-Kultur zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung. Man könnte aber eine Trennlinie in der großen Hauptgruppe annehmen. Sie zieht sich quer von den F_0 -, bzw. F_v -Werten von 300-, bzw. 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bis hin zu 700-, bzw. 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Allgemein kann man die Tendenz der Hauptgruppe so beschreiben: Je höher die Grundfluoreszenz F_0 , desto höher ist auch die variable Fluoreszenz F_v . Auffällig sind die F_0 -Werte über 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sie haben alle eine F_v um 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Außerdem weist eine einzelne Zelle mit $F_0 = 380 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eine sehr hohe F_v von 580 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf.

Die Fe-Mangel-gestressten Zellen in b) grenzen sich in zwei Gruppen ab. Im F_0 -Bereich von 150 bis 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zeigt die Hauptgruppe solcher Zellen fast gleichmäßig verteilt variable Fluoreszenzwerte von knapp über 0 bis 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Darüber, im F_v -Bereich von 300 bis 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wurden nur noch wenige Zellen detektiert. Sie sind scheinbar mit einer F_0 um 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zentriert. Die zweite Zellgruppe liegt im F_0 -Bereich von 1.000

bis $2.500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mit F_v -Werten von 30 bis $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Es fällt auf, dass sich die F_v -Werte im Vergleich zu den stark variierenden entsprechenden F_0 -Werten dieser Gruppe wenig variierend zeigen.

Ein paar wenige Zellen mit sehr niedrigen F_0 -Werten zeigen eine ebenso niedrige F_v um $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und grenzen sich somit von den anderen Zellgruppen etwas ab.

Abb. 1.3.2

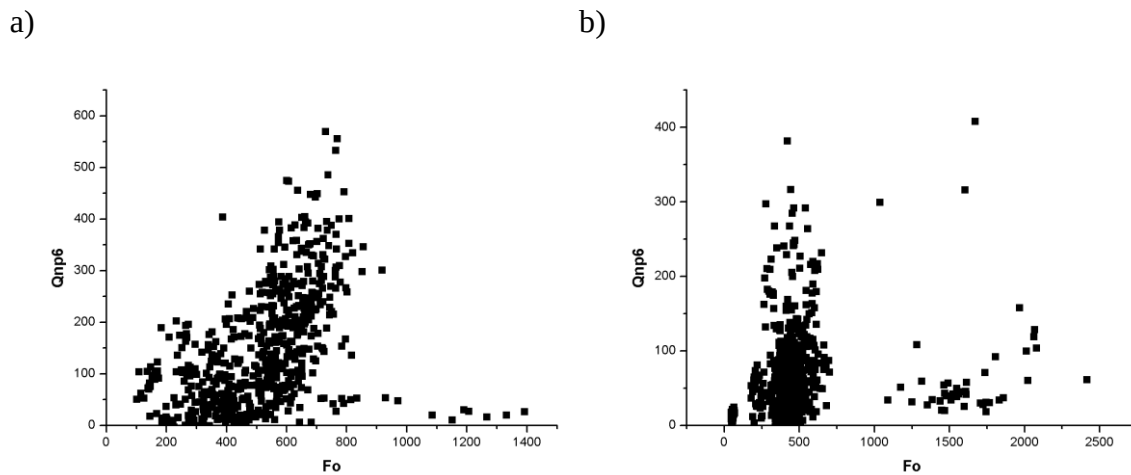


Abbildung 1.3.2: Scatterplots der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 (aus Abb. 1.2.1), und dem nicht-photochemischen Quenching Q_{NP} , zum Zeitpunkt des 6. gesättigten Lichtimpulses (in der aktinischen Belichtungsphase) von Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium (a), und der Kulturen mit 1/10 des normalem Fe-Gehalts im Medium unter b) dargestellt.

Die Abb. 1.3.2 zeigt Verteilung des Nicht-photochemischen Quenchings Q_{NP} einzelner Zellen zum Zeitpunkt des 6. gesättigten Lichtimpulses in der aktinischen Belichtungsphase, im Bezug zu deren ChlA-Grundfluoreszenz F_0 (aus Abb. 1.2.1), der Kontroll-Kultur in a) und der Fe-Mangel-gestressten Kultur in b).

Die Zellen der Kontroll-Kultur zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung. Allgemein kann man aber die Tendenz der Hauptgruppe, ähnlich wie bei Abb.1.3.1, so beschreiben: Je höher die Grundfluoreszenz F_0 , desto höher ist auch das Q_{NP6} . Man könnte die Hauptgruppe auch in 2 Gruppen unterteilen. Erst Zellen mit F_0 -Werten über $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ haben hohe Q_{NP6} -Werte über $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bis hin zu $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Eine kleine Gruppe im F_0 -Bereich 900 bis $1.400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zeigt relativ niedrige Q_{NP6} -Werte um $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Die Fe-Mangel-gestressten Zellen in b) grenzen sich in zwei Gruppen ab. Der F_0 -Bereich von 150 bis $750 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hat gleichmäßig verteilt Zellen mit Q_{NP6} -Werten von knapp über 0 bis $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Darüber im Q_{NP6} -Bereich 150 bis $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befinden sich deutlich abgrenzend weniger Zellen als bei der Kontrolle. Die zweite Zell-Gruppe liegt im F_0 -

Bereich von 1.000 bis 2.500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mit Q_{NP6} -Werten von 30 bis 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Drei einzelne Zellen zeigen hier sehr hohe Q_{NP6} -Werte von 300 bis über 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Wenige Zellen mit sehr niedriger Grundfluoreszenzen zeigen, ähnlich wie in Abb. 1.3.1b), auch hier sehr niedrige Q_{NP6} -Werte von nahe 0 bis 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.1.4. Spektrale Eigenschaften von *Trichodesmium* in den verschiedenen Aktivitätszuständen

Die theoretischen Überlegungen über Aktivitätszustände in Bezug auf die Kopplung der Phycobillisomenuntereinheiten (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004), ließ uns die Zellen nach ihren F_0 -Werten (mit 20-facher Vergrößerung gemessen) in 4 Gruppen unterteilen. Die „low F_0 “-Zellen haben F_0 -Werte bis 4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Hauptgruppe der Zellen, die „normalen“ Zellen, haben F_0 -Werte bis 18 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die so genannten „bright I“-Zellen sind heller fluoreszierend im Bereich von 18 bis 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die seltenen „bright II“-Zellen haben generell die höchsten Grundfluoreszenzwerte und beginnen ab 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (bis > 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Manche der „normalen“ Zellen wiesen so gut wie keine variable Fluoreszenz auf. Diese wurden, im Gegensatz zu den „normal active“-Zellen mit normaler F_v , als „normal inactive“ bezeichnet.

Abb. 1.4.1

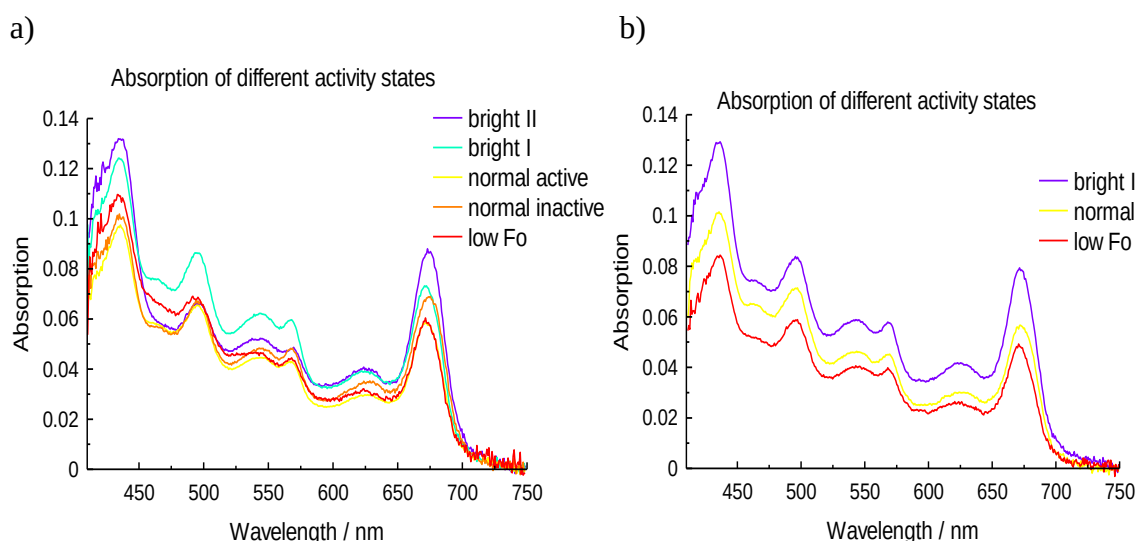


Abbildung 1.4.1: Übersicht der in vivo-Absorptionsspektren einzelner Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen. Unter a) sind Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt, und unter b) sind Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts im Medium gezeigt.

Die Abb. 1.4.1 zeigt die *in vivo* Absorptionsspektren von einzelnen *Trichodesmium*-Zellen in verschiedenen Aktivitätszuständen. Wie in Material und Methoden beschrieben, absorbieren die verschiedenen Photopigmente das Licht mit ihren charakteristischen Einzelspektren.

In a) ist die Kontroll-Gruppe beschrieben. Die „normalen“ Zellen haben beide sehr ähnliche Spektren mit einer unauffälligen Verteilung der absorbierenden Photopigmente. Die „low F_0 “-Zelle zeigt ein ähnliches Spektrum mit der Ausnahme einer relativ erhöhten Absorption im Bereich der Karotinoide um 460 nm. Die „bright I“-Zelle zeigt die hohe Absorption des ChlA. Am auffälligsten ist eine sehr stark erhöhte Fluoreszenz im Absorptionsbereich der Karotinoide, von PUB, PE und auch leicht bei PC. Die „bright II“-Zelle hat von allen Aktivitätszuständen die höchste Chlorophyll-Absorption. Die Absorptionswerte der Karotinoide sowie der Untereinheiten der PBPs hingegen zeigen „normale“ Werte. Der Absorptionswert von PC liegt allerdings am höchsten, ähnlich dem der „bright I“-Zelle, ist aber relativ zu allen anderen Aktivitätszuständen nur leicht erhöht.

In b) sind Fe-Mangel-gestresste Zellen gezeigt. Die verschiedenen Zellen der 3 Aktivitätszustände zeigen im Grunde die gleichen Absorptionsspektren wie die entsprechenden Zellen der Kontroll-Gruppe unter a). Nur in der „low F_0 “-Zelle scheint die relativ erhöhte Absorptionsrate der Kontroll-Zelle von Karotin wieder auf das normale Niveau gesunken zu sein. Man kann allgemein für die Fe-Mangel-gestressten Zellen erkennen, dass je höher die F_0 -Werte der Zellen sind, desto stärker absorbieren alle Komponenten der Photopigmente. Die relative Verteilung der Komponenten der verschiedenen PBPs untereinander bleibt hier stets sehr ähnlich.

Abb. 1.4.2

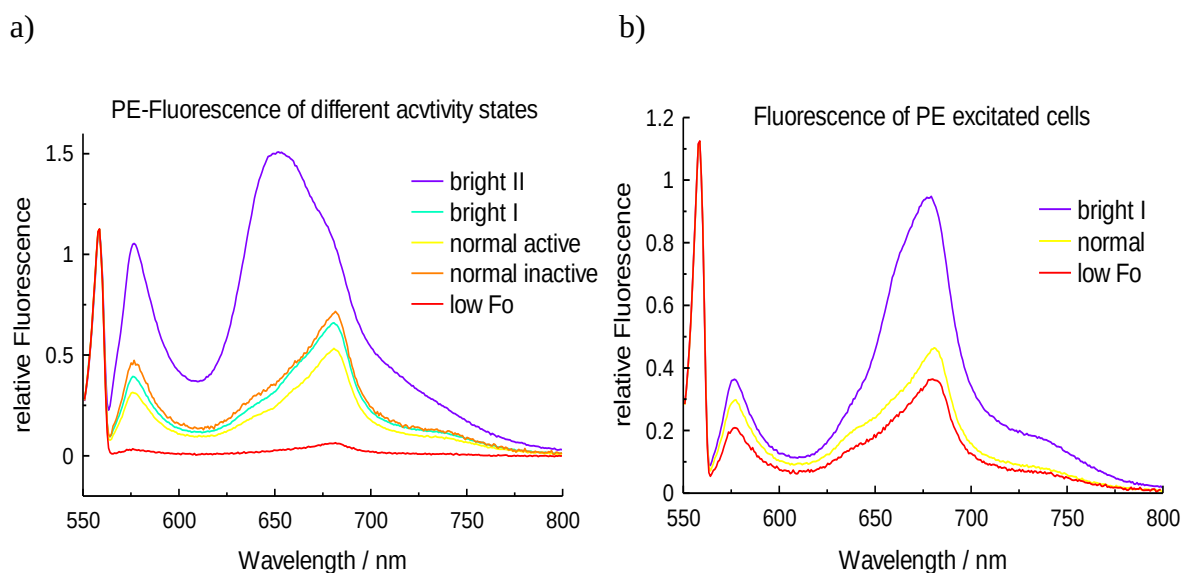


Abbildung 1.4.2: Übersicht der in vivo-Fluoreszenzspektren verschiedener Aktivitätszustände einzelner Zellen bei der Anregung durch Bestrahlung im Absorptionsbereich von PE. Unter a) sind Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt, und unter b) sind Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts im Medium gezeigt.

Die Abb. 1.4.2 zeigt die relative Fluoreszenz von *Trichodesmium*-Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen bei Anregung mit Licht im Bereich von 530 bis 570 nm, in dem hauptsächlich PE absorbiert. Es wurden für dieses Experiment die gleichen Zellen gemessen, die auch anschließend für die Absorptionsmessungen (Abb. 1.4.1) Verwendung fanden.

In Abb. 1.4.1a) sind die Zellen der Kontroll-Gruppe gezeigt. Die „low F_0 “-Zelle zeigt wie erwartet kaum Fluoreszenz. Die Spektren der „normalen“ Zellen sind sich sehr ähnlich. Die „inactive“-Zelle zeigt eine höhere Fluoreszenzrate als die entsprechende „active“-Variante. Die Spektren zeigen zwei Hauptpeaks. Ein kleinerer bei 580 nm, sowie der größere bei 665 nm. Man könnte annehmen, dass bei 645 nm ein leichter Bauch dem Hauptpeak anliegt. Im Bereich von 725 bis 775 nm ist aber auch ein wenig Fluoreszenz zu erkennen. Das Spektrum der „bright I“-Zelle liegt genau zwischen den „normalen“ Zellen und ähnelt diesen auch sehr in seiner Form. Nur die „bright II“-Zelle verhält sich anders. Ihr erster Peak mit seinem Maximum bei 580 nm ist ca. doppelt so groß wie bei den „normalen“ Zellen. Der Hauptpeak hat sein Maximum bei 645 nm und hat einen relativen Fluoreszenzwert von ca. 1,5. Anliegt ist ein Bauch bei 665 nm, also im Bereich des Hauptpeaks der anderen Aktivitätszustände. Die erhöhte Fluoreszenz im Bereich 725 bis 775 nm ist, mit zunehmend abnehmender Tendenz bei steigender Wellenlänge (ab 775 nm), auch hier zu erkennen.

In Abb. 1.4.1b) sind die Fe-gestressten Zellen aufgezeigt. Die „low F_0 “-Zelle zeigt allgemein die niedrigste Fluoreszenzrate. Die Form der Spektren ähnelt sehr den „normalen“ Zellen der Kontroll-Gruppe unter a). Das Spektrum der „normalen“ Zelle zeigt, außer der relativ leichten Erhöhung der allgemeinen Fluoreszenzrate, kaum Veränderung im Vergleich zur „low F_0 “-Zelle. Auch die „bright II“-Zelle zeigt eine ähnliche Form des Spektrums wie die, der anderen Aktivitätszustände. Allerdings ist die allgemeine Fluoreszenzrate ca. doppelt so hoch wie die der „normalen“ Zelle.

Abb. 1.4.3

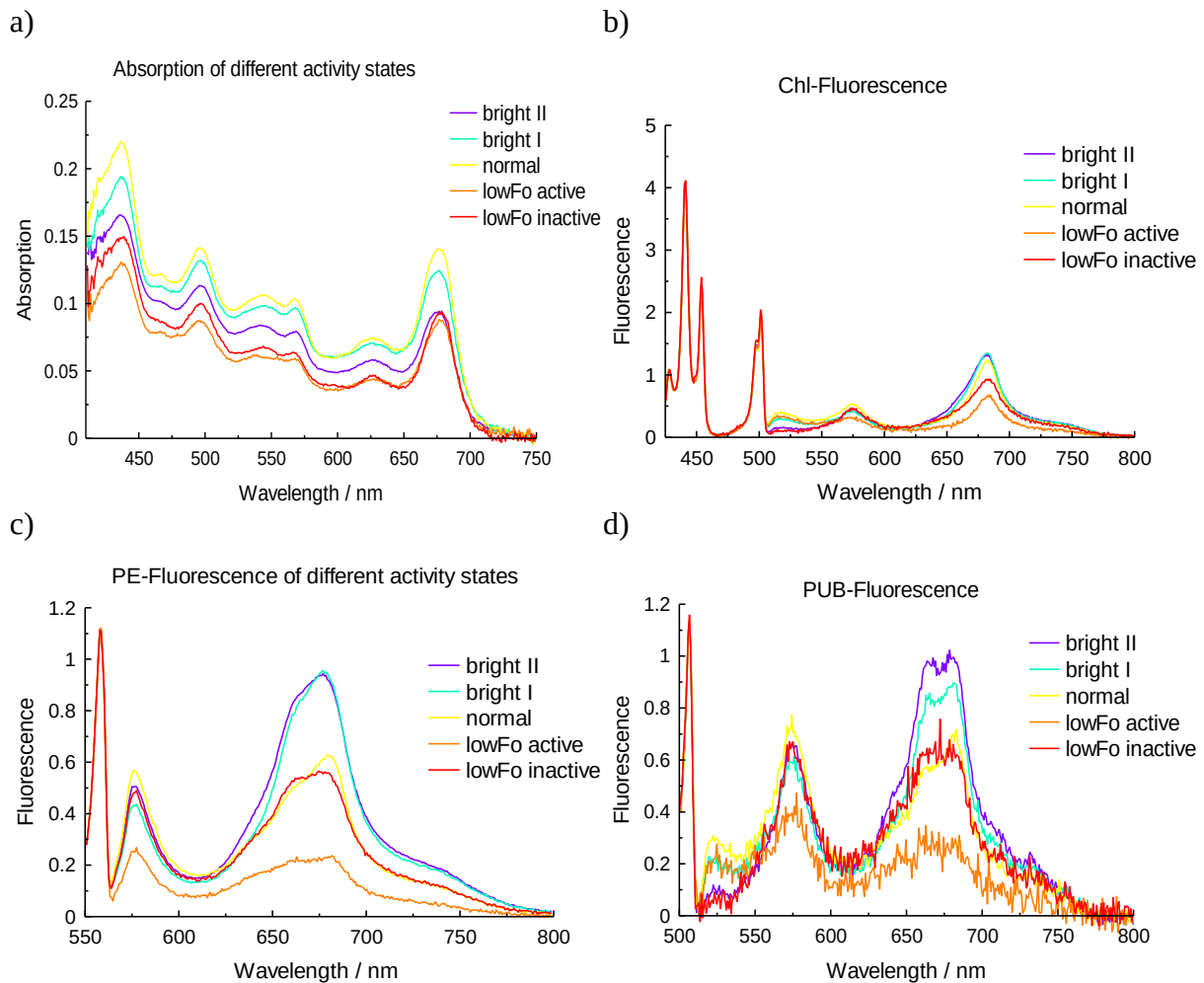


Abbildung 1.4.3: Übersicht der spektralen Eigenschaften einzelner ungestresster *Trichodesmium*-Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen. a) In vivo-Absorptionsspektren, b) in vivo-Fluoreszenzspektren durch ChlA-, und PUB-Bestrahlung, c) in vivo-Fluoreszenzspektren durch PE-Bestrahlung und d) in vivo-Fluoreszenzspektren durch PUB-Bestrahlung.

In Abb. 1.4.3 ist eine Übersicht der spektralen Eigenschaften der verschiedenen Aktivitätszustände einzelner ungestresster *Trichodesmium*-Zellen gezeigt. Für alle Graphen von a) bis d) wurden die gleichen Zellen verwendet.

Die einzelnen Absorptionsspektren unter a) sind in der Form weitgehend sehr ähnlich. Der Unterschied liegt in der Höhe der Absorption. Die „low F₀“-Zellen absorbieren in allen Wellenlängenbereichen am geringsten. Die „bright II“-Zelle zeigt mittlere Absorptionswerte. Obwohl hier der Rot-absorbierende ChlA-Peak bei 675 nm eine ähnliche Höhe hat wie der, der „low F₀“-Zellen, ist im Vergleich der Blau-absorbierende Peak bei 445 nm, sowie alle anderen Absorptionsbereiche, größer. Die „bright I“-Zelle zeigt in allen Wellenlängen deutlich noch mehr Absorption. Die größte Absorption in allen Bereichen zeigt die „normale“ *Trichodesmium*-Zelle. Auffällig ist, dass zwar der Absorptionspeak von PC bei 625 nm (wie

auch alle anderen Peaks) entsprechend am höchsten ist, die Täler dazwischen aber gleiche Absorptionswerte wie die Täler der „bright I“-Zelle aufweisen.

In Abb. 1.4.3b) sind die Fluoreszenzspektren bei blauem Anregungslicht im Bereich von 415 bis 495 nm gezeigt, die auch für die Kinetikmessungen verwendet wurden. Dadurch kann selektiv ChlA und ein Teil von PUB angestrahlt werden. Bis 510 nm ist das Spektrum des Anregungslichts gezeigt. Die „low F_0 “-Zellen weisen fast über den ganzen Wellenlängenbereich die niedrigste Fluoreszenz auf. Die „active“-Variante zeigt in den 2 Hauptpeaks bei 570 nm bzw. 680 nm niedrigere Werte als die „inactive-low F_0 “-Variante. Allerdings hat ihr kleiner Peak bei 520 nm hohe Fluoreszenzwerte wie die, der „normal“- und „bright I“-Zelle. Die „inactive-low F_0 “-Zelle hat hier auffallend die niedrigsten Werte, fast wie die, der „bright II“-Zelle. Allerdings weist sie bei 570 nm mit die höchsten Werte auf. Die „normal“-Zelle zeigt in den Peaks bei 520 bzw. 570 nm, im Vergleich zu den anderen Aktivitätszuständen, die höchsten Fluoreszenzwerte. Bei 680 nm fluoresziert sie fast so stark wie die „bright“-Zellen. Die Spektren der „bright“-Zellen sind der „normalen“ Zelle sehr ähnlich und zeigen bei 680 nm die größte Fluoreszenz. Die „bright II“-Variante hat aber, ähnlich wie die „inactive-low F_0 “-Zelle, beim Peak um 520 nm signifikant die niedrigsten Werte.

In Abb. 1.4.3c) ist die *in vivo*-Fluoreszenz einzelner Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen durch selektive Bestrahlung von hauptsächlich PE (ähnlich wie in Abb. 1.4.3b) für ChlA) gezeigt. Das rote Spektrum bis 570 nm ist das Anregungslicht für PE. Allgemein hat jedes Spektrum einen relativ kleinen Peak bei 575 nm, sowie einen Großen mit zwei Maxima bei ca. 660 bzw. 680 nm. Die „active-low F_0 “-Zelle zeigt mit Abstand in allen Bereichen die niedrigste Fluoreszenz. Zirka doppelt so stark und in der Form des Spektrums der „normalen“ Zelle ähnelnd, fluoresziert die „inactive-low F_0 “-Version in allen Bereichen. Der Unterschied zwischen den zwei Zellen liegt im Verhältnis der jeweiligen Maxima des großen Peaks. Die „normal“-Zelle zeigt mehr Fluoreszenz im Peak bei 680 nm, wo hingegen sie weniger im Peak bei 660 nm vorweist. Auffallend sind auch die höchsten Werte der „normal“-Zelle im kleinen Hauptpeak. Die „bright“-Zellen zeigen wieder die höchsten Fluoreszenzwerte im großen Peak. Sie sind ca. ein Drittel höher als die, der „normal“-Zelle. Das Verhältnis der Maxima ist aber relativ gleich. Im kleinen Peak rangieren die Werte der „bright“-Zellen aber wieder unter denen, der „normal“-Zelle.

In Abb. 1.4.3d) ist die *in vivo* Fluoreszenz einzelner Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen durch selektive Bestrahlung von hauptsächlich PUB gezeigt. Das rote

Spektrum bis 510 nm ist das Anregungslicht für PUB. Allgemein ist die Beschreibung der Spektren der verschiedenen Aktivitätszustände ab 570 nm die gleiche wie die, der PE-Fluoreszenz unter c). Allerdings ist der kleine Peak bei 525 nm noch auszuwerten. Hier scheint es 3 Gruppen zu geben. Die „low F_0 -inactive“- und die „bright II“-Zelle haben die niedrigsten Werte in diesem Peak. Doppelt so stark fluoreszieren hier die „low F_0 -active“- sowie die „bright I“-Zelle. Dreifache Werte zeigt nur die „normal“-Zelle bei 525 nm.

3.1.5. *In vivo*-Absorptionsspektren von *Trichodesmium* zu verschiedenen Tageszeiten

In den folgenden Graphen sind die *in vivo*-Absorptionsspektren von Fe-Mangel-gestressten Zellen im Tagesverlauf gezeigt. Jedes Einzelspektrum ist der Mittelwert aus 6 zufällig ausgewählten Zellen an jeweils 4 verschiedenen Messtagen, also 24 Zellen insgesamt. Es sollte hier untersucht werden, wie sich die einzelnen Komponenten des Photosyntheseapparats im Bezug auf ihre Absorption relativ zueinander im Tagesverlauf verändern. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jeweils eine „baseline“-Korrektur im UV-Bereich vorgenommen um alle Spektren auf das gleiche Niveau zu bringen.

Abb. 1.5.1

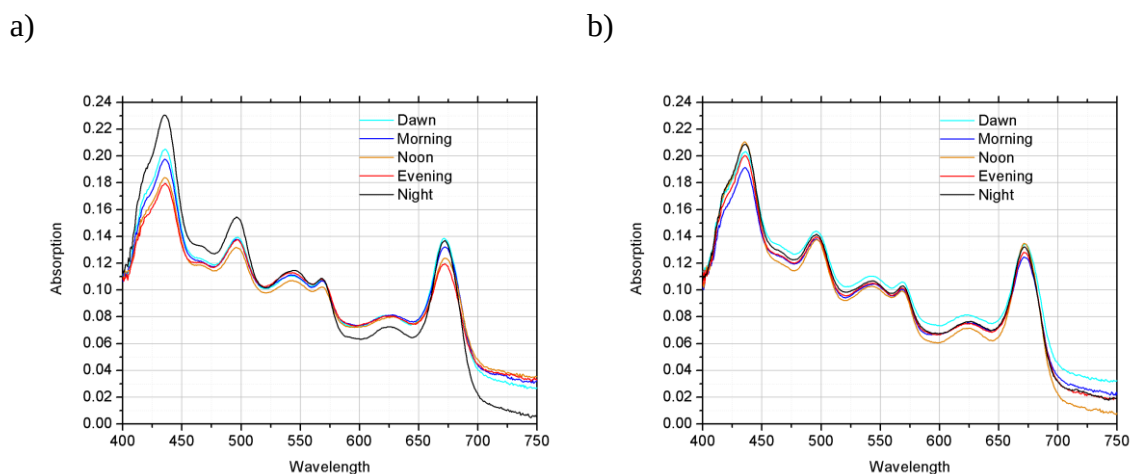


Abbildung 1.5.1: *In vivo*-Absorptionsspektren der verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahme von Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium (a) und Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts im Medium (b). Jedes Einzelspektrum ist ein Mittelwert aus Messungen mehrerer Zellen. Es folgte außerdem eine „baseline“-Korrektur im UV-Bereich (< 400 nm) um alle Graphen auf ein vergleichbares Niveau (den Mittelwert der Einzelspektren in diesem Bereich) zu bekommen.

In Abb. 1.5.1a) sind die ungestressten Zellen der Kontroll-Kultur gezeigt. Mit Ausnahme der „Night“-Zellen haben die Zellen, der anderen Messzeitpunkte im Absorptionsbereich der PBPs und der Karotinoide, sehr ähnliche Werte. Es wird aber ersichtlich, dass die

Absorptionspeaks von ChlA in den Morgenstunden („Dawn“, „Morning“) und in der Nacht („Night“) am größten sind. Die Zellen, die in der Nacht gemessen wurden zeigen aber noch andere Besonderheiten. Die „baseline“ des Spektrums > 750 nm zeigt mit Abstand die niedrigste Höhe. Der Rotlicht-absorbierende Peak von ChlA hat aber die gleichen Werte, wie die Zellen, der anderen Messzeitpunkte (Tageszeiten). Im Bereich von PC absorbieren die Zellen 1/10 weniger Licht als alle anderen. Im Bereich der zwei Maxima des PE-Absorptionspeaks zeigen die „Night“-Zellen wieder sehr ähnliche Werte. Aber in den Absorptionsbereichen des blauen Peaks von ChlA, der Karotinoide sowie von PUB weisen sie stets ca. 10% mehr Absorption als die Zellen der verschiedenen anderen Tageszeiten auf.

In b) sind die *in vivo*-Absorptionsspektren der Fe-Mangel-gestressten Zellen gezeigt. Auf den ersten Blick scheinen alle Spektren der verschiedenen Tageszeiten relativ ähnlich. Signifikante Unterschiede in der Absorption der Pigmentkomposition sind eigentlich nur im Bereich von PC und der Karotinoide zu erkennen. Die Zellen, die am Mittag („Noon“) gemessen wurden, zeigen hier ein wenig niedrigere Werte. Die „Dawn“-Zellen (vor dem Anschalten des Kultivierungslichts gemessen) haben hier, wie auch entsprechend in fast allen anderen Absorptionsbereichen, den höchsten Wert.

Abb. 1.5.2

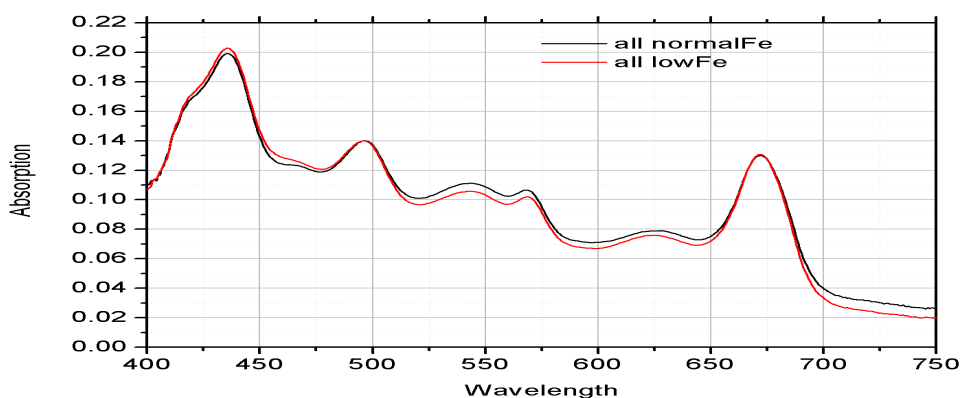


Abbildung 1.5.2: Vergleich der *in vivo*-Absorptionsspektren der Kontroll-Kulturen mit den Fe-Mangel-gestressten Kulturen (1/10 des normalem Fe-Gehalts im Medium). Jedes Einzelspektrum ist jeweils der Mittelwert der verschiedenen Tageszeiten aus Abb. 1.5.1a), bzw. b). Es folgte außerdem eine „baseline“-Korrektur im UV-Bereich um beide Graphen auf ein vergleichbares Niveau zu bekommen.

In Abb. 1.5.2 ist ein Gesamtvergleich aller *in vivo*-Absorptionsspektren zwischen der Kontroll-, und der Fe-Mangel-Kultur gezeigt. Jedes Einzelspektrum ist jeweils der Mittelwert der entsprechenden Einzelspektren der verschiedenen Tageszeiten aus Abb. 1.5.1. Die Fe-Mangel-gestresste Kultur zeigt im Bereich der „baseline“ bei 750 nm, von PC und von PE

niedrigere Werte. Gleiche Absorptionswerte haben die Kulturen im roten Peak von ChlA sowie für PC. Bei den Karotinoiden, sowie beim Blaulicht-absorbierenden Peak von ChlA, hat die Fe-Mangel-Kultur („all lowFe“, rotes Spektrum) allerdings, die leicht höheren Werte.

Abb. 1.5.3

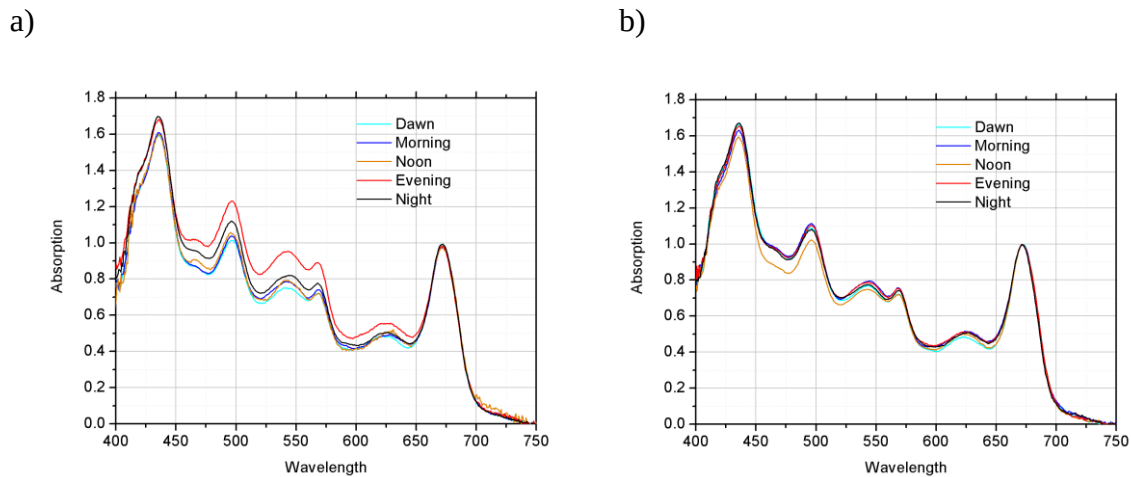


Abbildung 1.5.3: In vivo-Absorptionsspektren der verschiedenen Probenahmezeitpunkte von a) Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium und b) Kulturen mit 1/10 des normalen Fe-Gehalts. Jedes Einzelspektrum ist der Mittelwert aus mehreren Messungen. Es folgte außerdem eine „baseline“-Korrektur im Bereich > 750 nm um alle Graphen auf ein vergleichbares Niveau (Absorption(750 nm)=0) zu bringen. Anschließend wurden die Spektren auf den Rotlicht-absorbierenden Peak von ChlA normiert, um den Pigmentgehalt in Relation darzustellen.

In Abb. 1.5.3 sind *in vivo*-Absorptionsspektren Fe-Mangel-gestresster Zellen im Tagesverlauf gezeigt. Jedes Einzelspektrum ist der Mittelwert aus 6 jeweils zufällig ausgewählten Zellen, (die Selben wie in Abb. 1.5.1) an 4 verschiedenen Messtagen, also 24 Zellen insgesamt. Es sollte hier untersucht werden, wie sich die Absorption der verschiedenen Komponenten des Photosyntheseapparats, sowie dessen Komposition im Tagesverlauf, relativ zueinander verändert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jeweils eine „baseline“-Korrektur im Bereich > 750 nm durchgeführt um alle Graphen auf ein Niveau zu bringen. Anschließend wurden die Spektren auf den Rotlicht-absorbierenden Peak von Chlorophyll normiert um den Pigmentgehalt relativ zu ChlA darzustellen.

Unter a) sind die Kontroll-Kulturen gezeigt. Die Absorptionspeaks der Pigmente wurden aufsteigend nach ihrer Wellenlänge untersucht: Die Zellen der Abend- („Evening“) und der Nacht-Proben („Night“) zeigen, jeweils im Blaulicht-absorbierenden ChlA-Peak, ca. 6% mehr Absorption als die Zellen der anderen Messzeitpunkte. Dieser Trend wird im nächsten Peak (Absorption der Karotinoide) fortgesetzt. Die „Evening“-Zellen zeigen hier mit Werten über 1,0 die größte Absorption. Die Zellen der Nacht haben allerdings nur 5% niedrigere Werte.

Erneut ca. 5% weniger Absorption in diesem Peak weisen die „normalen“ Zellen auf. Die „Dawn“- und „Morning“-Zellen haben mit Werten um 0,85 die wenigste Absorptionsrate. Der nächste deutliche Haupt-Peak stammt in erster Linie von PUB. Die Reihenfolge der Absorptionsstärke, wie auch die Relation der Peaks, der verschiedenen Tageszeiten untereinander, entspricht relativ genau dem Muster des ersten kleinen Peaks der Karotinoide um 465 nm. Nur der Morgen („Morning“) hebt sich mit leicht höheren Absorptionswerten ein wenig von den „Dawn“-Zellen ab. Die Absorptionspeaks von PE zeigen mit ca. 19% Differenz die höchsten Werte bei den Zellen der Abendprobe („Evening“). Die Spektren der anderen Tageszeiten liegen in der Höhe darunter und relativ nah beisammen ($\pm 5\%$), zeigen aber doch erneut die gleiche Reihenfolge und relative Absorptionsfähigkeit, wie die Karotinoid-, bzw. PUB-Peaks zuvor. Der letzte deutliche Absorptionspeak stammt von PC. Hier hat wieder der Abend, mit ca. 17% Abstand, die höchsten Werte. Auffälligerweise liegen hier aber die Peakhöhen der anderen Tageszeiten sehr nah bei einander.

Unter 1.5.3b) sind die Fe-Mangel-gestressten Zellen dargestellt. Die Absorptionsspektren für die verschiedenen Tageszeiten sehen sich in der Höhe der Peaks sowie in deren Form, mit einer Ausnahme, sehr ähnlich. Auffällig zeigen sich die „Noon“-Zellen in den Absorptionspeaks der Karotinoide, sowie von PUB mit ca. 10% niedrigeren Werten. Im Blaulicht-absorbierenden Peak von ChlA, sowie in den Peaks von PE, wird die niedrigere Absorption der „Noon“-Zellen allerdings viel weniger deutlich.

Abb. 1.5.4

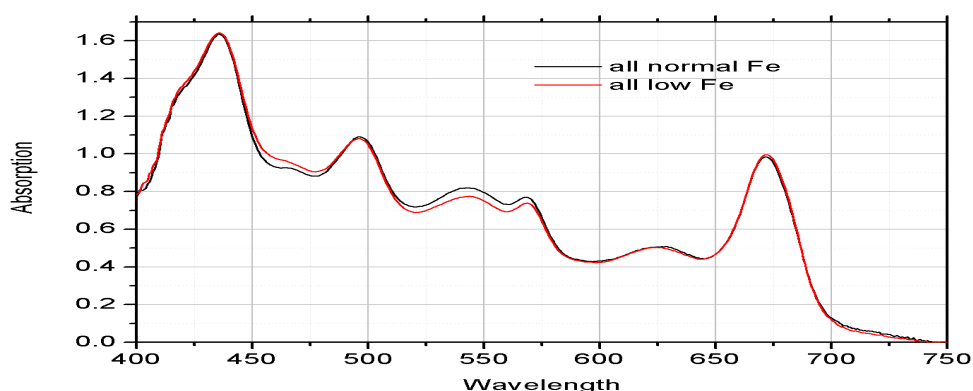


Abbildung 1.5.4: Vergleich der in vivo-Absorptionsspektren der Kontroll-Kulturen (schwarz) mit den Fe-Mangel-Kulturen (rot) mit 1/10 des normalem Fe-Gehalts im Medium. Jedes Einzelspektrum ist jeweils der Mittelwert der verschiedenen Tageszeiten aus Abb. 1.5.3. In Abb. 1.5.3 bekamen die Rohspektren eine Korrektur der „baseline“ im Bereich > 750 nm, um alle Graphen auf ein vergleichbares Niveau ($\text{Absorption}(750 \text{ nm}) = 0$) zu bringen. Anschließend wurden die Spektren auf den Rotlicht-absorbierenden Peak von ChlA normiert um den Pigmentgehalt in Relation darzustellen.

In Abb. 1.5.4 ist wieder der Gesamtvergleich der *in vivo*-Absorptionsspektren der Kontroll-Kultur mit der Fe-Mangel-Kultur gezeigt. Jedes Einzelspektrum ist jeweils der Mittelwert der Einzelspektren der verschiedenen Tageszeiten aus Abb. 1.5.3. Die Rohspektren für Abb. 1.5.3 erfuhren zuvor eine Korrektur der „baseline“ im Bereich > 750 nm um alle Graphen auf ein vergleichbares Niveau ($y=0$) zu bringen. Außerdem wurden die Spektren auf den roten Peak von ChlA normiert um den Pigmentgehalt in Relation darzustellen.

Die einzigen leichten Unterschiede in der Absorption der Pigmente zeigen die Peaks der Karotinoide und die von PE. Die Fe-Mangel-gestressten Kulturen („all lowFe“) zeigen im Vergleich zu den Kontroll-Kulturen („all normal Fe“) leicht niedrigere Werte im Absorptionsbereich von PE, aber wiederum leicht Höhere für die Kartinoid-Absorption. Gleiche Absorptionswerte haben die Kulturen im Blaulicht-absorbierenden Peak von ChlA sowie im Peak von PC.

3.1.6. Analyse von *in vitro*-Absorptionsspektren mit der Gauss-Peak-Spektren Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Pigmentkomposition

Abb. 1.6.1

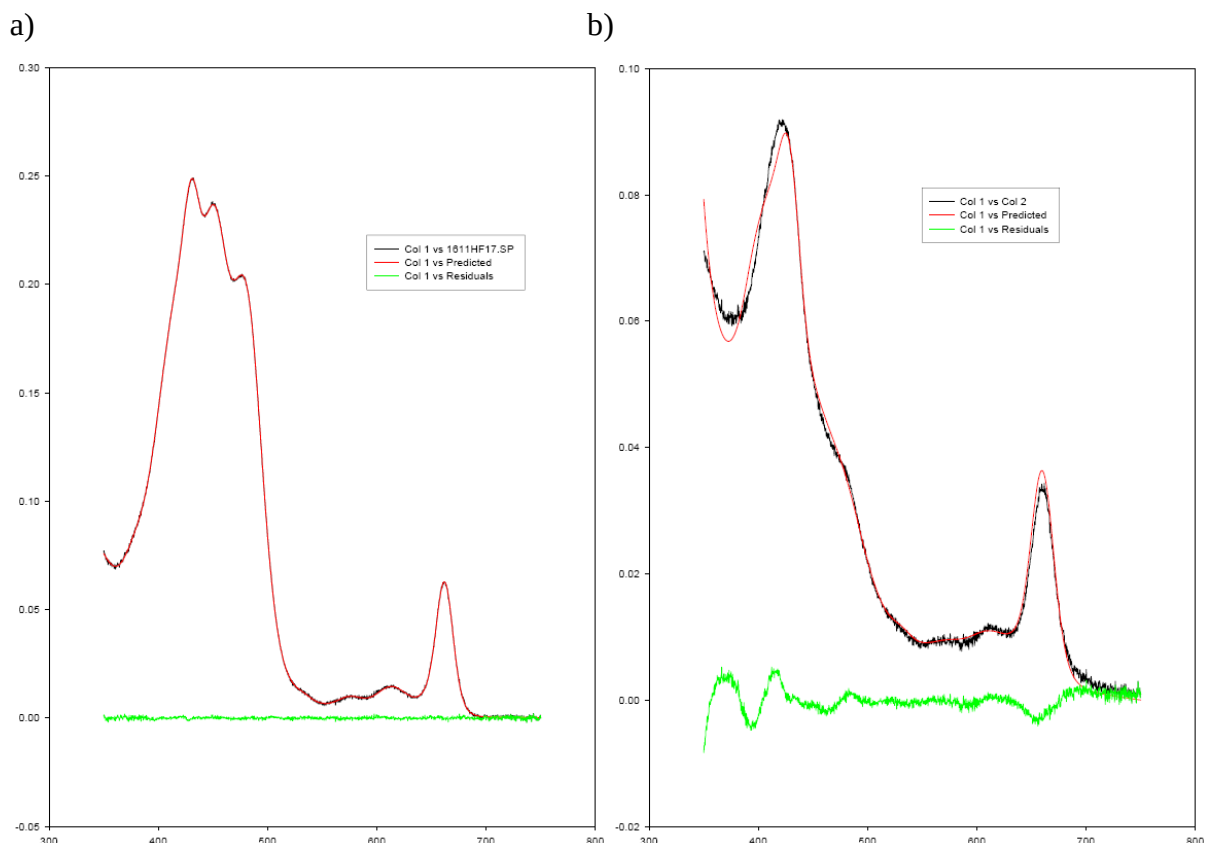


Abbildung 1.6.1: Durch „Gauss-Peak-Fitting“ beschriebene *in vitro*-Absorptionsspektren von a) Kontroll-Kulturen mit normalem Fe-Gehalt im Medium und b) Kulturen mit 1/10 des normalem Fe-Gehalts. In Schwarz ist das *in vivo*-Pigmentspektrum (in Aceton gemessen) dargestellt. Die Summenformel der, durch Fitting mit „Gauss-Peaks“ zusammengesetzten Näherung, ist in Rot dargestellt. Die Restunterschiede zwischen Spektrum und Näherung sind in Grün dargestellt. Die X-Achse beschreibt die Wellenlänge in nm, die Y-Achse relative Absorptionswerte.

In Abb. 1.6.1 sind *in vitro*-Absorptionsspektren aus Pigmentisolaten in Aceton (schwarz), sowie die entsprechende, durch Fitting mit Gauss-Peaks (Kupper, Seibert *et al.* 2007) errechnete Näherung (rot) gezeigt. Die Differenz zwischen Spektrum und Näherung ist jeweils in Grün dargestellt.

In a) ist das Spektrum der Kontroll-Kultur gezeigt. Das „Fitting“ (Beschreiben) des *in vitro*-Absorptionsspektrums mit den Sets aus Gauss'schen Peaks war hier erfolgreich. Die Näherung zeigt ca. 99% Ähnlichkeit zum Spektrum. Mit der gewonnenen Summenformel lassen sich im Weiteren die Konzentrationen der einzelnen Pigmente ausrechnen.

Weniger Erfolg beim „Fitting“ hatten einige Absorptionsspektren der Fe-Mangel-Kulturen, wie hier in b) exemplarisch dargestellt. Die häufiger als bei den Kontrollen auftretenden Trübe im Medium dieser gestressten Kulturen ist auf teilweise degradierte Photopigmente und Zellbestandteile zurückzuführen. Die Einzelspektren dieser Degradationsprodukte überlagerten oftmals das eigentliche Gesamt-Absorptionsspektrum der Photopigmentkomposition, was zur Unauswertbarkeit der errechneten Näherung mit dem möglichen Set an undegradierten Pigmentstandarts resultierte. Diese Proben zeichneten sich durch die hohe Varianz zwischen Spektrum und Näherung in den meisten Wellenlängenbereichen aus.

3.1.7. Tageszyklus der Pigmentverteilung ungestresster *Trichodesmium*-Filamente

Abb. 1.7.1

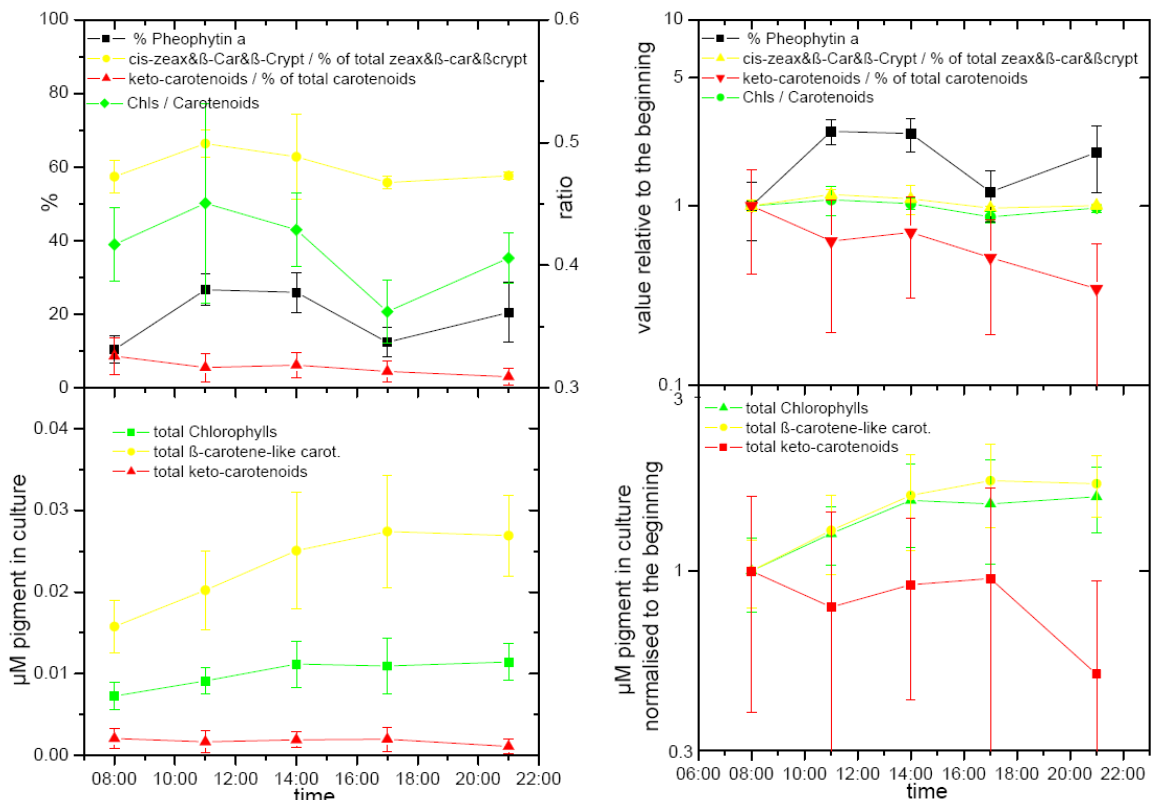


Abbildung 1.7.1: Tageszyklus der prozentualen Pigmentverteilung ungestresster *Trichodesmium*-Filamente. Die Konzentrationen aller Aceton-löslichen Pigmente einer Kultur wurden durch „Gauss-Peak-Fitting“ (Kupper, Seibert *et al.* 2007) des entsprechenden *in vitro*-Absorptionsspektrums errechnet. Im Graph links oben sind von mehreren Kulturen die dominierenden Pigmente, sowie das Verhältnis der Pigmentgruppen zueinander, prozentual dargestellt. Rechts oben ist die gleiche Verteilung, aber relativ zum Anfang („Dawn“) dargestellt. Im Graph links unten sind die Konzentrationen der wichtigsten Pigmentgruppen der Kultur über den Tag gezeigt. Rechts unten sind die Konzentrationen dieser Pigmentgruppen relativ zum Anfang („Dawn“) normiert im Tagesverlauf gezeigt.

Die Abb. 1.7.1 zeigt den Tageszyklus der prozentualen Pigmentverteilung ungestresster *Trichodesmium*-Filamente. Die Konzentrationen aller Aceton-löslichen Pigmente einer Kultur wurden durch „Gauss-Peak-Fitting“ (Kupper, Seibert *et al.* 2007) des entsprechenden *in vitro*-Absorptionsspektrums errechnet.

Im Graph links oben sind die dominierenden Pigmente von mehreren Kulturen, sowie das Verhältnis der Pigmentgruppen zueinander, prozentual dargestellt. In Schwarz ist das Verhältnis von PheophytinA zu ChlA beschrieben. Die „Dawn“-Messung um 8.00 Uhr weist niedrige Werte um 10% auf. Die „Morning“- und „Noon“-Werte um 11.00 bzw. 14.00 Uhr sind bis fast 30% stark erhöht. Am Abend (17.00 Uhr) erfolgt wieder ein Einbruch der

PheophytinA-Konzentration auf ca. 15%. In der Nacht (21.00 Uhr) steigt die Konzentration wieder auf Werte um 20%, allerdings mit einer hohen Varianz der verschiedenen Messergebnisse. Eine sehr ähnliche Form der Kurve des Tageszyklus von PheophytinA ist auch beim Verhältnis von *cis*-Zeaxanthin, β -Karotin und β -Cryptoxanthin zur Gesamtkonzentration von Zeaxanthin, β -Karotin und β -Cryptoxanthin (gelb), sowie beim Verhältnis der ChlA-Konzentration zur Konzentration aller Karotinoide (grün), zu sehen. Von 10 bis 5% über den Tag hin abfallende Verhältnisse sind bei der roten Kurve zu beobachten. Diese beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen der Keto-Karotinoide zur Gesamtheit aller Karotinoide.

Die Ausgangsdaten im Graph rechts oben sind die Selben wie für den Graph links oben. Diese wurden hier auf den Anfang (8.00 Uhr) normiert, um die Entwicklung über den Tag deutlicher verfolgen zu können.

Der Graph links unten zeigt die Molarität der Pigmentkonzentrationen aller Chlorophylle (grün), aller β -Karotin-ähnlichen Karotinoide (gelb), sowie der Keto-Karotinoide (rot), in den gemessenen Kulturen. Die Keto-Karotinoide zeigen sehr niedrige und wenig schwankende Konzentrationen im Tageszyklus. Die Kurve der ChlA-Konzentration hingegen steigt stetig vom Anfang (8.00 Uhr) bis zum Mittag (14.00 Uhr) um ca. 1/3, stagniert dann bis zum Abend (17.00) und steigt sogar noch einmal leicht zur Nacht (21.00) hin an. Die β -Karotin-ähnlichen Karotinoide zeigen die höchsten Konzentrationen. Wie bei den Chlorophyllen steigt hier die Kurve relativ konstant bis zum Mittag um 2/3. Anschließend steigt sie bis zum Abend wieder weniger und erreicht ihr Maximum. Die Konzentration ist dabei auf fast das doppelte der Konzentration um 8.00 Uhr gestiegen. Zur Nacht hin (21.00) sinkt sie wieder leicht ab.

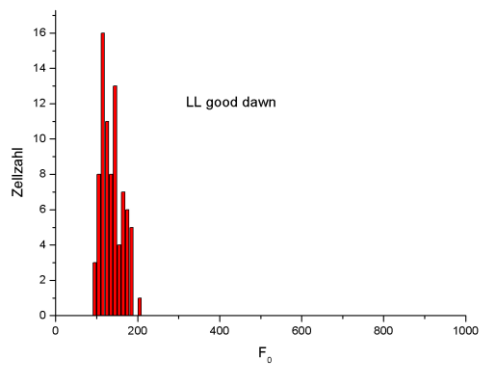
Die Ausgangsdaten des Graphen rechts unten sind die Selben wie links unten, allerdings auf den Anfang (8.00 Uhr) normiert, um die Entwicklung über den Tag deutlicher verfolgen zu können.

3.2. Starklicht-Stress bei *Trichodesmium* aus Batch-Kulturen

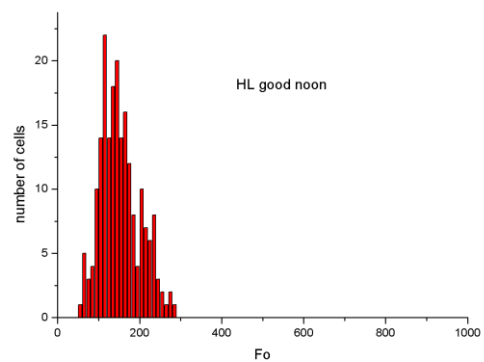
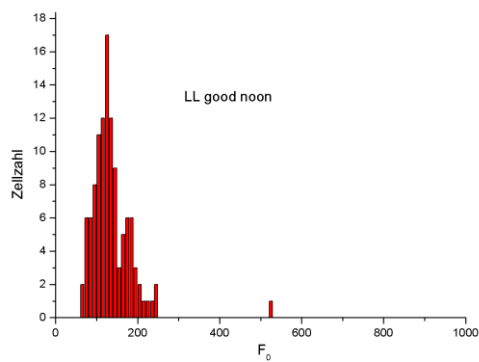
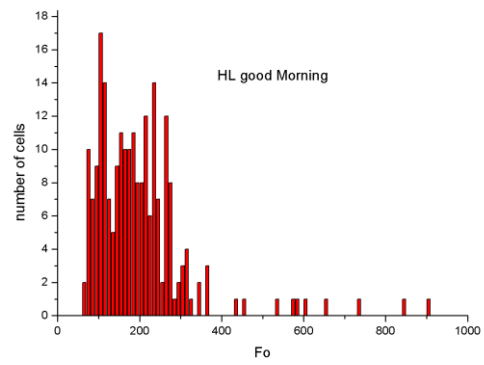
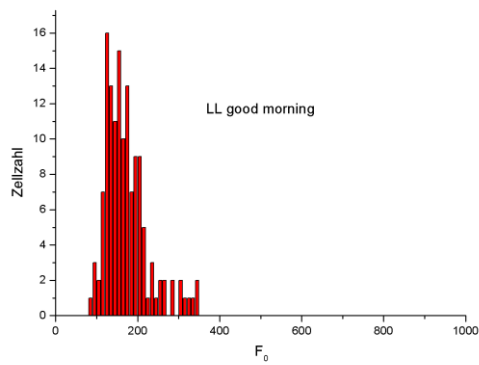
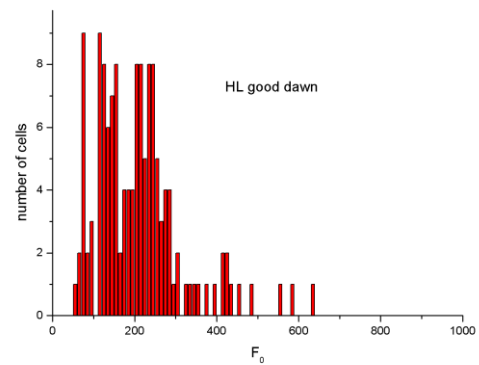
3.2.1. Grundfluoreszenz F_0 vitaler Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 2.1.1

a)



b)



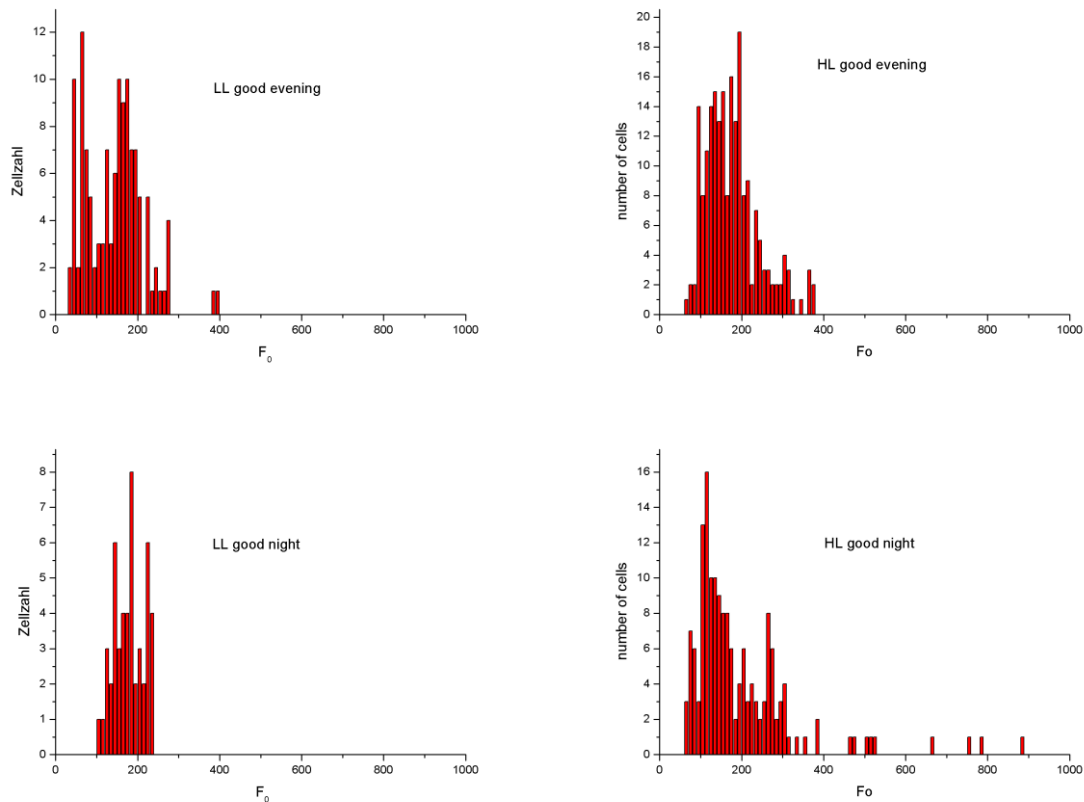


Abbildung 2.1.1: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen aus Batch-Kulturen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts). Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (niedrige bzw. normale Belichtung ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)), die zur Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht Bedingungen ($830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die F_0 -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts, mit 40-facher Vergrößerung gemessen. Es wurden nur „gute“ Kulturen („good“) verwendet, die hauptsächlich lange, sich bewegende, bzw. vitale Filamente (ohne „bright II-Zellen“) hatten, sowie nach dem Messtag noch weitere Tage am Wachsen waren.

Die Abb. 2.1.1 zeigt Histogramme der F_0 -Werte von einzelnen Starklicht-gestressten Zellen zu den verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts). Es wurden nur „gute“ Batch-Kulturen („good“) für die numerische Auswertung verwendet, welche hauptsächlich lange, sich bewegende bzw. vitale Filamente hatten, sowie nach dem Messtag noch weitere Tage am Wachsen waren.

Unter a) sind zunächst die Kontroll-Kulturen mit normaler Kultivierungsbelichtung gezeigt. Die F_0 -Werte im „Dawn“-Graph liegen alle im Bereich zwischen 90 und $210 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die meisten Zellen sind bei $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vertreten. Bei $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich ein leichter Einschnitt in der Zellanzahl. Die Häufigkeiten der Zellen des „Morning“-Graphen beginnt bei $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und steigen schnell bis $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf den Maximalwert an.

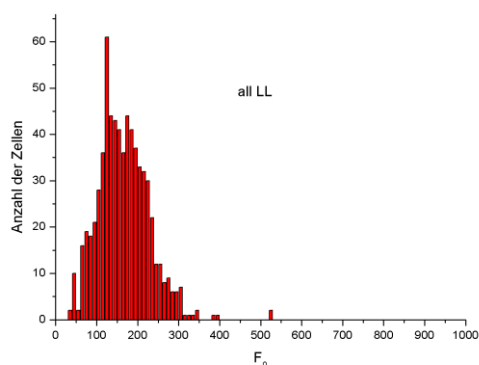
Danach sinkt sie wieder relativ variabel bis $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Es scheint einen kleinen Seitenpeak um $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu geben, der wieder bis $230 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf minimale Werte absinkt. Darüber hinaus finden sich nur noch vereinzelt stark fluoreszierende Zellen. Die Zellanzahlen des „Noon“-Graphen beginnen bei Werten ab $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und steigen schnell auf den Maximalwert bei $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Anschließend sinkt die Zellzahl wieder rapide bis $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Im Bereich zwischen 140 und $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich eine zweite kleinere Gruppe Zellen zu befinden. Sie hat ihr Maximum um $175 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Eine Zelle mit $530 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist auch sehr auffällig. Der „Evening“-Graph ist hingegen relativ diffus strukturiert. Grob betrachtet scheint sich im Bereich zwischen 30 und $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ eine Gruppe Zellen mit ihrem Maximum bei $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu befinden. Zwischen 100 bis kurz nach $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ liegt die Hauptgruppe der Zellen. Der Peakbereich hat F_0 -Werte um $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab $230 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder vereinzelt stark fluoreszierende Zellen detektiert worden. Der „Night“-Graph hat leider nur relativ wenige auswertbare Zellen. Ab $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl relativ stetig an und erreicht ihr Hauptmaximum um $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Anstieg ist $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ein auffälliges lokales Maximum zu sehen. Nach dem Hauptpeak folgt um $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ein breiter Einschnitt in der Häufigkeit der Zellen. Ab $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie wieder stark an und sinkt kurz darauf wieder auf null ab.

Die Graphen unter b) repräsentieren die Starklicht-gestressten Kulturen. Die Beschreibung des „Dawn“-Graphen ist aufgrund der stark variierenden Zellanzahlen benachbarter F_0 -Intervalle nicht ganz einfach. Zwischen 50 bis $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich eine kleine Gruppe Zellen mit ihrem Maximum bei $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl wieder auf den Maximalwert des ganzen Graphen. Mit leicht variierenden Zellanzahlen erstreckt sich diese zweite Gruppe bis ca. $165 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und fällt dann wieder schlagartig ab. Ab 170 bis $310 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich die große Hauptgruppe der Zellen zu befinden. Ihr breiter Peakbereich liegt um $230 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Bereich zwischen 320 und $630 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder vereinzelt Zellen zu sehen. Das Zentrum dieser Gruppe scheint bei $425 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu liegen. Ebenso variierend sind die Zellanzahlen der Intervalle im „Morning“-Graph. Zellen haben hier niedrigste F_0 -Werte ab $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab dort steigt die Zellanzahl wieder relativ stetig bis zum Maximum dieser ersten Gruppe bei $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach sinkt die Zellanzahl wieder auf ein lokales Minimum bei $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bis $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erstreckt sich die Hauptgruppe mit stark variierenden Zellanzahlen. Bei grober Betrachtung scheint in diesem Bereich ein Maximum um 170 und ein Weiteres um ca.

240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu liegen. Ab 280 bis 370 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Häufigkeit der Zellen wieder leicht. Darüber hinaus sind vereinzelt bis 910 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mehrere Zellen zu beobachten. Der „Noon“-Graph ist wieder einfacher zu beschreiben. Die Hauptgruppe der Zellen befindet sich zwischen 50 und 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat zwei Peakspitzen bei 120 bzw. 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Anliegend erstreckt sich eine kleine Nebengruppe von 200 bis 290 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Stark fluoreszierende Zellen wurden nicht detektiert. Am Abend („Evening“) variieren die Zellanzahlen der F_0 -Intervalle leider wieder stark, sodass eine Gruppierung schwer möglich ist. Ab 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Häufigkeit der Zellen erst leicht und ab 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ schlagartig auf einen hohen Wert an, um im nächsten Intervall wieder zu sinken. Im Bereich zwischen 110 und 170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint eine Gruppe Zellen vertreten zu sein. Danach erstreckt sich die Gruppe mit der höchsten Anzahl der Zellen im F_0 -Intervall bei 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bis 220 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 220 steigt die Zellanzahl wieder sprunghaft auf kleine Werte und sinkt wieder stetig in den nächsten Intervallen ab. Ab 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie erneut in einem kleinen Peak an. Um 370 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich letztlich noch eine kleine Anhäufung von Zellen. Beim „Night“-Graph erscheint als erstes eine kleine Gruppe Zellen im Bereich zwischen 60 und 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach steigt die Zellanzahl der F_0 -Intervalle wieder stark an und erreicht bei 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ihr absolutes Maximum. Sie sinkt anschließend stetig bis 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. In den Bereichen zwischen 195 und 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bzw. 240 und 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheinen sich ebenfalls zwei kleine Gruppen Zellen zu befinden. Darüber hinaus sind wieder vereinzelt Zellen bis 880 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu beobachten.

Abb. 2.1.2

a)



b)

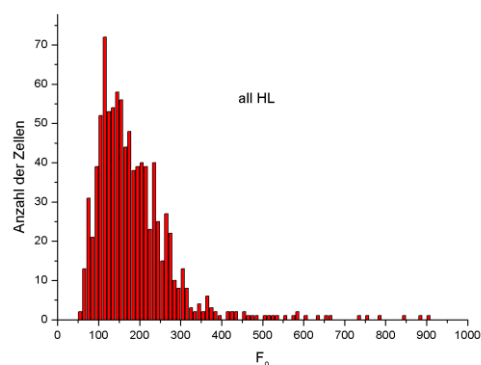


Abbildung 2.1.2: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte aus Abb. 2.1.1 wurden jeweils addiert um eine Tagesübersicht darzustellen. a) Low Light (niedrige oder normale Belichtung, (300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)) dient zur Kontrolle. b) „High Light“-Stress (Starklicht Bedingungen (830 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die F_0 -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts (60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen. Es wurden nur „gute“ Kulturen („good“) verwendet, die hauptsächlich lange, sich bewegende bzw. vitale

Filamente (ohne „bright II-Zellen“) besaßen, sowie nach dem Messtag noch weitere Tage am Wachsen waren.

Die Abb. 2.1.2 zeigt jeweils die aufaddierte Übersicht aller Zellzahlen der F_0 -Intervalle aus Abb. 2.1.1 des gesamten Experiments.

In a) ist die Tagesübersicht der Kontroll-Kultur (Abb. 2.1.1a) addiert) mit normaler Kultivierungsbelichtung dargestellt. Die Verteilung der Zellanzahlen der F_0 -Intervalle hat Ähnlichkeit mit einer Gauß-Normal-Verteilung. Die Form der Verteilung zeigt allerdings kleine Besonderheiten. Die F_0 -Werte der Zellen beginnen ab ca. $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und steigen danach relativ schnell an. Bei $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Zellanzahl, allerdings nicht signifikant, wieder ab. Ab dem Intervall um $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Anzahl der Zellen wieder sprunghaft auf mittlere Werte und bildet darüber hinaus leicht ansteigend einen Sattel bis $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aus. Danach steigt sie nochmals sehr stark bis sie um $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ihr absolutes Maximum findet. Nach einem starken Absinken der Zellanzahl im nächsten Intervall, sinkt sie darüber hinaus bis ca. $170 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nur ganz leicht ab. Nach $170 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie sprunghaft um ca. 8 Zellen und sinkt wieder relativ stetig bis $350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Man hat den Eindruck, dass sich in der rechten abfallenden Flanke der Kurve, in den Bereichen zwischen 200 und $225 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bzw. 240 und $310 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, zwei Sättel mit nur leichtem Absinken der Zellanzahl befindet. Die wenigen Zellen mit F_0 -Werten über $350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bilden in diesem Fall keine eigenständige Gruppe aus.

In b) ist die Tagesübersicht der Kontroll-Kultur (Abb. 2.1.1b) aufaddiert) mit normaler Kultivierungsbelichtung dargestellt. Ab $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl relativ konstant und stark an und findet bei ca. $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ihr absolutes Maximum. Bei $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich ein lokales Maximum, wo hingegen bei der Kontroll-Kultur an dieser Stelle der erste Sattel sich befindet. Ab $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Zellanzahl des Peakbereichs wieder und erstreckt sich dann relativ konstant bis $170 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bis $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Anzahl der Zellen wieder sprunghaft und bildet relativ konstant bleibend bis $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ einen weiteren Sattel aus. Danach sinkt die Häufigkeit der Zellen wieder relativ variierend bis $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Einzelne, aus der Regel fallende Intervalle mit hohen Zellanzahlen finden sich um 170 bzw. bei $240 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Bereich zwischen 400 und $910 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind beinahe gleichmäßig vereinzelt Zellen verteilt.

Beim direkten Vergleich der gestressten Zellen mit denen, der Kontroll-Kultur fällt die Ähnlichkeit der markanten Extrempunkte und Bereiche auf. Die Hauptgruppe der Zellen liegt im gleichen Bereich. Das jeweilige absolute Maximum der Zellzahl liegt bei beiden Kulturen

beim selben F_0 -Wert. Auch die Sattelpunkte sitzen an ähnlichen Stellen. Der einzig auffällige Unterschied ist die hohe Anzahl der stark fluoreszierenden Zellen der gestressten Kultur ab $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Kontrolle besitzt so gut wie keine.

3.2.2. Grundfluoreszenz F_0 nicht-vitaler Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 2.1.3

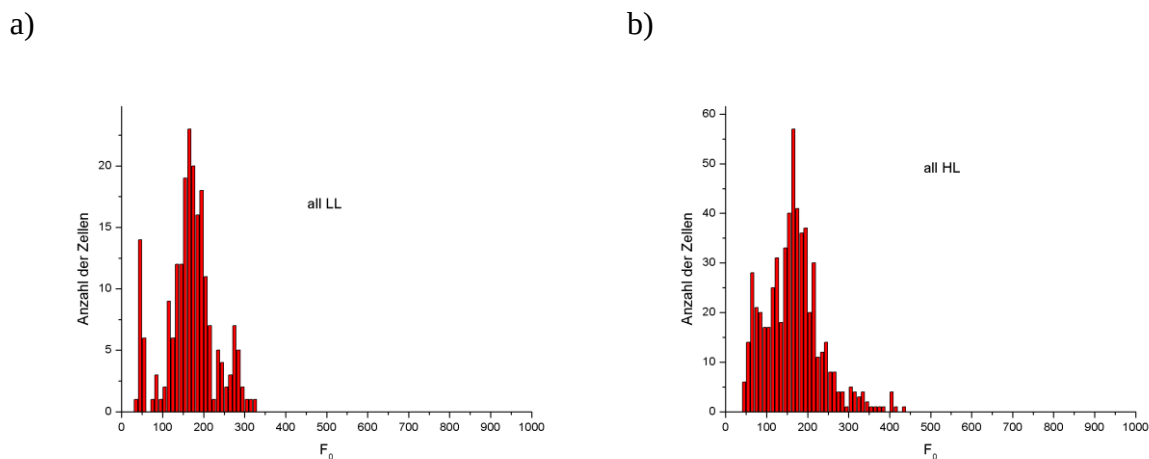


Abbildung 2.1.3: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. Es wurden jene Batch-Kulturen verwendet, die vor der Messung eine $OD_{750} > 0.07$ aufwiesen, oder im Laufe der darauffolgenden Woche zusammenbrachen („bad“). Die Filamente waren eher kurz und immobil und besaßen zum Teil „bright II“-Zellen. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte dieser „bad“-Kulturen wurden ähnlich wie in Abb. 2.1.2 jeweils aufaddiert um eine Tagesübersicht darzustellen. a) „Low Light“ (niedrige oder normale Belichtung, (LL= $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)) dient zur Kontrolle. b) „High Light“-Stress (Starklicht Bedingungen (HL= $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die F_0 -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Die Abb. 2.1.3 zeigt die aufaddierten Histogramme der F_0 -Werte von einzelnen Starklicht-gestressten Zellen zu den verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts). Es wurden die Batch-Kulturen verwendet, die vor der Messung eine $OD_{750} > 0.07$ aufwiesen oder im Laufe der darauffolgenden Woche zusammenbrachen („bad“). Die Filamente waren eher kurz und immobil und besaßen zum Teil „bright II“-Zellen.

In a) sind die Kontroll-Kulturen gezeigt. Im schwach fluoreszierenden Bereich um $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine erste abgegrenzte Gruppe zu erkennen. Ab $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Hauptgruppe der Zellen in der Häufigkeit der Zellen relativ konstant bis zum absoluten Maximum bei $170 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an. Danach sinkt die Zellanzahl, bis auf einen kleinen

Einschnitt in der rechten Flanke der Hauptgruppe bei $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, wieder relativ konstant bis $225 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ gegen Null ab. Im Bereich zwischen 225 und $330 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich die dritte Gruppe Zellen. Diese besitzt 2 Peaks bei 230 bzw. $270 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

In b) sind die Starklicht-gestressten „bad“-Kulturen gezeigt. Die schwach fluoreszierende Gruppe Zellen der Kontroll-Kulturen ist hier ebenso im selben F_0 -Bereich (Peak bei $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) vertreten. Allerdings grenzt sie sich nicht von der Hauptgruppe ab, sondern geht mit mittleren Zellanzahlen in diese über. Ab $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Anzahl der Zellen wieder bis zum Peakbereich der Hauptgruppe bei $170 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an. Ein starker Einschnitt der Zellanzahl des F_0 -Intervalls bei $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist allerdings markant. Nach dem Peakbereich sinkt die Häufigkeit der Zellen relativ sprunghaft auf niedrige Werte ab. Bei $210 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich allerdings wieder ein Einschnitt in der Zellanzahl. Nach $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie wieder leicht und bildet bis $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ eine kleine Gruppe. Zwischen 300 und 390 befindet sich eine weitere Gruppe Zellen. Darüber hinaus sind nur sehr wenige einzelne Zellen um $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu sehen.

Beim direkten Vergleich der gestressten Zellen mit denen der Kontroll-Kultur, fällt die Ähnlichkeit der markanten Extrempunkte und der Gruppen-Bereiche auf. Die Hauptgruppe der Zellen liegt im gleichen Bereich. Das absolute Maximum der Zellanzahlen liegt bei beiden im gleichen F_0 -Intervall. Die einzig auffälligen Unterschiede in b) sind der Übergang der schwach fluoreszierenden Gruppe in die Hauptgruppe, sowie die stärker fluoreszierende größere Gruppe Zellen über $320 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

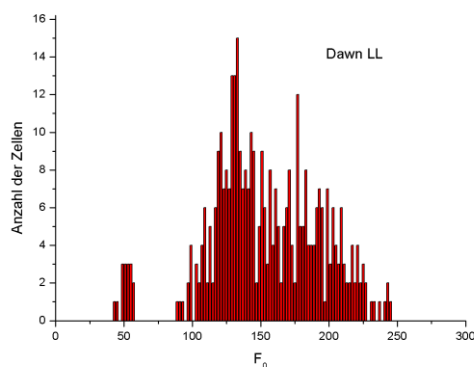
3.3. Starklicht-Stress bei *Trichodesmium* aus Chemostat-Kulturen

3.3.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

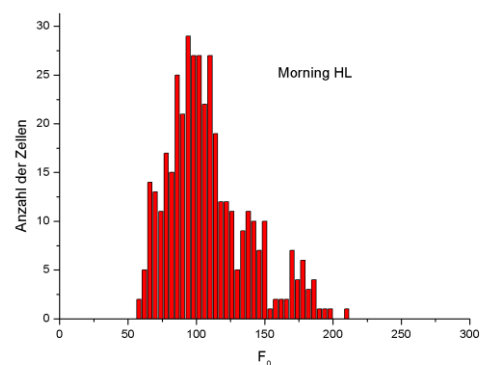
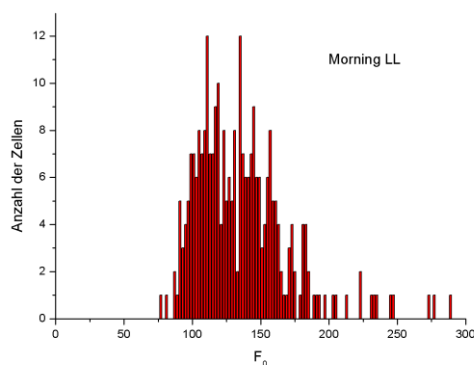
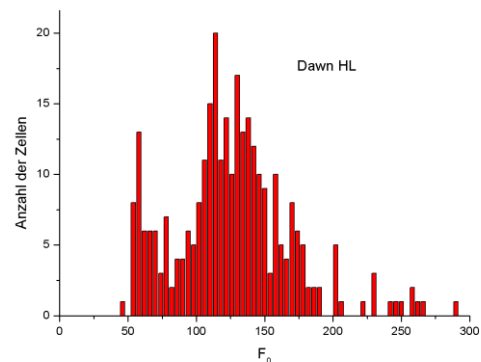
Die Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, in Chemostaten in der exponentiellen Wachstumsphase und bei konstanter $OD_{750} = 0,05$ kultiviert. *Trichodesmium*-Proben wurden zu den 5 Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts) geerntet und für die „bildgebenden“ Fluoreszenzkinetikmessungen in die Messkammer eingebettet. Es wurden Fluoreszenzkinetiken von einzelnen Zellen durch Bestrahlung mit 21% des blauen Anregungslichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) gemessen. Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden die gemittelten F_0 -Werte der Pixel jeder Zelle numerisch errechnet und als Histogramm aufgetragen.

Abb. 3.1.1

a)



b)



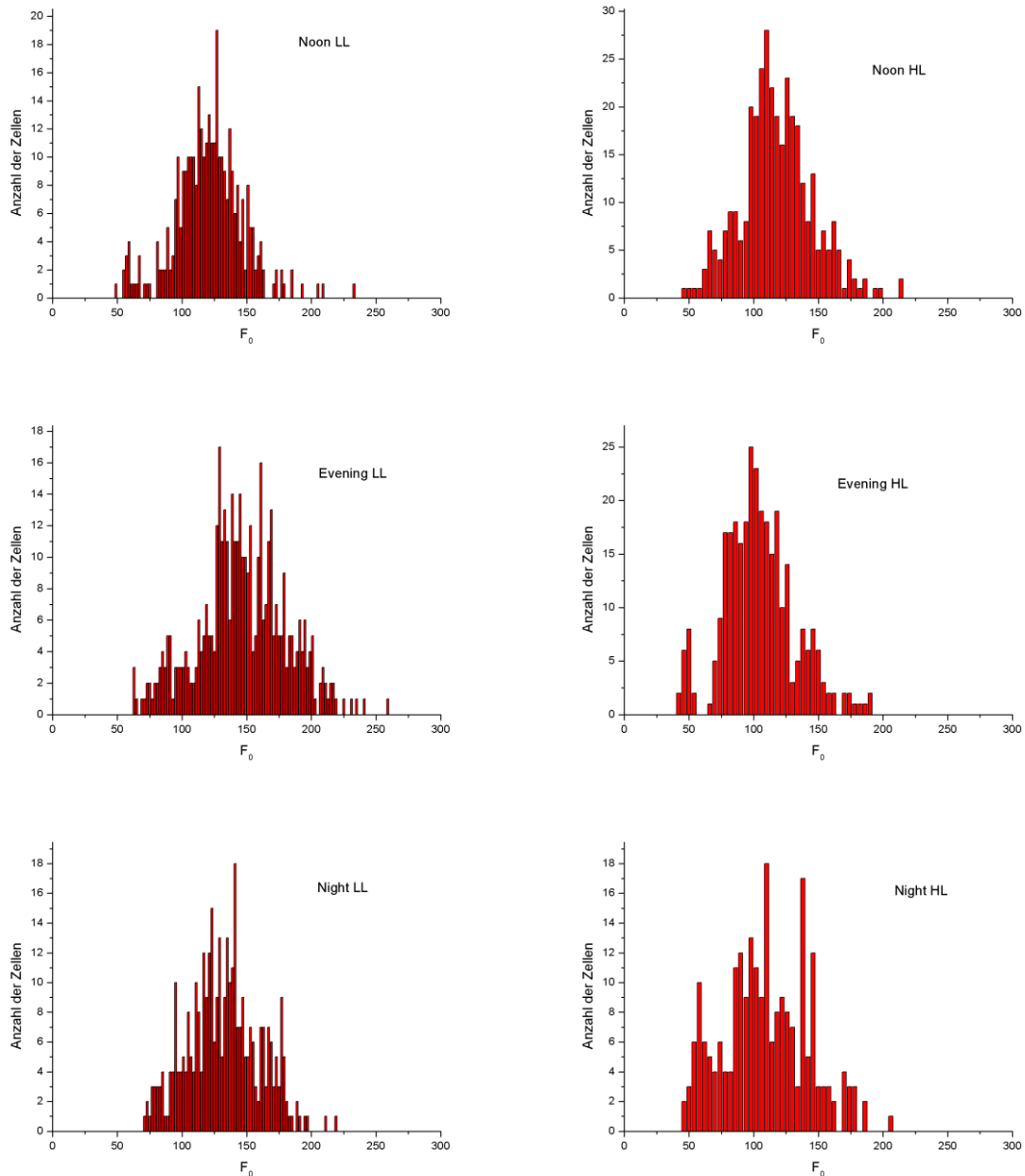


Abbildung 3.1.1: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner, in Chemostaten angezogener Zellen, zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts). Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (niedrige oder normale Belichtung ($LL=300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)), die zur Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht Bedingungen ($HL=830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die F_0 -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Anregungslichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Die Histogramme in Abb. 3.1.1 zeigen die Verteilung der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten.

Unter a) sind die Graphen der Kontroll-Zellen mit normaler Kultivierungsbelichtung („Low Light“ $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ maximal) gezeigt. Die Verteilung der F_0 -Werte vor dem Anschalten

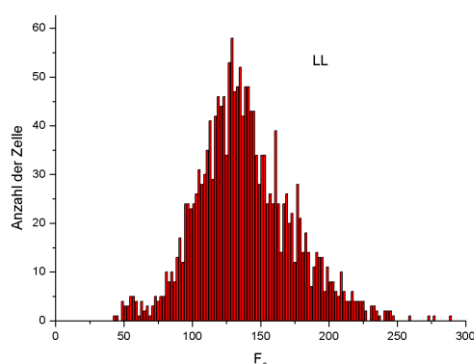
des Lichts („Dawn“) ist ca. in 3 Gruppen gegliedert. Eine kleine niedrig fluoreszierende Gruppe von Zellen hat Werte um $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Bereich zwischen kurz vor 85 bis ca. $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist die Hauptgruppe der Zellen mit dem größten Peak bei $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vertreten. Gleich daneben im breiteren Bereich zwischen 150 bis $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist die große dritte Gruppe vertreten. Die zwei Hauptgruppen scheinen sich aber stark zu überschneiden, sodass eine klare Abgrenzung der Gruppen kaum zu erkennen ist. Die Verteilung der F_0 -Werte am Morgen („Morning“) ist einheitlicher. Es sind relativ klar zwei ungefähr gleich große Gruppen von Zellen zu erkennen. Die Erste beginnt mit $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an und endet mit ca. $135 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Zweite liegt im Bereich zwischen 135 und $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bis $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind außerdem noch einzelne, stärker fluoreszierende Zellen detektiert worden. Der Mittagsgraph („Noon“) hat eine andere Verteilung. Man erkennt hier eine große Hauptgruppe im Bereich von 75 bis $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mit dem Peak bei $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zusätzlich wird diese Gruppe ab $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, und bis $235 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ von wenigen einzelnen Zellen flankiert. Die Beschreibung des Graphen vom Abend („Evening“) ist wieder schwieriger. Von 60 bis $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint die Häufigkeit der Zellen erst langsam zuzunehmen. Ab $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt dann die Zellanzahl der F_0 -Intervalle nahezu auf das Doppelte bis $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an und variiert nur leicht. Es folgt ein dramatischer Einbruch in der Häufigkeit der Zellen bei $155 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Anschließend steigt sie wieder stark. Ab 166 bis $225 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Zellanzahl wieder gleichmäßig ab. Wenige einzelne Zellen bis $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder an der rechten Flanke zu erkennen. Die Verteilung der F_0 -Werte der Nacht („Night“) ist wieder einheitlicher. Ab $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Häufigkeit der Zellen relativ variabel bis $130 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an und sinkt wieder bis $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Im Bereich 160 bis $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine kleinere zweite Gruppe Zellen zu erkennen. Bis $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder zwei einzelne stärker fluoreszierende Zellen zu erkennen.

Unter b) sind die Starklicht-gestressten Zellen gezeigt. Die Verteilung der F_0 -Werte vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) ist nicht sehr eindeutig. Man kann eine kleine Gruppe von Zellen im Bereich zwischen 50 und $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erkennen. Zwischen 80 bis $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich die Hauptgruppe zu befinden. Bei $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist allerdings ein Einbruch in der Häufigkeit zu erkennen. Im Bereich zwischen 150 bis $190 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine weitere kleinere Gruppe Zellen zu sehen. Anschließend folgen bis $290 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vereinzelt stärker fluoreszierende Zellen. Auffällig ist der schemenhaft exponentielle Abfall der Zellhäufigkeit an der rechten Flanke der Hauptgruppe ab $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und darüber

hinaus. Der Graph der Morgenmessungen („Morning“) ist dagegen einheitlicher. Eine große Hauptgruppe der Zelle liegt im Bereich zwischen 60 und 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Von 130 bis 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist dieser Hauptgruppe, eine kleinere Gruppe Zellen angelegt. Im Bereich von 150 bis 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine weitere kleine Gruppe zu erkennen. Am Mittag („Noon“) sind die F_0 -Werte wieder einheitlicher verteilt. Von 45 bis 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Häufigkeit der Zellen leicht an. Danach steigt sie dramatisch auf hohe Werte an. Der Hauptpeak liegt bei ca. 110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach sinkt die Zellzahl wieder relativ exponentiell bis 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Bei 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ könnte man allerdings ebenso einen Einbruch in der Häufigkeit interpretieren. Am Abend („Evening“) sieht die Verteilung der F_0 -Werte wieder anders aus. Eine kleine, relativ scharf abgegrenzte Gruppe von Zellen um 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fällt als erstes auf. Im Bereich zwischen 65 und 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist die Hauptgruppe lokalisiert. Der Hauptpeak befindet sich bei 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 130 bis 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich eine weitere Gruppe Zellen, die man aber auch als abgetrennten Ausläufer der Hauptgruppe interpretieren kann. Der Graph der Nacht („Night“) zeigt eine sehr unregelmäßige Verteilung. Von 45 bis ca. 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist eine kleine Gruppe Zellen zu erkennen. Ab 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fängt die Hauptgruppe an. Den Hauptpeak kann man tendenziell um 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lokalisieren. Es folgt wieder ein relativ konstantes Absinken der Zellhäufigkeit bis 180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Vereinzelt sind in manchen F_0 -Bereichen starke Schwankungen zu sehen. Bei schwächerer Auflösung (größere Fluoreszenzintervalle) wären diese eher geringer ausgeprägt, was zur Glättung der „Zellhäufigkeits-Kurve“ des Histogramms führt.

Abb. 3.1.2

a)



b)

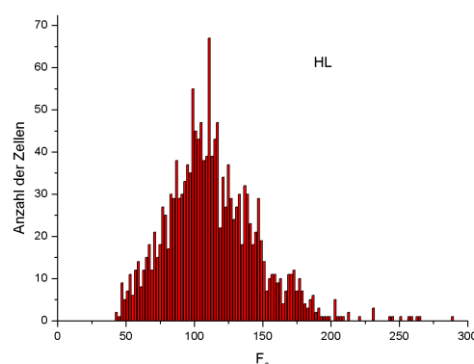


Abbildung 3.1.2: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner, als Chemostat-Kultur angezogener Zellen. Die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte aus Abb. 3.1.1 wurden jeweils aufaddiert um eine Tagesübersicht zu erhalten. Die F_0 -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Anregungslichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen. a) „Low

Light“ (niedrige / normale Belichtung, ($LL=300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)) dient zur Kontrolle. b) „High Light“-Stress (Starklicht Bedingungen ($HL=830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)).

Die Abb. 3.1.2 zeigt jeweils die aufaddierte Tagesgesamtübersicht der F_0 -Intervalle der Graphen aus Abb. 3.1.1.

In a) ist die aufaddierte Tagesübersicht der Kontroll-Kultur (Abb. 3.1.1a)) mit normaler Kultivierungsbelichtung dargestellt. Es fällt schwer die F_0 -Werte der Zellen in Gruppen einzuteilen. Vielmehr erkennt man eine Art Glockenkurve, ähnlich einer Normalverteilung nach Karl Friedrich Gauss. Die Form der Kurve hat allerdings ein paar Besonderheiten. Ab 40 bis $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ gibt es anscheinend eine kleine Gruppe Zellen, die sich etwas von der großen Hauptgruppe abgrenzt. Bis ca. $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ folgt ein relativ konstanter Anstieg in der Häufigkeit der Zellen. Ab $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ folgt dann aber schlagartig eine Verdopplung der Zellanzahl. Bis $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie wieder relativ konstant. Ab $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ folgt wieder ein starker Anstieg der Zellhäufigkeit, der sich darauf im Peakbereich der Hauptgruppe um $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ abflacht. Die rechte Flanke der Kurve zeigt im Allgemeinen ein schwächer werdendes, absolutes Absinken der Zellanzahl der Art $1/x$. Durch die relativ hohe Varianz der Häufigkeit der Zellen der F_0 -Intervalle fällt allerdings eine weitere Gruppierung der Flanke schwer.

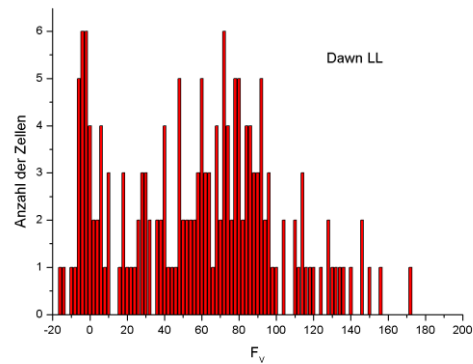
Die Form der Kurve der Starklicht-gestressten Zellen („HL“) unter b) ist der, der Kontroll-Kultur sehr ähnlich. Von 40 bis $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Häufigkeit der Zellen relativ konstant an. Es folgt wieder ein Sprung in höhere Zellanzahlen, sowie ein weiterer kurzer Anstieg bis ca. $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Verteilung der Zellanzahl der Peakregion im Bereich zwischen 90 und $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist relativ variierend. Die rechte Flanke der Kurve zeigt ebenso ein schwächer werdendes, absolutes Absinken der Zellanzahlen. Allerdings ist auch hier die Varianz sehr hoch. Man sieht bei ca. 115 und $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, oder auch bei $165 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ leichte Einbrüche in der Häufigkeit der Zelle, die aber nur unsicher als Abtrennung zwischen Gruppen zu interpretieren sind.

Im Vergleich der Kontroll-Kultur mit der „HL“-gestressten Kultur über den ganzen Tag fällt die ähnliche Form, der Anfang und das Ende der „Kurven“ (Zellanzahlen der F_0 -Intervalle als Funktion von λ) auf. Allerdings scheint die Peakregion, sowie die rechte Flanke der „HL“-Kurve um ca. $-25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, im Vergleich zur „LL“-Kurve verschoben zu sein.

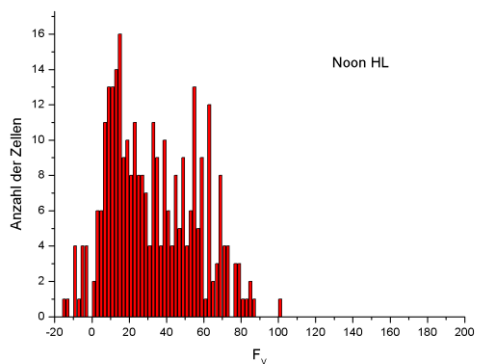
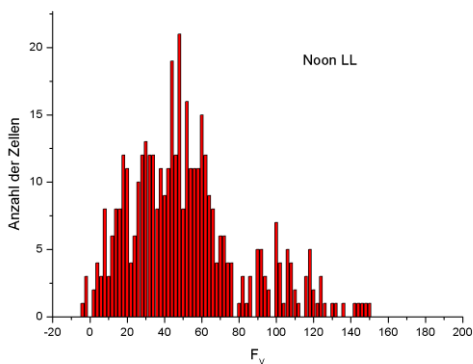
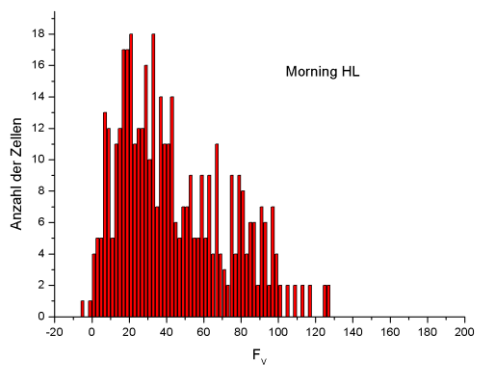
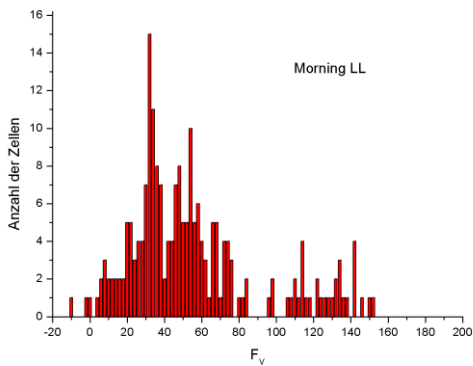
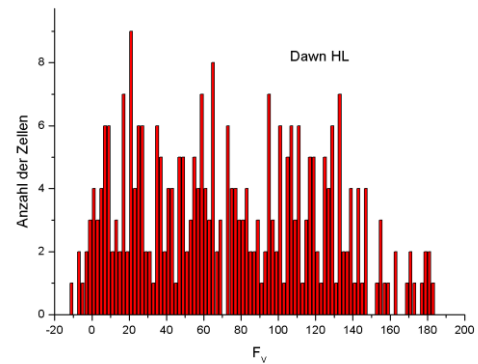
3.3.2. Variable Fluoreszenz F_V einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 3.2.1

a)



b)



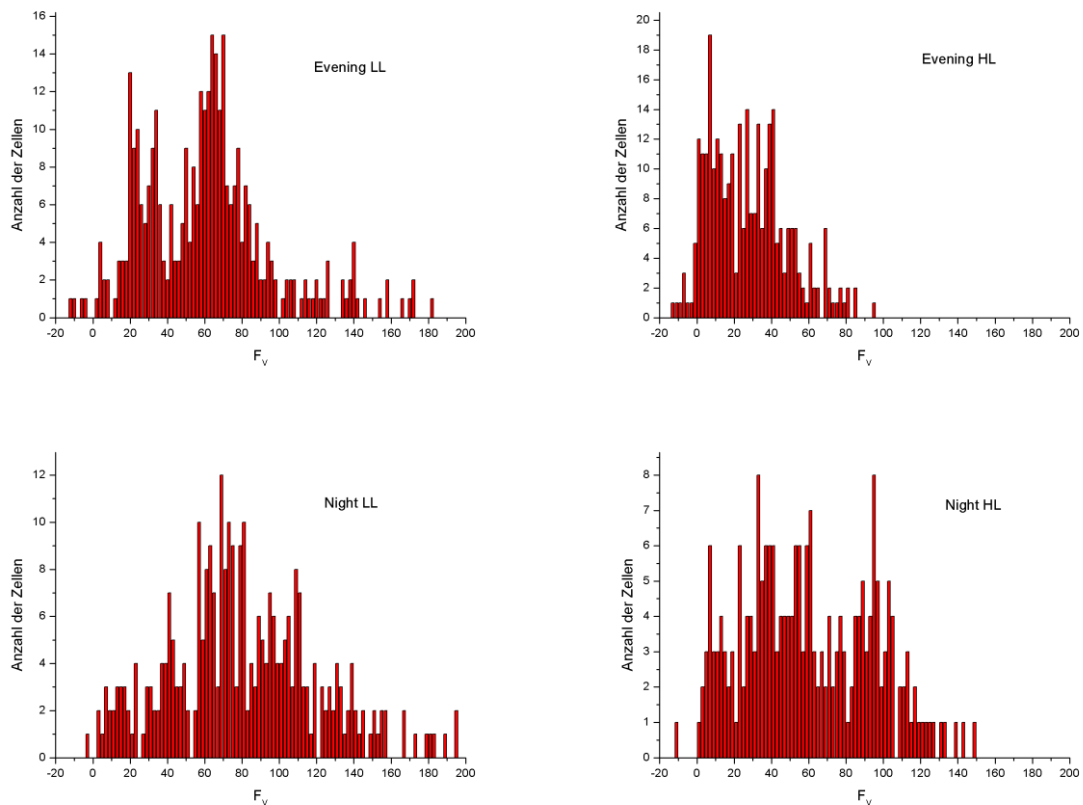


Abbildung 3.2.1: Histogramme der variablen Fluoreszenz F_v einzelner Zellen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts). Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (niedrige oder normale Belichtung (LL=300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), die zur Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht-Bedingungen (HL=830 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die F_v -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts (60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Die Abb. 3.2.1 zeigt die variable Fluoreszenz F_v derselben Kulturen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten, die schon in Abb. 3.1.1 beschrieben wurden. Es fällt schwer die Ergebnisse eindeutig zu beschreiben, da die Zellanzahlen benachbarter F_v -Intervalle stark schwanken.

Unter a) sind die Graphen der Kontroll-Zellen mit normaler Kultivierungsbelichtung („Low Light“ = 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ maximal) gezeigt. Der „Dawn“-Graph zeigt grob zwei Gruppen von Zellen. Die Kleinere hat F_v -Werte um 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Hauptgruppe erstreckt sich von ca. 20 bis über 170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat seinen Peakbereich bei 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die F_v -Werte des „Morning“-Graphs gliedern sich in ungefähr 2 Gruppen auf. Die Hauptgruppe liegt im Bereich zwischen 0 bis 85 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Sie teilt sich durch den Einschnitt der Zellhäufigkeit im Intervall bei 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ noch einmal auf. Die kleine zweite Gruppe liegt zwischen 95 und 153 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Der „Noon“-Graph ist ähnlich gegliedert. Die Hauptgruppe erstreckt sich von 0 bis 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Sie ist auch wieder in 3 bis 4 Untergruppen unterteilt. Die

kleine Nebengruppe liegt im F_v -Bereich zwischen 80 und 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Verteilung der F_v -Häufigkeiten im „Evening“-Graph ist dagegen anders strukturiert. Bis auf wenige Zellen vor 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, erstreckt sich ab dieser F_v bis 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ eine große Gruppe Zellen. Sie besitzt aber einen starken Einschnitt in der Zellanzahl um 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ähnlich der Form einer Gauß'schen Normalverteilung liegt die Hauptgruppe im Bereich zwischen 40 und 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Von 100 bis 183 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ folgt noch eine kleine Gruppe Zellen. Die Gruppierung des „Night“-Graphen fällt wiederum schwer. Über den gesamten F_v -Bereich wurden Zellen detektiert. Das Maximum der Zellanzahl liegt bei 68 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zwischen ca. 0 bis 25 bzw. 25 bis 53 zeichnen sich zwei Untergruppen ab. Im Bereich zwischen 55 und 83 liegt die in der Zellanzahl benachbarter Intervalle stark variierende Hauptgruppe der Zellen. Eine weitere Untergruppe erstreckt sich bis 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 122 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind nur noch vereinzelt Zellen zu sehen, die man eventuell auch als eigenständige Gruppe interpretieren kann.

Unter b) sind die Starklicht-gestressten Zellen gezeigt. Die Verteilung der F_v -Werte vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) ist nicht sehr eindeutig. Die Zellen verteilen sich über den gesamten Bereich. Man kann sie dennoch grob in drei Gruppen einteilen. Von -10 bis 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bzw. von 40 bis 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erstrecken sich die ersten zwei. Die Dritte ab 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ variiert stark in der Häufigkeit der Zellen benachbarter Intervalle. Der „Morning“-Graph ist einfacher strukturiert. Ab 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erfolgt ein steiler Anstieg der Zellanzahl. Bei ca. 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist das Maximum erreicht. Nach diesem F_v -Wert sinkt die Zellanzahl wieder schwankend aber stetig bis 127 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Es ist schwer weitere Aussagen über Gruppierungen in diesem Fall zu machen. Allerdings scheint sich bei 48 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ eine Grenze abzuzeichnen. Der „Noon“-Graph ist wieder ähnlich. Ein paar Zellen im negativen F_v -Bereich sind hier zu erkennen. Ab 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl wieder stark an. Bei 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erreicht sie ihr Maximum und sinkt danach wieder bis 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ stark ab. Ab 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich eine sehr diffuse Nebengruppe zu befinden. Mit am stärksten schwankender Häufigkeit der Zellen in benachbarten F_v -Intervallen erstreckt diese sich bis ca. 88 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Auch der „Evening“-Graph zeigt ein ähnliches F_v -Verteilungsmuster in der *Trichodesmium*-Population. Wieder sind vereinzelt Zellen im negativen F_v -Bereich zu sehen. Ab 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl ähnlich wie am Mittag stark an. Bei ca. 8 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erreicht sie ihr Maximum und sinkt danach wieder bis 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ stark ab. Ab 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich ebenfalls eine diffuse Nebengruppe zu befinden. Mit stark schwankenden Intervall-Zellanzahlen erstreckt sie sich

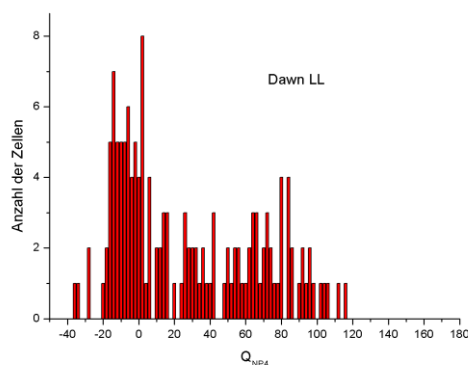
bis ca. $84 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Der Graph der Nacht („Night“) unterscheidet sich wieder von den anderen Messzeitpunkten. Ab $0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl der F_V -Intervalle wieder schnell an und sinkt ab ca. $8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wieder ab. Im Bereich zwischen 20 und $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ befindet sich die große Hauptgruppe der Zellen. Sie hat allerdings einen deutlichen Einschnitt um $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Eine weitere große Gruppe liegt zwischen 80 und $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.3.3. Nicht-photochemisches Quenching Q_{NP} einzelner Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

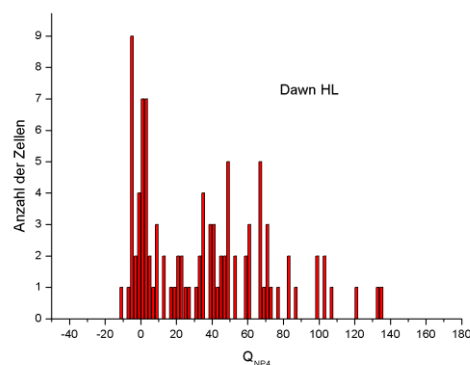
Die negativen Fluoreszenzwerte der folgenden Abbildungen sind kein Beweis für „Anti-Fluoreszenzlicht“, sondern häufig Folge von Filamentbewegungen, bzw. Verschiebungen der markierten Zellraster im Laufe der Messungen. Durch die starke Kompartimierung fitter *Trichodesmium*-Zellen zeigt sich das fluoreszierende Zellmaterial unterschiedlich stark verteilt. Zusätzlich ist bei diesen der Bewegungsdrang auch relativ hoch (wie „hin und her fahrende Tunnelbohrmaschinen“). Das „apoptotische“ Sterben, bzw. Auslaufen der Zellen ist als Grund auszuschließen, da die ganze Kinetik auf solche Ereignisse hin (+ erkennbare Filamentbewegungen) geprüft und entsprechende Zellraster verworfen wurden. Es scheint, dass selbst kleinste Bewegungen der Zellen gravierende Folgen für späte-, und besonders für verrechnete Kinetikparameter (aus Kinetikbildern verschiedener Zeitpunkte im Messprotokoll) haben. Auf Grund dessen sind die absoluten Werte der folgenden Abbildungen ohne Aussagekraft und das Ergebnis nur in Bezug auf die abzeichnende Gruppenbildung innerhalb der Histogramme verwertbar.

Abb. 3.3.1

a)



b)



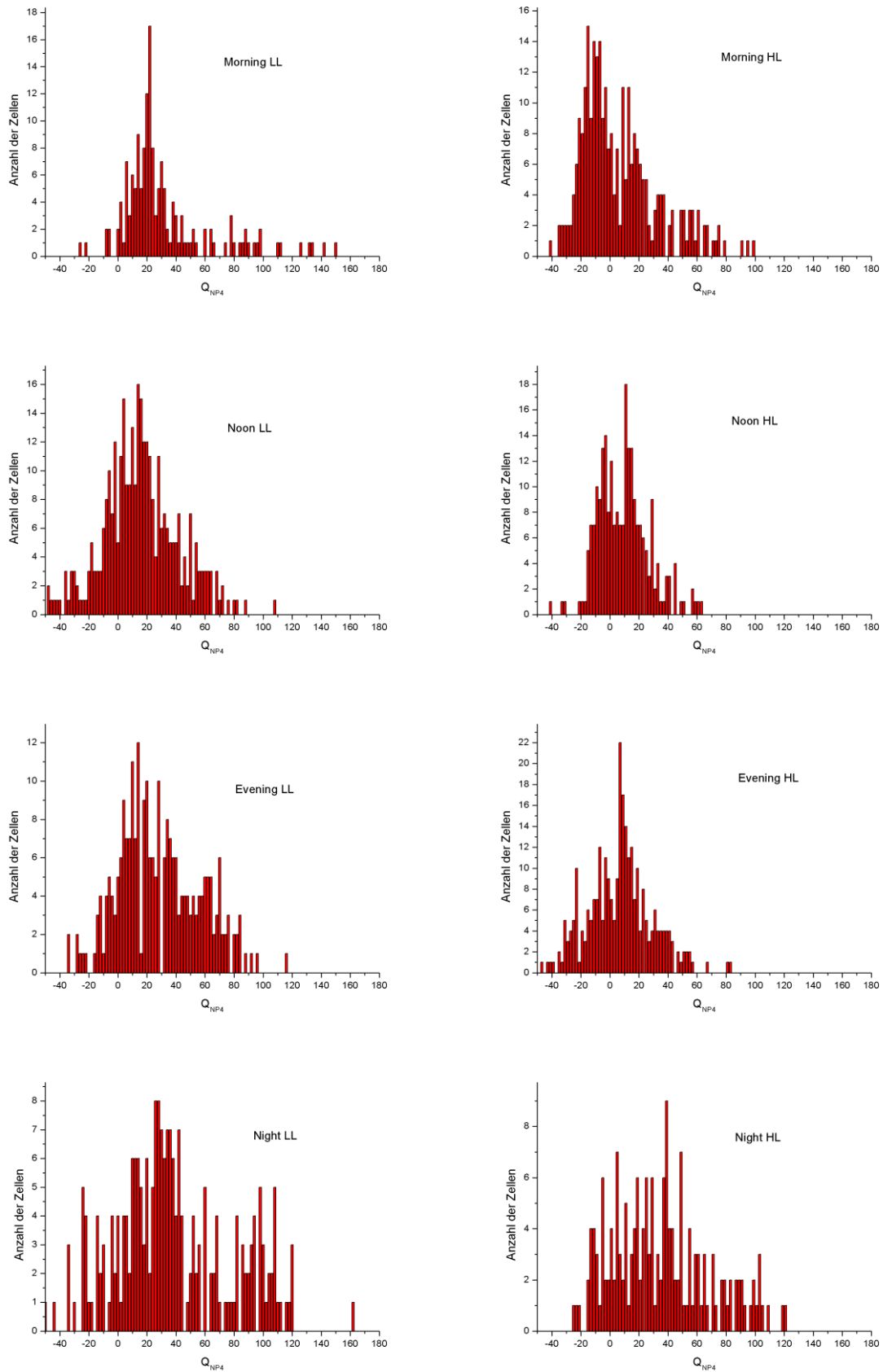


Abbildung 3.3.1: Histogramme des QNP einzelner Zellen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts)

nach gesättigtem Lichtblitz #4 des Kinetikprotokolls. Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (normale bzw. niedrige Kultivierungsbelichtung ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), die als Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht-Bedingungen ($830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die QNP4-Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Die Abb. 3.3.1 zeigt das Q_{NP4} infolge eines gesättigten Lichtblitzes (Lichtpuls #4 des Kinetik-Messprotokolls) zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Es ist auch der letzte Messpunkt des Kinetik-Protokolls am Ende der aktinischen Belichtungsphase. Es wurden dieselben Kulturen bzw. Ausgangsdaten wie für Abb. 3.1.1 verwendet.

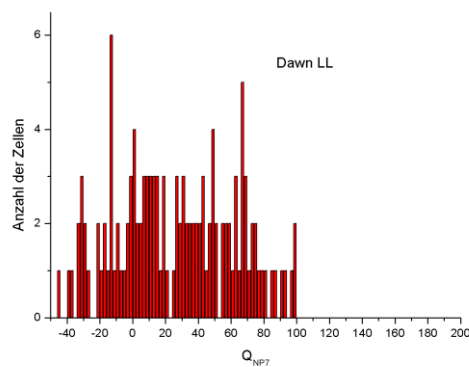
Unter Abb. 3.3.1a) ist die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung dargestellt. Die Zellanzahlen benachbarter Q_{NP4} -Intervalle des „Dawn“-Graphen variieren sehr stark. Bei einer kleineren Auflösung der Intervalle sieht man jedoch ansatzweise Gruppenbildung im Bereich zwischen -20 und $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bzw. 45 und $116 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Der „Morning“-Graph ist anders aufgebaut. Nach ein paar wenigen negativen Werten steigt die Zellanzahl der Q_{NP4} -Intervalle ab ca. $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dramatisch an und sinkt nach ihrem Maximum um $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ebenso stark wieder ab. Ab ungefähr 53 bis $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder vereinzelte Zellen als lockere Gruppe zu erkennen. Die Zellanzahlen der Q_{NP4} -Intervalle des „Noon“-Graphs variieren wieder stärker. Sie sind jedoch noch grob als Glockenkurve gruppiert erkennbar. Diese große Hauptgruppe erstreckt sich von -50 bis $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihr Maximum bei ca. $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ansatzweise ist um $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ noch eine kleine Randgruppe zu erahnen. Ganz ähnlich ist auch der „Evening“-Graph. Seine Hauptgruppe erstreckt sich von -16 bis ca. $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihr Maximum ebenso bei $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Gleich danach im Bereich zwischen 50 und 100 ist wieder eine weitere kleine Gruppe erkennbar. Im „Night“-Graph variieren die Werte wieder stärker. Trotzdem sind relativ klar zwei Gruppen zu erkennen. Die große Hauptgruppe erstreckt sich von -45 bis ca. $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihr Maximum um $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Auch in diesem Graph gibt es eine kleine Nebengruppe im Bereich zwischen 70 und $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ihr Peak liegt bei ca. $95 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Unter b) sind die Zellen der Starklicht-gestressten Kultur gezeigt. Da im „Dawn“-Graph nur relativ wenige Zellen ausgewertet werden konnten ist die Beschreibung etwaiger Gruppenbildungen schwer. Von -10 bis $14 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erstreckt sich die erste Gruppe mit relativ hohen Zellanzahlen. Die Zweite ist im Graphen breiter und lockerer strukturiert. Sie liegt im Bereich zwischen 14 und $136 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihr Maximum um $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Der „Morning“-Graph ist im Vergleich dazu anders aufgebaut. Ab $-36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die

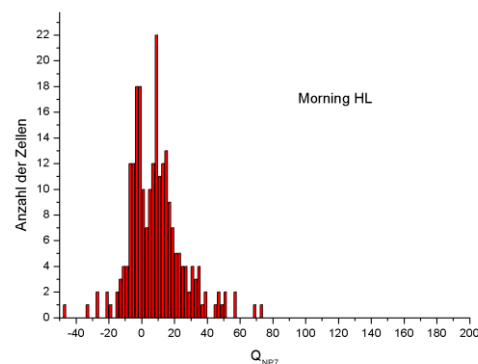
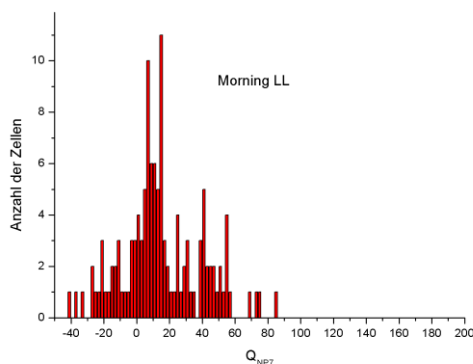
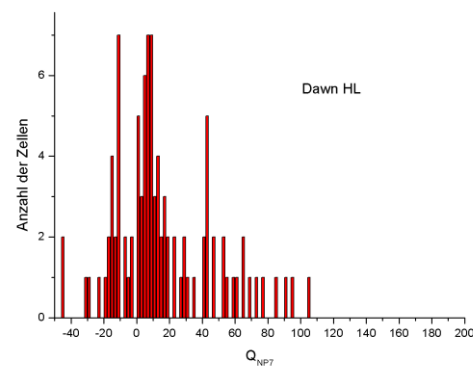
Zellanzahl der Q_{NP4} -Intervalle schnell und relativ konstant an und erreicht ihr Maximum bei ca. $-15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Darauf sinkt sie wieder (nach der Grundformel $1/x$) bis $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf Zellanzahlen gegen 0. Auffällig sind starke Einschnitte in der Zellanzahl bei 8, bzw. $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Auch die Hauptgruppe Zellen, im Bereich zwischen -20 und $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ im „Noon“-Graph, zeigt Einschnitte in der Zellanzahl bei $8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 35 bis $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist auch hier wieder eine sehr kleine Gruppe Zellen erkennbar. Die Ergebnisse des „Evening“-Graphen sind dagegen schwerer auszuwerten. Die Häufigkeiten der Zellen pro Q_{NP4} -Intervall sind im Großen und Ganzen als Glockenkurve angeordnet, welche sich von $-50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, über das Maximum bei $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bis über $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hinaus erstreckt. Deutlich werden auch wieder die Einschnitte in der Zellanzahl bei -20 , 4 , bzw. $26 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Q_{NP4} -Intervall-Zellanzahlen des „Night“-Graphen variieren hier sehr stark, bzw. unstet untereinander. Es wurden relativ gleichmäßig Zellen mit Q_{NP4} -Werten von -26 bis $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ detektiert. Diese diffuse Gruppe Zellen erscheint hauptsächlich bei Werten um $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ im Histogramm. Weitere signifikante Aussagen sind nicht zu treffen.

Abb. 3.3.2

a)



b)



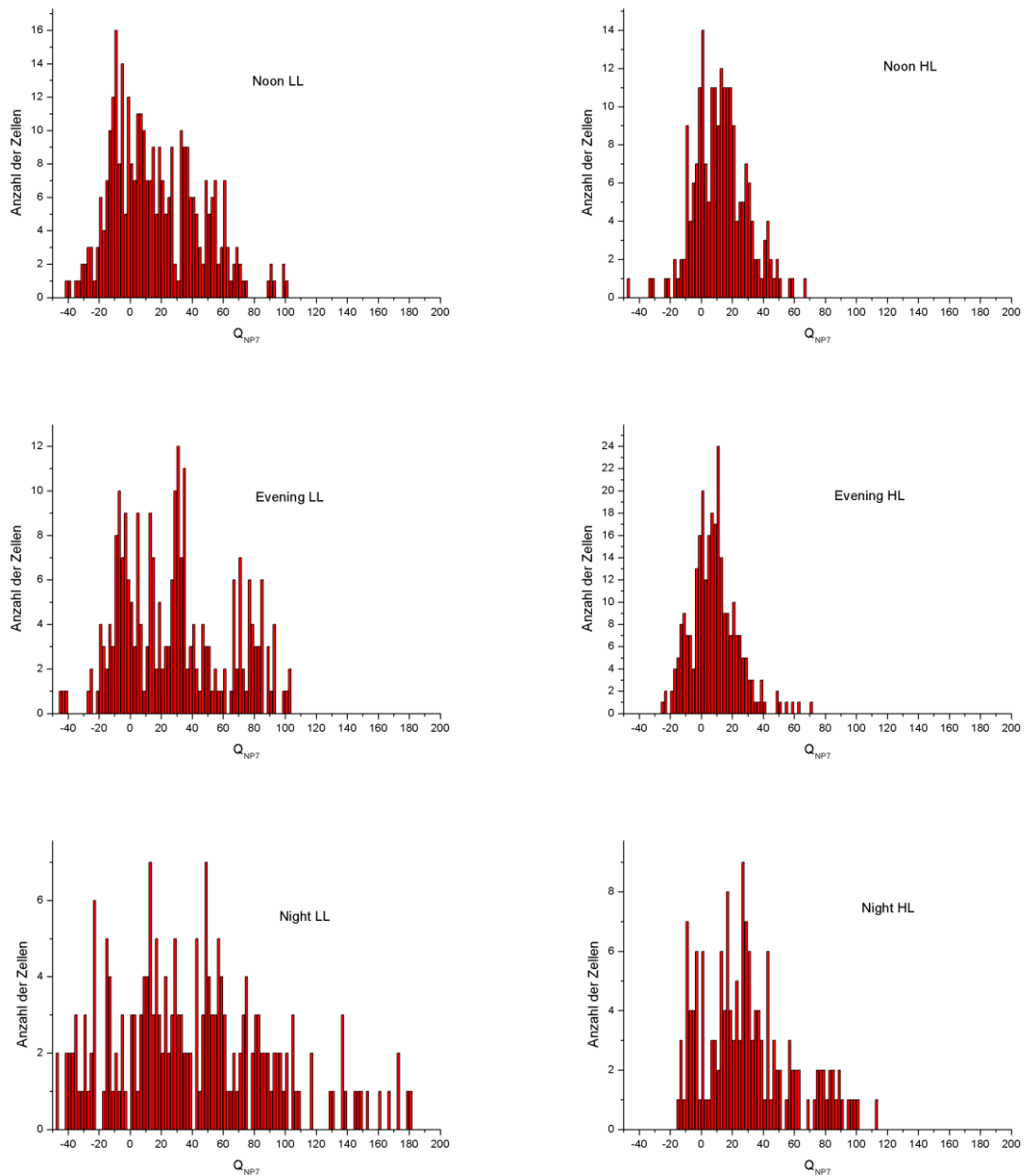


Abbildung 3.3.2: Histogramme des Q_{NP} einzelner Zellen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts) infolge eines gesättigten Lichtblitzes (Lichtpuls #7 des Kinetik-Protokolls). Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (normale bzw. niedrige Belichtung ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)), die als Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht Bedingungen ($830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die Q_{NP7} -Werte wurden durch Bestrahlung mit 21% des blauen Lichts ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Die Abb. 3.3.2 zeigt das Q_{NP} zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten infolge eines gesättigten Lichtblitzes (Lichtpuls #7 des Kinetik-Protokolls). Er ist der letzte gesättigte Messblitz der Kinetik am Ende der dunklen Photorelaxationsphase ohne aktinische Belichtung. Es liegen dieselben Kulturen bzw. Ausgangsdaten wie für Abb. 3.1.1 zu Grunde.

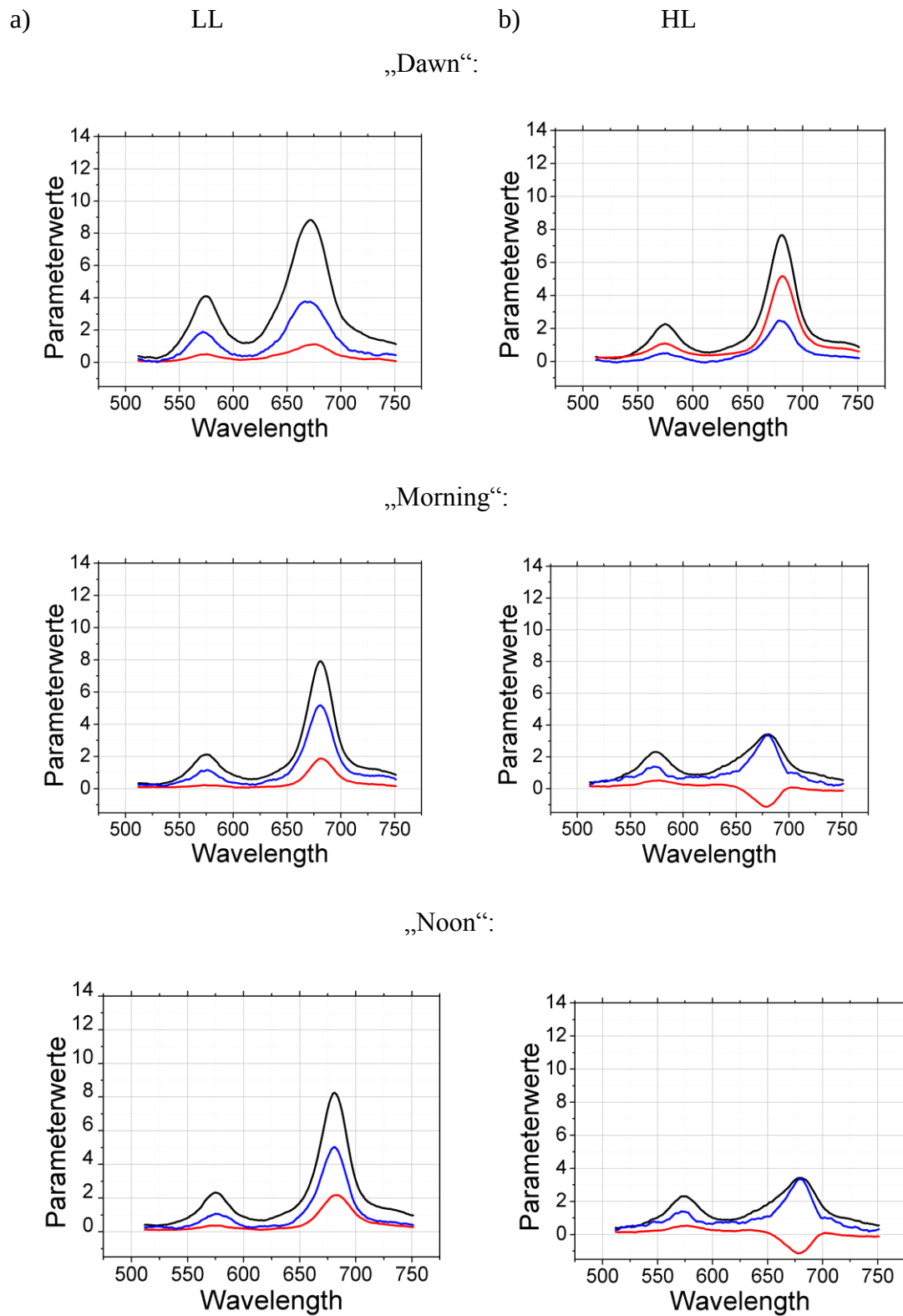
Unter Abb. 3.3.2 a) ist die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“) dargestellt. Die Q_{NP7} -Werte des „Dawn“-Graphen verteilen sich aufgrund der geringen Zellanzahlen nicht eindeutig. Im Bereich zwischen -40 und $-25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich eine kleine Gruppe von Zellen. Im Bereich zwischen -20 und $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erstreckt sich die große Hauptgruppe der Zellen. Sie scheint sich aber relativ deutlich durch ein starkes Absinken der Zellanzahl um $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nochmals zu unterteilen. Der „Morning“-Graph ist ähnlich. Ab $-40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl der Hauptgruppe relativ konstant an und erreicht ihr Maximum im Bereich um $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach sinkt die Häufigkeit der Zellen wieder dramatisch ab und erreicht ein Minimum bei $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 22 bis $85 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind nur wenige Zellen als kleine lockere Gruppe zu erkennen. Der Graph vom Mittag („Noon LL“) ist dagegen schwieriger zu beschreiben. Ab $-40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl rasant bis $-10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an. Danach sinkt sie wieder langsam auf mittlere Häufigkeiten ab. Bei $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erkennt man einen starken Einschnitt in der Q_{NP7} -Intervall-Zellzahl. Bei genauerer Betrachtung kann man kurz vor und unmittelbar nach dem Einschnitt wieder ein Ansteigen der Zellzahlen mit einem Maximum bei ca. $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erkennen. Kurz vor $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich wieder ein starker Einschnitt. Er begründet den Anfang der letzten Teilgruppe Zellen, die sich bis ca. $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ausdehnt. Darüber hinaus sind nur noch wenige vereinzelte Zellen zu sehen. Der „Evening“-Graph scheint wieder einfacher strukturiert zu sein. Ab $-30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt hier die Zellanzahl relativ konstant an und erreicht ihr Maximum bei ca. $-7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach sinkt Die Häufigkeit der Zellen wieder schnell bis $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Dieser Einschnitt in der Zellanzahl bei $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist jeweils $5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ davor, bzw. danach von hohen Zellanzahlen flankiert. Bei grober Betrachtung scheint er allerdings nur den Anfang der mittleren Gruppe Zellen zu begründen. Diese Gruppe erstreckt sich bis ca. $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihr Maximum bei $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Bereich zwischen 65 und $105 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich die letzte Gruppe. Sie ist relativ diffus strukturiert, sodass sich das Zentrum nicht genau lokalisieren lässt. Der „Night LL“-Graph ist durch die geringe Zellanzahl und der diffusen Verteilung wieder schwierig zu beschreiben. Bei genauer Betrachtung kann man allerdings 4 bis 5 relativ eigenständige Gruppen von Zellen erkennen. Sie liegen in den Bereichen zwischen -45 und $-10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, -10 und $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 40 und $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 65 und $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bzw. 130 und $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Die Graphen unter b) stellen die Starklicht-gestressten Zellen dar. Trotz der geringen absoluten Zellzahl im „Dawn“-Graph sind relativ klar 3 Gruppen von Q_{NP7} -Werten der Zellen

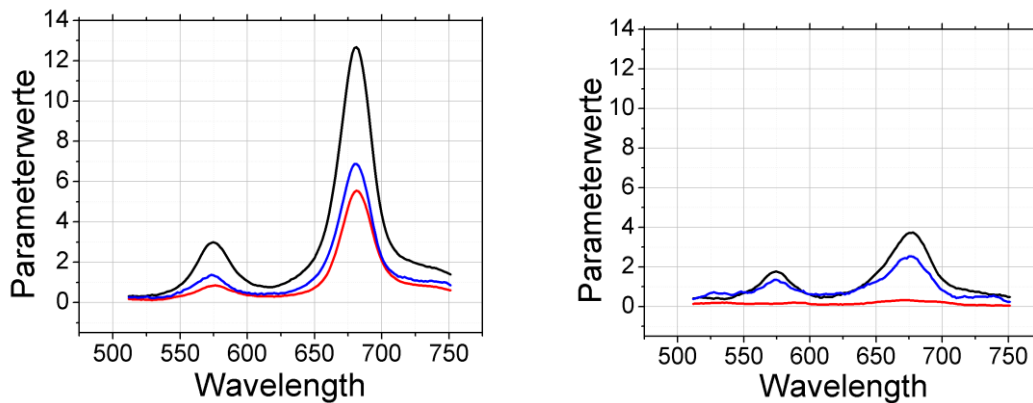
zu erkennen. Im Bereich zwischen -30 und $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ befindet sich die Erste mit ihrem Maximum bei $-10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Zweite ist die Hauptgruppe. Sie erstreckt sich von 0 bis $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und hat ihre maximalen Intervall-Zellanzahlen bei $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Von 32 bis $107 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dehnt sich die mittelgroße dritte Gruppe Zellen aus. Ihr Maximum liegt bei ca. $43 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Der „Morning“-Graph sieht zwar anders aus, weist allerdings Extrema an ähnlichen Parameterbereichen auf. Ab $-32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl erst langsam. Ab $-17 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie aber rasant und erreicht ein vorläufiges Maximum bei $-2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bis $4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Häufigkeit der Zellen wieder auf mittlere Werte. Sofort danach steigt die Zellanzahl wieder bis zum zweiten Maximum bei $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an. Die Zellanzahl der rechten Flanke dieser Gruppe sinkt anschließend wieder relativ gleichmäßig bis $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf Zellanzahlen gegen 0 ab. Ab $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ treten nur noch vereinzelt wenige Zellen auf, die kaum als eigenständige Gruppe zu betrachten sind. Das Histogramm vom Mittag („Noon“) ist ähnlich aufgebaut. Ab $-32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl erst langsam. Ab $-17 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt sie wieder stark und erreicht ein erstes Maximum bei $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Bis $5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sinkt die Häufigkeit der Zellen wieder auf mittlere Werte ab. Anschließend steigt sie wieder bis zum zweiten Maximum bei $12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Das relativ gleichmäßige Absinken der Zellanzahl danach, ist durch zwei markante Einschnitte bei 24 bzw. $38 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ unterbrochen. Der „Evening“-Graph ist ebenfalls sehr ähnlich aufgebaut. Ab $-27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ steigt die Zellanzahl relativ stark auf das erste vorläufige Maximum bei $-10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Danach sinkt sie wieder auf das lokale Minimum bei $-6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Wieder folgt ein starker Anstieg in der Häufigkeit der Zellen pro Q_{NP7} -Intervall. Bei $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist das nächste Maximum erreicht. Ein Q_{NP7} -Intervall danach sinkt die Zellanzahl erneut ab und steigt anschließend wieder bis zum höchsten Maximum bei ca. $8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ an. Die Zellanzahlen der rechten Flanke nach dem Peak sinken relativ schnell bis $72 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bis auf null ab. Der „Night“-Graph ist aufgrund der geringen Anzahl auswertbarer Zellen wieder schwer zu beschreiben. Im Bereich zwischen -16 und $2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint sich die erste Gruppe Zellen zu befinden. Von 4 bis $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ erstreckt sich die Hauptgruppe mit ihrem Maximum bei $28 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ab 52 bis über $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind wieder einige Zellen vertreten, die durchaus auch als eigenständige Gruppe zu betrachten sind.

3.3.4. Spektral aufgelöste Kinetiken Starklicht-gestresster Zellen bei blauem Anregungslicht mit 40-facher Vergrößerung

Abb. 3.4.1



„Evening“:



„Night“:

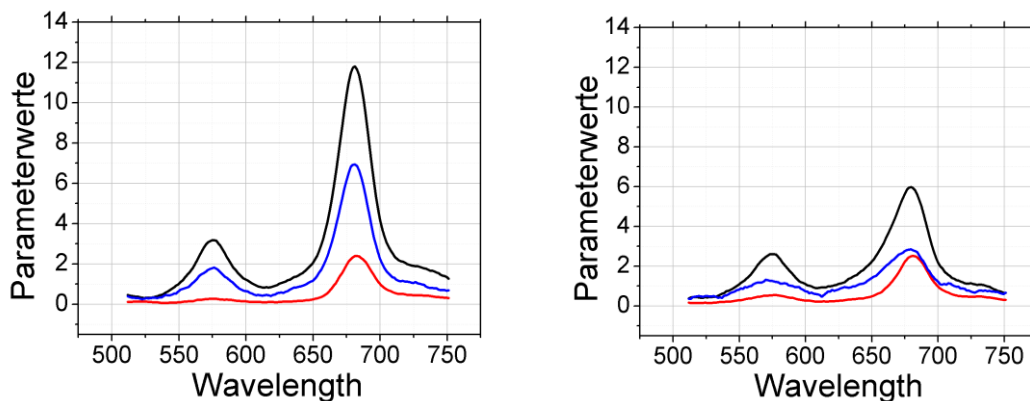


Abbildung 3.4.1: Spektral aufgelöste Kinetiken zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts, der Parameter der variablen Fluoreszenz F_v (schwarz), des Q_{P4} (blau) und Q_{NP4} (rot). Der Index 4 bei QP und QNP bedeutet, dass die Werte beim letzten Lichtpuls (4), in der aktinischen Belichtungsphase gemessen wurden. Die Graphen unter a) zeigen die „Low Light“-Kultur (niedrige bzw. normale Belichtung ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)), die als Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur gezeigt (Starklicht Bedingungen ($830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Die Fluoreszenzkinetiken wurden mit blauem Anregungslicht (~ 415 bis 500 nm) gemessen. Auf der x-Achse der Graphen ist die Wellenlänge des Lichts in nm aufgetragen.

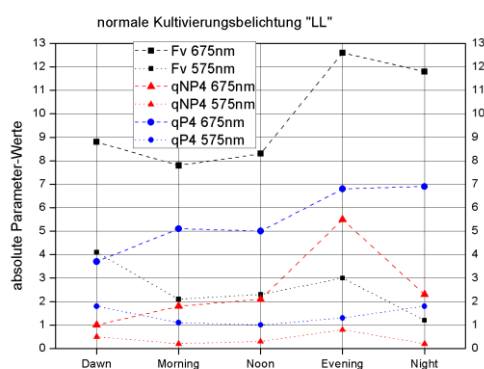
Die Abb. 3.4.1 zeigt spektral aufgelöste Kinetiken der Parameter der variablen Fluoreszenz F_v (schwarz), des Q_{P4} (blau) und des Q_{NP4} (rot) einzelner, gesunder Zellen mit durchschnittlicher Morphologie, aus der Mitte eines *Trichodesmium*-Filaments. Die Graphen der drei Fluoreszenzparameter sind Mittelwerte von mehreren unabhängigen Wiederholungen und beschreiben unter Anregung der Zellen im blauen Absorptionsbereich (bei PUB + Chl) das typische Fluoreszenzspektrum von *Trichodesmium*, mit einem kleineren Peak bei 575 nm sowie einem dominanten Größeren um 675 nm. Die absoluten Parameterwerte dieser Peaks sind in der Abb. 3.4.2 aufgezeigt. Auf Grund der Tatsache nie identische Zellen (bzw.

markierte Bereiche) messen zu können, wird anschließend in Abb. 3.4.3, statt auf die absoluten Werte, auf das Verhältnis von $\text{Peakgröße}_{675\text{ nm}} / \text{Peakgröße}_{575\text{ nm}}$ eingegangen. Dies soll die Änderung der Fluoreszenz der verschiedenen Komponenten des Photosystems im Tagesverlauf aufzeigen.

Bei der Betrachtung der spektral aufgelösten Kinetiken fällt auf, dass sich die 2 großen Hauptpeaks von F_v bzw. Q_{P4} („LL-Dawn“-Graph) nun bei 670 nm, anstatt wie in allen anderen Kinetiken bei ca. 680 nm, befinden. Deshalb ist im Weiteren näherungsweise vom $\text{Peak}_{675\text{ nm}}$ die Rede.

Abb. 3.4.2

a)



b)

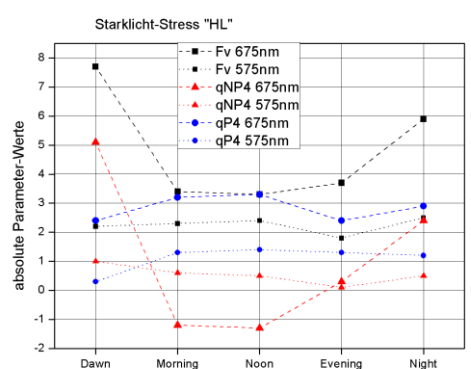


Abbildung 3.4.2: Absolute Fluoreszenzparameterwerte der zwei Hauptpeaks (bei 675 nm (große Symbole / Strich-Linien) bzw. bei 575 nm (kleine Symbole/Strich-Linien)), der spektralen Kinetiken aus Abb. 3.4.1, zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts), der variablen Fluoreszenz F_v (schwarz), des photochemischen Quenching Q_{P4} (blau) und des nicht-photochemischen Quenching Q_{NP4} (rot). Der Index 4 bei Q_P und Q_{NP} bedeutet, dass die Werte beim letzten Lichtpuls (4) in der aktinischen Belichtungsphase gemessen wurden. Der Graph unter a) ist die Auswertung des Graphen 3.4.1a), der „Low Light“-Kultur (niedrige bzw. normale Belichtung ($300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)), die zur Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur der Abb. 3.4.1.b) entsprechend ausgewertet (Starklicht-Bedingungen ($830\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)).

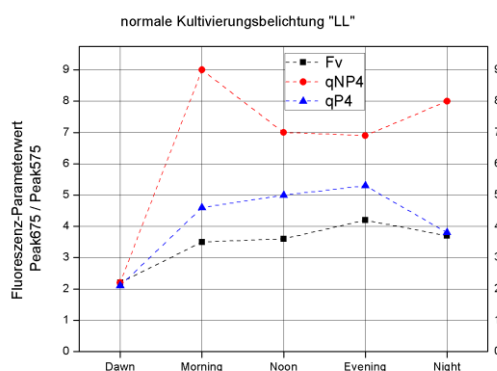
Die Graphen unter a) zeigen die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung. Die Werte der variablen Fluoreszenz F_v (schwarz) der zwei Hauptpeaks der spektralen Kinetiken zeigen eine korrelierende Entwicklung im Tagesverlauf. Zum Morgen („Morning“) hin sinken sie relativ stark ab. Bis zum Mittag („Noon“) ist wieder ein leichter Anstieg zu erkennen, der sich bis zum Abend („Evening“) hin noch verstärkt. Zur Nacht („Night“) hin sinken die F_v -Werte wieder leicht ab. Die Entwicklung der Q_{NP4} -Werte (rot) der zwei Peaks korreliert dagegen weniger. Während der Wert vom $\text{Peak}_{675\text{ nm}}$ bis zum Morgen ansteigt, sinkt der vom $\text{Peak}_{575\text{ nm}}$. Im weiteren Tagesverlauf korreliert die Entwicklung der zwei Peakwerte wieder.

Bis zum Mittag steigen die Q_{NP4} -Werte nur leicht, aber zum Abend hin stark an um wieder ebenso stark zur Nacht hin abzusinken. Die Entwicklung der Q_{P4} -Werte (blau) ist ähnlich. Während der Wert vom Peak_{675 nm} bis zum Morgen ansteigt, sinkt der, vom Peak_{575 nm}. Danach sinken zum Mittag hin beide Peakwerte nur leicht ab. Bis zum Abend hin steigen die Werte relativ stark an. Zur Nacht hin steigt der Wert von Peak_{675 nm} noch weiter leicht an, während der, von Peak_{575 nm} wieder auf seinen niedrigsten Wert im Tagesverlauf absinkt.

In b) ist die Starklicht-gestresste Kultur gezeigt. Die Entwicklung der F_v -Werte der beiden Hauptpeaks im Tagesverlauf korreliert kaum miteinander. Während der große Peak (675 nm) zum Morgen hin, vom höchsten Wert aus, stark absinkt, steigt der, des Kleinen (575 nm) sogar leicht an. Diese Trends werden bis zum Mittag in stark abgeschwächter Form fortgeführt. Zum Abend hin steigt der große Peak wieder stärker an, während der Kleine abfällt. Zur Nacht steigen die Werte der beiden Peaks wieder relativ stark an. Die Entwicklung der Q_{NP4} -Werte (rot) der zwei Peaks im Tagesverlauf verläuft wiederum unterschiedlich. Während der große Peak (675 nm) zum Morgen hin, wieder vom höchsten Wert aus, stark auf einen negativen Wert absinkt, sinkt der, des Kleinen (575 nm) nur leicht ab. Bis zum Mittag hin verändern sich beide Peakwerte nur kaum. Der große Peak steigt danach bis zur Nacht hin wieder relativ konstant stark in den positiven Bereich an, während der Kleine zum Abend hin absinkt und bis zur Nacht wieder auf das Niveau vom Mittag ansteigt. Die Q_{P4} -Entwicklung (blau) im Tagesverlauf verläuft dagegen anders. Beide Peakwerte steigen zum Morgen hin erst stark, und anschließend bis zum Mittag nur sehr leicht an. Bis zum Abend sinkt die Höhe des großen Peaks wieder stark auf den Ausgangswert vom Tageszeitpunkt „Dawn“. Der kleine Peak dagegen sinkt nur sehr leicht ab und setzt diesen Trend bis zur Nacht weiter fort, während der Große wieder stärker steigt.

Abb. 3.4.3

a)



b)

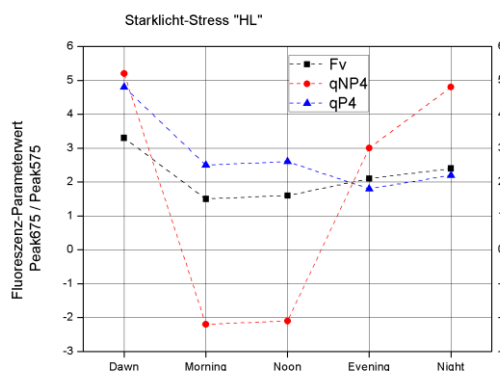


Abbildung 3.4.3: Höhen-Verhältnisse der zwei Hauptpeaks (675 nm/575 nm) der spektralen Kinetiken aus Abb. 3.4.1, zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts), der Kinetik-Parameter variable Fluoreszenz F_v (schwarz), photochemischen Quenching QP4 (blau) und nicht-photochemischen Quenching QNP4 (rot). Der Index 4 bei QP und QNP bedeutet, dass die Werte beim letzten Lichtpuls (4) in der aktinischen Belichtungsphase gemessen wurden. Der Graph unter a) ist die Auswertung der Graphen unter 3.4.1a), der „Low Light“-Kultur (niedrige bzw. normale Belichtung ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)), die als Kontrolle dient. Unter b) ist die „High Light“-gestresste Kultur der Abb. 3.4.1b) ausgewertet (Starklicht Bedingungen ($830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)).

In der Abb. 3.4.3 wird auf das Verhältnis $\text{Peakgröße}_{675 \text{ nm}} / \text{Peakgröße}_{575 \text{ nm}}$ („Q“: großer Peak/kleiner Peak) eingegangen, um die Änderung der Fluoreszenz der verschiedenen Komponenten des Photosystems im Tagesverlauf aufzuzeigen.

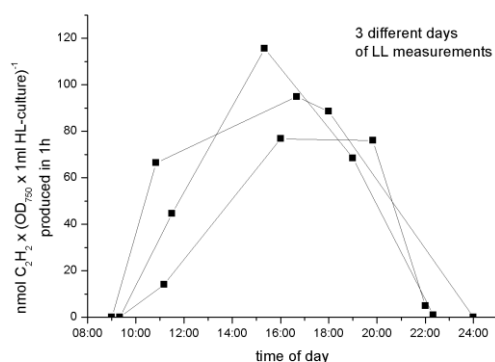
Der Graph unter a) zeigt die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung. Der Quotient „Q“ des F_v -Werts (schwarz) steigt bis zum Morgen von ca. 2 auf ca. 3,5 an. Bis zum Mittag hin ist der weitere Anstieg von „Q“ nur minimal. Zum Abend hin steigt er aber wieder stärker über einen Wert von 4 und sinkt anschließend bis zur Nacht wieder unter 4 relativ stark ab. Der Quotient „Q“ von Q_{NP4} (rot) steigt bis zum Morgen von ca. 2 auf den Maximalwert 9 an. Bis zum Mittag hin sinkt „Q“ auf 7 ab. Danach sinkt der Quotient bis zum Abend nur leicht unter 7 ab. Ein erneuter Anstieg zur Nacht hin auf 8 schließt die Entwicklung von „Q“, im Tagesverlauf des Q_{NP4} -Wertes ab. Die Entwicklung der Verhältnisse von Q_{P4} (blau) korreliert stark mit der, von Q_{NP4} . Zu den Messzeitpunkten „Dawn“ und „Night“ haben sie sogar das gleiche Peakverhältnis „Q“. Die „Q“-Werte der anderen Messzeitpunkte liegen stets um ca. 1,2 höher als die Werte die entsprechenden Q_{NP4} -Graphen.

In b) ist die Starklicht-gestresste Kultur gezeigt. Der Quotient „Q“ des F_v -Spektrums (schwarz) sinkt bis zum Morgen von ca. 3,3 auf ca. 1,5 ab. Danach steigt er nur leicht variabel bis zur Nacht wieder auf einen Wert um 2,5 an. Die Entwicklung des Quotienten von Q_{NP4} (rot) ist dramatischer. Bis zum Morgen sinkt er von über 5 auf unter -2 ab. Es folgt zum Mittag hin ein leichter Anstieg des Wertes. Zum Abend hin springt der „Q“-Wert wieder auf ca. 3. Anschließend steigt er weiter zur Nacht hin bis knapp unter 5. Auch der Q_{P4} -Quotient sinkt zum Morgen hin von unter 5 auf 2,5 ab. Eine Stagnation in der Entwicklung folgt bis zum Mittag. Bis zum Abend sinkt „Q“ sogar unter 2 und steigt anschließend zur Nacht hin wieder darüber.

3.3.5. Messung der Stickstofffixierung via Acetylenreduktion und Gaschromatographie

Abb. 3.5.1

a)



b)

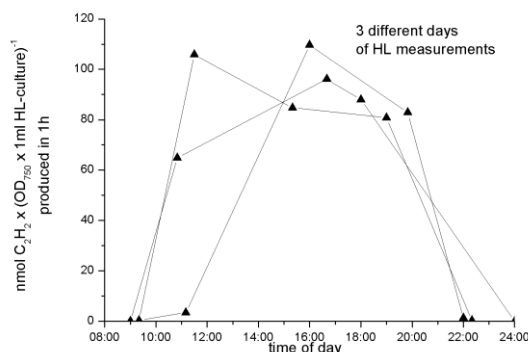


Abbildung 3.5.1: Tagesübersicht der Acetylen-Verstoffwechslung der Nitrogenase als Maß für die N-Fixierung zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten, der Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (a), und der mit Starklicht („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) kultivierten Kultur (b), an jeweils 3 verschiedenen Messtagen. Es wurde dabei stets jeweils die gleiche Chemostat-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase gemessen. X-Achse: Uhrzeit Y-Achse: $\text{nmol C}_2\text{H}_2 \times (\text{OD}_{750} \times 1 \text{ ml Kultur})^{-1}$ in 1h gebildet.

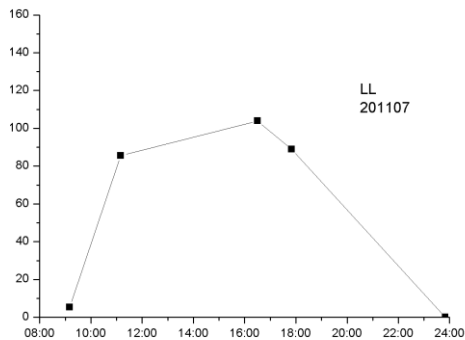
Die Abb. 3.5.1 zeigt die Tagesübersicht der Acetylen-Verstoffwechslung der Nitrogenase zu Ethylen als Maß für die N-Fixierung zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten.

Unter a) ist die Kontroll-Kultur mit normaler Belichtung gezeigt. An allen 3 Messtagen steigt der Umsatz der Nitrogenase von null (um 8:30) über den Morgen (ca. 11:00) bis zum Mittag (ca. 16:00) auf maximale Werte an. Zum Abend hin (ca. 19:00) erfolgt wieder ein leichtes Absinken der Acetylenreduktionsrate. Später, zur Nacht hin (23:00), sinkt die N-Fixierung wieder stark auf Werte gegen null ab.

Unter b) ist die Starklicht-gestresste Kultur gezeigt. Die 3 Messkurven sind hier nicht so einheitlich wie bei der Kontrolle. Alle beginnen den Messtag (ca. 8:30) mit Werten um null. Zum Morgen (ca. 11:00) hin steigen zwei der drei Kurven sehr steil an, während die Dritte nur sehr leicht steigt. Bis zum Mittag (16:00) allerdings steigt diese darauf stark auf ihren maximalen Wert an, während eine der anderen Messkurven, nur leicht ansteigend das Maximum erreicht, und die andere sogar wieder leicht absinkt. Zum Abend hin (ca. 19:00) sinken alle Kurven des Graphen wieder leicht und zur Nacht hin (nach 22:00) sehr stark auf Werte gegen null ab.

Abb. 3.5.2

a)



b)

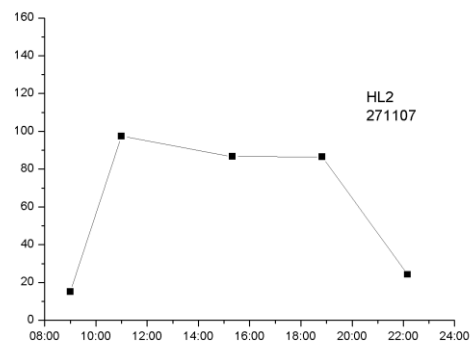
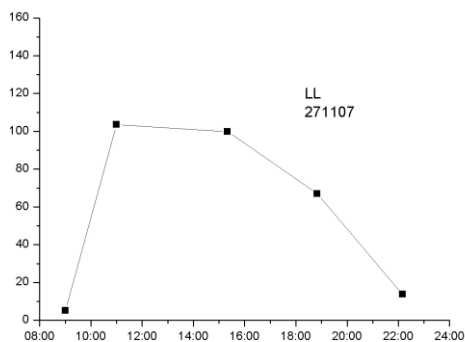
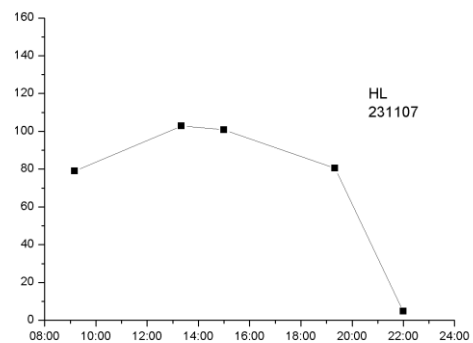
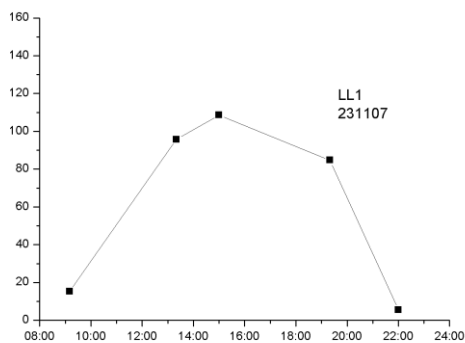
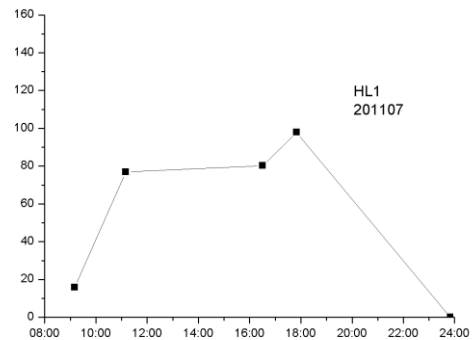


Abbildung 3.5.2: Tagesübersicht der Acetylen-Verstoffwechslung der Nitrogenase als Maß für die N-Fixierung zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten der Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (a) und der mit Starklicht („HL“, $830 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) kultivierten Kultur (b), an jeweils 3 verschiedenen Messtagen innerhalb einer Woche. Es wurde jeweils die gleiche Chemostat-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. X-Achse: Uhrzeit Y-Achse: $\text{nmol C}_2\text{H}_2 \times (\text{OD}_{750} \times 1 \text{ ml Kultur})^{-1}$ in 1 Stunde gebildet.

Die Abb. 3.5.2 zeigt, ähnlich wie in Abb. 3.5.1, eine weitere Tagesübersicht der Acetylen-Verstoffwechslung der Nitrogenase als Maß für die N-Fixierung, zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten.

Unter a) ist die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung gezeigt. Die Messkurven 201107 bzw. 231107 zeigen den erwarteten typischen Verlauf. Mit sehr niedrigen Umsatzraten vor dem Anschalten des Lichts (8:30) beginnt für sie der Messtag. Zum Morgen hin (ca. 11:00) steigen die Werte stark an. Danach steigen die Werte bis zum Erreichen des absoluten Maximalwerts bis zum Mittag nur schwächer an. Anschließend sinken die Werte bis zum Abend wieder leicht- und zur Nacht hin stark gegen null ab. Die Messkurve 271107 ist ähnlich geformt. Allerdings wird hier der Maximalwert schon am Morgen (11:00) erreicht. Bis zum Mittag sinkt der Acetylen-Umsatz aber nur leicht ab.

Unter b) ist die Starklicht-gestresste Kultur gezeigt. Die 3 Messkurven sind hier nicht so einheitlich wie bei der Kontrolle. Um 9:00 Uhr beginnen zwei (201107 bzw. 271107) der drei Messkurven mit sehr niedrigen Werten. Bei der Messkurve 231107 ist um diese Zeit schon ein sehr hoher Acetylen-Umsatz erreicht. Bis zum Morgen steigt er hier noch weiter auf den Maximalwert an, während er an den anderen beiden Messtagen erstmals stark ansteigt. Zum Mittag hin (ca. 16:00) sinkt die Messkurve 231107, ebenso wie 271107 wieder leicht ab. Die vom 20.11. (201107) steigt nur leicht, aber bis zum Abend (18:00) dann stärker auf den Maximalwert an. Die Kurve vom 23.11. (231107) sinkt dagegen noch stärker ab. Der Umsatzwert der Messung 271107 bleibt dagegen unverändert. Zur Nacht hin (später als 22:00) sinken zwei der drei Umsatzraten wieder sehr stark auf Werte gegen null. Die Umsatzrate der Messung 271107 sinkt allerdings nur auf 1/5 des Maximalwertes ab.

3.3.6. *In vivo*-Absorptionsspektren Starklicht-gestresster Zellen

Abb. 3.6.1

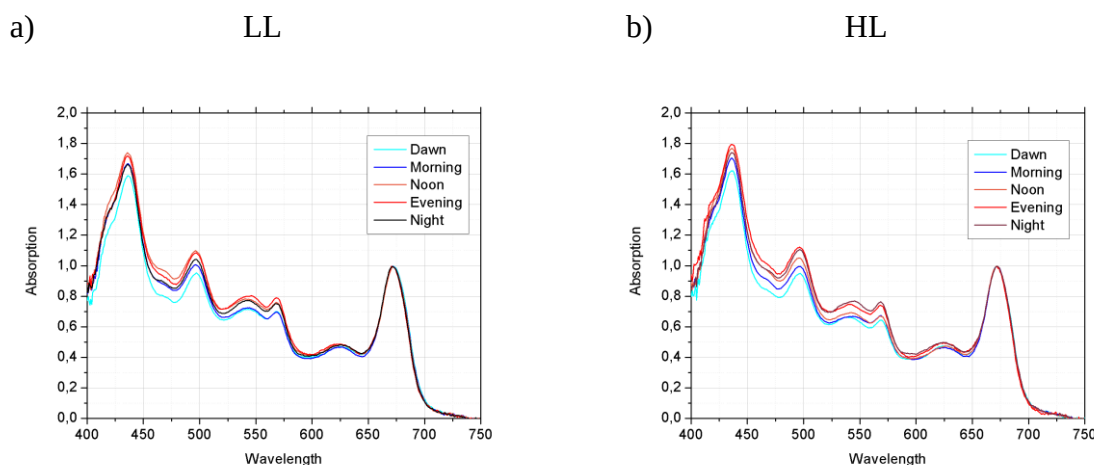


Abbildung 3.6.1: *In vivo*-Absorptionsspektren der verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts) von lebenden Zellen, der Kontrolle (a) mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), und von der mit Starklicht („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) belichteten Kultur (b), die auch für die „bildgebenden“ Kinetiken gemessen worden. Jedes einzelne Spektrum ist ein Mittelwert von 4 Messtagen a 6 Zellen. Die einzelnen Spektren wurden „Baseline“-korrigiert, d.h. es wurde jeweils von jedem Spektrum der Absorptionsbetrag, den es im roten Bereich ($> 750 \text{ nm}$) hat, subtrahiert. Anschließend wurden die verschiedenen Spektren auf den Rotlicht-absorbierenden Peak von ChlA (670 nm) normiert.

Die Abb. 3.6.1 zeigt die Entwicklung der *in vivo*-Absorptionsspektren von einzelnen Starklicht-gestressten *Trichodesmium*-Zellen im Tagesverlauf. Jedes einzelne Spektrum ist ein Mittelwert von 4 Messtagen a 6 Zellen. Die einzelnen Spektren wurden „Baseline“-korrigiert; d.h. es wurde jeweils von jedem Spektrum der Absorptionsbetrag, den es im roten Bereich ($> 750 \text{ nm}$) hat, subtrahiert. Anschließend wurden die verschiedenen Spektren auf den „roten“ Peak der ChlA-Absorption (670 nm) normiert, um mehr über das Mengen-Verhältnis PBPs/Chlorophylle im lebenden Organismus zu erfahren. Die Absorptionspeaks der verschiedenen Photopigmente sind in der Einleitung und in Material und Methoden beschrieben.

Unter Abb. 3.6.1a) sind die Spektren der ungestressten Kontroll-Zellen gezeigt. Sie haben alle samt eine sehr ähnliche Form. Auch die Verhältnisse der Photopigmente untereinander sind im Wesentlichen gleich. Nur das Verhältnis PBPs / ChlA scheint einem Tageszyklus zu unterliegen. Die Abweichung der Verhältnisse beträgt allerdings höchstens ca. 13%. Die Absorption der PBPs / ChlA ist vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) die mit Abstand Geringste. Dieser Unterschied wird besonders bei der Karotinoid-, und teilweise bei der PUB-

Absorption sichtbar. Vom Morgen über den Mittag und bis zum Abend steigen Verhältnisse leicht auf maximale Werte an. Zur Nacht hin sinkt PBPs / ChlA wieder leicht ab.

Unter Abb. 3.6.1 b) sind die Starklicht-gestressten Zellen gezeigt. Die Beschreibung der Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren gestaltet sich hier schwieriger, da alle eine sehr ähnliche Form (PBPs / ChlA) aufweisen. Allgemein kann man aber festhalten, dass die Verhältnisse relativ konstant bis zum Abend auf maximale Werte ansteigen und zur Nacht hin nur ganz leicht wieder absinken.

Abb. 3.6.2

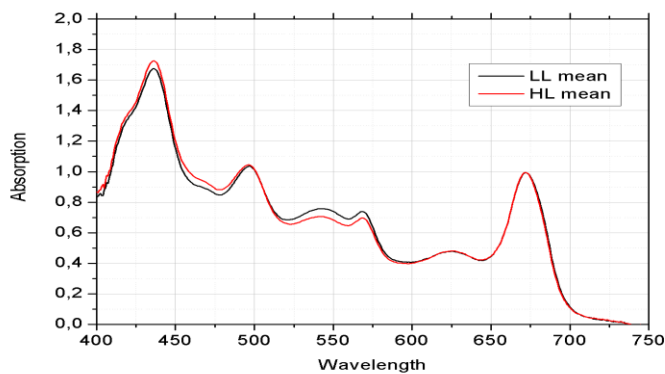
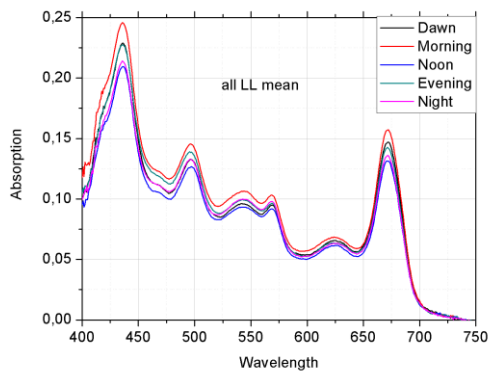


Abbildung 3.6.2: Vergleich der *in vivo*-Absorptionsspektren der Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mit der Starklicht-gestressten Kultur („HL“, $830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jedes Spektrum ist jeweils der Mittelwert, der 5 Einzelspektren, der verschiedenen Messzeitpunkte, aus Abb. 3.6.1. Auf der X-Achse ist die Wellenlänge in nm aufgetragen.

Die Abbildung 3.6.2 vergleicht die, jeweils aus Abb. 3.6.1 gemittelten *in vivo*-Absorptionsspektren der Starklicht-gestressten Kultur („HL“) mit denen der Kontroll-Kultur („LL“). Die Starklicht-gestresste Kultur absorbiert ca. 5% mehr Licht im Bereich der Karotinoide, weist allerdings 9% weniger Absorption im Bereich von PE auf. Die Absorption von PUB, PC und auch von APC scheint in beiden Kulturen gleich stark zu sein.

Abb. 3.6.3

a)



b)

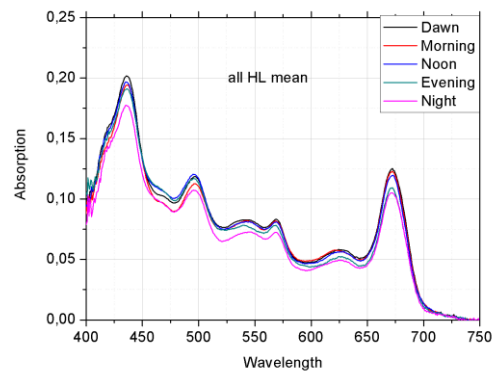


Abbildung 3.6.3: In vivo-Absorptionsspektren zu den verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts) von lebenden Zellen, der Kontrolle (a) mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), und der mit Starklicht („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) belichteten Kultur (b). Jedes einzelne Spektrum ist ein Mittelwert von 2 Messtagen a 6 Zellen. Die einzelnen Spektren wurden „Baseline“-korrigiert, d.h. es wurde jeweils von jedem Einzelspektrum der Absorptionbetrag, den es im „roten“ Wellenlängenbereich ($> 750 \text{ nm}$) hat, subtrahiert.

Im Experiment für die Abb. 3.6.3 sind im Gegensatz zur Abb. 3.6.1 nur halb so viele Zellen ausgewertet. Außerdem sind diesmal die absoluten Absorptionswerte gezeigt. Die einzelnen Spektren wurden lediglich „Baseline“-korrigiert, d.h. es wurde jeweils von jedem Einzelspektrum der Absorptionbetrag, den es im roten Bereich ($> 750 \text{ nm}$) hat, subtrahiert.

Unter a) ist die Kontroll-Kultur gezeigt. Die Einzelspektren haben alle eine sehr ähnliche Form. Die Variation zwischen den Absorptionshöhen der verschiedenen Photopigmente beträgt relativ einheitlich ca. 15%. Die in allen Bereichen niedrigsten Absorptionswerte zeigen die Zellen am Mittag („Noon“). Die Höchsten weisen die Zellen vom Morgen auf. Die Spektren der anderen Messzeiten variieren insignifikant dazwischen, sodass man kaum Aussagen über einen Tageszyklus der Pigmente machen kann.

Auch bei den Starklicht-gestressten Zellen unter b) ist ein Tageszyklus der Pigmente kaum zu erkennen. Die in allen Bereichen niedrigsten Absorptionswerte zeigen die „Night“-Zellen. Die höchsten Werte weisen hier die „Dawn“-Zellen auf. Die Variation zwischen den Absorptionshöhen der verschiedenen Photopigmente ($(\text{„Dawn“-Wert} - \text{„Night“-Wert}) / \text{„Dawn“-Wert}$) schwankt zwischen 10 und 15%. Die Spektren der anderen Tageszeiten variieren mit Werten dazwischen. Auffällig ist die gleiche Absorptionsstärke der „Night“- und „Morning“-Zellen im Bereich der Karotinoide (bei 465 nm), obwohl die „Morning“-Zellen im Bereich von ChlA und den meisten PBPs, mit die höchsten Absorptionswerte

aufweisen. Außerdem zeigen die Karotinoide der „Noon“- und „Evening“-Zellen die höchsten Absorptionswerte auf.

Abb. 3.6.4

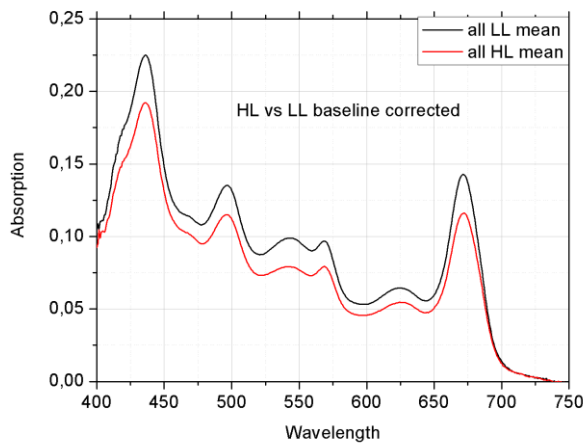


Abbildung 3.6.4: Vergleich der *in vivo*-Absorptionsspektren der Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) mit der Starklicht-gestressten Kultur („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Die Spektren sind jeweils der Mittelwert, der 5 Einzelspektren, der verschiedenen Messzeitpunkte, aus Abb. 3.6.3. Auf der X-Achse ist die Wellenlänge in nm aufgetragen.

Die Abbildung 3.6.4 vergleicht die, jeweils aus Abb. 3.6.3 gemittelten, *in vivo*-Absorptionsspektren, der Starklicht-gestressten Kultur („HL“) mit denen, der Kontroll-Kultur („LL“).

Die absoluten Absorptionswerte der verschiedenen Photopigmente der Starklicht-gestressten Kultur liegen stets unter denen, der Kontroll-Kultur (ChlA.: 17%; Karotinoide: 11%; PUB: 12%; PE: 14%; PC: 8%). Im Fall einer Normierung auf den „roten“ Absorptionspeak von ChlA (bei 670 nm), um also mehr über das Mengen-Verhältnis PBPs (auch Karotinoide) / ChlA im lebenden Organismus zu erfahren, zeigt sich ein anderes Bild. Während die Verhältnisse für die Karotinoide, bzw. PC ungefähr gleiche Werte in beiden Vergleichskulturen aufweisen, liegen die Werte für PUB, bzw. PE in der Starklicht-gestressten Kultur ca. 10% niedriger.

3.3.7. *In vitro*-Absorptionsspektren Starklicht-gestresster Zellen

Abb. 3.7.1

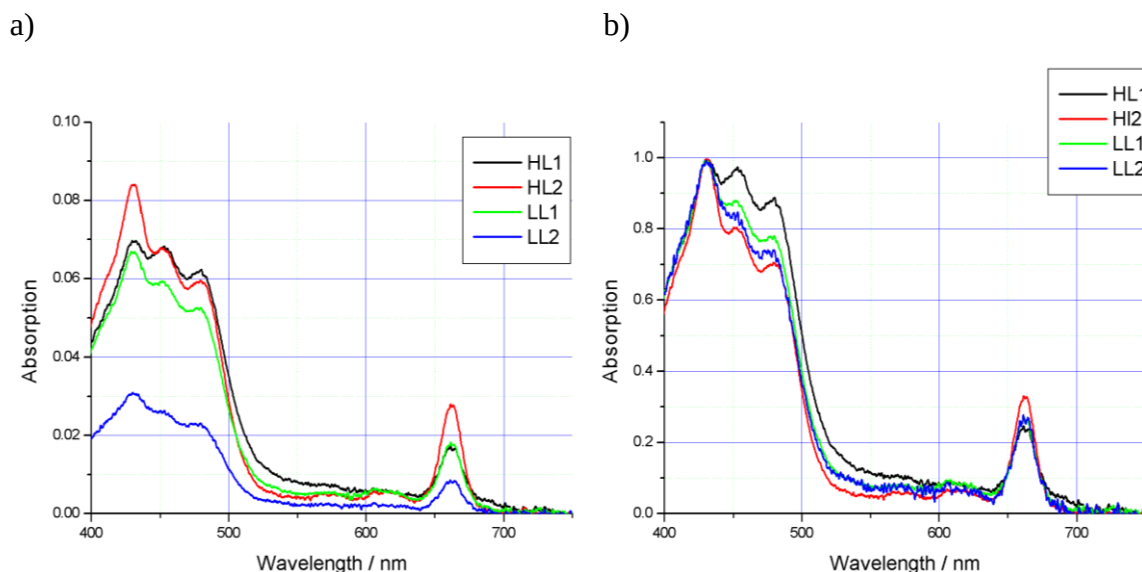


Abbildung 3.7.1: *In vitro*-Absorptionsspektren (in Aceton) aller Aceton-löslichen Photopigmente lyophilisierter *Trichodesmium*-Kulturen, der Kontrolle („LL“, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), sowie die, der Starklicht-gestressten Zellen („HL“, $830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). In a) sind die originalen Spektren aufgezeigt. In b) wurden diese auf den „blauen“ Absorptionspeak-Peak von ChlA (bei 435 nm) normiert, um die Verhältnisse der anderen Photopigmente zu ChlA jeweils miteinander vergleichen zu können.

Die Abb. 3.7.1 zeigt beispielhaft jeweils zwei *in vitro*-Absorptionsspektren der *Trichodesmium*-Extrakt-Überstände (in Aceton), der Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und der, mit Starklicht („HL“, $830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) belichteten Kultur.

In a) sind die originalen Spektren mit absoluten Werten aufgezeigt. Aus Solchen wurden im Weiteren die Konzentrationen der verschiedenen Pigmentgruppen berechnet (Kupper, Seibert *et al.* 2007).

In b) wurden die Originalspektren (aus a)) auf den „blauen“ Absorptions-Peak von ChlA (bei 435 nm) normiert, um jeweils die Verhältnisse der verschiedenen Photopigmente zum ChlA miteinander vergleichen zu können. Unabhängig von der Stressart, kann man deutlich die Schwankungen in der Höhe der Absorption (bis zu 20%) der einzelnen Pigmentpeaks erkennen.

Abb. 3.7.2

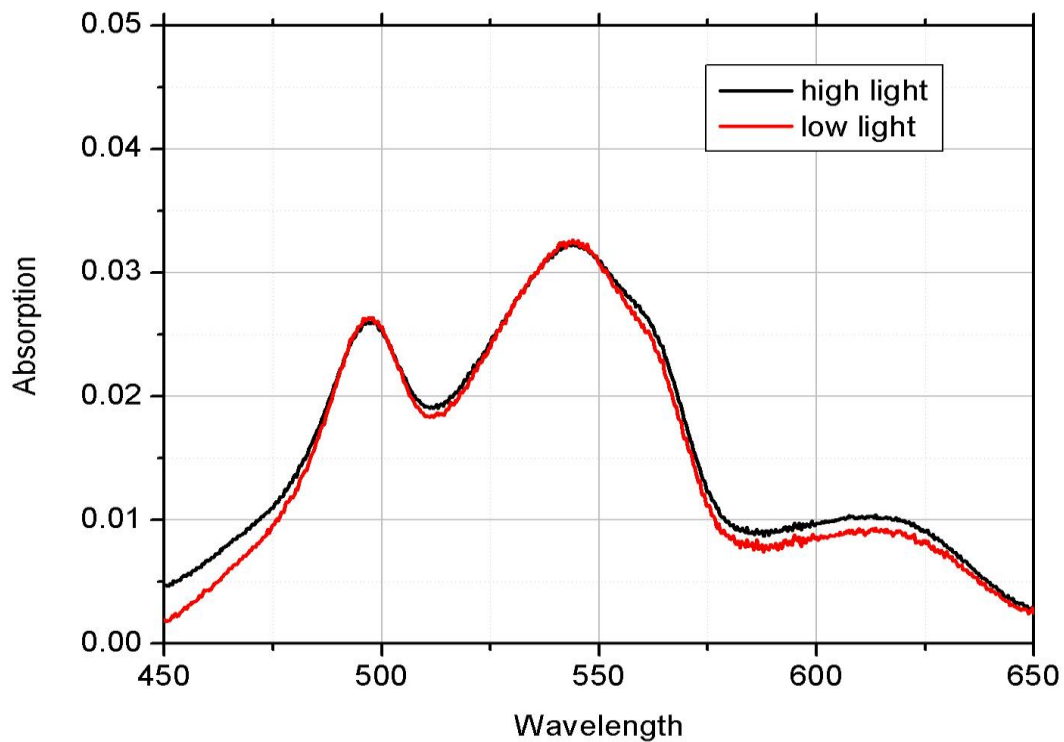


Abbildung 3.7.2: In vitro-Absorptionsspektren (in 1xPBS) aller PBS-löslichen *Trichodesmium*-Pigmente (PBPs) des Extraktüberstands der Kontroll-Kultur („low light“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) und der Starklicht- („high light“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) belichteten Kultur im Vergleich dazu. Die Spektren sind Mittelwerte von mehreren Einzelmessungen, um einen Tagesschnitt zu demonstrieren. Diese Einzelspektren wurden zuvor jeweils auf 1 ml Kultur und auf den OD_{750} -Wert normalisiert.

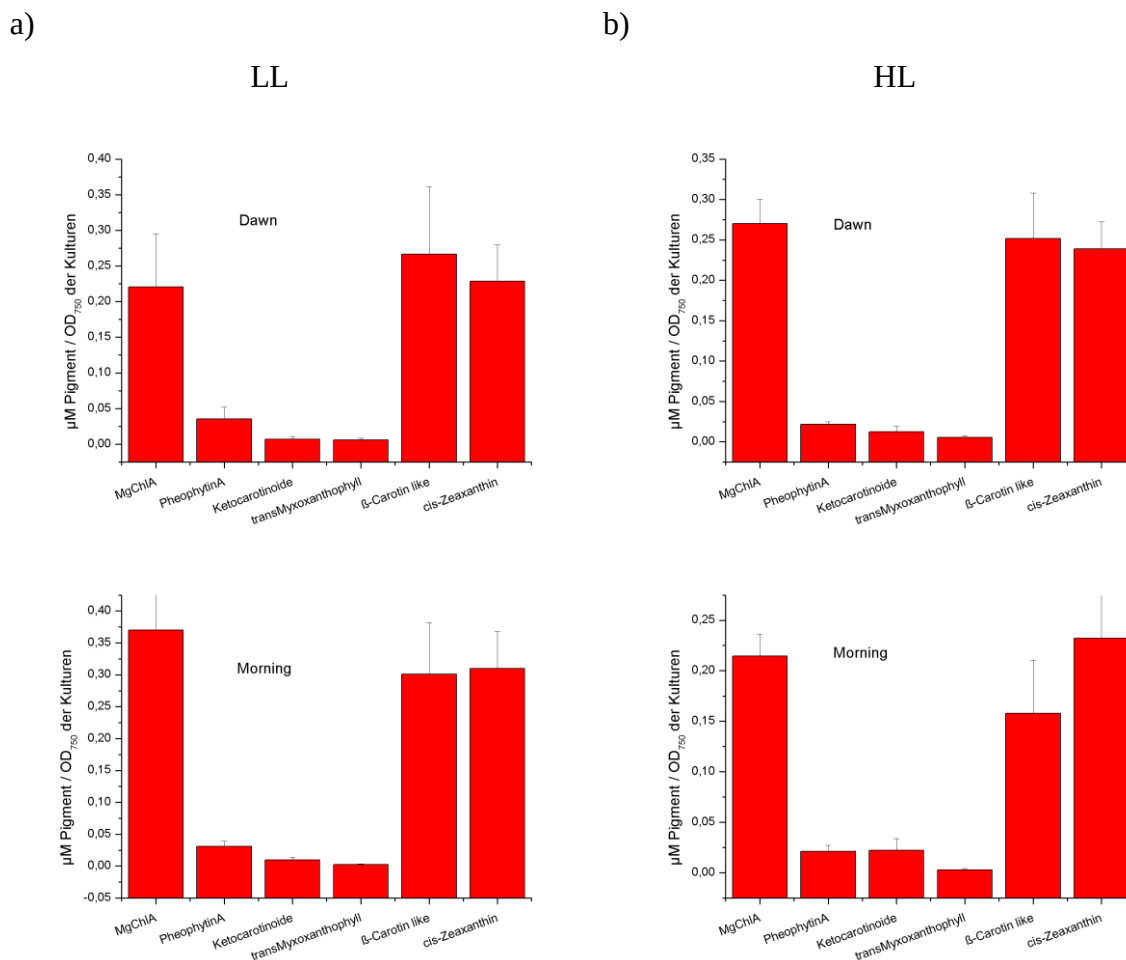
Die Abb. 3.7.2 zeigt beispielhaft die *in vitro*-Absorptionsspektren der *Trichodesmium*-Extraktüberstände (in PBS) der normalen Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) und der Starklicht belichteten Kultur („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Alle Einzelspektren der verschiedenen Probenahmezeitpunkte wurden jeweils auf 1 ml Kultur und $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$ normiert und anschließend gemittelt.

Im Vergleich der Kulturen kann man in beiden Spektren bei 495, bzw. 540 nm die jeweils gleiche Absorption erkennen. Im Peak bei 630 nm (PC) und in der Flanke um 450 nm zeigt allerdings die Starklicht-gestresste Kultur etwas weniger Absorption. Die genaue Konzentrationsbestimmung der PBPs im Tageszyklus wurde anschließend, anhand der Einzelspektren der verschiedenen Tageszeiten, mit der Methode des „Gauss-Peak-Fitting“ (Kupper, Seibert *et al.* 2007) durchgeführt.

3.3.8. Konzentrationsbestimmung der Photopigmentgruppen durch „Gauss-Peak-Fitting“ von *in vitro*-Absorptionsspektren

Mit der Methode des „Gauss-Peak-Fittings“ der *in vitro*-Absorptionsspektren einer Kultur (Kupper, Seibert *et al.* 2007) kann präzise die Konzentration aller enthaltenen, Aceton-löslichen Photopigmente (bzw. Photopigmentgruppen mit gleichem Grundaufbau oder spektralen Eigenschaften) bestimmt werden. Von jedem enthaltenen Pigment, wie auch von deren Auf-/ Abbauprodukten, wurden zuvor Absorptionsspektren (hoch rein) als Standard aufgenommen. Diese wurden jeweils mit einem bestimmten Set an „Gauss-Peaks“ (Kombination verschiedener Glockenkurven mit Normalverteilung, als Summenformel aufaddiert) beschrieben. Mit diesen Sets an Standards wurden daraufhin die einzelnen *in vitro*-Absorptionsspektren, wie zum Beispiel in Abb. 1.6.1a) bzw. 3.7.1a) beschrieben („Gauss-Peak-Fitting“), um letztlich die Pigment-Konzentrationen der *Trichodesmium*-Kultur zu den verschiedenen Tageszeiten zu errechnen.

Abb. 3.8.1



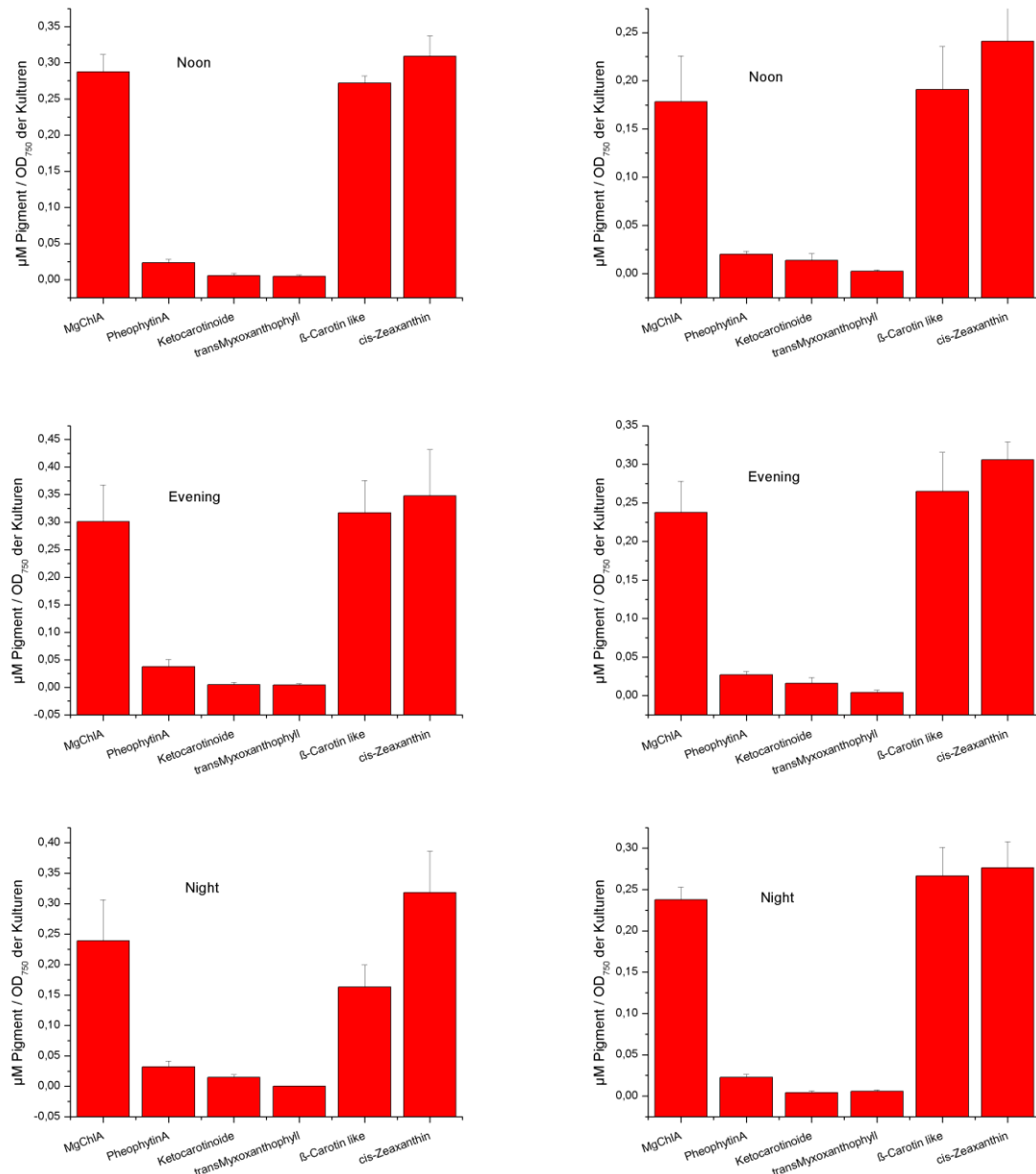


Abbildung 3.8.1: Übersicht der Konzentrationen der Photopigmentgruppen zu den verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts), der Kontrolle (a) mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), und der mit Starklicht („HL“, 830 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) belichteten Kultur (b), aus jeweils 4 Messtagen gemittelt. Die Konzentrationen jeder einzelnen Messung wurden auf die OD_{750} der entsprechenden Kultur zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert.

Die Abb. 3.8.1 zeigt die Konzentrationen der, mit der oben benannten Methode („Gauss-Peak-Fitting“), unterscheidbaren Pigmentgruppen. In a) ist die normal belichtete Kontroll-Kultur und in b) ist die Starklicht-Gestresste gezeigt. Zum besseren Verständnis des Tageszyklus der Pigmentgruppen ist in Abbildung 3.8.2 jeweils eine Zusammenfassung dargestellt.

Abb. 3.8.2

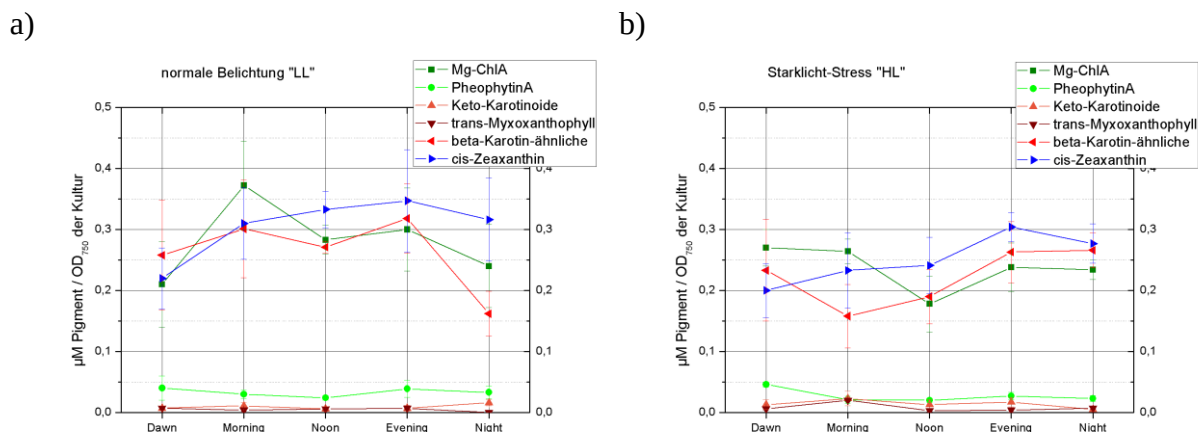


Abbildung 3.8.2: Tageszyklus der Konzentrationen der Photopigmentgruppen aus Abb. 3.8.1, zu den verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts), der Kontrolle (a) mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), und der mit Starklicht belichteten („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) Kultur (b), aus jeweils 4 Messtagen gemittelt. Die Konzentrationen jeder einzelnen Messung wurden auf die OD_{750} der entsprechenden Kultur zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert.

Die Abb. 3.8.2 zeigt den Tageszyklus, der Konzentrationen der Photopigmentgruppen, sowie der wichtigsten Intermediate entsprechend Abb. 3.8.1.

In a) ist die Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung gezeigt. Das Hauptpigment Mg-ChlA (oliv-grün) ist vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) mit Konzentrationen knapp über $0,200 \mu\text{M}$ vertreten. Bis zum Morgen steigt es wieder leicht auf $0,380 \mu\text{M}$ an. Die Konzentrationen von Mg-ChlA sinken anschließend relativ unstetig zur Nacht hin auf Werte um $0,240 \mu\text{M}$ ab. PheA (hell-grün) ist dagegen in relativ geringen Konzentrationen vertreten. Vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) liegt die Konzentration bei $0,040 \mu\text{M}$. Bis zum Morgen sinkt sie nur leicht auf $0,030 \mu\text{M}$ und bis zum Mittag („Noon“) weiter auf $0,024 \mu\text{M}$ ab. Dann steigt die Konzentration bis zum Abend wieder auf $0,039 \mu\text{M}$ an und sinkt anschließend wieder zur Nacht hin auf Werte um $0,033 \mu\text{M}$ ab. Die Keto-Karotinoide (orange) sind allgemein in sehr geringer Konzentration vertreten. Von „Dawn“ bis „Night“ sind die Werte $0,007$; $0,011$; $0,006$; $0,007$ und $0,014 \mu\text{M}$. Über den Tageszyklus sind kaum verlässliche Aussagen zu treffen, da die Varianz der Konzentrationen der einzelnen Messzeitpunkte relativ hoch ist. Auch das Pigment *trans*-Myxoxanthophyll (Wein-rot) ist relativ wenig vorhanden. Die Konzentrationsentwicklung über den Tag („Dawn“ bis „Night“) zeigt folgende Werte: $0,007$; $0,004$; $0,006$; $0,007$ und $0,0005 \mu\text{M}$. Auch hier sind Aussagen über einen Tageszyklus der Konzentration aufgrund der relativ hohen Varianz, bzw. der geringen eigenen Konzentration mit zusätzlich überlagernden Spektren der dominierenden

Pigmente (ChlA, *cis*-Zeaxanthin, β -Karotin-ähnliche), kaum zu treffen. Die Pigmentgruppe der β -Karotin-Ähnlichen (rot) ist allgemein mit ähnlichen Konzentrationen wie Mg-ChlA vertreten. Auch die Entwicklung ihrer Konzentrationskurve zeigt eine ähnliche Form. Vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) beträgt die Konzentration 0,258 μ M. Bis zum Morgen steigt sie auf 0,301 μ M an, sinkt wieder bis zum Mittag auf 0,271 μ M ab und steigt bis zum Abend erneut auf 0,318 μ M an. Zur Nacht hin folgt ein relativ starkes Absinken der Konzentration auf 0,162 μ M. Auch *cis*-Zeaxanthin ist allgemein in hohen Konzentrationen vertreten. Von 0,22 μ M („Dawn“) steigt die Konzentration relativ stark bis zum Morgen auf 0,31 μ M an. Ein weiterer leichter Anstieg auf 0,333 μ M erfolgt bis zum Mittag. Zum Abend hin erreicht die Konzentration mit einem noch leichteren Anstieg das Tagesmaximum mit Werten um 0,347 μ M. Zur Nacht hin sinkt sie wieder leicht auf 0,316 μ M.

In b) sind die Starklicht-gestressten Zellen gezeigt. Das Hauptpigment Mg-ChlA (oliv-grün) ist vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) mit Konzentrationen um 0,270 μ M vertreten. Im Gegensatz zur Kontroll-Kultur sinkt die Konzentration aber bis zum Morgen leicht auf 0,264 μ M ab. Danach scheint der Tageszyklus aber wieder ähnlich wie der, der Kontroll-Kultur zu verlaufen. Die Konzentration sinkt bis zum Mittag relativ stark auf 0,178 μ M ab, steigt danach erneut stark auf 0,238 μ M an und sinkt zur Nacht hin wieder ganz leicht auf 0,234 μ M ab. Auch der Tageszyklus der Konzentration von PheoA (hell-grün) ist dem, der Kontroll-Kultur sehr ähnlich. Vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) liegt die Konzentration bei 0,046 μ M. Bis zum Morgen sinkt sie relativ stark auf 0,021 μ M-, und bis zum Mittag („Noon“) nur leicht weiter auf 0,020 μ M ab. Darauf steigt die Konzentration bis zum Abend wieder auf 0,027 μ M an und sinkt anschließend zur Nacht hin wieder auf Werte um 0,023 μ M ab. Die Keto-Karotinoide (orange) sind allgemein auch bei der Starklicht-gestressten Kultur in sehr geringer Konzentration vertreten. Von „Dawn“ bis „Night“ sind die Werte 0,013; 0,023; 0,013; 0,017 und 0,005 μ M. Die Entwicklung der Konzentration von *trans*-Myxoxanthophyll (Wein-rot) über den Tag („Dawn“ bis „Night“) zeigt folgende Werte: 0,006; 0,020; 0,003; 0,004 und 0,007 μ M. Die Pigmentgruppe der β -Karotin-Ähnlichen (rot) zeigt hier einen anderen Tageszyklus der Konzentration als die, der Kontroll-Kultur. Vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) beträgt die Konzentration 0,233 μ M. Anschließend sinkt sie aber relativ stark bis zum Morgen auf 0,158 μ M ab, steigt darauf wieder bis zum Mittag leicht auf 0,190 μ M-, und bis zum Abend erneut nochmal stärker auf 0,263 μ M an. Es folgt zur Nacht hin ein relativ leichter Anstieg der Konzentration auf 0,266 μ M. Andererseits haben die Steigungen der verschiedenen Messintervalle von *cis*-Zeaxanthin im Vergleich zur Kontroll-

Kultur entsprechend die gleichen Vorzeichen. Von 0,200 μM („Dawn“) steigt die Konzentration bis zum Morgen auf 0,233 μM an. Ein weiterer leichter Anstieg der Konzentration auf 0,241 μM erfolgt bis zum Mittag. Mit einem relativ starken Anstieg bis zum Abend erreicht sie ihr Tagesmaximum mit Werten um 0,304 μM . Zur Nacht hin sinkt die Konzentration wieder auf 0,277 μM ab.

Abb. 3.8.3

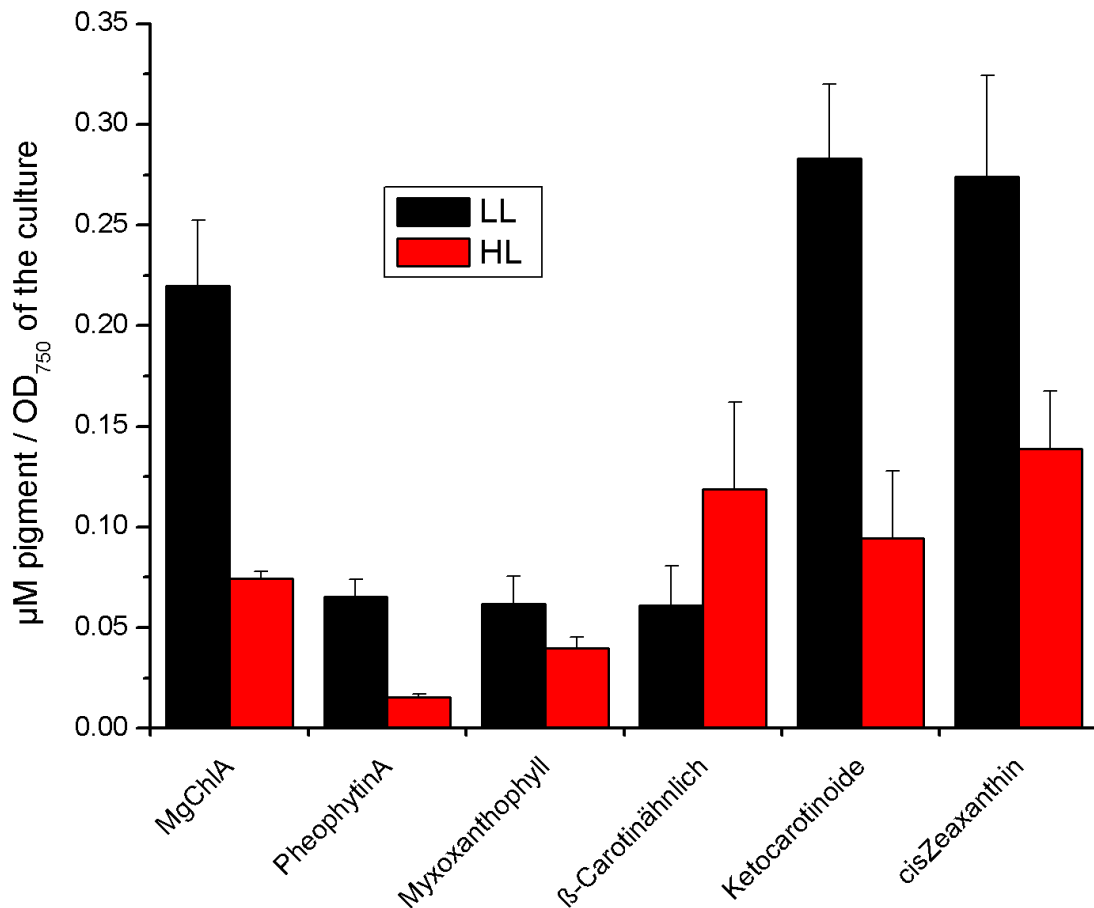


Abbildung 3.8.3: Vergleich der Konzentrationen verschiedener Aceton-löslicher Pigmentgruppen einer Starklicht-gestressten Kultur (in rot, „High Light“, $830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mit der entsprechenden Kontroll-Kultur mit normaler Kultivierungsbelichtung (in schwarz, „Low Light“, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Die Konzentrationen der Photopigmentgruppen der verschiedenen Tageszeiten („Dawn“ 8.00 Uhr, kurz vor dem Sonnenaufgang, „Morning“ 11.00 Uhr morgens, „Noon“ 14.00 Uhr mittags, „Evening“ 17.00 Uhr abends und „Night“ 21.00 Uhr nachts) wurden jeweils auf die OD_{750} der Kultur zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert der Pigmentkonzentrationen aller Messzeitpunkte errechnet um eine Tagesgesamtübersicht darzustellen.

Die Abb. 3.8.3 zeigt eine weitere Messreihe der Pigmentgruppenkonzentrationen, ähnlich der in Abb. 3.8.2. Hier wurden die Einzelwerte der verschiedenen Tageszeiten der beiden Kultivierungsvarianten jeweils gemittelt und miteinander verglichen.

Mg-ChlA ist in der Kontroll-Kultur („LL“) mit 0,220 μM fast dreimal so häufig vertreten als in der Starklicht-gestressten Kultur („HL“). Auch PheoA ist mit 0,066 μM in der Kontroll-

Kultur vielfach höher konzentriert als in der Starklicht-gestressten Variante. Im Fall von Myxoxanthophyll ist der Unterschied nicht ganz so groß. Die Konzentrationen sind 0,060 μM für die Kontroll-Kultur und 0,041 μM für die Starklicht-gestresste „HL“-Kultur. Die Gruppe der β -Karotin-ähnlichen Photopigmente zeigt dagegen eine entgegengesetzte Verteilung. Sie ist in der Kontroll-Kultur mit 0,062 μM nur ca. halb so häufig vertreten als in der Starklicht-gestressten Kultur mit 0,118 μM . Die Verteilung der Keto-Karotinoide („LL“: 0,287 μM / „HL“: 0,093 μM) ist aber wieder, mit ungefähr 3:1 die gleiche wie bei Mg-ChlA. Letztlich zeigt auch die Verteilung von *cis*-Zeaxanthin mit ca. 2:1 („LL“: 0,276 μM / „HL“: 0,140 μM) den allgemeinen Trend, dass wesentlich weniger Photopigmente trotz ähnlicher OD_{750} ($\sim 0,05$) in der Starklicht-gestressten Kultur vorhanden sind.

4. Diskussion

4.1. Tageszyklus der Stickstofffixierung Starklicht-gestresster Chemostat-Kulturen

Die in Abb. 3.5.1a) und 3.5.2a) gemessenen Tageszyklen der N-Fixierung von *Trichodesmium*-Kontroll-Kulturen mit normaler Kultivierungsbelichtung („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) weisen in nahezu allen Graphen (5 von 6) ähnliche Formen auf. Die gemittelte Messkurve der Kulturen folgt ungefähr dem sinusidalen Tageszyklus der Belichtungsintensität. Das heißt: Je mehr Licht, desto stärker läuft die N-Fixierung in den Kontroll-Kulturen ab. Folglich erreicht die Nitrogenase um die Mittagszeit, während der stärksten Kultivierungsbelichtung, ihre maximalen Umsatzraten. Nur ein Kontroll-Graph in Abb. 3.5.2a) erreicht schon zum Morgen hin den Maximalwert. Bis zum Mittag sinkt seine Nitrogenaseaktivität aber nur leicht ab, sodass man diese Messung als Messartefakt oder auch als Hinweis auf Photoinhibition interpretieren kann.

Jeweils unter b) sind die entsprechenden Starklicht-gestressten Kulturen gezeigt. Es fällt auf, dass die Umsatzrate der Nitrogenase in 3 bis 4 von 6 Messungen wieder leicht zum Mittag hin abnimmt, oder nur noch leicht ansteigt. Zum Abend hin werden die Umsatzraten nur wenig schwächer, was die Vermutung nahe legt, dass die Zellen durch das starke Kultivierungslicht zur Mittagszeit (Starklicht = $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) geschädigt sind (Photoinhibition), sodass letztlich weniger Energie bereit steht um N_2 -Fixierung zu betreiben. Allerdings scheinen 2 Zyklen in Abb. 3.5.2b) vom Starklicht unbeeinflusst zu sein, da sie ganz ähnliche Kurven aufweisen, wie die der Kontroll-Kultur. Diese Kurven könnten durch eine relativ hohe Dichte der Zellen, bzw. durch die resultierende, gegenseitig verstärkte Beschattung erklärt werden. Außerdem könnte die Dauer der Belichtung der Kultur hierbei eine Rolle spielen. Die Kultur unter Abb. 3.5.2b) gibt das Beispiel: Die Vorkulturen wurden unter Kontroll-Bedingungen ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) angezogen. Erst am ersten Messtag (HL1, 201107) wurde die Kultur dem Starklicht ausgesetzt. Sie ist also noch relativ unbeschädigt. Man erkennt im Vergleich zur Kontroll-Variante (LL1, 201107) des ersten Messtags, dass der gewöhnliche Anstieg der Umsatzrate vom Morgen zum Mittag hin nur noch sehr gering ist. Erst wenn das Licht zum Abend hin weniger stark ist verschwinden die Photoinhibitionseffekte und die N_2 -Fixierung steigt wieder an. Drei Tage darauf (HL, 231107) ist die Schädigung der Starklicht-gestressten Kultur weiter vorangeschritten. Die Umsatzrate der Nitrogenase sinkt hier erstmals vom Morgen mit absolut maximalem Wert, leicht bis zum Mittag hin ab. Es folgt hier kein

erneuter Anstieg der Umsatzrate zum Abend hin. Vielmehr sinkt sie weiter. Eine Woche nach Beginn der Messungen (HL2, 271107) ist die Schädigung der Starklicht-gestressten Kultur noch weiter fortgeschritten. Die Umsatzrate des Morgens ist leicht niedriger als die, 4 Tage zuvor. Auch das Absinken zum Mittag hin ist noch einmal verstärkt. Dieses vermutlich durch Starklichtschädigung hervorgerufene Phänomen ist auch am letzten Messtag der Kontroll-Kultur (LL, 271109) zu beobachten, sodass man auch eine Schädigung durch die doch relativ starke Kultivierungsbelichtung ($300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) als Ursache nicht ausschließen kann.

4.2. Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskopie

4.2.1. Grundfluoreszenz F_0 einzelner Batch-Zellen unter Fe-Mangel

Fe-Mangel ist der erste biotische Stressversuch dieser Arbeit gewesen. Zu dieser Zeit war die Kultivierung von *Trichodesmium* in Batch-Kulturen das Mittel der Wahl. Für die meisten späteren Experimente (Starklicht-Stress) wurde die Kultivierung als Chemostat-Kultur etabliert. Leider sind oft Batch-Kulturen unabhängig von der Stressart und ohne erkennbaren Grund relativ bald gestorben, sodass viele Experimente vorzeitig abgebrochen werden mussten. Da dies oft in Mitten der Messreihe passierte wurden in den ersten Experimenten viele unvollständige Messreihen erzielt, die aus Gründen der Vergleichbarkeit (unterschiedliche Umgebungsbestrahlung, Photoperiode, bzw. Raumtemperatur zu verschiedenen Jahreszeiten; verschiedene Stammkulturen bei der Vorkultivierung etc.) leider gänzlich verworfen werden mussten. In Abbildung 1.1.1 bis 1.1.4 ist eine der wenigen Fe-Mangel-gestressten Kulturen (sowie die entsprechende Kontrolle) dargestellt, die etwas länger komplett überlebt hat. Innerhalb einer Woche wurden „bildgebende“ Kinetiken dieser Zellen, an 3 Tagen zu jeweils 3 verschiedenen Mess-, bzw. Tageszeiten, gemessen. Die optischen Dichten (750 nm) dieser Messkulturen lagen stets im Bereich um 0,05, in dem sich *Trichodesmium* in der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Demnach müssten in den Kulturen laut der Theorie (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001; Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) um die Mittagszeit vermehrt Zellen mit erhöhter Grundfluoreszenz F_0 zu detektieren sein. Die ersten Versuche wurden noch mit verschiedenen Anregungslichtfarben (blau bzw. grün) gemessen. Grün regt eher den Absorptionsbereich der Phycobilline an. Mit blauem Anregungslicht kann direkt ChlA und ein kleiner kurzwelliger Teil der Phycobilisomen angeregt werden. Falls die Regulation der Photosynthese für die N_2 -Fixierung um die Mittagszeit durch Entkopplung der Phycolillisomenuntereinheiten vermittelt wird, oder falls einfach ein Stau im Energietransfer vor den Reaktionszentren stattfindet, wird die aufgenommene Lichtenergie vermehrt etwas langwelliger als Fluoreszenz emittiert. Diese Grundfluoreszenz F_0 von ChlA wurde von jeder getesteten Zelle einzeln gemessen und in den Abb. 1.1.1 bis 1.1.4 als Histogramm der verschiedenen Tageszeiten dargestellt.

Bei beiden getesteten Anregungslichtfarben liegt die Hauptgruppe der Zellen trotz der geringen Zellanzahlen immer in den F_0 -Intervallen um $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ist in manchen Abbildungen außerdem eine leichte Gruppenbildung feststellbar. Auffällig ist,

dass kaum Gruppen von „bright“-Zellen um die Mittagszeit detektiert werden konnten. Lediglich in der „lowFe“-Kultur, die mit grünem Messlicht bestrahlt wurde, ist eine leichte Gruppenbildung bei $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu erkennen. Diese muss noch nicht viel bedeuten, da die gemessene Zellanzahl statistisch gesehen kaum verlässliche Aussagen zulässt. Außerdem scheinen weitaus mehr „bright“-Zellen-, bzw. Zellen mit vielfach erhöhter Fluoreszenz ($> 150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) vorzukommen als „normale“ Zellen in der eigentlichen Hauptgruppe bei $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Besonders fällt dies, unabhängig von der Stressart, bei den Messzeitpunkten „Morgens“ und „Abends“ auf. Weiter auffällig ist, dass diese „bright“-Zell-Erscheinungen, und besonders die „very-bright“-Zellen („bright II“) in den gestressten Kulturen häufiger vertreten sind. Begleitend wurden die Filamente während der Messung mit dem Auge beobachtet. Gerade bei der, noch nicht optimierten Batch-Kultivierungsart war, neben dem frühzeitigem Absterben (3 Tage nach der Messung), von sich eigentlich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Kulturen, das Verkürzen der Filamente zu beobachten. Dies war hauptsächlich bei den gestressten Kulturen der Fall. Gleichzeitig waren in solchen Kulturen zu jeder Messzeit einzelne Zellen mit stufenlos erhöhten Fluoreszenzwerten zu erkennen. Zudem war das Phänomen zu beobachten, dass die emittierte Fluoreszenz einzelner-, bzw. auch oft mehrerer benachbarter Zellen eines Filaments, bis zu einem gewissen Vielfachen im Zeitraum von ~ 20 sec bis zu 2 min, relativ gleichmäßig anstieg. Dadurch kann die verblüffend hohe Anzahl der „bright“-Zellen am Morgen und am Abend erklärt werden. In sehr vielen Fällen sah man anschließend ein Aufplatzen dieser, in Agarose eingebetteten Zellen, sowie ein anschließendes Auslaufen des fluoreszierenden Zellmaterials. Die verbleibende Hülle zeigte nur noch sehr niedrige Fluoreszenzwerte, sodass auch die „low F_0 “-Zelle in Abb. 1.1.4c) erklärbar wird. Da dieses Phänomen auch bei den ersten Chemostat-Messreihen zu beobachten war, scheint das Verkürzen der Filamente durch Absterben einzelner Zellen, ein Anzeichen für das baldige Absterben der gesamten Kultur in dieser Kulturflasche zu sein. Da dies auch unabhängig von der Messlichtfarbe hauptsächlich um die Abendzeit stattfand, kann ein Grund für dieses Sterben die Dauerbestrahlung mit relativ hohen Lichtintensitäten über die Mittagszeit sein. Andere Veröffentlichungen ziehen auch eine Verbindung zu Starklicht-vermittelte, Apoptose-ähnliche Prozesse bei *Trichodesmium* in Betracht (Berman-Frank, Rosenberg *et al.* 2007). Die Veränderung der Emissionsstärke des Fluoreszenzlichts bei diesem Prozess verläuft zu systematisch, um diesen Zelltod eindeutig als nekrotisch einzuordnen. Es scheint vielmehr, dass Enzyme (ähnlich der Caspasen von Eukaryonten) die photoaktiven Proteinkomplexe, sowie sämtliche physiologische Strukturen

innerhalb der Zelle in ihre Untereinheiten aktiv aufspalten. Somit sollte man im Zusammenhang mit diesen letalen Effekten bei *Trichodesmium* besser von nekrotischer Apoptose sprechen.

Wenn man alle F_0 -Werte der verschiedenen Tageszeiten miteinander in einem Histogramm vereint, entsteht wie in Abb. 1.1.5 des Ergebnisteils eine Tagesgesamtübersicht. Im Fall der theoretischen Entkopplung der Untereinheiten der Phycobillisomen, die F_0 -Werte der Zellen charakteristisch ansteigen lassen soll, sodass sie sich als eigenständige abgrenzbare Gruppe darstellen, müssten sie in diesem kumulierten Übersichtshistogramm eigentlich besser zu sehen sein.

Für diese und alle weitere Ergebnisse wurde die Fluoreszenz mit blauem Anregungslicht gemessen. In beiden Kultivierungsarten (normaler Fe-Gehalt bzw. Fe-Mangelstress) beginnen die F_0 -Werte der einzelnen Zellen bei ca. $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Das Maximum der Hauptgruppe der Kontroll-Kultur (ohne Fe-Mangel) liegt bei ca. $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Allerdings ist dieses durch einen relativ tiefen Einschnitt gekennzeichnet. Inwieweit dieser Absturz der Zellanzahl pro F_0 -Intervall signifikant ist, lässt sich aufgrund der immer noch zu geringen Zellanzahl in den Messungen nicht bestimmen. Eine weitere, in der Theorie beschriebene, Gruppe von Zellen mit nochmals höheren F_0 -Werten ist nicht wirklich zu erkennen.

Das Maximum der Hauptgruppe der F_0 -Werte in der Fe-Mangel-gestressten Kultur liegt mit ca. $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ um $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ höher als das, der Kontroll-Kultur. Ein fast ebenso häufig vertretenes Maximum der Zellanzahl hat F_0 -Werte um ca. $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Weitere vereinzelte Zellen mit Werten bis über $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ liegen nur in der gestressten Kultur vor. Außerdem sind einige Zellen mit sehr niedrigen F_0 -Werten gemessen worden.

Der Graph wirft mehr Fragen auf als er ursprünglich beantworten sollte. Da die Kontroll-Kultur kaum klar voneinander abgetrennte Gruppen von Zellen mit ähnlichen F_0 -Werten aufweist und auch die theoretischen „very bright“- und „low F_0 “-Zellen nicht wirklich erkennbar sind, waren für die Darstellung der postulierten F_0 -Gruppen weitere Experimente mit noch größeren Messreihen über längere Zeiträume von Nöten. Die Fe-Mangel-gestresste Kultur zeigt allerdings wider erwartend diese theoretische Verteilung der F_0 -Werte (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004). Inwieweit dieses Ergebnis die augenscheinlichen Beobachtungen (Aufleuchten und anschließendes Platzen der Zellen) des vorherigen Abschnitts repräsentiert, bzw. durch diese beeinflusst ist, werde ich später diskutieren.

4.2.2. ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Chemostat-Zellen unter Fe-Mangel

Für diese und alle weiteren hier diskutierten Ergebnisse wurde die Fluoreszenz mit blauem Anregungslicht und 40-facher Vergrößerung gemessen. Die gemessenen Zellen wurden in Chemostaten kultiviert. Dadurch wurde die Lebenszeit der Kulturen deutlich verlängert und die Zellen stets in der exponentiellen-, also vitalen Wachstumsphase gehalten, was letztlich größere Messreihen möglich machte. Zur besseren Unterscheidung des Tageszyklus der F_0 -Werte erfolgten die Messungen zu 5 verschiedenen Tageszeiten. Der erste Messzeitpunkt war kurz vor dem Anschalten des Lichts. Der nächste Messpunkt war am Morgen, wenn die Photosynthese hochfährt. Der Dritte ist am Mittag, wenn die Belichtungsstärke ihr Maximum hat. Der Abend, wenn es wieder dunkler wird, und die Nacht, wenn das Licht bereits eine halbe Stunde aus ist, waren die letzten beiden Messzeitpunkte.

Der Ergebnisteil zeigt in den Abbildungen 1.2.1, bzw. 1.2.2 nur die Tagesübersichten aller Messzeitpunkte, da die Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte einzeln, erneut kaum verlässliche Aussagen über etwaige Gruppenbildung der F_0 -Werte zuließen. Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen sind die allgemein höheren F_0 -Werte auf den Einsatz des 40x-Objektivs zurückzuführen. Es erhöht zusätzlich noch die Schärfe auf den Kinetikbildern, was zu einer höheren Genauigkeit der F_0 -Werte der ausgewählten Zellen führt.

Die Zellen für Abbildung 1.2.1 wurden direkt nach der Ernte aus der Kultur in die Messkammer eingebettet und anschließend gemessen. Die Kontroll-Kultur weist ca. 3 bis 4 Gruppen von Zellen (siehe Ergebnisteil) auf. Wenn man entsprechend der Theorie den 4 Gruppen der F_0 -Werte einen bestimmten Aktivitätszustand zuweisen müsste, haben die „low F_0 “-Zellen Werte zwischen 100 und 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Danach erstreckt sich, mit F_0 -Werten bis ca. 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, die Gruppe der „normalen“ Zellen. Zahlenmäßig überwiegt allerdings die nächst höher fluoreszierende Gruppe Zellen. Sie müsste eigentlich die „bright I“-Zellen repräsentieren, jedoch steht ihr vorausgesagtes Auftreten, hauptsächlich um die Mittagszeit, im Gegensatz zur sehr hohen Anzahl Zellen dieses Aktivitätszustands in dieser Tagesübersicht. Mit Werten ab 1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ist auch die sehr kleine Gruppe der „bright II“-Zellen erkennbar.

Die Fe-Mangel-gestresste Kultur zeigt die Gruppenbildung der Kontrolle weniger deutlich. Eigentlich ist auf den ersten Blick nur eine Hauptgruppe erkennbar. Ihr Maximum liegt im Bereich der „normalen“ Zellen. Es scheint als ob große Teile der „low F_0 “- und der „bright I“-

Zellen der Kontrolle, bei der Fe-Mangel-Variante, in den „normalen“ Aktivitätszustand übergegangen zu sein. Diese Vermutung wird auch durch die höheren, absoluten Zellanzahlen pro F_0 -Intervall dieser Gruppe unterstrichen. Leichte Rudimente der „low F_0 “- sowie der „bright I“-Gruppe sind in der gestressten Kultur dennoch erkennbar. Die Gruppe der „bright II“-Zellen ist zahlenmäßig sichtlich angestiegen. Die Werte erstrecken sich hier sogar bis zu $2.400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, was einem Vielfachen des „normalen“ F_0 -Werts einer *Trichodesmium*-Zelle entspricht. Es wurden außerdem wieder einige sehr schwach fluoreszierende Zellen detektiert.

Wenn man die augenscheinlichen Beobachtungen über das spontane Aufleuchten des Fluoreszenzlichts mit anschließendem Sterben, bzw. Auslaufen der Zellen und die damit verbundene Degradation der Zellhülle, mit dem daraus resultierenden Verkürzen der Filamente heranzieht, kann das Ergebnis gut interpretiert werden. Durch den starken Fe-Mangel könnte zum Erhalt der Gesamtkultur ein Notprogramm in *Trichodesmium* ausgeführt werden. Der Stress könnte dabei das „apoptotische“ Sterben mancher Zellen triggern, was unter dem Mikroskop auch nach kurzer Zeit zu beobachten war. Dass dies nicht unbedingt erst durch die relativ rüde Behandlung der Zellen beim Einbetten in die Messkammer verursacht wurde, beweisen die vielen kurzen Filamente in den Chemostaten solcher Kulturen. Da in der Fe-Mangel-Kultur der Stress höher als in der Kontrolle ist, sterben also mehr Zellen „apoptotisch“, d.h. sie gehen relativ spontan aus den „normalen“ Zustand in den „bright“-Zustand über. Dies war bei einzelnen Zellen-, aber auch über dem gesamten Filament möglich. Oftmals haben die Zellen darauf innerhalb kurzer Zeit stark aufgeleuchtet, sind anschließend aufgeplatzt und ausgelaufen. Die Gruppe der „bright II“-Zellen könnte folglich jene Zellen beinhalten, die kurz vor dem Platzen stehen. Die Mehrheit dieser „bright“-Zellen jedoch „brannten langsam innerlich aus“, verblieben also längere Zeit (bis zu über 1 Stunde) in diesem Zustand. Diese Zellen könnten in die Gruppe der „bright I“-Zellen fallen. In jedem beobachteten Fall allerdings, sind diese Zellen irgendwann degradiert zerfallen oder die Zellhülle verblieb, wenig fluoreszierend im Filament. Die „low F_0 “-Zellen könnten demnach diese ausgelaufenen und „ausgebrannten“ Zellhüllen vertreten.

Nach dem Einbetten der Zellen in die Messkammer wurden stets willkürlich Zellen zur Messung ausgesucht. Es wurden nie besonders auffällige Zellen zur Messung bevorzugt, sondern ein guter Schnitt aller vital aussehenden Zellen, durchschnittlicher Filamente herangezogen. Die Messung wurde erst nach einer 5-minütigen Dunkeladaption ausgeführt, in der die Zelle genug Zeit hat das theoretisch „apoptotische“ Sterben durchzuführen.

Die Zeiträume der visuell beobachteten Ereignisse (Normalzustand, Ausbrennen, Aufleuchten, leere Hülle) entsprechen in ihrer relativen Häufigkeit erstaunlich gut den gemessenen F_0 -Gruppen der Fe-Mangel-Kultur in Abb. 1.2.1b). Die Kontroll-Kultur unter a) ohne Stress entspricht dieser Theorie allerdings weniger. Hier sind ebenso „bright II“-Zellen gemessen worden. Die Kontrolle scheint demnach ebenso Stress ausgesetzt zu sein, der das „apoptotische“ Sterben zu verursachen vermag. Außergewöhnlich stark ist die Gruppe der „bright I“-Zellen vertreten. Es scheint, dass die Zellen der Kontroll-Kultur, die in den „bright I“-Zustand übergegangen sind, länger in diesem zu verharren und langsam „auszubrennen“ als die „bright I“-Zellen, der gestressten Kultur. In diesem Fall verblieb die Zellhülle oft schwach fluoreszierend im Filament integriert vorhanden. Die sehr große Gruppe der „low F_0 -Zellen“ in der Kontroll-Kultur bestätigt diese visuellen Eindrücke.

Im Zuge weiterer, nicht fortgesetzter Fluoreszenz-Experimente wurde ein Teil, der zu messenden Proben nach der Ernte in einem Eppendorfgeläß, rotierend für eine Stunde bei ca. $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (nur bei den Morgen-, Mittag-, und Abend-Proben, sonst dunkel) und 23°C inkubiert. Anschließend wurden wie gewöhnlich die F_0 -Werte dieser Zellen gemessen. Die entsprechenden Tagesübersichts-Histogramme sind in Abb. 1.2.2 dargestellt. Da das angeschaltete Licht während den Vorinkubationen der Zellen ausreichend stark ist um Photosynthese theoretisch betreiben zu können, sollten hier auch Zellen die verschiedenen postulierten Aktivitätszustände aufweisen. Es sollten sich also Gruppen in den F_0 -Werten dieser Zellen abzeichnen. Allerdings bestätigt sich diese Vermutung nicht. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die zahlenmäßig kleine Gruppe der „bright II“-Zellen in beiden Kultivierungsarten („normal Fe“: Abb. 1.2.1a) bzw. „lowFe“: Abb. 1.2.1b) nach dieser Vorinkubation völlig verschwunden ist. Da aus den vorherigen Ergebnissen erkenntlich wurde, dass abiotischer Stress (Fe-Mangel) den beobachteten apoptotischen Tod („bright II“-Zellgruppe) triggert, und da die Kontroll-Kultur (nach direkter FKM-Messung ohne Vorinkubation, Abb. 1.2.1a)) einige „bright II“-Zellen aufweist, kann man schlussfolgern, dass diese Vorinkubation den Stressdruck auf die Kultur deutlich senkt.

Da bei beiden Behandlungsarten (direktes Einbetten / Vorinkubation der Zellen) stets der physiologisch verträgliche Temperaturbereich gegeben war, bleibt eigentlich nur die Lichtintensität als weiterer möglicher Stressfaktor übrig, der zum „apoptotischen“ Sterben, also zu „bright II“-Zellen führt. Die Arbeit von (Fu and Bell 2003) behauptet, dass die optimale Lichtintensität zur Kultivierung von *Trichodesmium* bei $45 - 75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ („LL“) liegt. Bei höheren Intensitäten nahm die Wachstumsrate wieder deutlich ab (Fu-„HL“-

Bedingungen: $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Bei Experimenten von Kranz wurde der Einfluss von CO_2 und Licht (quantitativ) auf das Wachstum (N-, C-Gehalt der Zellen) in *Trichodesmium* untersucht (Kranz, Levitan *et al.*). Dafür wurden die Kulturen mit zwei Lichtstärken (50 bzw. $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) kultiviert und deren Antwort gemessen. Bei $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ war das Wachstum am höchsten. Die Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks allerdings führte nur unter den Niedriglichtbedingungen ($50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) zur höchsten N- bzw. C-Produktion. Die Kultivierungsbelichtung unserer Kontroll-Kulturen lag mit ca. $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ deutlich darüber. Eventuell ist dies der Grund für das häufige, doch recht unerklärbar frühe Absterben von eigentlich, sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindender, vitaler Kulturen. Allerdings wurde bei Fu (Fu and Bell 2003) das Kultivierungslicht abrupt angeschaltet, was nicht der natürlichen Situation bzw. unserem Experiment entspricht. Unsere maximalen Belichtungsintensitäten (am Mittag) zur Kultivierung („HL/LL“) wurden aufgrund der Tatsache gewählt, dass *Trichodesmium* in der Blüte als „Teppich“ an der Wasseroberfläche schwimmt und somit auch der, in tropischen Meeren noch höheren Lichtintensität ($> 830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ausgesetzt ist. In wie fern jene „Blüte“-Zellen nach dem Zerfall des „Teppichs“ überleben und wieder in den nicht-kolonialen, normalen Zustandstyp (freitreibende Filamente) übergehen, oder wie groß das Ausmaß der gegenseitigen Beschattung der Filamente ist, ist nicht bekannt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass unsere „LL“-Intensität der Kontrollen zu hoch gewählt wurde und bereits dem natürlichen „HL“-Stress entspricht.

Vergleicht man die Kontrollen miteinander fällt auf, dass die Hauptgruppe der direkt gemessenen Kontroll-Kultur im gleichen Bereich wie die, der vorinkubierten Kontroll-Kultur liegt. Die vormalig als „bright I“ bezeichneten Zellen scheinen also eher die „normalen“ zu sein. Dafür spricht auch die fehlende Gruppe der „low F_0 “-Zellen, sowie die sehr stark reduzierte Anzahl Zellen im F_0 -Bereich der, vormalig als „normal“ bezeichneten Zellgruppe.

Wenn man die Verteilung der F_0 -Werte der gestressten Kulturen (Abb. 1.2.1.b) bzw. 1.2.2.b)) vergleicht, fällt in beiden Fällen die Normalverteilung der dominierenden Hauptgruppe auf. Außerdem haben die meisten Zellen dieser Hauptgruppen F_0 -Werte unter $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, liegen also im Bereich der vormalig als „normal“ bezeichneten Zellen, während die Hauptgruppen der beiden Kontroll-Kulturvarianten am häufigsten F_0 -Werte über $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aufweisen.

Allgemein scheint der mögliche F_0 -Bereich der groben Gauss-Verteilung (Glockenkurve) der Hauptgruppe, sowie dessen absolutes Maximum um ca. $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, schwächer zu

fluoreszieren als bei den Kontroll-Zellen der Fe-Mangel-Messreihe. Bildlich gesehen ist der Kontroll-Graph („die Glocke“) im Vergleich zur Fe-Mangel-Kultur nach links (in Richtung schwächerer F_0 -Werte verschoben.

4.2.3. Fluoreszenzkinetikparameter einzelner Zellen unter Starklichtstress

4.2.3.1. *Trichodesmium* als Batch-Kultur herangewachsen

In der Abbildung 2.1.1 (im Ergebnisteil) sind die Tagesübersichten der Verteilung der F_0 -Werte von *Trichodesmium* gezeigt, welches durch Batch-Kultivierung angezogen wurde. Um die Gruppenbildung noch deutlicher darzustellen, wurden die Histogramme der einzelnen Tageszeiten aufaddiert, sodass eine Gesamtübersicht der Messtage entstand (Abb. 2.1.2). Wie im gesamten Abschnitt über Starklicht-Stress, wurde auch hier die Fluoreszenz von *Trichodesmium* mit 40-facher Vergrößerung gemessen.

Unter Abb. 2.1.2a) (1.1.5a)) ist die Kontrolle-, und unter b) die gestresste Kultur dargestellt. Die Kontrolle, sowie die Starklicht-gestresste Kultur zeigt eine sehr ähnliche Verteilung der F_0 -Werte. Durch die relativ hohe Anzahl der gemessenen Zellen zeichnet sich bei beiden Kulturen eine Gruppenbildung, mit ähnlichen absoluten Zellanzahlen in den entsprechenden Maxima, bzw. stark überlappenden F_0 -Bereichen ab. Zwischen $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ und etwas über $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint die erste Gruppe Zellen zu liegen. Die meisten Zellen in diesem F_0 -Bereich zeigen Werte um $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. In der Kontrolle sind das 19 (11%)-, und in der Starklicht-gestressten Kultur 30 Zellen (14%). Die Prozentangaben in den Klammern stellen das Verhältnis der Zellanzahl der häufigsten F_0 -Werte einer Gruppe (Zellanzahl im F_0 -Intervall des Peaks), zur entsprechenden Zellanzahl der jeweils häufigsten F_0 -Werte (in den Peakintervallen) aller sich abzeichnenden Gruppen der Population zusammen (Zellanzahlen der F_0 -Gruppen der verschiedenen Peakintervalle aufaddiert) dar. Diese Zellen scheinen also die angesprochenen „low F_0 “-Zellen (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) zu sein. Eine weitere Gruppe Zellen erstreckt sich jeweils in beiden Kulturen von ca. 100 bis $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im Maximum der Gruppe bei $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hat die Kontrolle 62 Zellen (37%) und die gestresste Kultur 72 (33%). Diese zahlenmäßig absolut dominierende Gruppe beinhaltet wahrscheinlich die Zellen im sogenannten „normalen“ Aktivitätszustand (mit gekoppelten Phycobilisomenuntereinheiten; (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004)), da N-Fixierung im Gegensatz zur normalen Photosynthese nicht der dominierende Prozess innerhalb des

gesamten, gemessenen Tagesabschnitts ist. Die nächst höher fluoreszierende Gruppe Zellen (vermutlich „bright I“- Zellen während der N-Fixierung (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004)) erstreckt sich von ca. 150 bis 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Sie scheint allerdings bei beiden Kultivierungsarten jeweils erneut in zwei Untergruppen, deren Peaks bei 160 bzw. 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ liegen, geteilt zu sein. Die Untergruppe mit F_0 -Werten um 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ im Peakintervall ist mit 44 Zellen (26%) bei der Kontroll-Kultur, bei mit 47 Zellen (22%) bei der Starklicht-gestressten Kultur vertreten. Die zweite Untergruppe Zellen, mit F_0 -Werten um 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ im Peak weist 32 Zellen (19%) bei der Kontroll-Kultur, bzw. 39 Zellen (18%) bei der Starklicht-gestressten Kultur auf. Eine weitere, zahlenmäßig wieder kleinere Gruppe Zellen zeichnet sich in beiden Kulturen im F_0 -Bereich von ca. 200 bis 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ab. Das Maximum der Zellanzahl, bei ungefähr 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, beträgt in der Kontroll-Kultur 32 (6%), bzw. 27 Zellen (13%) in der Starklicht-gestressten Kultur. Diese letzten, sich klar als Gruppe abgrenzenden Zellen müssten demnach, die in der Theorie aufgestellten „bright II“- Zellen sein. In der Kontrolle sind nur ca. 9 Zellen mit höheren F_0 -Werten als 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (bis max. 530 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) zu erkennen. In der gestressten Kultur sind es über 20 Zellen mit F_0 -Werten bis über 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Wenn man die Zellhäufigkeiten der verschiedenen Gruppen beider Kultivierungsarten betrachtet, kann man sagen, dass die Starklicht-gestresste Kultur ca. 3% mehr „low F_0 “- und 7% mehr „bright II“-Zellen besitzt. Dafür ist die Anzahl der „normalen“ Zellen um 4% im Vergleich zur Kontrolle kleiner. Auch die „bright I“-Zellen werden unter Starklichtstress weniger häufig. Der erste Peak (bei 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ist um 4%, und der Zweite (bei 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) um 1% im Vergleich zur Kontrolle gesunken.

Das gewonnene Bild entspricht sehr den vorherigen Ergebnissen. Stressinduzierung durch Starklicht (830 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), oder auch wie bei den älteren Ergebnissen durch Fe-Mangel, vermittelt ein vermehrtes Absterben der Zellen, im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Absterben scheint eine Art „apoptotische“ Stressantwort zu sein. Sehr viele Zellen fluoreszieren innerhalb von Minuten sukzessive immer stärker bis auch über 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ auf, platzen darauf und laufen aus, bis eine niedrig fluoreszierende Hülle überbleibt, die meist bald darauf zerfällt. Das Platzen von Zellen ist in der Literatur als ein Merkmal von nekrotischem Sterben bei eukaryotischen Zellen beschrieben (Berman-Frank, Rosenberg *et al.* 2007). Neuere Essays belegen allerdings, dass die Ereignisse von Apoptose bzw. Nekrose durchaus gleichzeitig ablaufen können. Man spricht dann von nekrotischer Apoptose. Die verhältnismäßig vielen Zellen in der Starklicht-gestressten Kultur mit F_0 -Werten über 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, unterstützten diese visuellen Eindrücke.

Oftmals wurden auch Zellen beobachtet, die mit ca. doppelter Fluoreszenz langsam, innerhalb von bis zu 30 min „ausbrannten“, und anschließend degradierten oder ausliefen. Diese Eindrücke passen gut zur Gruppe der „bright II“-Zellen im Bereich von 200 bis 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, da dieses Sterben in der gestressten Kultur (13%), zwar vermindert aber dennoch auch in der Kontrolle (mit 6%) zu beobachteten war. Die „normalen“ Zellen, sowie die „bright I“-Gruppe sind dementsprechend in ihrer prozentualen Häufigkeit vermindert.

In wieweit diese 3 Gruppen zur Regulierung der Photosynthese für die N-Fixierung physiologisch beitragen, kann aus den Histogrammen der verschiedenen Probenahmezeitpunkte (Abb. 2.1.1) erschlossen werden. Kurz nach dem Anschalten des Lichts liegen alle F_0 -Werte der Kontrolle (unter a); „LL“; „dawn“) zwischen 100 bis 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Der Einschnitt in der Zellhäufigkeit bei ca. 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ scheint die weniger fluoreszierende Hauptgruppe, der „normalen“ Zellen von der, ungefähr 2/3 kleineren Gruppe mit höherer Fluoreszenz („bright I“; ab 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) abzutrennen. Sehr ähnlich ist die Verteilung der F_0 -Werte am Morgen. Allerdings ist der Einschnitt zwischen den zwei Hauptgruppen weniger ausgeprägt sichtbar. Die „bright I“-Untergruppe mit dem Zellmaximum um 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ wird erkennbar. Zusätzlich sind ein paar Zellen mit Werten von 200 bis 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dazugekommen („bright II“). Am Mittag, wenn das Licht am stärksten ist, zeigt das entsprechende Histogramm wieder ein ähnliches Muster wie am Morgen. Die große Hauptgruppe (ca. 2/3 aller Zellen; „normale“) ist deutlich bei ca. 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ von der stärker fluoreszierenden kleineren Gruppe (bis ca. 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; „bright I“) abgetrennt. Im Vergleich zum Morgen ist die Anzahl der Zellen mit noch höherer Fluoreszenz als 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ („bright II“) leicht gesunken. Außerdem sind einige Zelle mit F_0 -Werten < 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ hinzugekommen („low F_0 “). Zum Abend hin zeigt sich eine andere Verteilung der F_0 -Werte. Die Zahl der „low F_0 “-Zellen steigt nochmals an. Der relative Anteil der „bright I“-, wie auch der, der „bright II“-Zellen scheint dagegen abzusinken. Die meisten „normalen“ Zellen sind in „low F_0 “- und hauptsächlich in „bright I“-Zellen übergegangen. Auch „bright II“-Zellen mit F_0 -Werten über 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ wurden wieder öfter detektiert. Kurz nach dem Ausschalten des Lichts lassen sich keine „low F_0 “-Zellen mehr finden. Die „bright I“-Gruppe dominiert zu dieser Tageszeit fast ausschließlich. Die wenigen verbliebenen „normalen“ Zellen sind nur noch schwach erkennbar. Doch die Gruppe der „bright II“-Zellen scheint mit wachsenden Zellzahlen wieder zu erstarken.

Die Starklicht-gestressten Zellen (Abb. 2.1.1b) dagegen, zeigen schon vor dem Anschalten des Lichts eine sehr starke Verschiebung zu hohen F_0 -Werten. Im Gegensatz zur Kontrolle

befindet sich hier bereits die Mehrheit der Zellen im „bright I“-, bzw. II“- Stadium. Sie bilden jeweils ihren Maximal-Wert beim 2. Hauptpeak ($190 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) der, in dieser Arbeit neu definierten „bright I“-Zellen, sowie bei $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, der Mitte des „bright II“-Bereichs aus. Außerdem weisen die relativ vielen Zellen mit F_0 - Werten über $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (bis $650 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 16 Zellen), sowie eine klar abgegrenzte kleine Gruppe „low F_0 “-Zellen auf hohen Stress hin. Da sich aber die, vor der F_0 -Messung ausgewählten Filamente in den physiologisch aktiven Stadien befanden (F_0 -Werte von „90 bis $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ “), müssten also Zellen während der Dunkeladaption vor der Messung (5 min) in die F_0 -Zustände über 300 -, bzw. unter $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ übergegangen sein. Der Grund für diese, sehr häufig auftretende Aktivitätszustandsänderung kann kaum die Sauerstoffreduktion für die N-Fixierung in den Zellen sein. Vielmehr scheinen die Zellen durch die hohe Belastung durch das Starklicht ($830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ständig am Existenzminimum zu leben. Sobald *Trichodesmium* dann noch zusätzlich gestresst wird (Einbetten in die Messkammer mit etwas wärmerer Agarose; schlagartiges dem normalen Tageslicht Aussetzen am Morgen des Messtages), scheint es durch die oben besprochenen Wege „apoptotisch“ zu sterben. Da beide Messkulturen („LL; HL“) aus der gleichen Stammkultur, unter Batch-Kultivierungsbedingungen (ohne Mediumwechsel) heranwuchsen und nach der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{750} : über 0,25) noch viele Tage ohne Krankheitsanzeichen in der stationären Phase überlebten (sogenannte „good“-Kulturen), kann auch ein rein nekrotisches Sterben der Kultur, durch Vergiftung mit Zellabbauprodukten, oder Kontamination mit anderen Organismen ausgeschlossen werden.

Zum Morgen hin, wenn die Zellen den Schock, des schnellen Ansteigens der Lichtstärke registriert haben, verändert sich das Bild nur wenig. Im Gegensatz zur Kontrolle sind hier wieder hauptsächlich „bright“-Zellen (150 bis $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) detektiert worden. Die Häufigkeit der „normalen“ Zellen zum Zeitpunkt „dawn“ im Vergleich zur Kontrolle ist relativ leicht angewachsen. Die Mehrheit der „bright“-Zellen allerdings konzentriert sich nun in den 2 Untergruppenpeaks der „bright I“-, Variante (bei 160 , bzw. $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Diese kleine Erholung kann damit zusammenhängen, dass die Zellen vor dem Messzeitpunkt „dawn“, die schon maximal gestresst und kurz vor dem Sterben waren, beim kleinsten Mehrstress, wie z.B. durch das Anschalten des Lichts, „aussortiert“ worden sind. Die Verbleibenden können also fit genug sein um den ersten Lichtstress zu überleben. Einzelne, aufleuchtende Zellen mit finalen F_0 -Werten bis über $900 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ wurden außerdem detektiert. Diese Ereignisse gingen mit den vorher beschriebenen, Stress-induzierten

„apoptotischen“ Sterben der Zellen einher. Solche, mit F_0 -Werten über $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sind in den „noon“-Messungen am Mittag nicht mehr zu finden. Die ganze Verteilung hat sich geschärft. Die „normalen“ Zellen scheinen ebenso häufig wie die „bright I“-Zellen (hauptsächlich um den 1. Hauptpeak bei $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) vorzuliegen. Nur halb so viele Zellen dagegen liegen im Aktivitätszustand „bright II“ vor. Noch weniger Zellen befinden sich im „low F_0 “-Zustand. Letztere Gruppe wird im Vergleich zum Mittag leicht kleiner. Allgemein scheinen die „bright“ Zellen bei dieser stark ansteigenden Belichtung in die Richtung der „normalen“ Zellen zu tendieren.

Dieser Trend ändert sich zum Abend hin in die andere Richtung. Die „bright I“-Zellen des Mittags scheinen wieder zu höheren F_0 -Werten (Peak bei $190 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) zu streben. Außerdem tauchen mehr „bright II“-Zustände, und noch stärker fluoreszierende Zellen auf.

Diese Tendenz verstärkt sich weiter bis zum Zeitpunkt „night“. Auch die „low F_0 “-Gruppe steigt wieder leicht zahlenmäßig an. Die dominierende Gruppe scheint jetzt die, der „normalen“ Zellen zu sein. Die Entscheidung allerdings fällt schwer, da die „bright I“-Zellen sich im Peak bei $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ konzentrieren und in die „normale“ Gruppe übergehen. Der Anstieg der Stressindikatoren („low F_0 “- bzw. „bright II“-Zellen) ist dadurch zu erklären, dass die Zellen, die den Lichtstress des Tages überlebt hatten, erneut durch den zusätzlichen Stress direkt vor der Messung (Ernte; Einbetten) „apoptotisch“ starben. In der entsprechenden Kontrolle sind diese Stressantworten nicht zu beobachten - der Zusatzstress der Präparation reicht in diesem Fall also nicht aus, um die „apoptotische“ Stressreaktion zu induzieren.

In keiner Messkultur („LL“ bzw. „HL“) dieser Versuchsreihe konnten Gruppen von Zellen oder deren F_0 -Verschiebungen detektiert werden, die sich speziell um die Mittagszeit hervortaten und damit im Verdacht stehen, die theoretische Regulierung der Photosynthese für die N-Fixierung zu vermitteln. Auffällig ist allerdings, dass die F_0 -Werte beider Kulturen stets um die Mittagszeit relativ scharf, bzw. einheitlich verteilt sind (gut erkennbare Kammlinie des Histogramms). Die Werte der anderen Messzeitpunkte dagegen sind diffuser gruppiert (benachbarte F_0 -Intervalle mit stark variierenden Zellanzahlen), und machen eine Erkennung der diversen Aktivitätszustände nicht immer leicht.

Die gemessenen Zellen in den Abbildungen 2.1.1 bzw. 2.1.2. wurden mit dem Prädikat „good“ (gut) bezeichnet, da bei vorangegangenen Experimenten, aufgrund des häufigen Absterbens der Kulturen (meist „HL“; trübe Kultur; stagnierende bis sinkende OD_{750} -Werte; kurze Filamente), Messreihen vorzeitig abgebrochen werden mussten, sodass der Verdacht

aufkam, dass kontaminierte Kulturen die Messwerte in der Übersicht verfälschen, bzw. die Effekte der N-Fixierung überdecken könnten. Wenn eine solche Kultur Tage nach der Messung auffällig schnell abstarb ohne eine OD_{750} von 0,3 zu erreichen, oder irgendwie kränklich aussah, wurden die, aus ihr gewonnenen Messergebnisse als „bad“ bezeichnet. Eine solche Tagesgesamtübersicht der F_0 -Werte („bad“) ist in Abbildung 2.1.3 dargestellt.

Unter Abb.2.1.3a) sind nur „bad“-Kontroll-Kulturen gezeigt. Im Vergleich zu den F_0 -Werten der „good“-Kontroll-Kulturen aus Abb. 2.1.2a) fällt die scharfe Gruppierung der Werte auf. Außerdem liegen hier ca. viermal so viele „low F_0 “-Zellen vor. Die beinahe dominierende Gruppe der „normalen“ Zellen (von ca. 90 bis 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in den „good“-Kulturen ist dagegen auf einen relativ kleinen Rest weniger Zellen, zur kleinsten Gruppe zusammengeschrumpft. Dagegen ist die Gruppe der „bright I“-Zellen (hauptsächlich im Peak bei 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) zahlenmäßig außergewöhnlich stark angestiegen. Ebenso wie in den „good“-Kulturen dominiert bei der „bad“-Variante dieser Gruppe, die Untergruppe um den Peak bei 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Im ungefähr gleichen Verhältnis liegen die „bright II“-Zellen vor. Die erwartete Expansion der F_0 -Werte in den „bright II“-Bereich ist nicht zu erkennen. Vielmehr decken sie sich ziemlich genau mit dem Wertebereich der „good“-Zellen.

Die Starklicht-gestressten „bad“-Kulturen (Abb.2.1.3.b)) zeigen im Vergleich zu den entsprechenden „good“-Kulturen (Abb. 2.1.2b)) eine auffällig diffuse Verteilung der F_0 -Werte. Allgemein könnte man hieraus schlussfolgern, dass Messwerte vitaler Kulturen ein einheitlicheres Gesamtbild, ohne starke statistische Ausreißer (wenig variierende Zellanzahlen benachbarter F_0 -Intervalle) im Histogramm darstellen. Die Gruppierung der F_0 -Werte in die verschiedenen Aktivitätszustände ist bei den sterbenden oder kränkelnden Kulturen („bad“) dagegen deutlicher zu sehen. Die verschiedenen F_0 -Gruppen der „good“-Zellen scheinen auch breitere Bereiche der Fluoreszenzintensität einzunehmen. Im Ergebnis überlappen sich diese mehr und gehen in einander über.

Im Gegensatz zur „bad“-Kontrolle (Abb. 2.1.3.a)) sind überraschenderweise die Gruppen der „low F_0 “- und die der „normalen“ Zellen in den entsprechenden Stress-Kulturen (Abb. 2.1.3b)) wieder angestiegen (ca. dreimal so häufig). Dieses Ergebnis erstaunt, da durch den Zusatzstress an Starklicht noch mehr „bright II“-Zellen zu sehen sein sollten. Da aber die Einteilung der Batch-Kulturen in „good“ und „bad“ erst Tage nach der Messung stattfand, sind vermutlich die Starklicht-gestressten Kulturen („HL“), die bis zur Messung überlebt hatten, im allgemeinen vitaler, als die entsprechenden, für vital befundenen, und gemessenen Niedriglicht-Kulturen (Kontrollen), die diesem Zusatzstress niemals ausgesetzt waren.

Folglich sind die gemessenen Starklicht-gestressten Kulturen vitaler, oder bzw. besser an Starklicht adaptiert, und zeigen somit, ebenso wie die entsprechenden „good“-Kulturen mit Kontroll-Kultivierung („LL“), auch mehr „normale“-Zellen. Andersherum gesagt, scheint es also auch *Trichodesmium*-Kulturen zu geben, die allein durch das Aufleuchten des Kontroll-Kultivierungslichts nach der Nacht soweit gestresst sind, dass faktisch so gut wie keine sogenannten „normalen“ Zellen mehr messbar sind. Dies weist auf eine sehr hohe Sensibilität von *Trichodesmium*, in Bezug auf die Lichtintensität hin.

Ein weiterer Beweis dafür ist die Expansion der F_0 -Werte (Abb. 2.1.3b); „HL“; bad) über den „bright II“-Bereich hinaus bis $440 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. In der „bad“-Kontrolle (Abb. 2.1.3a)) erstrecken sich die F_0 -Werte dagegen nur bis $330 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Gruppe der „bright II“-Zellen zeigt allerdings in beiden Kultivierungsvarianten („HL“ und „LL“) ein ähnliches Größenverhältnis und ist zahlenmäßig eher klein ausgeprägt.

4.2.3.2. *Trichodesmium* als Chemostat-Kultur herangewachsen

Die Kultivierung von *Trichodesmium* in Chemostaten wurde nötig, um die Verfälschung der Ergebnisse durch sterbende Zellen zu minimieren. Diese Kultivierungsart verbesserte allgemein die Vitalität der Zellen, sodass einzelne Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bis zu 4 Wochen und länger überlebten. Dementsprechend wurden bis zu 6 Messungen (bzw. Messtage) an der gestressten Kultur und ihrer entsprechenden (aus gleicher Stammkultur angezogenen) Kontrolle möglich. Die hohe resultierende Anzahl vergleichbarer Zellen zeigt die Verteilung der erwünschten, physiologisch wirklich „aktiven“ F_0 -Werte wesentlich genauer.

In Abbildung 3.1.2 des Ergebnisteils sind in jeweils einem Gesamt-Histogramm alle F_0 -Werte einer solchen Messreihe (Abb. 3.1.1) als Tagesübersicht kumuliert dargestellt. Im Vergleich zur Abb. 2.1.2, den „good“-Zellen, die als Batch-Kultur kultiviert wurden, fällt auf, dass die F_0 -Werte des Chemostaten niemals $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ überschreiten. Die Vorteile der Chemostaten scheinen also die gewünschte Verbesserung der Ergebnisse zu zeigen. Auch die verhältnismäßig geringe Anzahl an „low F_0 “-Zellen in beiden Kulturvarianten („LL“/ „HL“) gegenüber der, in den „batch“-Kulturen zeigt ebenso die verbesserten Kultivierungsbedingungen.

Die Histogramme sind im Allgemeinen denen, der vorherigen Batch-Messungen sehr ähnlich. Auch die oben beschriebene Einteilung der Zellen in Gruppen, mit bestimmtem F_0 -

Wertebereichen, deckt sich mit den neuen Chemostat-Ergebnissen recht gut. Die „low F_0 “- (Batch)-Zellen waren im Bereich zwischen 40 und 100 (90) $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lokalisiert. Auch hier in Abb. 3.1.2 (Chemostat) gruppieren sich einige wenige Zellen. In der Starklicht-gestressten Kultur sind es deutlich mehr, als in der Kontrolle. Der rasche Anstieg der Zellhäufigkeit kurz vor 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, wo die Gruppe der „normalen“ Zellen nach Definition dieser Arbeit beginnt, ist in beiden Kulturvarianten zu erkennen. In der „HL“-Kultur unter b) allerdings, ist dieser markante Anstieg schon bei F_0 -Werten um 85 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lokalisiert („LL“: 90). Ebenso typisch ist auch der anschließende leichte-, und der darauf folgende starke Anstieg der Zellanzahl mit jedem Intervall bis ca. 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, wo sich der Peakbereich der „normalen“ Zellen befindet. Die Gruppe der „normalen“ Batch-Zellen erstreckt sich bis zu F_0 -Werten von 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Das Muster dieser speziellen Verteilung ist in beiden Fällen in der Abb. 3.1.2 zu erkennen, nur dass es in der Starklicht-gestressten Kultur (b) um ca. 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in Richtung geringerer F_0 -Werte verschoben ist. In der Kontroll-Kultur sind es hingegen nur ca. 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in Richtung geringerer F_0 -Werte. Die „bright I“-Zellen scheinen sich zwischen 150 und 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ zu gruppieren. Hier, bei den Chemostat-Kulturen ist diese Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden „normalen“ Zellen nur schwach ausgeprägt. Die darüber hinausgehende Gruppe der „bright II“-Zellen bis 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ist in beiden Kultivierungsvarianten nur noch rudimentär vorhanden. Die Starklicht-gestresste Kultur weist so gut wie keine traditionell, als „bright II“- eingestufte Zellen mehr auf. Die Zellen waren also sehr vital und gut an das Starklicht angepasst.

Allgemein scheinen sich die Formen, bzw. die Zell-Gruppierungen der Histogramme bei Starklicht in Richtung niedrigere F_0 -Werte zu verschieben. Dies erscheint logisch, da der Überfluss an Licht weniger ChlA, welches den F_0 -Wert emittiert, zum Überleben nötig macht. Auch die neuartige Anordnung der zwei Chemostat-Kulturflaschen im Aquarium scheint leichten Einfluss auf die Bereiche der Gruppen der verschiedenen Aktivitätszustände zu haben. Die Werte der Chemostat-Kontrolle erstrecken sich bis ca. 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die Werte der Starklicht-gestressten Chemostat-Kultur nur bis ca. 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Darüber hinaus sind nur noch vereinzelt Zellen in den F_0 -Intervallen zu erkennen. Die Batch-Kulturen hingegen zeigten F_0 -Werte bis ca. 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ („bright II“). Die relative Verteilung der Aktivitätszustandsgruppen, bzw. die Form der Histogramme im F_0 -Wertebereich ist allerdings auffallend ähnlich. Demnach ergibt optional die Verrechnung der Gruppenbereichsgrenzen mit entsprechenden Expansionsfaktoren (Verhältnisse der F_0 -Werte der Gruppenenden ($F_{0, \text{Chemostat-}}$ / $F_{0, \text{Batch-Kultur}}$)) des jeweiligen Aktivitätszustandes (z.B.: „bright II“- Zellen: (LL:

250/300; HL: 200/300)) wieder eine Möglichkeit die Chemostat-Ergebnisse sinnvoll mit den Batch-Ergebnissen zu vergleichen.

Die „low F_0 “-Zellen liegen somit für die Niedriglicht-Kultur (Kontrolle) zwischen 42 und 83 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, und für die Starklicht-gestresste Kultur zwischen 40 und 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Die „normalen“ Zellen der Kontrolle erstrecken sich stärker fluoreszierend bis über 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, bzw. bis knapp über 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in der Starklicht-gestressten Kultur. Die „bright I“-Zellen haben F_0 -Werte bis 167 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in der Kontrolle, bzw. bis 135 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in der gestressten Kultur. Diese neue Einteilung deckt sich weitgehend mit der erwarteten Verteilung der F_0 -Werte in den beiden Kulturen und macht die weitere Interpretation der F_0 -Werte der einzelnen Tageszeiten (Abb. 3.1.1) wesentlich einfacher.

In Abbildung 3.1.1 ist unter a) die Kontrolle und unter b) die Starklicht-gestresste Kultur dargestellt. Nimmt man die neue Einteilung der Aktivitätszustände für die Chemostat-Kulturen zugrunde, fällt die sehr hohe Anzahl an „bright“-Zellen auf. Nach dem Anschalten des Lichts („Dawn“) sind in beiden Kulturen kaum „normale“ Zellen erkennbar. Die Gruppe der „bright I“-Zellen dominiert in der Starklicht-gestressten Kultur, wohingegen in der Kontrolle die „bright II“-Gruppe häufiger vertreten ist. Allerdings sind wieder mehr „low F_0 “-Zellen, und Zellen, mit Werten über den „bright II“-Bereich hinaus, in der Starklicht-gestressten Kultur gemessen worden. Am Morgen, wenn das Licht langsam stärker wird und der erste Lichtstress „verkräftet“ ist, sinkt die Zahl der „bright“- und der „low F_0 “-Zellen in beiden Kulturen deutlich ab. Die meisten Zellen gehen dabei in den „normalen“ Aktivitätsbereich über. Sie scheinen sich also an den ersten Schock (beim Anschalten des Lichts) adaptiert zu haben und betreiben die angelaufene Photosynthese. Dabei fällt auf, dass die wenigen Zellen im Graph „Dawn“ mit noch höheren F_0 -Werten als die der „bright II“-Gruppe ($> 200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), bis zum Morgen („Morning“) gänzlich verschwunden sind. Die gegenteilige Entwicklung ist in der Kontrolle zu beobachten. Die Starklicht-gestressten Zellen scheinen also besser als die Kontrolle an die rasch steigenden Lichtintensitäten angepasst zu sein. Am Mittag („Noon“), wenn die N-Fixierung und die Kultivierungsbelichtung Maximalwerte erreichen, sollte nach theoretischer Grundidee (Berman-Frank, Lundgren *et al.* 2001) (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004), die Gruppe der „bright I“-Zellen im Vergleich zu den anderen Messzeiten am stärksten ausgeprägt sein. Diese Gruppe Zellen stand im Verdacht durch Entkopplung der Untereinheiten ihrer PBPs die deutlich erhöhte Grundfluoreszenz zu emittieren, und somit ohne ausreichende Photonen-Energieversorgung eine negative Netto- O_2 -Bilanz für die N-Fixierung zu erzeugen.

Leider zeigt der Graph der ungestressten Kontrolle („LL“, Abb. 3.1.2a)) nicht das erwartete Bild. Vielmehr sind die meisten Zellen im Bereich der „normalen“ Zellen (83 bis 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) zu finden. Da am Mittag im Vergleich zu den anderen Messzeiten die meisten Zellen am schwächsten fluoreszieren, konnten somit die Beobachtungen aus Küpper et. al (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004) nicht repliziert werden. Auch die Verteilung der Zellen ähnelt einer Glockenkurve (Gauss'sche Normalverteilung), die gewöhnlich für nur eine, normal verteilte Gruppe, bzw. bei einem Aktivitätszustand entsteht.

Das Bild der Starklicht-gestressten Kultur (Abb. 3.1.2b)) entspricht schon mehr der theoretischen Erwartung. Die dominierende Gruppe ist die, der „bright I“-Zellen. Die „low F_0 “- und die „normalen“ Zellen scheinen bis zum Mittag ihren Aktivitätszustand zu ändern. Die Gruppe der „bright II“-Zellen (133 bis 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ist allerdings, wie zu allen Messzeiten der Starklicht-gestressten Kultur, weiterhin relativ stark vertreten. Zur Form des Histogramms fällt auf, dass sie sowohl bei der entsprechenden Kontrolle, wie auch bei den „Noon“-Kulturen der Batch-Messreihen, im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten, der Gauss'schen Normalverteilung am ähnlichsten kommt.

Dieser gegensätzliche Trend der zwei Kulturen („HL / LL“) setzt sich bis zum Abend weiter fort. In der Kontrolle ist die Gruppe der „normalen“ Zellen nur noch schwach vorhanden. Die meisten Zellen scheinen dabei in den Aktivitätszustand „bright I“ übergegangen zu sein. Man kann auch die zwei Peaks dieser Gruppe erkennen. Allerdings ist auch die Gruppe der „bright II“-Zellen (leicht auch die, der „low F_0 “) angewachsen, was auf hohen Stress und das vorher beschriebene „apoptotische“ / nekrotische Sterben hinweist.

Die Starklicht-gestresste Kultur (Abb. 3.1.1b)) scheint sich dagegen zu erholen, da die meisten Zellen in den Bereichen der „normalen“ und „bright I“-Zellen zu finden sind. Eine Erklärung für den shift in Richtung „normale“ Zellen kann in der starken Adaption an Starklicht über den Mittag zu finden sein. Die Überlebenden kommen viel leichter mit dem schwächeren Licht am Abend zurecht.

Zur Nacht hin steigt erwartungsgemäß die Anzahl der „normalen“ Zellen in der Kontrolle wieder zur zweitgrößten Gruppe an. Die „bright I“-Zellen sind nur unerheblich häufiger vertreten, aber ebenso dominant wie am Abend. Auch die Zahl der „bright II“-Zellen ist wie erwartet verringert, was auf sinkenden Stress hinweist. Der Graph der gestressten Kultur ist dagegen schwerer zu deuten. Allgemein dominieren die „normalen“- und „bright I“-Zellen zu gleichen Maßen. Auffällig ist die relativ hohe Zahl von „low F_0 “-Zellen. Möglicherweise sind

das die leeren Zellhüllen die sich im Laufe des Tages in der Kultur vermehrt angesammelt haben. Eine Verbindung zum Vorkommen der „bright II“- (oder auch von „bright I“-) Zellen konnte in keiner der beiden Kulturen nachgewiesen werden. Vielmehr scheinen die „bright“-Zellen die postulierte „apoptotische“ Antwort auf den Lichtstress zu sein.

4.2.3.3. Variable Fluoreszenz; Photochemisches- bzw. Nicht-photochemisches Quenching

Im Gegensatz zu F_0 (dunkeladaptierte Grundfluoreszenz) sind die Histogramme von F_v , Q_{NP} und Q_P kaum sinnvoll auszuwerten. Einzig das Erkennen von rudimentärer Gruppenbildung ist leicht möglich. Die hohe Varianz der Parameterwerte zwischen benachbarten Intervallen deutet auf Verschiebungen, der in Agarose eingebetteten Filamente bzw. der Raster, der (auf den F_0 -Kinetikbild markierten) Zellen hin. Dies war häufig der Fall wenn die Agarose zu lange benutzt wurde. Durch das Erwärmen verdunstet minimal das Wasser wodurch sich die Konzentration der Mediumssalze erhöht. Die Agarose quoll dadurch langsam auf und die Filamente im Präparat wanderten aus dem Fokus, was ein unscharfes Bild bzw. zu niedrige Parameterwerte der markierten Zellen zur Folge hatte. F_0 im Gegensatz wird am Anfang des Kinetikprotokolls ermittelt (siehe Fig 2.2.3.1), wo der Einfluss dieser „osmotischen Verschiebung“ noch gering ist. Eine weitere Quelle für die Verfälschung der Parameterwerte ist generell die Bewegung der Filamente in der Bildebene. Der Bewegungsdrang dieser „Züge“ schien dabei positiv mit der Fitness zu korrelieren. Bei machen Chemostat-Messreihen ließen sich für die Auswertung nur noch wenige unverschobene Zellen auf den Kinetikbildern markieren. Immobile Filamente waren in der Regel relativ kurz und/oder mit vielen „bright“-Zellen durchsetzt.

4.2.3.4. Spektral aufgelöste Fluoreszenz-Kinetik

Die spektral aufgelösten Parameter (Abb. 3.4.1) wurden durch Anregung im Absorptionsbereich von Chl und PUB ermittelt. Sie zeigen auf, welche Komponenten beteiligt sind und wie stark der jeweilige Beitrag ist.

F_v beschreibt die dunkel adaptierte maximale Aktivität des PS II. Unter LL (normale Kultivierungsbelichtung) sinkt sie um die Mittagszeit, vermutlich durch Kopplung der Phycobilisomen an das PS I, hauptsächlich im spektralen Bereich von PE. Unter HL (Starklichtstress) sinkt die Aktivität vor allem im Bereich von Chl.

Q_{NP4} beschreibt den Anteil der Fluoreszenzänderung beim Quenching, der nicht photochemisch nutzbar wird. Die negativen Werte unter HL um die Mittagzeit, weist auf eine Entkopplung intakter Phycobilisomen von den RCs hin.

Q_{P4} beschreibt den photochemisch nutzbaren Anteil des Fluoreszenzquenchings. Die niedrigen Werte in der HL-Kultur zeigen deutlich das Herunterregulieren der Photosynthese, als ein Resultat der Akklimatisierung an Starklicht auf.

Zum besseren Verständnis der Entwicklung der Parameterspektren von F_v , q_{NP} und q_P im Tagesverlauf wurden jeweils die 2 Hauptpeakwerte (PE: 575 nm bzw. Chl: 675 nm) aller Tageszeiten in Abb. 3.4.2 vereint. In der Abb. 3.4.3 wurde auf das Verhältnis $\text{Peakgröße}_{675 \text{ nm}} / \text{Peakgröße}_{575 \text{ nm}}$ (großer Peak/ kleiner Peak) eingegangen, um die Änderung der Fluoreszenz der verschiedenen Komponenten des Photosystems im Tagesverlauf aufzuzeigen.

4.3. Spektrale Eigenschaften

4.3.1. *In vivo*-Fluoreszenz und -Absorption von einzelnen ungestressten Zellen

In Abb. 1.4.3 ist eine Übersicht der spektralen Eigenschaften von einzelnen ungestressten *Trichodesmium*-Zellen ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Kultivierungsbelichtung, Batch-Kultur) aufgezeigt. Die Einteilung der Zellen in „bright I/II“, „normal“ bzw. „low F_0 “ erfolgte aufgrund der, dieser Arbeit zugrunde liegenden Theorie (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004), der verschiedenen Aktivitätszustände (Gruppenbildung der Grundfluoreszenzwerte F_0 einzelner Zellen). Die „low F_0 “-Zellen wurden in „active“, mit „normaler“ variablen Fluoreszenz F_v (wie auch alle andere Zelltypen), was auf eine hohe PS II-Aktivität zurückzuführen ist, und in „inactive“, ohne signifikante F_v -Werte, was auf eine niedrige PS II-Aktivität hinweist, eingeteilt.

Unter Abb. 1.4.3a) sind die *in vivo*-Absorptionsspektren der verschiedenen Aktivitätszustände gezeigt. ChlA absorbiert mit 2 Hauptpeaks bei 430 bzw. 675 nm. Die Karotinoide absorbieren im Bereich um 465 nm. Die verschiedenen Komponenten, der an das ChlA gekoppelten Phycobillisomen absorbieren *in vivo* maximal bei folgenden Wellenlängen: PUB um 500 nm, PE bei 545 bzw. 570 nm, und PC bei 625 nm. Das Linkerprotein APC absorbiert im gleichen Bereich wie der „rote“ Peak von ChlA um 665 nm. Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen Pigmente unter den Abb. 1.4.3b)c)d) zeigen bei bestimmten Wellenlängen stets signifikante Peaks auf. Aufgrund der Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums von nur wenigen nm im Vergleich zum Absorptionsspektrum, wurden die Peaks entsprechend zugeordnet: ChlA fluoresziert bei 680, PUB bei 515, PE bei 575 und PC bei 660 nm.

Die „normale“ Zelle zeigt zunächst einmal in allen Wellenlängenbereichen die höchsten Absorptionswerte, kann also die meiste Lichtenergie absorbieren. Bei der selektiven Bestrahlung von ChlA und einem kleinen Teil von PUB fluoresziert PUB und PE maximal, sehr stark auch das ChlA. PC dagegen fluoresziert nur sehr schwach im Vergleich zu den anderen Aktivitätszuständen. Bei der PE-Bestrahlung fluoresziert dieses Protein erwartungsgemäß am stärksten. Auch ChlA fluoresziert mit mittlerer Stärke, und PC nur sehr schwach im Vergleich der Aktivitätszustände. Wenn PUB selektiv angestrahlt wird, fluoresziert auch dieses in der „normalen“ Zelle am stärksten. Ebenso fluoresziert auch PE mit maximalen Werten. PC zeigt dagegen wieder sehr geringe Fluoreszenzwerte. ChlA weist

hier nur die 3.-höchsten Werte auf. Diese spektralen Eigenschaften der „normalen“ Zelle zeigen, dass die Zelle, aufgrund der hohen Absorptionsfähigkeit in diesem Aktivitätszustand sehr vital ist, und dass der Energietransfer von PUB über PE und PC bis zum ChlA reibungslos und ohne Einschränkung abläuft. Somit kann man schlussfolgern, dass die Phycobilisomen intakt- (gekoppelt), und mit ChlA verbunden sind. ChlA dagegen scheint auch die aufgenommene Energie ohne Stau an das Reaktionszentrum weitergeben zu können. Diese Vermutung kann durch die relativ geringe Fluoreszenz gestützt werden.

Die „bright“-Zellen dagegen weisen andere spektrale Eigenschaften auf. Die „bright I“-Zelle zeigt in allen Wellenlängenbereichen die zweithöchste Absorption (Abb. 1.4.3a)). Daraus kann man schlussfolgern, dass reichlich intaktes ChlA vorhanden ist, und dass dazu ebenso die Komponenten der Phycobilisomen im ähnlichen Verhältnis wie in der „normalen“ Zelle zur Verfügung stehen. Wird in diesem Aktivitätszustand selektiv PE angeregt, fluoresziert es nur sehr schwach (Abb. 1.4.3c)). Da allerdings PC am zweitstärksten, und ChlA am stärksten fluoresziert, scheint hier die Verbindung zwischen ChlA und den Phycobilisomen noch weitgehend intakt zu sein. Da aber trotz der geringeren Absorption des ChlA die Fluoreszenzwerte maximal sind, muss in diesem Aktivitätszustand der Energietransfer zum ChlA unterbrochen, oder bei den Reaktionszentren gestaut sein. Diese Überlegung wird auch durch die selektive Bestrahlung von PUB (Abb. 1.4.3d)) gestützt. Im Vergleich der vier Aktivitätszustände zeigt PUB die zweithöchste-, und das nachfolgende (längerwellig-absorbierende) PE, bedingt durch den Energietransfer zum PC, nur relativ wenig Fluoreszenz. PC weist dafür aber die zweithöchste Fluoreszenz auf. Auch ChlA zeigt zweithöchste Werte.

Die spektralen Charakteristika der „bright II“-Zelle ähneln denen, der „bright I“-Zelle. In den Bereichen des Blaulicht-absorbierenden Peaks von ChlA, bei den Karotinoiden und bei allen Komponenten der Phycobilisomen, weist sie mittlere Absorptionswerte auf. Nur der Rotlicht-absorbierende Peak von ChlA hat ein ähnlich hohes Niveau wie der entsprechende, der „low F₀“-Zellen. Folglich kann man relativ wenig intaktes Chlorophyll und mittlere Mengen der PBPs vermuten. Im Vergleich der vier Aktivitätszustände fluoresziert PE bei selektiver Bestrahlung mit zweithöchsten Werten. PC fluoresziert maximal, wie auch ChlA, trotz der doch eher geringen Absorptionswerte dieser Pigmente. Die selektive Bestrahlung von PUB zeigt ein ähnliches Bild. PUB fluoresziert darauf nur schwach und gibt seine Energie an PE weiter, welches mit den zweithöchsten Werten fluoresziert. Anschließend fluoreszieren bei der „bright II“-Zelle PC und ChlA, trotz ihrer geringen Absorption, am stärksten. In der Zelle im Aktivitätszustand „bright II“ ist allgemein die Pigmentmenge noch geringer als bei der

„normalen“-, bzw. „bright I“-Zelle. Aufgrund der starken Fluoreszenz aller Komponenten der PBPs müssen diese noch gekoppelt und mit ChlA verbunden sein. Allerdings scheint hier der Energiestau nach dem ChlA noch viel stärker, als bei der „bright I“-Zelle zu sein. Das Reaktionszentrum scheint die aufgenommene Energie nicht mehr verarbeiten zu können.

Die „low F_0 “-Zellen zeigen andere spektrale Extreme auf. Die „active“-Variante, durch hohe F_v -Werte mit intaktem PS II charakterisiert, zeigt in allen Wellenlängenbereichen die geringsten Absorptionswerte auf ($\sim 1/2$ der „normalen“ Zelle). Bei der selektiven Anregung von PE (PE zeigt $\sim 70\%$ der Absorption der „normalen“ Zelle), fluoresziert die „low F_0 “-Zelle mit ca. 45%-, PC mit ca. 44%-, und Chlorophyll mit ca. 37% der entsprechenden Werte, der „normalen“ Zelle. Es scheint hier also ein ähnlicher Aktivitätszustand wie der, der „normalen“ Zelle vorzuliegen. Nur der Energietransfer zwischen den Komponenten der Phycobilisomen scheint weniger gut zu funktionieren, was auf Entkopplungen eines Teils dieser Pigmente zurückgeführt werden kann. Auffällig ist auch das Verhältnis zwischen der Fluoreszenz von PC zu ChlA. Es hat (wie auch in der „inactive“-Variante) den höchsten Wert, was, im Gegensatz zur „normalen“ Zelle, auf einen schlechteren Energietransfer vom PC zum ChlA, also auf eine häufigere Entkopplung der Phycobilisomen vom ChlA, hinweisen könnte. Auch die Bestrahlung von PUB (zeigt $\sim 60\%$ der Absorption, der „normalen“ Zelle) beschreibt dieses Bild. PUB fluoresziert darauf mit ca. 70% der Stärke der „normalen“ Zelle. Es scheint also bei der „low F_0 -active“-Zelle eine partielle Entkopplung von PUB vom Rest der Phycobilisomen zu geben.

Die „low F_0 inactive“-Zelle zeigt andere spektrale Eigenschaften. Bei der selektiven Bestrahlung von PE (zeigt über 75% der Absorption der „normalen“ Zelle) fluoresziert es ähnlich stark wie das, der „bright I“-Zelle, und nur wenig schwächer als das, der „normalen“ Zelle mit maximalen Absorptionswerten. Man könnte daher auf eine teilweise Entkopplung der Phycobilisomen zwischen PE und PC schließen. Auch PC und ChlA fluoresziert mit ähnlichen Werten wie die, der „normale“ Zelle. Das Verhältnis der Fluoreszenz von PC zu ChlA ist aber größer als in der „normalen“ Zelle. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Energieübertragung innerhalb der Phycobilisomen durch eventuelle Degradation in die Untereinheiten gestört ist und / oder die transferierte Energie auf dem Weg vom ChlA zum Reaktionszentrum angestaut wird. Auch die selektive Bestrahlung von PUB unterstützt diese Eindrücke. Während PUB hier im Vergleich der vier Aktivitätszustände am geringsten fluoresziert, sind die Werte von PE am zweit höchsten. Die Verbindung PUB-PE in den Phycobilisomen der „low F_0 inactive“-Zelle scheint also noch weitgehend intakt zu sein.

Zwischen PE und PC scheint es aber häufig zu Entkopplungen zu kommen. Durch das starke Fluoreszieren der nachfolgenden Pigmente PC bzw. ChlA wird auch hier der Energiestau vor den Reaktionszentren deutlich.

4.3.2. *In vivo*-Fluoreszenz und -Absorption von einzelnen Zellen unter Fe-Mangel

In den Abbildungen 1.4.1 bzw. 1.4.2 sind die spektralen Eigenschaften verschiedener Aktivitätszustände von Fe-Mangel-gestressten Zellen, sowie von deren Kontroll-Kulturen gezeigt.

Die Kontroll-Kultur, jeweils unter a), wies Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen auf. Die „normalen“-Zellen (normale F_0 -Werte während der Fluoreszenzkinetikkmessungen) wurden genauer in „active“ (hohe F_v -Werte – PS II ist aktiv), bzw. in „inactive“, ohne signifikant hohe F_v -Werte, was auf eine niedrige PS II-Aktivität hinweist, eingeteilt. Die Absorptionsspektren der beiden Varianten zeigen sehr ähnliche Formen mit beinahe gleichen absoluten Werten. Die inaktive („inactive“) Variante weist allerdings etwas mehr Absorption im Bereich der PBPs auf. Dies wirkt sich auch auf die Fluoreszenzspektren bei selektiver PE-Bestrahlung aus. Alle dem PE nachfolgenden („länger-wellig“ absorbierende) Untereinheiten der PBPs fluoreszieren ein wenig stärker. Auch der Peak von ChlA ist bei der „normal inactive“-Variante entsprechend erhöht. Es scheint also auf der Ebene der Pigment-Komposition und -Kopplung keine Unterschiede zwischen den zwei Varianten der „normalen“ Zellen zu geben. Im Gegensatz zu Abb. 1.4.3c) hat hier (Abb. 1.4.2a)) allerdings der Fluoreszenzpeak von PE nicht den höchsten Wert, sondern zeigt mittlere Werte auf. Der Grund dafür kann nicht eindeutig erklärt werden.

Die „low F_0 “-Zelle zeigt zwar im Vergleich zu den „normalen“ Zellen leicht weniger Absorption in den Bereichen von ChlA, weist aber im Bereich der PBPs ähnliche Werte auf. Auffällig ist die relativ hohe Absorption der Karotinoide. Das Fluoreszenzspektrum weist zwar die gleiche Form wie das, der „normalen“ Zelle auf, hat aber relativ geringe Werte im gemessenen Wellenlängenbereich. Es ist möglich, dass in diesem Fall eine „normale“ Zelle mit extrem guten Energietransfer-Eigenschaften vorliegt, oder dass diese Zelle wahrscheinlich eher während der Messung aus dem Fokus gewandert ist. Auch wurde des Öfteren ein Platzen der Zellen während der Kinetik-Messungen beobachtet. Dieses Ereignis scheint hier eher unwahrscheinlich, da im Experiment die Absorptionsspektren nur von vitalen Zellen

gemessen wurden, die erfolgreich (ohne Bewegung) die zuvor durchgeführten Fluoreszenz-Kinetik-, bzw. Fluoreszenzspektrums-Messreihen überlebt hatten .

Die „bright I“-Zelle zeigt die höchsten Absorptionswerte im Bereich der PBPs, und die Zweithöchsten beim ChlA (nur „bright II“ zeigt noch mehr Absorption). Trotzdem liegt die Fluoreszenzkurve bei selektiver PE-Bestrahlung mit ähnlichen Werten genau zwischen denen, der „normalen“ Zell-Varianten. Man kann also sagen, dass sich diese Zelle eher im „normalen“ Aktivitätszustand befindet und ihr Energietransfer zum Reaktionszentrum, auch aufgrund der erhöhten Absorption im Bereich der PBPs, von allen Zelltypen am besten funktioniert. Hier scheinen auch die Komponenten der PBPs weitgehend miteinander gekoppelt und mit ChlA verbunden zu sein.

Die „bright II“-Zelle zeigt ganz andere Eigenschaften, als die in Abb. 1.4.3. Sie hat hier (Abb. 1.4.1) die höchsten Absorptionswerte im Bereich von ChlA und die Zweithöchsten bei den PBPs. Dennoch scheint der Energietransfer nach PC teilweise unterbrochen zu sein, da das (PC)-Fluoreszenzspektrum höhere Werte als das, von ChlA aufweist. Die PBPs scheinen zwar untereinander gekoppelt bzw. verbunden zu sein, jedoch selten mit ChlA. Es könnte hier auch ein Stau des Energietransfers vor dem Reaktionszentrum vorliegen, da auch der Fluoreszenzwert von ChlA relativ hoch ist.

Die Einordnung als „bright II“-Zelle (auch „very bright“ (Kupper, Ferimazova *et al.* 2004)) kann auch auf große Mengen ChlA zurückzuführen sein, da dieses Pigment und Teile von PUB während der Fluoreszenzkinetikkessung (F_0 -Wert zur Einteilung in die Aktivitätszustände) selektiv angestrahlt werden und im Ergebnis hohe Absorptionswerte aufzeigen.

Die individuellen spektralen Unterschiede der jeweiligen, durch den F_0 -Wert der Zellen eingeteilten, Aktivitätszustände sind in den Abbildungen 1.4.1a) und 1.4.2a), bzw. in Abb. 1.4.3, bei den „bright“-, bzw. „low F_0 “- Varianten offensichtlich. Es müssen also zur Aufklärung des genauen Aktivitätszustands der Zelle noch mehr Parameter als F_0 und F_v herangezogen werden. Zur Aufklärung der spektralen Situation, also an welcher Stelle genau im Phycobilisom, und in welcher physiologischen Situation es zu Entkopplungen zwischen den Pigmenten kommt, müssten größere Testreihen mit einer hohen Anzahl an Zellen zu jeder, der zu messenden fünf Tageszeiten durchgeführt werden. So wäre auch zu klären in wie fern eine Regulierung der Photosynthese auf Pigmentebene für die N-Fixierung stattfindet.

Die Fe-Mangel-gestressten Zellen sind in den Abb. 1.4.1b), bzw. 1.4.2b) gezeigt. Die „normale“ Zelle („active“) in den Graphen zeigt im Grunde die gleichen Eigenschaften wie die „normalen“, der Kontroll-Kultur.

Die Fe-Mangel-gestresste „low F_0 “-Zelle hat allgemein, auch im Vergleich zur Kontroll-Kultur (Abb. 1.4.1a)), mit Abstand die niedrigste Absorption in allen Bereichen. Auch die Fluoreszenzwerte der Pigmente liegen entsprechend niedriger. Allerdings scheint der Energietransfer zu den Reaktionzentren noch etwas besser, als in der „normalen“ Zelle zu funktionieren, da der Quotient der Absorptionswerte, der jeweiligen Pigmente (wie z.B. für PC: $\text{Abs.}_{\text{PC}, \text{low } F_0} / \text{Abs.}_{\text{PC}, \text{normal}}$), gegenüber den entsprechenden Fluoreszenzwerten ($F_{\text{PC}, \text{low } F_0} / F_{\text{PC}, \text{normal}}$), stets leicht höher ist.

Eine Zelle konnte als „bright I“ eingeordnet werden. Sie zeigt in allen Wellenlängenbereichen die höchste Absorption. Die überproportionale angestiegene ChlA-Fluoreszenz weist allerdings als einziges auf einen Energiestau vor den Reaktionszentren, oder auf eine unvollständige Entkopplung des PBPs-Chl-RC-Komplex „downstream“ vom ChlA hin. Der Energietransfer innerhalb der PBPs bis zum ChlA scheint allerdings in Ordnung-, bzw. die Pigmente miteinander gekoppelt zu sein. Auswirkungen des Fe-Mangels konnten hier nicht registriert werden. Vielmehr verhält sich diese „bright I“-Zelle sehr ähnlich wie die, der Kontroll-Kultur aus Abb. 1.4.3.

4.3.3. *In vivo*-Absorptionsspektren von *Trichodesmium* unter Fe-Mangel- und Starklicht-Stress im Tagesverlauf

Die *in vivo*-Absorptionsspektren im Tagesverlauf wurden erstellt um eventuelle Zyklen der Pigmentgruppen von normalen- (ungestressten), bzw. gestressten *Trichodesmium*-Kulturen aufzuzeigen. Die Absorption bestimmter Pigmente korreliert allgemein positiv mit der entsprechenden Konzentration in der Zelle.

In den Abbildungen 1.5.1 bzw. 3.6.1 der Kontroll-Kulturen unter a) sind absolute Werte gezeigt. Man kann relativ deutlich den Tageszyklus von ChlA erkennen. Vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) ist die Absorption von ChlA sehr hoch. Bis zur Mittagszeit, wenn die Lichtintensität am höchsten ist, sinkt sie auf niedrigste Werte ab. Zur Nacht hin, wenn das Licht wieder schwächer wird, steigt auch die Absorption erneut auf höchste Werte an. Es scheint also eine Adaption der ChlA-Produktion in Abhängigkeit zur Lichtmenge zu geben. Das Sinken der Absorption von ChlA könnte auch durch Photooxidation der Pigmente

hervorgerufen worden sein, da die Lichtintensität um die Mittagszeit doch relativ hoch ist (Fu and Bell 2003).

In Abb. 1.5.1 beschreibt die Absorption im Bereich der PBPs kaum einen Zyklus. Es fällt allerdings die geringe Konzentration von PUB und PE am Mittag („Noon“) auf. Dies kann man wieder auf die kleinere benötigte Anzahl Antennenpigmente aufgrund der im Überfluss vorhandenen Lichtmenge-, oder auch auf Photooxidation zurückführen. Die Absorptionswerte im Bereich der PBPs in der Abb. 1.5.2 sind sich zwar untereinander relativ ähnlich aber dennoch wird hier (Abb. 1.5.1) dieser Trend ebenfalls erkennbar. Bis zum Morgen steigt die Konzentration von PUB bzw. PE auf maximale Werte an und sinkt bis zum Mittag wieder auf die Niedrigsten ab. Eine leichte Erholung zur Nacht hin ist ebenfalls durch das erneute Ansteigen der Absorption erkennbar. Auch weitere, hier nicht veröffentlichte Ergebnisse, zeigen diesen Zyklus der PBPs im Tagesverlauf.

In den Abbildungen 1.5.3a) bzw. 3.6.3a) sind alle Spektren der Kontroll-Kulturen, infolge einer „baseline“-Korrektur (auf den Rotlicht-absorbierenden Peak von ChlA) normiert worden. Dadurch kann man die Menge der einzelnen Untereinheiten der Phycobilisomen (PBPs) in Abhängigkeit zur ChlA-Menge, zu den 5 verschiedenen Tageszeiten darstellen. Im Verlauf des Tages sind sich die 5 Absorptionswerte der verschiedenen PBPs sehr ähnlich. Dennoch ist in beiden Abbildungen ein Zyklus zu erkennen. Die PBPs (PUB, PE, PC) haben vor dem Anschalten des Lichts („Dawn“) die niedrigsten Absorptionswerte. Zum Morgen hin steigen sie nur leicht an. Besonders in Abb. 1.5.3a) wird deutlich, dass während PUB schon ansteigt, PE noch sehr ähnliche Werte wie zum Zeitpunkt „Dawn“ aufweist.

Auch die Starklicht-gestresste Kultur in Abb. 3.6.1.b) zeigt relativ klar dieses Ergebnis. Allgemein steigt das Verhältnis PBPs/ChlA bis zum Mittag („Noon“) weiter an. In Abb. 1.5.3b) erreicht PUB/ChlA, zu diesem Messzeitpunkt seinen Maximalwert. PE/ChlA weist den zweithöchsten Wert auf. Zum Abend hin wenn das Licht wieder schwächer wird, scheint sich diese Rangordnung umzudrehen. PE hat hier die höchsten Werte, und PUB die Zweithöchsten. Auch die Abb. 1.5.3 zeigt dieses Ergebnis recht deutlich. Zum Abend hin sinkt in beiden Abbildungen das Verhältnis PBPs/ChlA wieder auf mittlere Werte ab. Außerdem fallen in Abb. 1.5.3 die definierten Absorptionspeaks der Karotinoide, zu den Zeitpunkten „Noon“ bzw. „Evening“ auf. Dieses Hochregulieren scheint eine adaptive Schutzmaße gegen die harte Lichtintensität zu sein, um das ChlA vor Photooxidation zu bewahren.

Über die Fe-Mangel-gestressten Kulturen sind kaum signifikante Aussagen zu machen. Die absoluten Werte in Abb. 1.5.1b) lassen keinen Zyklus von ChlA erkennen, da sie sich sehr ähnlich sind und scheinbar zufällig variieren. Wahrscheinlich ist die „baseline“-Korrektur im UV-Bereich ($< 400\text{ nm}$), zu Beginn der Experimente nicht besonders gut geeignet um letztlich absolute Werte zu vergleichen. Die Korrektur der Einzelspektren, durch deren Verschiebung im Bereich der „baseline“ $> 750\text{ nm}$, führte entsprechend zu vergleichbareren Ergebnissen. Die PBPs sowie die Karotinoide weisen insbesondere bei Fe-Mangel-Stress (Abb. 1.5.1b)), wie auch in der entsprechenden Kontroll-Kultur (Abb. 1.5.1a)), sehr ähnliche Absorptionswerte zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf, und lassen somit kaum Aussagen über etwaige Zyklen der Pigmente zu. Auffällig ist aber die relativ hohe Konzentration von ChlA, die Geringe der Karotinoide, sowie von PC um die Mittagszeit. Durch eine alternative „baseline“-Korrektur im Bereich $> 750\text{ nm}$ befänden sich die niedrigen Absorptionswerte von PC bzw. der Karotinoide wieder im normalen Bereich der anderen Tageszeiten. Nur die erhöhte Konzentration von ChlA würde noch mehr verstärkt werden, was sich schwer deuten lässt.

In Abb. 1.5.3b) (4.6) sind die gleichen Spektren bzw. Zellen wie in Abb. 1.5.1b), allerdings mit der besseren, alternativen „baseline“-Korrektur im Bereich $> 750\text{ nm}$, und anschließender Normierung auf den „roten“ Absorptionspeak von ChlA, gezeigt. Das Verhältnis der PBPs bzw. der Karotinoide zum ChlA, ist hier zu den meisten Tageszeiten sehr ähnlich. Nur am Mittag haben die Verhältnisse Karotinoide/ChlA bzw. PUB/ChlA deutlich niedrigere Werte. Ein Grund dafür ist nicht erkennbar.

Die Starklicht-gestressten Kulturen in Abb. 3.6.1b) bzw. 3.6.3b) sind dagegen aussagestärker. Die absoluten Absorptionswerte der jeweiligen Pigmente in Abb. 3.6.3b) beschreiben allgemein die gleichen Tageszyklen wie die, der Kontroll-Kultur in Abb. 3.6.3a). Sie scheinen allerdings in allen Wellenlängenbereichen ca. 20% niedriger zu liegen. Unter Starklicht benötigt *Trichodesmium* scheinbar weniger Lichtsammelpigment um ausreichend Photosynthese zu betreiben. Andererseits sind hier die Absorptionswerte der Karotinoide, am Mittag und am Abend maximal, während hingegen bei der entsprechenden Kontroll-Kultur normale oder eher niedrige Werte zu beobachten sind. Auch weitere, hier nicht vorgestellte Ergebnisse zeigen dieses Bild.

Die auf ChlA normierten Werte in Abb. 3.6.1b) beschreiben einen, der entsprechenden Kontroll-Kultur sehr ähnlichen, PBPs/ChlA-, bzw. Carotinoide/ChlA-Zyklus auf. Diese Verhältnisse steigen von den niedrigsten Werten ausgehend, bis zum Mittag stetig an. Zum

Abend hin steigen sie erneut nur noch leicht an, wobei PE seinen zweithöchsten Wert aufweist, bzw. PUB seinen Höchsten. Zum Messzeitpunkt „Night“ hin bleiben die Verhältnisse PBPs/Chl, bzw. Car/Chl unverändert. Allerdings fällt auf, dass PE jetzt mit seinem maximalen Wert vertreten ist, und PUB mit seinem Zweithöchsten.

Da dies ebenso bei der entsprechenden Kontroll-Kultur (Abb. 3.6.1a)) zu beobachten ist, kann man postulieren, dass unter maximaler, aber nicht Photo-inhibierender Lichtintensität (bei „LL“: „Noon“, bzw. bei „HL“: „Evening“) der Wert von PUB/Chl maximal-, der von PE/Chl nur am zweithöchsten ist. Zum Messzeitpunkt nach der maximalen, nicht-inhibierenden Lichtintensität (bei „LL“: „Evening“, bzw. bei „HL“: „Night“) dreht sich die Rangfolge um. Es absorbiert dann PE maximal und PUB liegt auf den zweiten Rang.

Im folgenden Abschnitt werden die Graphen der Tagesdurchschnitte diskutiert. Die Abb. 1.5.2 zeigt die *in vivo*-Absorptionsspektren mit absoluten Werten von Fe-Mangel-gestressten Zellen, und die Abb. 1.5.4 welche, die weitergehend auf den Rotlicht-absorbierenden ChlA-Peak (675 nm) normierten wurden. Den beiden Abbildungen liegen verschiedene Experimente (Abb. 1.5.1 bzw. Abb. 1.5.3) zugrunde. Da bei den absoluten Werten in Abb. 1.5.2 die ChlA-Peaks bei 675 nm etwa den gleichen Wert haben, kann man sie direkt mit den Spektren aus Abb. 1.5.4 vergleichen. In beiden Fällen hat die Fe-Mangel-Kultur ca. 5% mehr Karotinoide als die entsprechende Kontrolle. Die PUB-Konzentration in der Zelle ändert sich bei Fe-Mangel dagegen nicht. Allerdings ändert die Konzentration von PE. In beiden Abbildungen liegt sie bei den Fe-Mangel-Kulturen (jeweils unter b)) im Tagesdurchschnitt um ca. 5-7% niedriger. PC hat bei den normierten Werten (Abb. 1.5.4) dagegen die gleichen Konzentration. In der Abb. 1.5.2 (Fe-Mangel) liegt sie mit absoluten Werten ca. 5% niedriger.

ChlA ist in beiden Abbildungen mit sehr ähnlichen Werten vertreten. Die PBPs PE und PC scheinen unter Fe-Mangel in geringerer Konzentration vorzuliegen. Das Herunterregeln der PBPs scheint Adaption zu sein, um das wichtigere ChlA, mit sehr hohem Fe-Bedarf, in ausreichender Form synthetisieren zu können. Die, unter Fe-Mangel erhöhte Produktion der Karotinoide könnte eine Schutzanpassung gegen Lichtstress sein um die wenigen Fe-haltigen Reparaturenzyme zu schonen.

Um klarere Aussagen über die *in vivo*-Absorptionsspektren bei Fe-Mangel machen zu können, müssen nachfolgende Experimente mit einer einheitlichen Auswertungsroutine, und mit einer viel größeren Anzahl Einzelsspektren durchgeführt werden. Dies war hier leider

nicht möglich, weil jede Proben der verschiedenen Tageszeiten relativ zeitnah auch für alle anderen Experimente der Messreihe (bzw. des Messzeitpunktes) verwendet wurden.

Die Starklicht-gestressten Kulturen zeigen dagegen im Gesamtdurchschnitt wieder anders ausgeprägte *in vivo*-Absorptionsspektren. Die absoluten Werte der Starklicht-gestressten Kultur in Abb. 3.6.4 offenbaren weniger Pigment (ca. 22% ChlA, 9% Karotinoide, 18% PUB, 20% PE und 8% PC) als in der entsprechenden Kontroll-Kultur. Es scheinen aber auf den ersten Blick keine drastischen Verschiebungen von den Konzentrationsverhältnissen der Pigmente zueinander vorzuliegen. Vielmehr scheint die Starklicht-gestressten Kultur einfach weniger Photopigmente zu brauchen, um ihren Energiebedarf zu decken. Bei den Karotinoiden, die auch zum Teil als Photoschutzpigmente dienen, ist auch keine besondere Ausprägung zu erkennen, was auf geringen Photostress, bzw. vitale Zellen hindeutet. Die Normierung auf den roten (675 nm) ChlA-Absorptionspeak in Abbildung 3.6.2 zeigt weitaus deutlicher die Verschiebungen der Pigmentkonzentrationen relativ zur Konzentration von ChlA. Es wird erkennbar, dass das Konzentrationsverhältnis der Karotinoide unter Starklicht-Stress sehr wohl leicht erhöht ist. Die Zellen investieren also verhältnismäßig mehr Energie in die Lichtabwehr als in ChlA-Aufbau. Die Verhältnisse von PUB und PC sind in beiden Kultivierungsarten entsprechend gleichbleibend. Nur PE ist in Relation zu ChlA leicht weniger in der Starklicht-gestressten Kultur als in der Kontrolle vorhanden. PE scheint also entweder durch den Energieüberfluss weniger benötigt zu werden oder es ist einfach anfälliger für Photostress als die anderen Komponenten der PBPs. Obwohl die Abbildungen 3.6.4 und 3.6.2 nicht dem gleichen Experiment zugrunde liegen, weisen beide auf eine relativ normale Anpassung der Pigmentkomposition von *Trichodesmium* an Starklichtbedingungen ($830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) hin. Dennoch zeigen andere, im Ergebnisteil nicht gezeigte Experimente, ein anderes Bild (Abb. 3.6.5).

Abb. 3.6.5

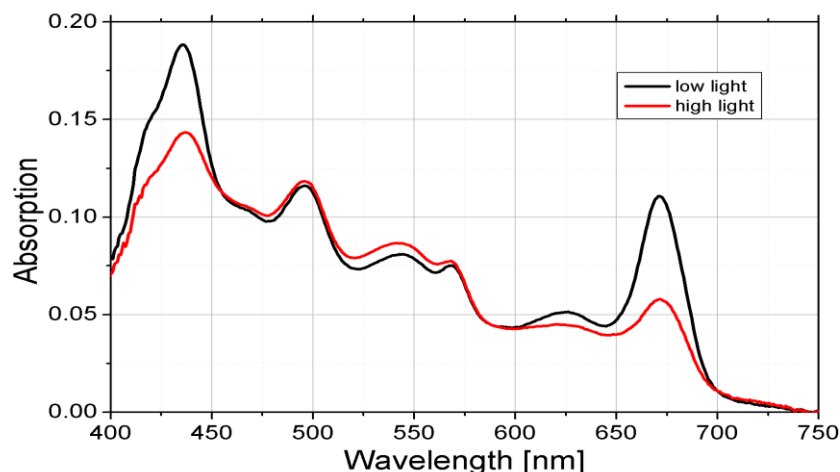


Abbildung 3.6.5: Vergleich der in vivo-Absorptionsspektren der Kontroll-Kultur („Low Light“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) mit der Starklicht-gestressten Kultur („High Light“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Jedes Spektrum ist jeweils der Mittelwert, der verschiedenen Messzeitpunkte, von insgesamt 50 Zellen. Auf der X-Achse ist die Wellenlänge in nm aufgetragen.

Unter Starklichtbedingungen war die Konzentration von ChlA ca. 45% kleiner, - der Karotinoide ca. 2% höher, - von PUB 3% höher, - von PE ca. 6% höher und die von PC ca. 10% niedriger als in der entsprechenden Kontroll-Kultur. Die Spektren waren Mittelwerte von jeweils 50 Einzelzellspektren zu verschiedenen Tageszeiten, bzw. Messtagen. Oft sind die Starklicht-gestressten Kulturen wenige Tage nach der Messung, wie oben ausgeführt „apoptotisch“/ nekrotisch eingegangen. Diese extrem abweichenden Ergebnisse scheinen *Trichodesmium*-Zellen in der späten Lebensphase unter Dauerlicht-Stress zu zeigen. Sehr viel weniger Chlorophyllgehalt weist auf starke Photooxidation hin. Die Komponenten der PBPs scheinen weniger anfällig für Lichtstress zu sein. Die Zellen scheinen dennoch relativ viel Energie in die Lichtabwehr zu investieren, da die Karotinoid-Konzentration mit gleichen Werten wie in der Kontrolle vertreten ist. Diese abweichenden Ergebnisse repräsentieren anscheinend Starklicht-adaptierte und bereits geschädigte Zellen, im Gegensatz zu den „nur“ adaptierten aus Abb. 3.6.4 bzw. 3.6.2.

4.3.4. *In vitro*-Absorptionsspektren von *Trichodesmium*

4.3.4.1. „Gaus-Peak-Fitting“ der *in vitro*-Absorptionsspektren zur Qualifizierung- und Quantifizierung der Pigmentgruppen

Wie in Abbildung 1.6.1 gezeigt, wurden *in vitro*-Gesamtspektren der Aceton-löslichen Pigmente der verschieden gestressten Kulturen aufgenommen. Durch Kombination der, zur Verfügung stehenden Standards, der möglichen Pigmente bzw. Pigmentgruppen, simuliert das von Hendrik Küpper erstellte PC-Programm eine Näherung zum Spektrum und stellt das Differenzspektrum graphisch als Maß für Berechnungsfehler dar. Die relativen Konzentrationen der, in der Acetonlösung vorhandenen Pigmente oder Pigmentgruppen werden nach kurzer Berechnungszeit angezeigt.

Die Abb. 1.6.1b) zeigt exemplarisch, gelegentlich vorkommende Berechnungsfehler. Diese traten häufig auf wenn die Kultur, wie in diesem Fall, Starklicht-gestressten oder alt war. Viele diffus absorbierende Abbauprodukte der Pigmente scheinen dabei das PC-Programm noch zu überfordern, da die relativ geringe PC-Rechenleistung nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Standards (bis zu 10), zum „Fitting“ der Gesamt-Absorptions-Spektren einer *Trichodesmium*-Kultur zuließ.

Zusätzlich bot die Methode eine elegante Gelegenheit das saubere Präparieren von Pigmentisolaten zur Quantifizierung zu überprüfen. Ein häufig auftretender Fehler ist, zum Beispiel das Verschleppen des leichtlöslichen Pigmentmixes der „Edding“-Farbstifte bei der Beschriftung der „Eppis“ (Eppendorf-Reaktionsgefäße) in die Probe. Die charakteristischen Absorptions-Spektren der verschiedenen Stifte in Aceton wurden also ebenfalls dem PC-Programm als Standard zum „Fitting“ der Gesamtspektren zur Verfügung gestellt. Wurden in einer Probe leichte Anteile „Edding“ gefunden konnte somit sicher gesagt werden, dass eine Verbindung vom „Eppi“-Inhalt zur Außenseite bestand, und dass somit die originale, absolute Photopigmentkonzentration nicht angezeigt werden kann. Die Entfernung dieser Proben half also bei der Erstellung genauerer Messwerte bzw. Balkendiagramme.

4.3.4.2. *In vitro*-Absorptionsspektren der Aceton-löslichen Pigmente Starklicht-gestresster Kulturen

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind zur Konzentrationsbestimmung der Aceton-löslichen Photopigmente nur die Gesamt-*in-vitro*-Absorptionsspektren nötig. Beispiele für solche Spektren sind im Ergebnisteil (Abb. 3.7.1a)) vorgestellt.

Aus den absoluten Werten in Abb. 3.7.1a), kann man im Allgemeinen erkennen, dass die Starklicht-Kultur („HL“, $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) mehr Absorption, bzw. mehr Pigmentgehalt als die Kontroll-Kultur („LL“, $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) aufweist, was mit der höheren Verfügbarkeit an Licht und dem damit verbundenen höheren Bedarf an Lichtschutzpigmenten, wie z.B. Karotinoide zu erklären ist.

In Abb. 3.7.1b) wurden die Spektren auf den Blaulicht-absorbierenden Peak von ChlA (bei 435 nm) normiert, um die Verhältnisse der Photopigmente zum ChlA jeweils miteinander vergleichen zu können. Bei den Starklicht-Proben kann man deutlich die Schwankungen der Absorption (bis zu 20%) der einzelnen Pigmentpeaks erkennen. Deshalb sollte bei zukünftigen Auswertungen von Rohdaten mehr Augenmerk auf weitere Kategorisierung der verschiedenen Lebensabschnitte (früh/spät, trübe/klare Kultur, kurze/lange Filamente usw.) einer *Trichodesmium*-Chemostat-Kultur gelegt werden. Auch bei sehr konstanten Werten der täglichen OD₇₅₀-Messungen, Medium-Zuflussraten etc., scheine sich die physiologischen Wachstumsbedingungen in den Chemostaten von Tag zu Tag zu ändern. Auch die visuellen Eindrücke bestätigen diese Annahme. Zuweilen veränderte sich die Farbe der Kulturen von rötlich-braun zu gelblich-grün, ohne dass die Fitness beeinflusst schien. Dies kann durch die allmählich in der Kultur akkumulierenden Stoffwechsel- und Abbauprodukte erklärt werden, da sie eventuell, zusätzlich im Medium herumtreibend, Teile oder bestimmte Wellenlängen des Lichts absorbieren, was die Produktion der Pigmentkomposition beeinflusst.

4.3.4.3. *In vitro*-Absorptionsspektren der PBS-löslichen Phycobiliproteide Starklicht-gestresster Kulturen

Zur Konzentrationsbestimmung der verschiedenen PBPs wurden diese zuerst in PBS gelöst bzw. isoliert. Die damit anschließend gemessenen *in vitro*-Absorptionsspektren (Material u. Methoden) standen somit zur Auswertung mit der neuen Methode von Küpper (Kupper, Seibert *et al.* 2007) bereit. Leider waren aufgrund von Zeitmangel die verschiedenen PBPs bis zum Ende dieses Projekts nicht einzeln bzw. hochrein (via HPLC) aus *Trichodesmium*

isolierbar. Somit konnten dem Programm nicht alle nötigen Standardspektren der PBPs zur Analyse bereitgestellt werden, sodass letztlich eine Quantifizierung dieser Photopigmente nicht möglich war.

Jeweils gemittelte Beispiele für solche Gesamt-Absorptionsspektren sind im Ergebnisteil in Abb. 3.7.2 vorgestellt. Die Einzelspektren sind Tagesdurchschnitte der Starklicht-gestressten Kultur („HL“), bzw. der Kontrolle mit normaler Belichtung („LL“). Die Absorption von PUB (um 490 nm) bzw. PE (um 540 nm) ist in beiden Kulturen gleich stark. Die Starklicht-gestresste Kultur zeigt allerdings im Bereich von PC (um 620 nm) ca. 10% mehr Absorption. Dies könnte eine Anpassung an die Starklichtbedingungen sein. In diesem Zusammenhang könnte die Menge an PC, welches bei PBP-Kopplung den Energietransfer von den „vorgeschalteten“, kurzwelligeren PBPs zu den Reaktionszentren vermittelt, ein Maß für die Lichtintensität sein. Die Menge an PUB und PE bleibt dagegen vom Licht relativ unbeeinflusst. Bei steigender Lichtstärke steigt demnach nur die PC-Konzentration, sodass PUB-PE-Komplexe vermehrt über PC Verbindung zu den Reaktionszentren eingehen können.

Die relativ stark erhöhte Absorption, der Starklicht-gestressten Kultur in der linken Flanke bei 450 nm, ist wahrscheinlich mit der relativ hohen Anzahl von Starklicht-Stress-bedingten Abbauprodukten zu erklären, die im UV-Bereich absorbieren.

4.3.5. Pigmentgehalt von *Trichodesmium* im Tagesverlauf

Im Ergebnisteil ist in Abb. 1.7.1 der Tageszyklus der acetonlöslichen Photopigmente einer ungestressten *Trichodesmium*-Kultur gezeigt (Kupper, Šetlík *et al.* 2008).

Die Konzentrationen der Chlorophylle, sowie der β -Karotin-ähnlichen Karotinoide steigen beide mit ähnlichen Wachstumsraten bis zum Mittag konstant auf ca. doppelte Werte an. Zum Abend hin, wenn das Licht wieder weniger stark ist, sinkt die Konzentration aller Chlorophylle wieder leicht, und steigt auch nur kaum zur Nacht hin an. Die Konzentration der β -Karotin-ähnlichen Karotinoide steigt dagegen zum Abend hin weiter leicht an und sinkt nur unbedeutend zur Nacht hin ab. Die Konzentrationsentwicklung der beiden Pigmentgruppen bis zum Mittag jeweils, korreliert also positiv mit der Lichtintensität. Die Produktion der zwei Gruppen wird aber nur kaum bis zur Nacht hin eingestellt. Solange ausreichend Licht für die Photosynthese vorhanden ist, steigen auch die Konzentrationen weiter an. Die Zyklus-Kurven beschreiben quasi, jeweils positiv korrelierend, das Integral aus der sinusoidalen Funktion der Lichtstärke, in Abhängigkeit von der Tageszeit.

Einen anderen Tageszyklus zeigen die Keto-Karotinoide. Durch die allgemein geringe Konzentration ist der Zyklus nur schwer darstellbar. Mit Hilfe der logarithmisch aufgeteilten y-Achse ist er dennoch zu erkennen. Die Konzentration sinkt zuerst bis zum Morgen hin ab, steigt darauf wieder über den Mittag-, und bis zum Abend auf den Ausgangswert des Zeitpunkts „Dawn“ an. Zur Nacht hin sinkt die Konzentration wieder dramatisch um ca. 1/3.

Die Abbildung zeigt außerdem noch den Tageszyklus der Konzentration von PheophytinA (ChlA ohne Mg^{2+} -Ion) im Vergleich zur Konzentration aller Chlorophylle. Bis zum Morgen steigt dieses Verhältnis schnell auf beinahe den dreifachen Wert an. Es bleibt auch zum Mittag hin relativ unverändert. Zum Abend hin sinkt das Verhältnis von PheophytinA zu den Chlorophyllen wieder fast auf den Anfangswert ab. Doch zur Nacht folgt ein erneutes signifikantes Ansteigen. Dieser Zyklus lässt sich wie folgt erklären: Wenn das Licht zum Morgen hin stärker wird, steigt auch der Anteil der Chlorophyllkomponente Pheophytin an. Dieses Verhältnis bleibt bis zum Mittag konstant, da das Licht immer noch stärker wird und immer noch ChlA produziert wird. Zum Abend hin, wenn das Licht wieder schwächer wird, ist die Chlorophyllkonzentration für maximale Photosynthese ausreichend, sodass die Produktion langsam eingestellt wird bzw. das Verhältnis von Pheophytin / Chlorophylle stark absinkt. Das erneute Ansteigen zur Nacht hin ist vermutlich auf den Abbau überflüssiger Chlorophyllmoleküle in PheophytinA und Mg^{2+} -Ionen zurückzuführen.

Diese Form der Kurve des Tageszyklus ist auch beim Verhältnis von *cis*-Zeaxanthin, β -Karotin, und β -Cryptoxanthin zur Gesamtkonzentration von Zeaxanthin, β -Karotin, und β -Cryptoxanthin (gelb), sowie beim Verhältnis der Chlorophyllkonzentration zur Konzentration aller Karotinoide (grün), zu sehen. Sie resultiert aus der Normierung der Pigmentkonzentrationswerte mit den Werten der jeweiligen Pigmentgruppen. Weitere Schlussfolgerungen über Abhängigkeiten der Pigmentzyklen und über das Verhältnis der Konzentrationen der Keto-Karotinoide zur Gesamtheit aller Karotinoide wurden in Küpper *et al.* (Küpper, Šetlík *et al.* 2008) diskutiert.

Zur Erstellung noch aussagestärkerer Graphen müsste ein Vielfaches an Zellen gemessen werden. Außerdem sollte jede Probenahme bzw. Einzelmessung doppelt oder besser 3-fach ausgeführt werden, um verfälschende Ausreißer in den Werten (bei Unfällen während-, bzw. durch Fehlerfortpflanzung bei der Durchführung der vielen Präparationsschritte) sofort auszusortieren, oder um fundierte statistische Mittelwerte zu erlangen.

4.3.6. Pigmentgehalt von *Trichodesmium* im Tagesverlauf unter Starklicht-Stress

Im Methodenteil (Kupper, Seibert *et al.* 2007) ist beschrieben, wie durch das „Fitting“ der *in vitro*-Absorptionsspektren, von Gesamt-Pigmentisolaten gestresster *Trichodesmium*-Chemostat-Kulturen, mit Sets verschiedener „Gauss-Peak“-Kombinationen (Pigment-Standards), die Konzentration der wichtigsten Aceton-löslichen Photopigmentgruppen bestimmt wurde.

Im Ergebnisteil in Abb. 3.8.1, bzw. 3.8.2 ist jeweils der Tageszyklus der Konzentrationen dieser Aceton-löslichen Photopigment-Gruppen, durch Einzel-Histogramme der 5 verschiedenen Mess-, bzw. Tageszeiten aufgezeigt. Es ist augenscheinlich, dass neben ChlA, die β -Carotin-ähnlichen Pigmente und *cis*-Zeaxanthin zu jeder Tageszeit dominieren, bzw. mit sehr ähnlichen Konzentrationen vertreten sind.

In Pflanzen spielt Zeaxanthin eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von Licht in Wärme, um bei hoher Strahlungsintensität keinen Schaden zu nehmen. Bei der Photosynthese schützen Carotinoide-, wie auch β -Carotin-ähnliche Pigmente (mit ähnlichem Grundgerüst) vor schädlichen Auswirkungen der UV-Strahlen. In den Wurzeln von Pflanzen gebildet, übernehmen sie dort den Schutz vor Infektionen. Eine generell Zell-schützende Wirkung als Antioxidantien, kann ihnen aber mit Sicherheit zugeschrieben werden.

Drei weitere Pigmente, bzw. Pigmentgruppen ähnlicher Konzentration, sind ebenfalls vorgestellt. Sie sind wesentlich schwächer konzentriert aber ebenso wichtig. PheophytinA (ChlA ohne Mg^{2+} -Ion) spielt eine wichtige Rolle in den PS II-RC. Mitverantwortlich für die Färbung von Cyanobakterien ist *trans*-Myxoxanthophyll, welches normalerweise in den Membranen der Zellwand lokalisiert ist. Nach Untersuchungen an *Synechocystis* ist es auch ferner mit für die korrekte Funktionserhaltung der Thylakoid-Membranen in Chloroplasten verantwortlich (Mohamed, van de Meene *et al.* 2005). Weiterhin scheint Myxoxanthophyll-, ähnlich wie auch das verwandte Zeaxanthin in höheren Pflanzen, Schutzfunktion für den Photosyntheseapparat zu haben (Domonkos, Malec *et al.* 2009). Allgemein tragen Xanthophylle Sauerstoffatome in Form von Hydroxy-, Keto- und Epoxy-Gruppen an ihren Ionon-Ringen. Xanthophylle mit Keto-Gruppen an den C(4) und C(4') Positionen, sogenannte Ketocarotinoide (oder auch Keto-Karotinoide) werden hauptsächlich von Algen, beispielsweise von *Haematococcus pluvialis* synthetisiert (Goodwin and Jamikorn 1954) und sind ebenso in Abb. 3.8.1 bzw. 3.8.2 vorgestellt.

Zum besseren Verständnis des Tageszyklus der einzelnen Pigmentgruppen ist in Abb. 3.8.2 jeweils eine Zusammenfassung der entsprechenden Histogramme der verschiedenen Tageszeiten aus Abb. 3.8.1 dargestellt. Die Konzentration des wichtigsten Pigments, Mg-ChlA, steigt in der Niedriglicht-Kultur (Kontrolle), ab dem Anschalten des Lichts („Dawn“) bis zum Morgen („Morning“) hin, auf beinahe den doppelten Wert an. In der Starklicht-gestressten Kultur sinkt sie allerdings sogar ein wenig ab. Je mehr Licht vorhanden ist, desto mehr ChlA wird scheinbar synthetisiert. Ab einem gewissen Punkt ist die Ausbeute des Photosyntheseapparates aufgrund physiologischer Gründe limitiert, d.h. es wird weiter kein ChlA produziert, da die maximale Lichtaufnahmefähigkeit (wie in der „HL“-Kultur) erreicht ist. Ist wiederum Licht im Überfluss vorhanden, wie zum Mittag hin („Noon“: „LL“, $\sim 300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; „HL“, $\sim 830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), wird sogar die Konzentration von Mg-ChlA scheinbar verringert. In der Starklicht-Variante auf zwei Drittel, des „Dawn“-Wertes, und in der Niedriglicht-Kultur sogar um die Hälfte des ersten Anstiegs. Inwiefern bei dieser Entwicklung die Degradation der Chlorophylle durch zu starke UV-Strahlung eine Rolle spielt oder einfach nur der normale Bedarf an ChlA durch den normalen Stoffwechsel vermittelt wurde, kann durch dieses Ergebnis nicht eindeutig geklärt werden. Dieser signifikante Abbau des O_2 -Produktions-antreibenden Pigments kann auch eine Art der Regulierung der N_2 -fixierenden, O_2 -sensitiven Nitrogenase sein. Bei gesteigerter O_2 -Veratmung um die Mittagszeit, kombiniert mit reduzierter O_2 -Produktion, wäre N-Fixierung auch denkbar. In beiden Kulturen steigt allerdings die Konzentration wieder bis zum Abend hin, negativ korrelierend mit der sinkenden Lichtintensität, relativ stark an. Zur Nacht hin, wenn das Licht gerade ausgegangen ist, sinkt sie wieder in beiden Kulturen auf auffällig ähnliche Werte ab. Man könnte daher unterstellen, dass es keine längerfristige Adaption der ChlA-Produktion auf Starklicht in *Trichodesmium* gibt. Allerdings sind die Fehlerbalken der verschiedenen Tageszeiten (arithmetisches Mittel aus 4 Messtagen, siehe Abb. 3.8.1) zu hoch um eindeutige Aussagen treffen zu können. Außerdem ist die Konzentration vor dem Anschalten des Lichts in den zwei Kultivierungsvarianten unterschiedlich hoch, was ebenso dagegen spricht. Im Allgemeinen, bzw. wenn jeweils alle Konzentrations-Messwerte der verschiedenen Tageszeiten gemittelt sind, besitzt die Niedriglicht-Kontroll-Kultur ca. 15% mehr ChlA als die Starklicht-Gestresste.

PheophytinA (ChlA ohne Mg^{2+} -Ion) zeigt in geringer Konzentration in beiden Kulturen einen sehr ähnlichen Tageszyklus wie ChlA. Die Konzentration sinkt in beiden Kulturen stetig bis zum Mittag leicht ab; steigt dann zum Abend hin leicht an und sinkt ebenso leicht zur Nacht

hin wieder ab. Dieser Zyklus verläuft völlig konform mit der vorherigen Annahme der Adaption der ChlA-Konzentration an die Lichtintensität, durch Produktion und Degradation dieses Pigments. PheophytinA scheint als Pool bis zu einer gewissen Konzentration vorhanden zu sein. Soll die ChlA-Synthese gesteigert werden, bedient sich *Trichodesmium* scheinbar zuerst aus diesem Pool, sodass die Konzentration sinkt. Wird kein ChlA mehr benötigt, scheint die Produktion von PheophytinA wieder den Pool bis zum normalen Level aufzufüllen. Da außerdem die Konzentration in der Starklicht-gestressten Kultur, im Gegensatz zur Kontrolle, zum Mittag sogar leicht ansteigt, könnte man zusätzlich auch auf eine eventuelle Kompensation der durch UV-Licht zerstörten Chlorophylle schließen, was deutlich die extreme Stresssituation durch „High Light“ verbildlicht.

Die Gruppe, der Pigmentmoleküle mit β -Karotin-ähnlichem Grundgerüst, beschreibt in der Niedriglicht-Kultur, vermutlich aufgrund der Schutzfunktion für ChlA, einen entsprechend ähnlich verlaufenden Tageszyklus der Konzentration. Die Intensität der Veränderungen zu den verschiedenen Tageszeiten ist allerdings geringer ausgeprägt als im entsprechenden ChlA-Zyklus. Im Vergleich zum leichten Sinken in der Kontroll-Kultur („LL“; Niedriglicht), sinkt in der entsprechenden Starklicht-Kultur die ChlA-Konzentration zum Morgen hin relativ stark ab. Scheinbar ist *Trichodesmium* durch das rasche Ansteigen der Lichtintensität in der Starklicht-gestressten Kultur mit der Produktion der Pigmente überfordert. Die schädigende Wirkung von Starklicht degradiert also mehr Pigment als gebildet werden kann. Zum Mittag hin, wenn das Licht am stärksten ist, scheint zumindest die Produktion, der β -Karotin-ähnlichen Pigmente, die Übermacht gegen das Licht „gewonnen“ zu haben, was durch einen relativ starken Anstieg dokumentiert ist. Außerdem haben in der Niedriglicht-Kultur, die Konzentrationen der β -Karotin-ähnlichen Pigmente bzw. von ChlA, erstaunlich ähnlich hohe Niveaus. Es scheint also, dass hier die Starklicht-Adaption vermittelnden Proteine zum Mittag hin völlig expremiert werden. Bestätigend steigt, zum Abend hin, wenn die Lichtintensität wieder sinkt, die Konzentration der β -Karotin-ähnlichen Pigmente, positiv korrelierend mit der entsprechenden ChlA-Konzentration der Niedriglicht-Kultur, noch stärker an. Die Konzentration verändert sich bis kurz nach dem Ausschalten des Lichts kaum weiter. Die Adaption der β -Karotin-Produktion an sinkende Lichtintensitäten, scheint der von ChlA etwas hinterher zuhängen oder einfach etwas länger zu dauern.

Cis-Zeaxanthin, welches in beiden Kultivierungstypen durch seine wichtige Schutzfunktion jeweils in ähnlicher Konzentration, wie die anderen dominanten Pigmentgruppen vorliegt, zeigt einen etwas anderen Tageszyklus. In beiden Kultivierungsarten steigt die Konzentration

bis zum Morgen an. In der Niedriglicht-Kultur steigt sie um die Hälfte-, und in der Starklicht-gestressten Kultur immerhin um ein Viertel des entsprechenden „Dawn“-Werts an. Die Produktion von *cis*-Zeaxanthin in der Starklicht-gestressten Kultur scheint sich also schneller zu adaptieren. Zum Mittag hin steigt dann die Konzentration in beiden Kulturtypen langsamer. Trotz der maximalen Lichtstärke zum Zeitpunkt „Noon“ und dem damit verbundenen Einbruch der ChlA-Konzentration bzw. Energieproduktion, scheint die Produktion dieses Schutzpigments weiterzulaufen. Dennoch ist sie in der Starklicht-gestressten Kultur, vermutlich aufgrund von Energiemangel, schwächer als in der Kontrolle ausgeprägt. Bis zum Abend wenn das Licht wieder weniger intensiv ist, erreichen beide Kulturtypen ihren Maximalwert in der *cis*-Zeaxanthinkonzentration. In der Starklicht-gestressten Kultur ist der Anstieg extrem stark. Da zum Abend hier auch die ChlA-Konzentration ansteigt, steht vermutlich wieder ausreichend Energie zur Verfügung, sodass die wichtigsten Schutzpigmente wieder häufiger produziert werden können. Zur Nacht hin sinkt die Konzentration, korrelierend mit dem Absinken der Lichtintensität und dem Lichtschutzbedarf ab.

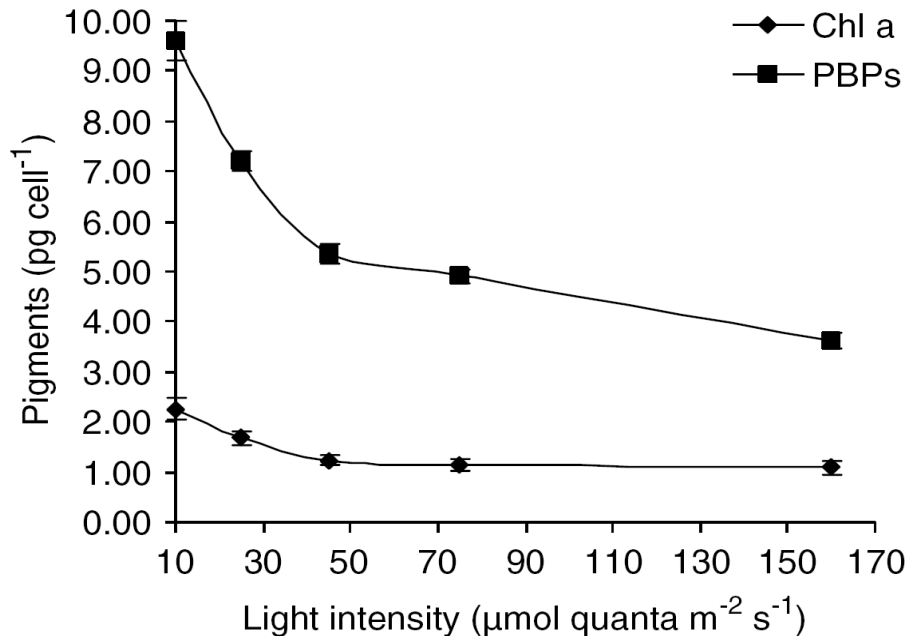
Die Tageszyklen von *trans*-Myxoxantophyll und der Keto-Karotinoide lassen aufgrund ihrer geringen Konzentrationen bzw. deren Veränderungen, und auch aufgrund der Fehlerbalken kaum signifikante Aussagen zu. Auffällig ist das relativ starke Ansteigen der beiden Pigmentkonzentrationen in der Starklicht-Kultur zum Morgen hin. Dies könnte eine alternative Adaption auf Starklicht sein um die dominierenden wichtigeren Pigmentgruppen bei der Lichtschutzaufgabe zu entlasten. Zum Mittag hin sinkt die Konzentration von *trans*-Myxoxantophyll in der Starklicht-Kultur wieder ungefähr auf Anfangsniveau-, die der Keto-Karotinoide hingegen nur leicht ab. Im Gegensatz zu *trans*-Myxoxanthophyll, sind hier die Keto-Karotinoide am Abend relativ stark vertreten, was vermutlich auf den hohen Lichtschutzbedarf der Starklicht-Kultur zurückzuführen ist.

Im Allgemeinen scheint die Starklicht-gestresste Kultur ($830 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) weniger Gesamtpigment als die entsprechende Kontrolle ($330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) auszubilden. Im Fall von ChlA ist dies aufgrund der höheren Verfügbarkeit an Photonen nicht verwunderlich. Die anderen Schutzpigmente dagegen sollten aber im Vergleich zur Kontrolle stärker erhöht sein. Da dies nicht der Fall ist, drängt sich der Verdacht auf, dass die Lichtintensität des Starklichts eventuell zu hoch gewählt wurde, sodass die Werte eher ein nekrotisch / „apoptotisches“ Sterben von *Trichodesmium* beschreiben. Das sehr frühe Absinken der ChlA-, und β -Karotin-Konzentrationen zum Morgen hin, sowie der starke Einbruch der ChlA-Konzentration am

Mittag in beiden Kultivierungsvarianten (Abb. 3.8.2a) bzw. b)), unterstützt diese Vermutung außerdem.

In der Arbeit von Peter R.F. Bell und Fei-Xue Fu (Fu and Bell 2003) ist die Photoinhibition von *Trichodesmium* bei verschiedenen Licht-Qualitäten, bzw. -Intensitäten untersucht.

Fig. 4.3.6.1



Figur 4.3.6.1: Pigmentgehalt in Abhängigkeit zur Lichtintensität (Fu and Bell 2003)

Die Ergebnisse (wie zu Fig. 4.3.6.1) zeigen bereits Photoinhibition bei Intensitäten unterhalb von $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, der in dieser Arbeit gewählten, maximalen Intensität der Niedriglicht-Kultur („Low Light“-, Kontroll-Kultur) am Mittag. Übertragen heißt das, dass unser Starklichtstress („HL“) viel zu hoch angesetzt ist, um noch physiologisch konstante, bzw. zielführende Ergebnisse liefern können. Sie würden stets von den drastisch schwankenden Effekten des Sterbens überlagert bzw. verfälscht werden. Ferner wären in dem Fall unsere Kontroll-Kultivierungsbelichtung („LL“) bereits Starklicht-Stress für *Trichodesmium*, und echte Kontroll-Kulturen in den Experimenten nie gemessen worden! Allerdings wurde das Licht bei Bell abrupt angeschaltet, was den niedrigen Photoinhibitionslevel auch erklären kann.

Das Herunterregulieren der ChlA-Konzentration, um die Nitrogenase durch verminderten O_2 -Gehalt zu aktivieren, ist jedoch weiterhin denkbar. Eventuell ist der starke Einbruch der ChlA-Konzentration am Mittag in beiden Kultivierungsvarianten (Abb. 3.8.2a) bzw. b)) durch die langsame Adaption der β -Karotinproduktion an Starklicht reguliert. Ist kein schützendes Pigment vorhanden, ist das somit „nackte“ ChlA der UV-Degradation schutzlos ausgeliefert.

Um diese Frage eindeutig zu klären sollten noch weitere, sehr viel schwächere Kultivierungslicht-Intensitäten getestet werden. Die Untersuchung noch stärkere Lichtintensitäten bei der Kultivierung erscheint nicht sinnvoll, da die Kulturen bei $830 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, häufiger als bei $330 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, vorzeitig zu Grunde gingen. Sie schienen augenscheinlich am Existenzminimum zu leben, was sich durch Trübung der Kulturen, sowie durch kurze und inaktive Filamente (mit wenig „Bewegungsdrang“) manifestierte.

In weiteren Experimenten wie z.B.: im Ergebnisteil in Abb. 3.8.3 ist die Starklichtstress-vermittelte Reduktion des Pigmentgehalts (im Tagesmittel) noch deutlicher zu sehen. ChlA ist nur noch mit 1/3-, PheophytinA mit 1/4-, Myxoxanthophyll mit 2/3-, die Ketocarotinoide mit leicht über 1/3-, und *cis*-Zeaxanthin mit leicht mehr als die Hälfte der entsprechenden Kontroll-Konzentration vorhanden. Nur die β -Karotin-ähnlichen Pigmente sind in fast doppelter Konzentration als in der Kontroll-Kultur vorhanden. Dieses Schutzpigment scheint also eine herausragende Funktion zur Rettung vor Photo-Stress in *Trichodesmium* zu haben. Wie oben schon erwähnt, war auch hier, trotz der Kultivierung in Chemostaten, die Starklicht-gestresste-Kultur bald am Absterben.

4.4. Axenische Kultivierung von *Trichodesmium*

Trichodesmium IMS101 ließ sich als Batch-Kultur nur selten länger als 2 Wochen vital am Leben erhalten. Verschiedenste Mortalitätsarten der Vor-, und Mess-Kulturen führten häufig zu unvollständigen Messreihen, bzw. zum Sinken des Vertrauens in die Aussagekraft der vorangegangenen Experimente sowie der entsprechenden Kulturen. Dies führte zum Versuch, die vermeintlich axenische (Rein-) Kultur des *Trichodesmium*-Stamms IMS101 auf Kontamination mit anderen Bakterien hin zu untersuchen und gegebenenfalls *Trichodesmium* zu isolieren.

Zum Nachweis kolonial wachsender Bakterienkontaminationen wurden 200 µl einer älteren Kultur (leicht trüb) steril ausplattiert und für 6 Tage im Brutschrank inkubiert. Mittels eines gewöhnlichen Lichtmikroskops wurden die Platten anschließend begutachtet. Dabei wurden bis zu 4 verschiedene (visuell: eine große-, drei kleine-) bakterielle Kolonietypen (kein *Trichodesmium*, siehe Fig. 2.1.3.1b)) gefunden.

Die Fig. 2.1.3.1 zeigt deutlich, dass die Filterung sämtliche Kontaminanten stark zu reduzieren vermag. Durch die Auszählung der Kolonien der 2 Platten (ungefiltert: 133 große, 5.675 kleine Kolonietypen; gefiltert: 3 große, 2 kleine Kolonietypen) konnte auf die Effizienz eines Filterschritts zurückgerechnet werden. Damit konnte darauf die Anzahl der notwendigen Filterschritte für das Erreichen der axenischen *Trichodesmium*-Kultur ermittelt werden. Demnach musste mehr als 10mal in der Art gefiltert werden um alle Kontaminanten in 250 ml (1Batch-Kulturflasche) bei 5 ml Inokulation zu entfernen. Die entsprechend 11mal (1mal-, bzw. 0mal-) gefilterten 5ml der Stammkultur wurden jeweils in 250 ml überführt und neu angezogen.

Durch die axenische Filterung allerdings konnten keine wesentlichen Verbesserungen bei der Fitness erzielt werden. Die Kulturen wuchsen auch nicht besser als ihre kontaminierten Varianten. Vielmehr schien der Stress bei der Filterung die Zellen zusätzlich zu schädigen; da die entsprechende angeimpfte (axenische) Kultur deutlich schlechter heranwuchs als die ungefilterte Kultur. Es kam der Eindruck auf, dass die Kontaminanten eher symbiotischen Charakter haben, woraufhin die Filterversuche zur Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase bzw. der Messbarkeit eingestellt wurden.

5. Referenzen

- Adams, D. G. (2000). "Heterocyst formation in cyanobacteria." Curr Opin Microbiol **3**(6): 618-624.
- Behrenfeld, M. J. and Z. S. Kolber (1999). "Widespread iron limitation of phytoplankton in the south pacific ocean." Science **283**(5403): 840-843.
- Bergman, Gallon JR, *et al.* (1997). "N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria." FEMS Microbiol. Rev. **19**: 139-185.
- Berman-Frank, I., P. Lundgren, *et al.* (2001). "Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*." Science **294**(5546): 1534-1537.
- Berman-Frank, I., P. Lundgren, *et al.* (2003). "Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria." Res Microbiol **154**(3): 157-164.
- Berman-Frank, I., G. Rosenberg, *et al.* (2007). "Coupling between autocatalytic cell death and transparent exopolymeric particle production in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*." Environ Microbiol **9**(6): 1415-1422.
- Bialek-Bylka, G., J. B, *et al.* (2003). "Unique spectroscopic properties of synthetic 15-cis-beta-carotene, an important compound in photosynthesis, and a medicine for photoprotective function." Cell Mol. Biol. Lett. **8**: 689-697.
- Bialek-Bylka, G., F. R, *et al.* (1998). "15-cis-carotenoids found in the reaction center of a green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* and the photosystem I reaction center of a cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*." Photosynth. Res. **58**: 135-142.
- Bialek-Bylka, G., H. T, *et al.* (1996). "15-cis-b-carotene found in the RC of spinach PS I " Photosynth. Res. **49**: 245-250.
- Bialek-Bylka, G., T. T, *et al.* (1995). "15-cis-b-carotene found in the reaction center of spinach PS II." FEBS Lett. **363**: 137-140.
- Biggins, J. and D. Bruce (1989). "Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins." Photosynthesis research **20**(1): 1-34.
- Bilger, W. and O. Björkman (1990). "Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*." Photosynthesis research **25**(3): 173-185.
- Bresinsky, A. K., C. Kadereit, J.W, Neuhaus, G.; Sonnewald, U. (2008). "Strasburger - Lehrbuch der Botanik."
- Brown, C. M. and C. G. Trick (1992). "Response of the cyanobacterium, *Oscillatoria tenuis*, to low iron environments: the effect on growth rate and evidence for siderophore production " Arch Microbiol **157**: 349-354.
- Campbell, D., V. Hurry, *et al.* (1998). "Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **62**(3): 667-683.
- Capone, D., J. Burns, *et al.* (2005). "Nitrogen fixation by *Trichodesmium spp.*: An important source of new nitrogen to the tropical and sub-tropical North Atlantic Ocean. ." Global Biogeochemical Cycles **19**.
- Capone, D. G. (2001). "Marine nitrogen fixation: what's the fuss?" Curr Opin Microbiol **4**(3): 341-348.
- Capone, D. G. and E. J. Carpenter (1982). "Nitrogen fixation in the marine environment." Science **217**(4565): 1140-1142.

- Capone, D. G., M. D. Ferrier, *et al.* (1994). "Amino Acid Cycling in Colonies of the Planktonic Marine Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*." Appl Environ Microbiol **60**(11): 3989-3995.
- Capone, D. G., M. O'Neil J, *et al.* (1990). "Basis for Diel Variation in Nitrogenase Activity in the Marine Planktonic Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*." Appl Environ Microbiol **56**(11): 3532-3536.
- Capone, D. G., J. Zehr, *et al.* (1977). "*Trichodesmium*: A globally significant marine cyanobacterium." Science **276**: 1221-1229.
- Carpenter, E. and T. Roenneberg (1995). "The marine planktonic cyanobacterium *Trichodesmium* spp.: photosynthetic rate measurements in the SW Atlantic ocean." Mar. Ecol. Progr. Ser. **118**: 267-273.
- Carpenter, E. J. and K. Romans (1991). "Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* in nutrient cycling in the north atlantic ocean." Science **254**(5036): 1356-1358.
- Chang, J., K.-P. Chiang, *et al.* (2000). "Seasonal variation and cross-shelf distribution of the nitrogen-fixing cyanobacterium, *Trichodesmium*, in southern East China Sea." Continental Shelf Research.
- Chellham, A. and K. Alagarwami (1978). "Blooms of *Trichodesmium thiebautii* and their effects on experimental pearl culture in the Pambau area and its effect on the fauna. ." Curr. Sci. **10**: 263.
- Chen, Y. B., B. Dominic, *et al.* (1999). "Expression of photosynthesis genes in relation to nitrogen fixation in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS 101." Plant Mol Biol **41**(1): 89-104.
- Clarke, A. K., V. M. Hurry, *et al.* (1993). "Two functionally distinct forms of the photosystem II reaction-center protein D1 in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(24): 11985-11989.
- Clarke, A. K., A. Soitamo, *et al.* (1993). "Rapid interchange between two distinct forms of cyanobacterial photosystem II reaction-center protein D1 in response to photoinhibition." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(21): 9973-9977.
- Domonkos, I., P. Malec, *et al.* (2009). "Phosphatidylglycerol depletion induces an increase in myxoxanthophyll biosynthetic activity in *Synechocystis* PCC6803 cells." Plant Cell Physiol **50**(2): 374-382.
- Ducret, A., W. Sidler, *et al.* (1994). "The complete amino acid sequence of R-phycoyanin-I alpha and beta subunits from the red alga *Porphyridium cruentum*. Structural and phylogenetic relationships of the phycocyanins within the phycobiliprotein families." Eur J Biochem **221**(1): 563-580.
- Durner, J., I. Bohm, *et al.* (1996). "Proteolytic degradation of dinitrogenase reductase from *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) as a consequence of ATP depletion and impact of oxygen." Journal of bacteriology **178**(3): 606-610.
- Ehling-Schulz, M., W. Bilger, *et al.* (1997). "UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*." Journal of bacteriology **179**(6): 1940-1945.
- Falkowski, P. G. (1997). "Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean " Nature **387**: 272-275.
- Fastner, J., R. Heinze, *et al.* (2003). "Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates." Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology **42**(3): 313-321.

- Ferimazova, N., H. Kupper, *et al.* (2002). "New insights into photosynthetic oscillations revealed by two-dimensional microscopic measurements of chlorophyll fluorescence kinetics in intact leaves and isolated protoplasts." Photochemistry and photobiology **76**(5): 501-508.
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, *et al.* (1998). "Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components." Science **281**(5374): 237-240.
- Foster, R. A., A. Subramaniam, *et al.* (2009). "Distribution and activity of diazotrophs in the Eastern Equatorial Atlantic." Environ Microbiol **11**(4): 741-750.
- Fredriksson, C. and B. Bergman (1997). "Ultrastructural characterisation of cells specialised for nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* spp." Protoplasma **197**(1): 76-85.
- Fu, F. X. and P. R. Bell (2003). "Factors affecting N fixation by the cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS101." FEMS microbiology ecology **45**(2): 203-209.
- Gallon, J. (1992). "Reconciling the incompatible: N₂ fixation and oxygen." New Phytol. **122**: 571-609.
- Genty B, B. J., Baker NR (1989). "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence." Biochim Biophys Acta **990**: 87-92.
- Ghassemian, M. and N. A. Straus (1996). "Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942." Microbiology **142** (Pt 6): 1469-1476.
- Goldman, S. J., P. J. Lammers, *et al.* (1983). "Siderophore-mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp." Journal of bacteriology **156**(3): 1144-1150.
- Goodwin, T. W. and M. Jamikorn (1954). "Studies in carotenogenesis. 11. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*." Biochem J **57**(3): 376-381.
- Guo, C. and P. A. Tester (1994). "Toxic effect of the bloom-forming *Trichodesmium* sp. (cyanophyta) to the copepod *Acartia tonsa*." Natural Toxins **2**(4): 222-227.
- Hawser, S. P., G. A. Codd, *et al.* (1991). "A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*." Toxicon **29**(3): 277-278.
- Hynes, M. A. (1998). "Diversity of the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium*: Characterization of the Woods Hole Culture Collection and Quantification of Field Populations."
- Janson, S., E. Carpenter, *et al.* (1994). "Compartmentalization of nitrogenase in a non-heterocystous cyanobacterium - *Trichodesmium contortum*." FEMS Microbiol. Letters **118**: 9-14.
- Kana, T. (1993). "Rapid oxygen cycling in *Trichodesmium thiebautii*." Limnol. Ocean. **38**: 18-24.
- Karl, D. M. (2002). "Hidden in a sea of microbes." Nature **415**(6872): 590-591.
- Katoh, H., A. R. Grossman, *et al.* (2000). "A gene of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 encoding a novel iron transporter." Journal of bacteriology **182**(22): 6523-6524.
- Katoh, H., N. Hagino, *et al.* (2001). "Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Journal of bacteriology **183**(9): 2779-2784.
- Katoh, H., N. Hagino, *et al.* (2001). "Iron-binding activity of FutA1 subunit of an ABC-type iron transporter in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." Plant & cell physiology **42**(8): 823-827.
- Kranz, S. A., O. Levitan, *et al.* "Combined effects of CO₂ and light on the N₂-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* IMS101: physiological responses." Plant Physiol **154**(1): 334-345.
- Kumar, K., R. A. Mella-Herrera, *et al.* "Cyanobacterial heterocysts." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a000315.

- Kupper, H., N. Ferimazova, *et al.* (2004). "Traffic lights in *Trichodesmium*. Regulation of photosynthesis for nitrogen fixation studied by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy." Plant Physiol **135**(4): 2120-2133.
- Kupper, H., A. Parameswaran, *et al.* (2007). "Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*." The New phytologist **175**(4): 655-674.
- Kupper, H., S. Seibert, *et al.* (2007). "Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra." Anal Chem **79**(20): 7611-7627.
- Kupper, H., I. Šetlík, *et al.* (2008). "Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation." New Phytol **179**(3): 784-798.
- Küpper, H., I. Šetlík, *et al.* (2001). "A Microscope for Two-Dimensional Measurements of *In Vivo* Chlorophyll Fluorescence Kinetics Using Pulsed Measuring Radiation, Continuous Actinic Radiation, and Saturating Flashes." Photosynthetica **38**(4): 553-570.
- Kupper, H., M. Spiller, *et al.* (2000). "Photometric method for the quantification of chlorophylls and their derivatives in complex mixtures: fitting with Gauss-peak spectra." Analytical biochemistry **286**(2): 247-256.
- Kustka, A., S. Sañudo-Wilhelmy, *et al.* (2003). "a revised estimate of the iron use efficiency of nitrogen fixation, with special reference to the marine cyanobacterium *Trichodesmium spp.* (cyanophyta)1." Journal of Phycology **39**(1): 12-25.
- Kyle, D., C. Osmond, *et al.* (1987). "Photoinhibition. In J. Barber, ed, Topics in Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, 315 pp." **9**.
- Lammers, P. J. and J. Sanders-Loehr (1982). "Active transport of ferric schizokinen in *Anabaena sp.*" Journal of bacteriology **151**(1): 288-294.
- Lantoine, F. o. and J. Neveux (1997). "Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean." Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers **44**(2): 223-246.
- Lazar, D. (1999). "Chlorophyll a fluorescence induction1." Biochimica et biophysica acta **1412**(1): 1-28.
- Leisner, J. J., J. C. Millan, *et al.* (1994). "Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish." The Journal of applied bacteriology **76**(5): 417-423.
- Leonhardt, K. and N. A. Straus (1992). "An iron stress operon involved in photosynthetic electron transport in the marine cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002." Journal of general microbiology **138 Pt 8**: 1613-1621.
- Li, B., D. Mao, *et al.* (2005). "Characterization of the cytochrome b(6)f complex from marine green alga, *Bryopsis corticulans*." Photosynthesis research **83**(3): 297-305.
- Li, B. X., P. Zuo, *et al.* (2006). "Study on energy transfer between carotenoid and chlorophyll a in cytochrome b6f complex from *Bryopsis corticulans*." Photosynthesis research **88**(1): 43-50.
- Li, Y., B. Wang, *et al.* (2004). "Spectroscopic investigation on the energy transfer process in photosynthetic apparatus of cyanobacteria." Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy **60**(7): 1543-1547.
- Lin, S., S. Henze, *et al.* (1998). "Whole-cell immunolocalization of nitrogenase in marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium spp.*" Applied and environmental microbiology **64**(8): 3052-3058.
- MacColl, R. (1998). "Cyanobacterial phycobilisomes." J Struct Biol **124**(2-3): 311-334.

- Margulis, L. (1975). "Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof." Symp Soc Exp Biol(29): 21-38.
- Masukawa, H., X. Zhang, *et al.* (2009). "Survey of the distribution of different types of nitrogenases and hydrogenases in heterocyst-forming cyanobacteria." Mar Biotechnol (NY) **11**(3): 397-409.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000). "Chlorophyll fluorescence--a practical guide." Journal of experimental botany **51**(345): 659-668.
- Meunier, P. C., M. S. Colon-Lopez, *et al.* (1997). "Temporal Changes in State Transitions and Photosystem Organization in the Unicellular, Diazotrophic Cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142." Plant physiology **115**(3): 991-1000.
- Meunier, P. C., M. S. Colon-Lopez, *et al.* (1998). "Photosystem II cyclic heterogeneity and photoactivation in the diazotrophic, unicellular cyanobacterium *cyanothece* species ATCC 51142." Plant physiology **116**(4): 1551-1562.
- Michel, K. P., P. Exss-Sonne, *et al.* (1998). "Immunocytochemical localization of IdiA, a protein expressed under iron or manganese limitation in the mesophilic cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301 and the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*." Planta **205**: 73-81.
- Michel, K. P., F. Kruger, *et al.* (1999). "Molecular characterization of idiA and adjacent genes in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strains PCC 6301 and PCC 7942." Microbiology **145 (Pt 6)**: 1473-1484.
- Michel, K. P., H. H. Thole, *et al.* (1996). "IdiA, a 34 kDa protein in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strains PCC 6301 and PCC 7942, is required for growth under iron and manganese limitations." Microbiology **142 (Pt 9)**: 2635-2645.
- Misra, H. S. and S. K. Mahajan (2000). "Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystems: a phenomenon associated with the temporal separation of photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterium, *Plectonema boryanum*." Biochimica et biophysica acta **1459**(1): 139-147.
- Misra, H. S. and R. Tuli (2000). "Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*." Plant Physiol **122**(3): 731-736.
- Mohamed, H. E., A. M. van de Meene, *et al.* (2005). "Myxoxanthophyll is required for normal cell wall structure and thylakoid organization in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Journal of bacteriology **187**(20): 6883-6892.
- Morel, F. M. and N. M. Price (2003). "The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans." Science **300**(5621): 944-947.
- Nausch, M. (1996). "Microbial activities on *Trichodesmium* colonies." Mar Ecol Prog Ser **141**: 173-181.
- Negri, A., D. Stirling, *et al.* (2003). "Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*." Chemical research in toxicology **16**(8): 1029-1033.
- Nixon, P. J., M. Barker, *et al.* (2005). "FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress." Journal of experimental botany **56**(411): 357-363.
- Ogawa, T., F. Obata, *et al.* (1966). "Two pigment proteins in spinach chloroplasts." Biochim Biophys Acta **112**(2): 223-234.
- Paerl, H. W. and B. M. Bebout (1988). "Direct measurement of o₂-depleted microzones in marine oscillatoria: relation to n₂ fixation." Science **241**(4864): 442-445.
- Paerl, H. W., L. E. Prufert-Bebout, *et al.* (1994). "Iron-Stimulated N₂ Fixation and Growth in Natural and Cultured Populations of the Planktonic Marine Cyanobacteria *Trichodesmium* spp." Appl Environ Microbiol **60**(3): 1044-1047.

- Park, Y. I., S. Sandstrom, *et al.* (1999). "Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation." Molecular microbiology **32**(1): 123-129.
- Piven, I., G. Ajlani, *et al.* (2005). "Phycobilisome linker proteins are phosphorylated in *Synechocystis* sp. PCC 6803." The Journal of biological chemistry **280**(22): 21667-21672.
- Postgate, J. (1998). "Nitrogen fixation Ed.3." Cambridge University Press.
- Prufert-Bebout, L., H. W. Paerl, *et al.* (1993). "Growth, nitrogen fixation, and spectral attenuation in cultivated *Trichodesmium* species." Appl Environ Microbiol **59**(5): 1367-1375.
- Rammamurthy, L. (1970). "Antibacterial activity traceable to the marine blue green alga *Trichodesmium erythraeum* in the gastro-intestinal contents of two pelagic fishes." Hydrobiologia Volume 41, Number 2, 247-250, DOI: 10.1007/BF00016449
- Raven, J. A., M. C. W. Evans, *et al.* (1999). "The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O-evolving organisms." Photosynthesis research **60**(2): 111-150.
- Reddy, K. J., G. S. Bullerjahn, *et al.* (1988). "Cloning, nucleotide sequence, and mutagenesis of a gene (*irpA*) involved in iron-deficient growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942." Journal of bacteriology **170**(10): 4466-4476.
- Roháček, K. (2002). "Chlorophyll Fluorescence Parameters: The Definitions, Photosynthetic Meaning, and Mutual Relationships." Photosynthetica **40**(1): 13-29.
- Rueter, J. G., K. Ohki, *et al.* (1990). "the effect of iron nutrition on photosynthesis and nitrogen fixation in cultures of *Trichodesmium* (cyanophyceae)1." Journal of Phycology **26**(1): 30-35.
- Schreiber, E. (1927). "Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers." Wiss. Meeresuntersuch., N.F. **10**: 1-34.
- Schreiber, U., U. Schliwa, *et al.* (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." Photosynth. Res. **10**: :51 - 62.
- Šetlíková, E., I. Šetlík, *et al.* (2005). "The photosynthesis of individual algal cells during the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda* studied by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy." Photosynthesis research **84**(1-3): 113-120.
- Sherman, L. A., P. Meunier, *et al.* (1998). "Diurnal rhythms in metabolism: A day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium." Photosynthesis research **58**(1): 25-42.
- Sroga, G. E., U. Landegren, *et al.* (1996). "Isolation of *nifH* and part of *nifD* by modified capture polymerase chain reaction from a natural population of the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp." FEMS microbiology letters **136**(2): 137-145.
- Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, *et al.* (2006). "The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria 4 3rd Ed ".
- Subramaniam, A., E. J. Carpenter, *et al.* (1999). "Bio-optical properties of the marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. II. A reflectance model for remote sensing." Limnol. Oceanogr. **44**(3): 618-627.
- Subramaniam, A., E.J. Carpenter, D. Karenz and P.G. Falkowski. (1999). "Bio-optical properties of the marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. I. Absorption and photosynthetic action spectra. ." Limnol. Oceanogr. **44**: 618-627.
- Sudek, S., M. G. Haygood, *et al.* (2006). "Structure of trichamide, a cyclic peptide from the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predicted from the genome sequence." Applied and environmental microbiology **72**(6): 4382-4387.
- Suvapepun, S., T. Okaichi, *et al.* (1989). "Occurrences of red tide in the Gulf of Thailand." Biology, Environmental Science and Toxicology: 41– 44.

- Trick, C. G., S. W. Wilhelm, *et al.* (1995). "Alterations in cell pigmentation, protein expression, and photosynthetic capacity of the cyanobacterium *Oscillatoria tenuis* grown under low iron conditions." Canadian journal of microbiology **41**(12): 1117-1123.
- Tuit, C., J. Waterbury, *et al.* (2004). "Diel variation of molybdenum and iron in marine diazo- trophic cyanobacteria." Limnol. Oceanogr. **49**: 978–990.
- Urania Pflanzenreich, N. P. (1997). " Urania Pflanzenreich. Niedere Pflanzen 2."
- Van Baalen, C. and R. M. Brown, Jr. (1969). "The ultrastructure of the marine blue green alga, *Trichodesmium erythraeum*, with special reference to the cell wall, gas vacuoles, and cylindrical bodies." Arch Mikrobiol **69**(1): 79-91.
- Wang, W. and R. Dei (2003). "Bioavailability of iron complexed with organic colloids to the cyanobacteria *Synechococcus* and *Trichodesmium*." Aquat.Microbial.Ecol. **33**: 247-259.
- Webb, E. A., J. W. Moffett, *et al.* (2001). "Iron stress in open-ocean cyanobacteria (*Synechococcus*, *Trichodesmium*, and *Crocospaera spp.*): identification of the IdiA protein." Applied and environmental microbiology **67**(12): 5444-5452.
- Webb, R., T. Troyan, *et al.* (1994). "MapA, an iron-regulated, cytoplasmic membrane protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC7942." Journal of bacteriology **176**(16): 4906-4913.
- Wenk, S. O., D. Schneider, *et al.* (2005). "Functional implications of pigments bound to a cyanobacterial cytochrome b6f complex." The FEBS journal **272**(2): 582-592.
- Westberry, T. and D. Siegel (2006). "Spatial and temporal distribution of *Trichodesmium* blooms in the world's oceans. ." Global Biogeochemical Cycles **20**.
- Woese, C. R. (1977). "Endosymbionts and mitochondrial origins." J Mol Evol **10**(2): 93-96.
- Wunschiers, R., H. Senger, *et al.* (2001). "Electron pathways involved in H(2)-metabolism in the green alga *Scenedesmus obliquus*." Biochim Biophys Acta **1503**(3): 271-278.
- Zahalak, M., B. Pratte, *et al.* (2004). "Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413." Mol Microbiol **51**(2): 539-549.
- Zehr, J. P., D. Harris, *et al.* (1997). "Structural analysis of the *Trichodesmium* nitrogenase iron protein: implications for aerobic nitrogen fixation activity." FEMS Microbiol Lett **153**(2): 303-309.
- Zehr, J. P., M. Mellon, *et al.* (1995). "Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat." Appl Environ Microbiol **61**(7): 2527-2532.
- Zehr, J. P., J. B. Waterbury, *et al.* (2001). "Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean." Nature **412**(6847): 635-638.
- Zehr, J. P., M. Wyman, *et al.* (1993). "Modification of the Fe Protein of Nitrogenase in Natural Populations of *Trichodesmium thiebautii*." Appl Environ Microbiol **59**(3): 669-676.

6. Anhang

Zusammenfassung

Die Stickstoff-Fixierung von Cyanobakterien ist in der Natur einer der wichtigsten Prozesse und Grundlage für das Leben höherer Organismen. Das wichtigste Enzym ist dabei die Nitrogenase, welche unter Sauerstoffanwesenheit irreversibel gehemmt ist. Das filamentöse Cyanobakterium *Trichodesmium erythraeum* ISM101 betreibt Stickstoff-Fixierung während des Tages in denselben Zellen, aber ohne spezielle Kompartimentierung- oder anstatt Verlegung dieses Prozesses in die Nacht, wie bei anderen Vertretern seiner Gattung. Das korrelierende Auftreten von Zellen oder Filamentbereichen mit erhöhter Grundfluoreszenz während der diazotrophen Phase schien dabei durch die Entkopplung der Phycobilisomenuntereinheiten vermittelt zu sein. Die O₂-Produktion könnte dadurch vermindert und die N₂-Fixierung ermöglicht werden.

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Aktivitätszustände von *Trichodesmium* und deren Veränderungen auf Einzelzellebene über den Tag untersucht, um die grundlegenden Mechanismen dieser Regulation der Photosynthese für das Nicht-Inhibieren der Nitrogenase aufzuschlüsseln. Darüberhinaus wurden die Effekte von abiotischen Stress wie zum Beispiel Starklicht und Fe-Mangel untersucht.

Die N₂-Fixierung der Filamente am Tag wurde via Acetylenreduktion und Gas-Chromatographie verfolgt. Die Fixierungsrate korrelierte dabei mit dem erwarteten sinusoidalen Intensitätszyklus der Kultivierungsbelichtung, welcher die Natur imitiert. Unter Starklicht-Stress wurde sie in vielen Fällen um die Mittagszeit leicht reversibel abgeschwächt.

Zur Untersuchung der Photosynthese wurde das Hauptaugenmerk der Studien auf das Erstellen und Auswerten von Chlorophyll-Fluoreszenz-Kinetiken gelegt. Diese wurden durch zwei-dimensionale („imaging“, bildgebende) Mikroskopmessungen mit unterzellulärer Auflösung realisiert. Die Grundfluoreszenz F₀, als Maß für den Aktivitätszustand, korrelierte bei Batch-Kultivierung häufig mit der Sterblichkeitsrate und dem Verkürzen der Filamente von *Trichodesmium*. Dies führte selbst unter Kontroll-Bedingungen häufig zum frühen Absterben der zu messenden Kulturen, und ließ uns daher die Fitness-verbessernde Kultivierung in Chemostaten etablieren. Das erwartete Korrelieren von erhöhten F₀-Werten einzelner Zellen speziell um die Mittagszeit konnte nicht reproduziert werden. Die in der Literatur beschriebene Gruppenbildung dieses Fluoreszenz-Kinetik-Parameters konnte aber je nach Tageszeit in Position und relativer Ausdehnung genauer definiert werden. Unabhängig

von der Tageszeit schien dabei allgemein die Batch-Kultivierung und besonders Stresseinfluss bei einzelnen Zellen bzw. ganzen Filamentbereichen vielfach erhöhte Grundfluoreszenzen hervorzurufen. Reversible Aktivitätszustandsänderungen konnten bei diesen Zellen nicht beobachtet werden. Vielmehr wies das häufig beobachtete Platzen und Auslaufen solcher Zellen, infolge schrittartigem starken Aufleuchten ihrer Fluoreszenz, auch über den „bright II“-Zustand hinaus, auf apoptotische Prozesse hin. Diese „nekrotische Apoptose“ könnte funktionell zum Auflösen der an der Wasseroberfläche treibenden Blüte-Teppiche dienen. Vor allem unter Eisenmangel konnte in Tagesgesamthistogrammen deutlich eine Verschiebung der Hauptgruppe in Richtung niedere F_0 -Werte, sowie eine diffusere Variation der Zellanzahlen benachbarter F_0 -Intervalle in der, einer Gauss'schen Glockenkurve ähnelnden Verteilung aller physiologisch aktiven Zellen beobachtet werden.

Durch weitere Adaptionen am Fluoreszenz-Kinetik-Mikroskop konnten dieselben Zellen *in vivo* direkt im Anschluss an die Fluoreszenz-Kinetik-Messungen auch für spektrale Studien der UV/VIS-Fluoreszenz und Absorption verwendet werden. Zusätzlich wurden auch räumlich (spektral) aufgelöste Fluoreszenz-Kinetiken einzelner Zellen messbar. Somit konnten die spektralen Eigenschaften der verschiedenen Aktivitätszustände genauer definiert werden, was detaillierte Einblicke in deren Änderungen und in die Systematik allgemein möglich macht. Außerdem konnten unterschiedliche Tageszyklen der verschiedenen Pigmente von *Trichodesmium* absolut bzw. relativ zu einander ersichtlich gemacht werden. Die Kultivierung unter Stressbedingungen schien dagegen keine unerwarteten Einflüsse auf die spektrale Situation zu haben.

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Pigmentkomposition von *Trichodesmium* wurde neben HPLC-Analysen auch das „Gauss-Peak-Fitting“ von *in vitro* Absorptionsspektren aus Extrakten angewendet. Dabei konnten die verschiedenen Tageszyklen der Pigmente bzw. Pigmentgruppen genauer untersucht und dargestellt werden. Unter Starklichteinfluss war der Pigmentgehalt einheitlich vermindert. Allerdings erschien unabhängig von der Kultivierungsvariante, um die Mittagszeit bei höchsten Belichtungsstärken, ein reversibler Einbruch in den Pigmentkonzentrationen.

Summary

Nitrogen-Fixation of cyanobacteria is one of the most important processes of nature and is the basis for life of higher organisms. The most important enzyme Nitrogenase is irreversibly inhibited in presence of molecular oxygen. The filamentous cyanobacteria *Trichodesmium erythraeum* ISM101 fixes molecular nitrogen in the same cells during the daytime, but without any special relocation of this process into compartments or into the night like other representatives of its genus. The correlating appearance of elevated basic-fluorescence levels of single cells or whole regions inside filaments was supposed to be mediated by uncoupling of phycobilisomal subunits during the diazotrophic period. This could diminish O_2 -production, which should improve the possibility for N_2 -fixation.

In this work we examined the different activity states of *Trichodesmium* and its changes on single cell level at daytime, in order to break down the basic mechanisms of that regulation of photosynthesis for the non-inhibiting of nitrogenase. Furthermore the effects of abiotic stress, such as high light or iron deficiency were studied.

The nitrogen fixation was measured via reduction of acetylene and gas chromatography during the day. The fixation rate was positively correlating with the sinusoidal intensity cycle of the nature imitating cultivation light, whereas a weak reversible inhibition was observed under high light conditions in many cases at noon.

For the examination of the photosynthesis we focused the studies on the creation and analysis of chlorophyll fluorescence kinetics. These were realized by two-dimensional („image giving“, spatial) microscope measurements with subcellular resolution. The basic fluorescence yield F_0 , determining the activity state of the cells, was positively correlating with the rate of mortality and the shortening of filaments inside the cultures, in case of averaging all values of that kinetic parameter from the whole measuring row. This effect also leads to unpredictable variations in the survival time of the measuring cultures, which forced us to establish fitness improving cultivation in chemostates. The predicted correlation of increased F_0 values of single cells at noon was not reproducible. But the group formation of that fluorescence kinetic parameter described in the literature could get better defined in position and relative expansion at any daytime. In independence of the daytime, in general batch cultivation and especially influence of stress leads to single cells or even whole regions inside filaments with multiple elevated fluorescence levels. But reversible changes in the activity states of these cells were not detectable. Moreover there is the often seen bursting and leaking of such cells after the fast elevating of their fluorescence to even more than the “bright II”

state, to suggest apoptotic processes. Functionally, this “necrotic apoptosis” might be involved in the disintegration of the bloom carpets floating on the water surface. In histograms of whole measuring rows, especially under scarcity of iron, a significant drift of the main group to lower F_0 values and a more diffuse variation in the number of cells of adjacent F_0 intervals became obvious in between a Gaussian normal distribution of all physiological active cells.

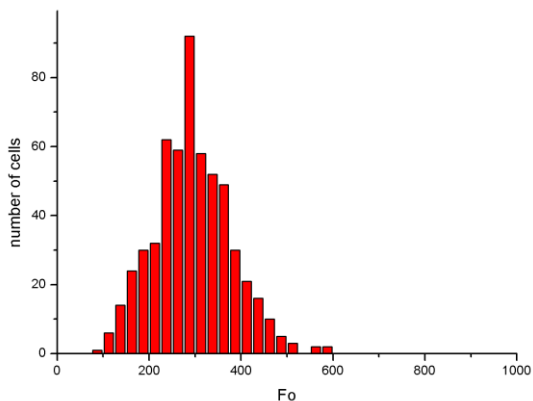
Cause of further adaptations on fluorescence kinetic microscope, the same cells measured for the spatial kinetics could be used for spectral *in vivo* studies of the UV/VIS fluorescence and absorption directly after. In addition, spectral resolved fluorescence kinetics of single cells also became measureable. Thus, the spectral purposes of the different activity states could be defined more precise, which led to more detailed insights into their changes, and into the systematic behind in general. In addition, different daily cycles of the various pigments of *Trichodesmium* could be shown *in vivo* absolutely and in relation to each other. In contrast, the cultivation under stress conditions doesn't seem to have any unexpected influences to the spektral situation.

To define the pigment composition of *Trichodesmium* in quality and quantity, “Gauss-Peak-Fitting” of *in vitro* absorption spectra from pigment extracts was performed in addition to HPLC-analyses. In process, the various daily cycles of the pigments and respectively pigment groups could be examined and pointed out more detailed. Under influence of high light the pigment content was consistently diminished. At noon, during highest light intensities, a reversible decrease in the concentration of pigments always appeared independently to the kind of cultivation.

Ergänzende Daten

Abb. 3.1.3

a)



b)

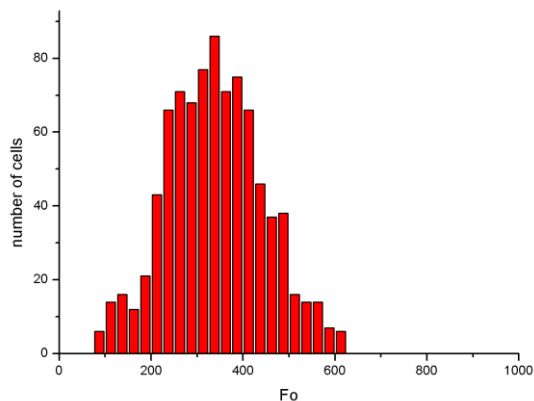
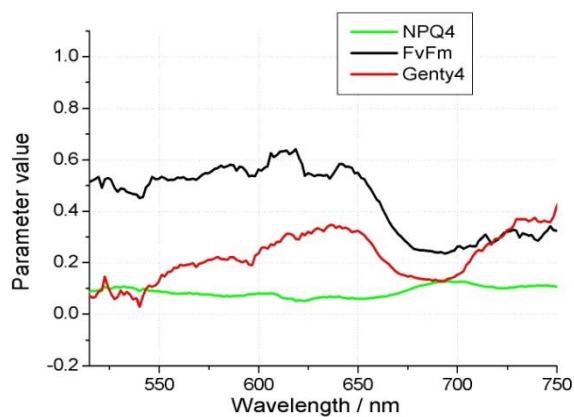


Abbildung 3.1.3: Histogramme der ChlA-Grundfluoreszenz F_0 einzelner Zellen. Die Histogramme der verschiedenen Zeitpunkte (Sonnenaufgang; morgens; mittags; abends; nachts) wurden addiert um eine Tagesübersicht zu erreichen. X-Achse: F_0 -Werte. Y-Achse: Zellanzahl a) Low Light (niedrige bzw. normale Belichtung) dient zur Kontrolle, b) High Light-Stress (Starklicht-Bedingungen)

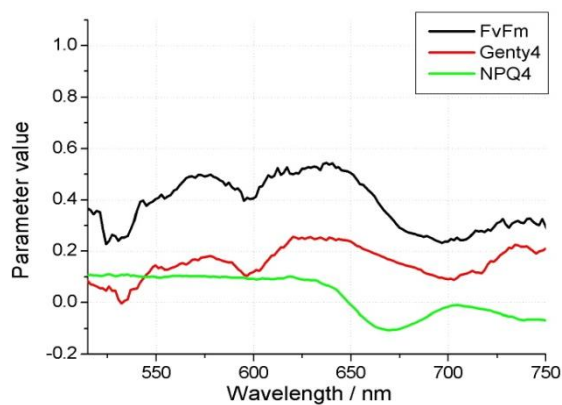
Abb. 3.4.4

a)

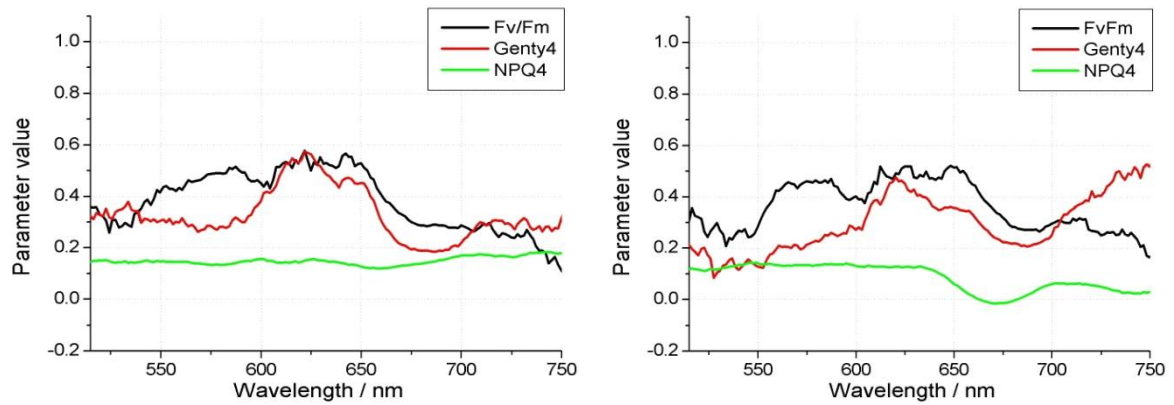


b)

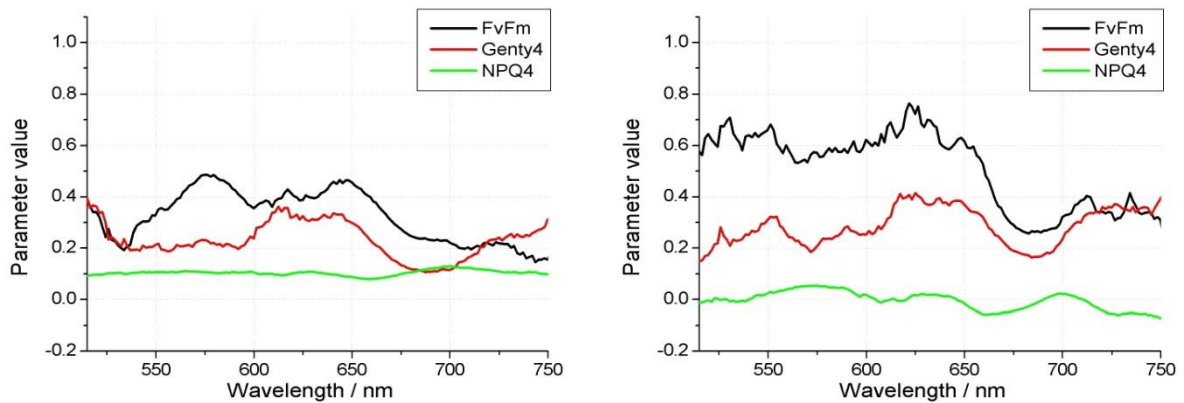
Morning:



Noon:



Evening:



Night:

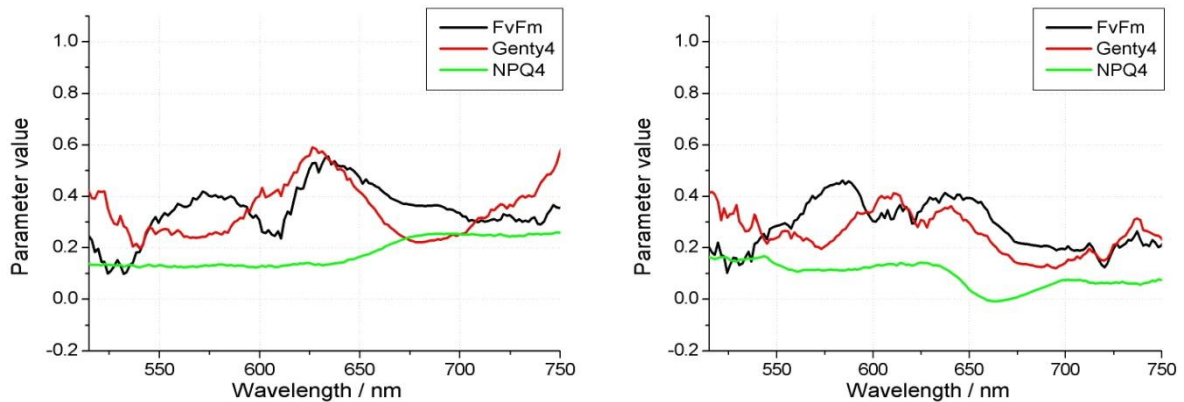
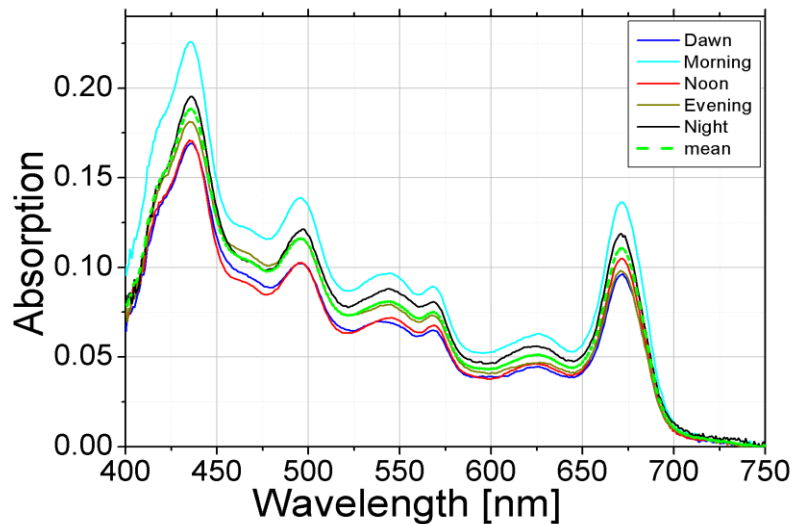


Abbildung 3.4.4: Spektral aufgelöste Kinetiken der Parameter der variablen Fluoreszenz zur maximalen Fluoreszenz F_v/F_m (schwarz), des Genty4 (rot) und des NPQ4 (grün). Der Index 4 bedeutet, dass die Werte beim letzten Lichtpuls (4) in der aktinischen Belichtungsphase gemessen wurden. a) Low Light (niedrige bzw. normale Belichtung) dient zur Kontrolle, b) High Light-Stress (Starklicht Bedingungen)

Abb. 3.6.5

a)



b)

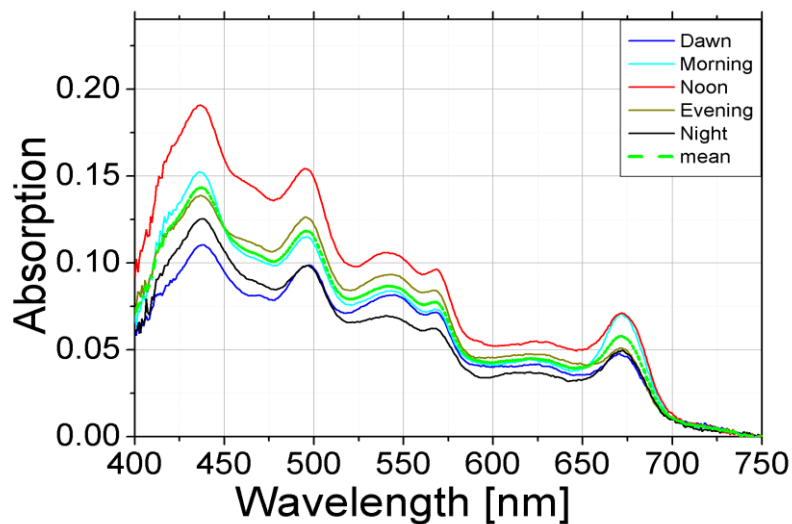
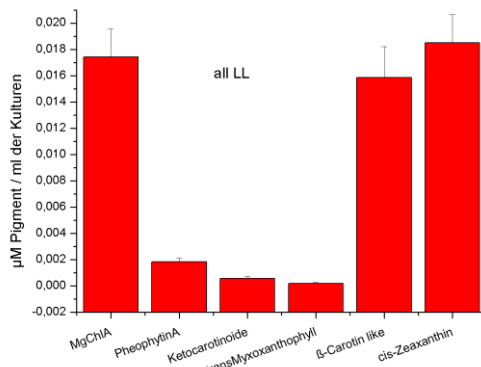


Abbildung 3.6.5: Tagesvergleich der in vivo-Absorptionsspektren von lebenden Zellen, die auch für die bildgebende Kinetik gemessen worden. Jedes einzelne Spektrum (Dawn bis Night) ist ein Mittelwert von 2 Messtagen mit 4 bis 6 Zellen. Die gemittelten Einzelspektren wurden daraufhin einer Backgroundkorrektur unterzogen (das Minimum des Spektrums bei ca. 750 nm wurde auf die Nulllinie der Absorption gelegt). Dies war nötig, da der messungsinterne Backgroundabgleich bei jeder Einzelmessung durch unscharfe Filamente beeinflusst wurde und somit stets schwankte. a) Low Light (niedrige oder normale Belichtung) dient zur Kontrolle b) High Light-Stress (Starklicht Bedingungen)

Abb. 3.8.4

a)



b)

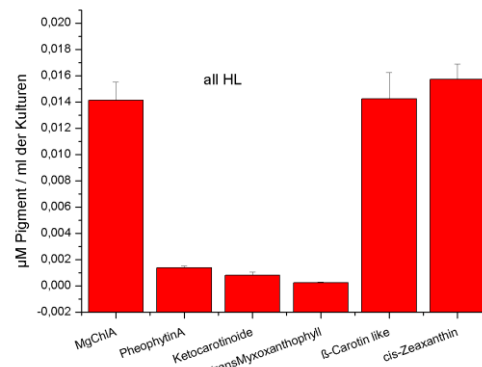
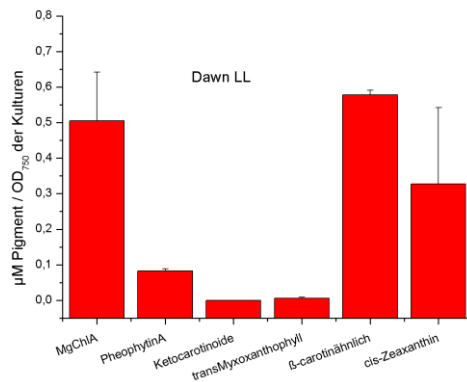


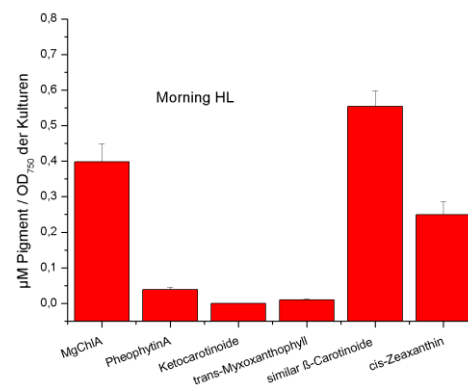
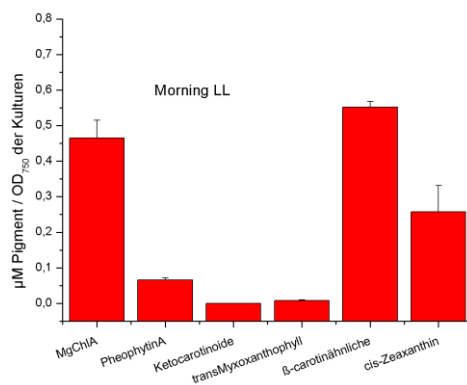
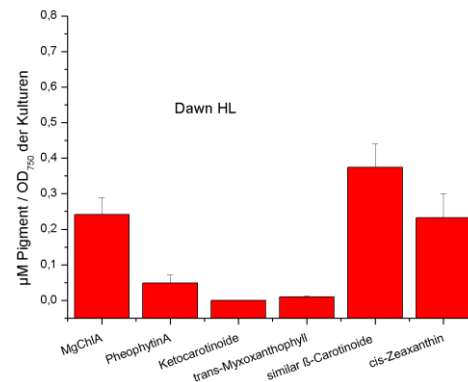
Abbildung 3.8.4: Die Tagesübersichten aus Figur 4a und 4a wurden jeweils gemittelt und miteinander verglichen. a) Die Kontroll-Kultur mit normalem Licht (LL), b) Die Starklicht gestresste Kultur (HL).

Abb. 3.8.5

a)



b)



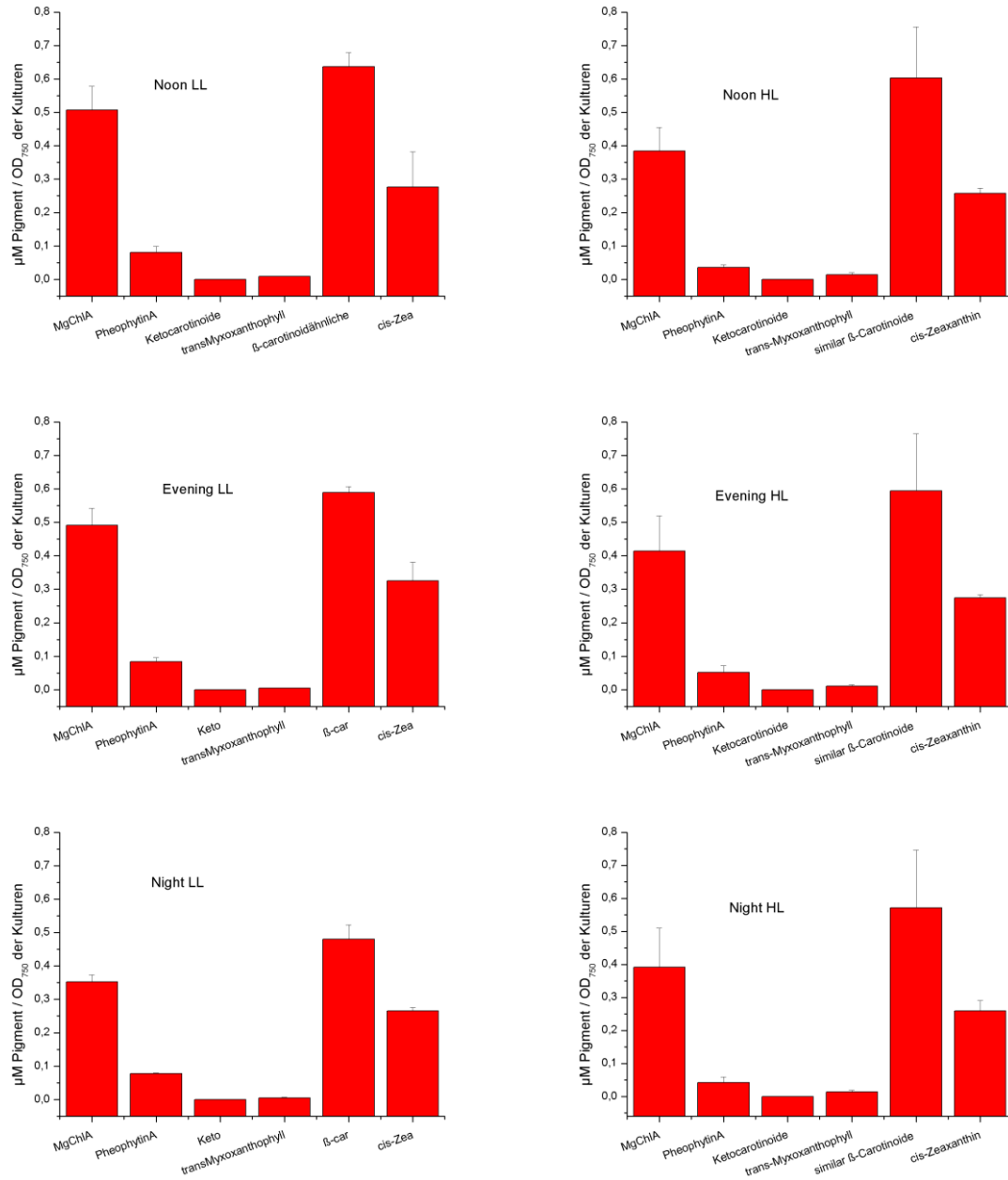
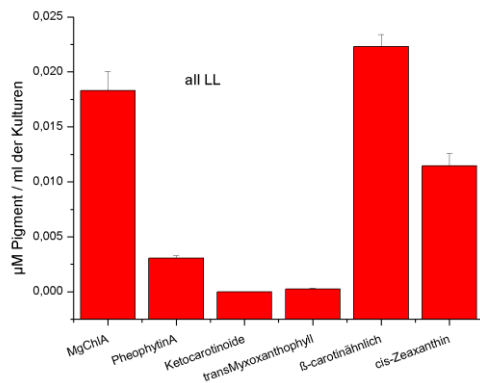


Abbildung 3.8.5: Übersicht der Photopigmentkonzentrationen der 5 Tageszeiten (Dawn bis Night) aus 3 verschiedenen Tage innerhalb einer Woche gemittelt. Jede Messung wurde durch die OD₇₅₀ der Kultur am jeweiligen Messtag dividiert. a) Normalen (LL) Kontroll-Kultur; b) Starklicht (HL) belichtete Kultur.

Abb. 3.8.6

a)



b)

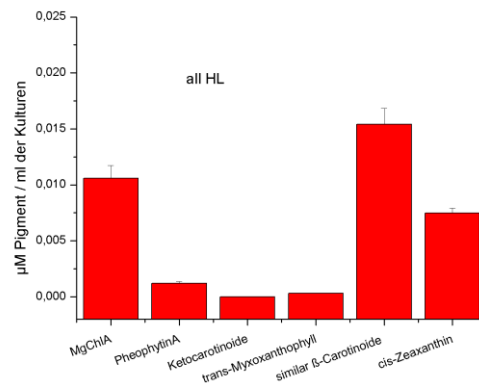


Abbildung 3.8.6: Die Tagesübersichte der Pigmentkonzentrationen aus Abb. 3.8.5a) bzw. Abb. 3.8.5b) wurden jeweils gemittelt und miteinander verglichen. a) Die Kontroll-Kultur mit normalem Licht (LL); b) Die Starklicht gestresste Kultur (HL). Im Gegensatz zu den ausgewerteten Konzentrationen aus Abb. 3.8.1 bzw. 3.8.3 („HL“) ist in beiden Kulturen stets weniger *cis*-Zeaxantin als β-Karotin-ähnliche vorhanden.

Fig. 6.1

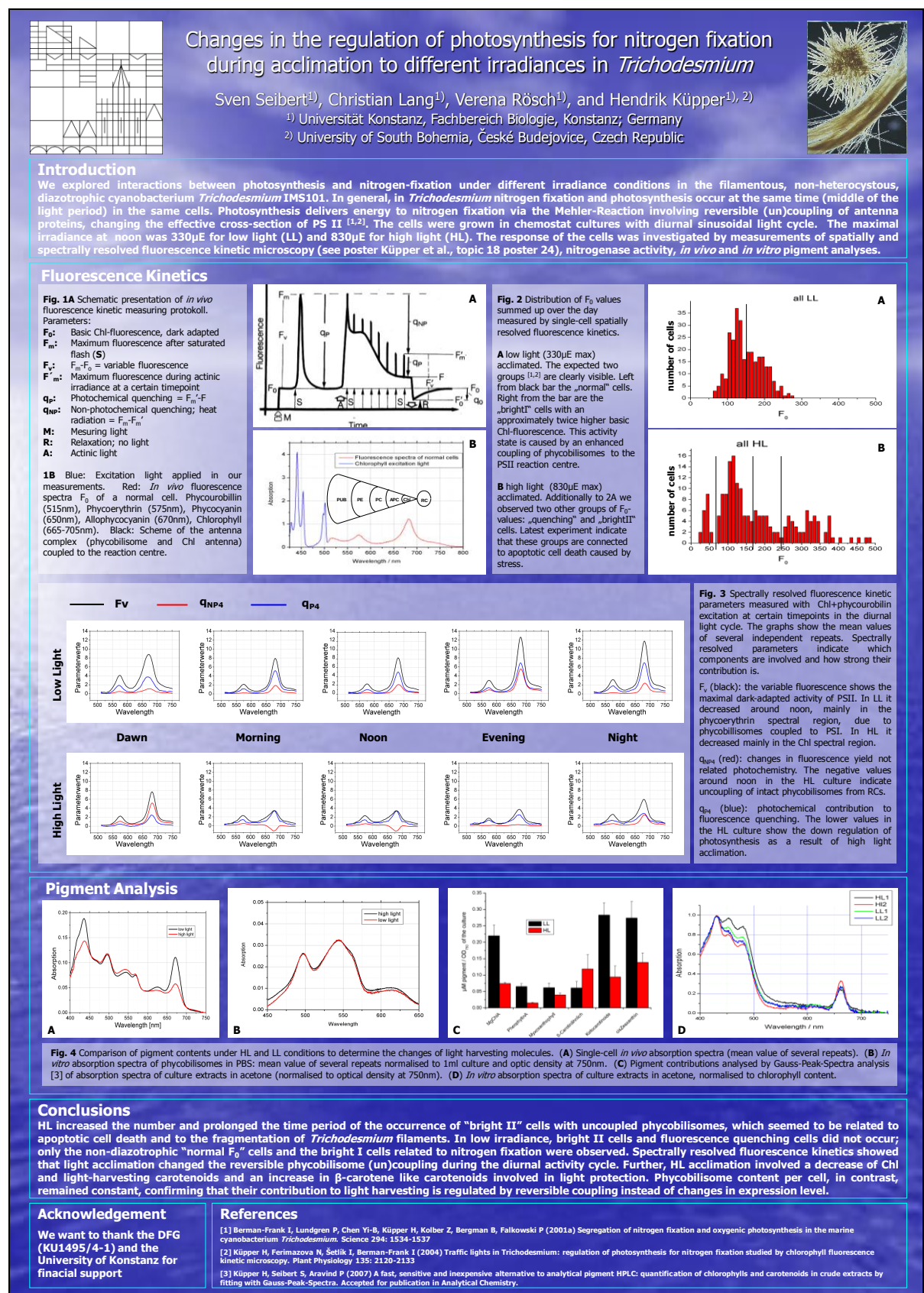


Fig 6.1: Poster Botanikertagung in Hamburg 2007 – 125 Jahre Deutsche Botanische Gesellschaft

Abbildungs- / Figurenverzeichnis

Fig. 1.1.2.1	<i>Trichodesmium</i> -Blüte als Teppich an der Meeresoberfläche	6
Fig. 1.1.3.1	<i>Trichodesmium</i> -Foto von „Puffs“ und „Tufts“; Lichtmikroskopaufnahmen von Filamenten mit 20-/ 40-facher Vergrößerung.....	7
Fig. 1.1.7.1	mögliche Erscheinungen der Farbvariation von <i>Trichodesmium</i>	10
Fig. 1.1.7.2	photosynthetischen Lichtreaktionen verschiedener Organismen; Absorptionspeaks der PBPs und ChlA von <i>Trichodesmium</i> im Gesamtspektrum; Filtersätze des FKM zur Anregung mit verschiedenen Lichtfarben; schematisch Phycobilisomen-ChlA-Komplex entsprechend zugeordnet	11
Fig. 1.1.8.1	Fotos verschiedener N ₂ -fixierender Organismen; schematisch Nitrogenase als 3D-Elektronendichte-Modell dargestellt	13
Fig. 1.1.8.2	Einteilung von Cyanobakterien u.a. nach Art der Nitrogenaseaktivität	15
Fig. 1.1.8.3	PS II-Aktivität und N ₂ -Fixierung-, bzw. Sauerstoffproduktion und Dunkelatmung im Tagesverlauf	18
Fig. 1.2.1.1	Saisonales Vorkommen von gelöstem Fe bzw. N ₂ -Fixierung der Ozeane	21
Fig. 1.4.1	Veränderung der Fluoreszenzemission der Zellen; Veränderung des Fluoreszenzspektrums einer Zelle (oder eines sich ähnelnden Filamentbereichs) über der Zeit.....	28
Fig. 1.4.2	An- und Abschalten der "bright"-Zellen; Veränderung des Fluoreszenzspektrums einer Zelle über der Zeit	29
Fig. 2.1.2.1	Schematischer Überblick der Aktivitätszustandsänderungen; Hypothese zur Regulation der Photosynthese für die N ₂ -Fixierung	32
Fig. 2.1.3.1	Temperiertes Glasaquarium vor Lichtleiste zur Batch-Kultivierung	34
Fig. 2.1.4.1	Schematische Darstellung einer Chemostat-Kulturflasche	36
Fig. 2.2.1.1	Foto und Skizze der Messkammer; Mediumkreislauf schematisch	38
Fig. 2.2.2.1	Foto des Konstanz-FKM mit Zusatzgeräten und Steuerungs-PC	39
Fig. 2.2.3.1	Schema des Fluoreszenz-Kinetik-Messprotokolls	41
Fig. 2.4.3.1	Messprotokoll einer Gradienten-HPLC verschiedener <i>Trichodesmium</i> -Kulturen; Absorptionsspektren der markantesten Fraktionen	46
Fig. 2.4.4.1	Quantifizierung von einer ChlA-Probe-, bzw. eines Pigmentmixes durch "Gauss-Peak-Fitting"	48

Figuren des Ergebnisteils (Kapitel 3) sind als "Abbildungen" (Abb.) definiert, nach zugehöriger Unter-Kapitelnummer indiziert, und absteigend nummeriert (Bsp.: Abb. 1.1.1 entspricht Fig. 3.1.1.1):

Abbildungen 1: Figuren zum Unter-Kapitel 3.1.: Fe-Mangel-Stress bei *Trichodesmium*

*Abbildungen 1.1: F_0 -Histogramme; normaler- vs. niedriger Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte
blaues- vs. grünes Anregungslicht; 20-fache Vergrößerung*

Abb. 1.1.1	F_0 -Histogramme; normaler Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht	51
Abb. 1.1.2	F_0 -Histogramme; niedriger Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht	52
Abb. 1.1.3	F_0 -Histogramme; normaler Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte; grünes Anregungslicht	53
Abb. 1.1.4	F_0 -Histogramme; niedriger Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte; grünes Anregungslicht	53
Abb. 1.1.5	F_0 -Histogramme; normaler- vs. niedriger Fe-Gehalt; Tagesübersicht; blaues Anregungslicht	54

Abbildungen 1.2: F_0 -Histogramme; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt; 3 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht; 40-fache Vergrößerung; Kinetik-Messung nach Probenahme direkt, bzw. Schwachlicht-Inkubation zuvor

Abb. 1.2.1	F_0 -Histogramme; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt; Tagesgesamtübersicht; 40-fache Vergrößerung; blaues Anregungslicht; direkte Messung	55
Abb. 1.2.2	F_0 -Histogramme; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt; Tagesgesamtübersicht; 40-fache Vergrößerung; blaues Anregungslicht; Schwachlicht-Inkubation vor Messung	56

Abbildungen 1.3: Scatterplots F_v vs. F_0 ; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt

Abb. 1.3.1	Scatterplots F_0 vs. F_v ; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt	58
Abb. 1.3.2	Scatterplots F_0 vs. Q_{NP6} ; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt	59

Abbildungen 1.4: spektrale Eigenschaften in vivo einzelner Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen

Abb. 1.4.1	In vivo-Absorptionsspektren verschiedener Aktivitätszustände; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt	60
Abb. 1.4.2	In vivo-Fluoreszenzspektren verschiedener Aktivitätszustände durch PE-Bestrahlung; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt	61

Abb. 1.4.3	Übersicht spektraler Eigenschaften der verschiedenen Aktivitätszustände; <i>In vivo</i> -Absorptionsspektren; <i>in vivo</i> -Fluoreszenzspektren durch PUB+ChlA-Bestrahlung; bzw. durch PE-Bestrahlung; bzw. durch PUB-Bestrahlung 63
------------	--

Abbildungen 1.5: In vivo-Absorptionsspektren; normaler- vs. niedriger Fe-Gehalt

Abb. 1.5.1	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren verschiedener Tageszeiten mit „baseline“-Korrektur im UV-Bereich; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt 65
Abb. 1.5.2	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren im Tagesmittel mit „baseline“-Korrektur im UV-Bereich; normaler- vs. niedriger Fe-Gehalt 66
Abb. 1.5.3	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren verschiedener Tageszeiten mit „baseline“-Korrektur im Bereich > 750 nm; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt 67
Abb. 1.5.4	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren im Tagesmittel mit „baseline“-Korrektur im Bereich > 750 nm; normaler- vs. niedriger Fe-Gehalt 68
Abb. 1.6.1	Durch „Gauss-Peak-Fitting“ beschriebene <i>in vitro</i> -Absorptionsspektren; normaler- bzw. niedriger Fe-Gehalt 69
Abb. 1.7.1	Tageszyklus der Pigmentverteilung bei normalem Fe-Gehalt durch „Gauss-Peak-Fitting“ errechnet; prozentuelle-, bzw. absolute Werte 71

Abbildungen 2: Figuren zum Unter-Kapitel 2: Starklicht-Stress bei Trichodesmium aus Batch-Kulturen

Abbildungen 2.1: F₀-Histogramme „guter“ ("good"-) bzw. "bad"-Kulturen; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht; 40-fache Vergrößerung

Abb. 2.1.1	F ₀ -Histogramme „guter“ Kulturen; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte 73
Abb. 2.1.2	F ₀ -Histogramme „guter“ Kulturen; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; Tagesübersicht 76
Abb. 2.1.3	F ₀ -Histogramme „bad“ Kulturen; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; Tagesübersicht 78

Abbildungen 3: Figuren zum Unter-Kapitel 3.3.: Starklicht-Stress bei Trichodesmium aus Chemostat-Kulturen

Abbildungen 3.1-3: Histogramme verschiedener Kinetik-Parameter einzelner Zellen; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht; 40-fache Vergrößerung

Abb. 3.1.1	F_0 -Histogramme; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte ..	80
Abb. 3.1.2	F_0 -Histogramme; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; Tagesübersicht	83
Abb. 3.2.1	F_v -Histogramme; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte ..	85
Abb. 3.3.1	Q_{NP4} -Histogramme; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	88
Abb. 3.3.2	Q_{NP7} -Histogramme; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	91

Abbildungen 3.4: spektral aufgelöste Kinetik-Parameter einzelner Zellen; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht; 40-fache Vergrößerung

Abb. 3.4.1	Spektral aufgelöste Kinetiken von F_v , des Q_{P4} und Q_{NP4} ; normale- bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	95
Abb. 3.4.2	Absolute Parameterwerte der zwei Hauptpeaks aus Abb. 3.4.1; normale- bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	97
Abb. 3.4.3	Höhen-Verhältnisse der zwei Hauptpeaks aus Abb. 3.4.1; normale- bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	99

Abbildungen 3.5: Stickstofffixierung via Acetylenreduktion und Gaschromatographie; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte

Abb. 3.5.1	Übersicht der Nitrogenaseaktivität von 3 Messtagen; normale bzw. Starklicht-Kultivierung	101
Abb. 3.5.2	Nitrogenaseaktivität als Tagesübersicht; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 3 Messtage	102

Abbildungen 3.6: In vivo-Absorptionsspektren; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte

Abb. 3.6.1	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren zu 5 verschiedenen Tageszeiten; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 4 Messtage x 6 Zellen gemittelt; „Baseline (> 750 nm)“-korrigiert und ChlA (670 nm)-normiert	104
Abb. 3.6.2	Vergleich <i>in vivo</i> -Absorptionsspektren; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 4 Messtage zu 5 verschiedenen Tageszeiten a 6 Zellen gemittelt; „Baseline (> 750 nm)“-korrigiert und ChlA (670 nm)-normiert ..	105

Abb. 3.6.3	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren zu 5 verschiedenen Tageszeiten; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 2 Messtage x 6 Zellen gemittelt; „Baseline (> 750 nm)“-subtrahiert	106
Abb. 3.6.4	Vergleich <i>in vivo</i> -Absorptionsspektren; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 2 Messtage, zu 5 verschiedenen Tageszeiten, a 6 Zellen gemittelt; „Baseline (> 750 nm)“-subtrahiert	107
Abb. 3.7.1	<i>In vitro</i> -Absorptionsspektren Aceton-löslicher Pigmente; normale vs. Starklicht-Kultivierung; absolute Spektralwerte bzw. auf ChlA (435 nm)-normiert	108
Abb. 3.7.2	<i>In vitro</i> -Absorptionsspektren PBS-löslicher Pigmente im Tagesdurchschnitt; normale vs. Starklicht-Kultivierung	109
 <i>Abbildungen 3.8: Konzentrationen der Aceton-löslichen Photopigmentgruppen durch „Gauss-Peak-Fitting“ von in vitro-Absorptionsspektren</i>		
Abb. 3.8.1	Konzentrations-Übersicht verschiedener Pigmentgruppen auf OD ₇₅₀ normiert; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte	111
Abb. 3.8.2	Tageszyklus der Pigment-Konzentrationen aus Abb. 3.8.1; normale bzw. Starklicht-Kultivierung	112
Abb. 3.8.3	Tagesübersicht der Konzentration verschiedener Pigmentgruppen; normale vs. Starklicht-Kultivierung	114
 Abbildungen und Figuren von Kapitel 4 (Diskussion):		
Abb. 3.6.5	Vergleich <i>in vivo</i> -Absorptionsspektren; normale vs. Starklicht-Kultivierung; 50 Zellen verschiedener Tageszeiten gemittelt	148
Fig. 4.3.6.1	Pigmentgehalt in Abhängigkeit zur Lichtintensität	157
 Abbildungen und Figuren von Kapitel 5 (Anhang):		
Abb. 3.1.3	F ₀ -Histogramme als Tagesübersicht; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 3 Messzeitpunkte; blaues Anregungslicht	171
Abb. 3.4.4	Spektral aufgelöste Kinetiken von F _v /F _m , des Genty4 und NPQ4; normale bzw. Starklicht-Kultivierung	171
Abb. 3.6.5	<i>In vivo</i> -Absorptionsspektren zu 5 verschiedenen Tageszeiten; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 2 Messtage x 5 Zellen gemittelt; „Baseline (> 750 nm)“-korrigiert	173

Abb. 3.8.4	Tagesübersicht der Konzentration verschiedener Pigmentgruppen; normale bzw. Starklicht-Kultivierung	175
Abb. 3.8.5	3-Tage-Übersicht der Konzentration verschiedener Pigmentgruppen, auf OD ₇₅₀ normiert; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte ...	175
Abb. 3.8.6	Wochen-Übersicht der Konzentration verschiedener Pigmentgruppen, auf OD ₇₅₀ normiert; normale bzw. Starklicht-Kultivierung; 5 Messzeitpunkte ...	176
Fig. 6.1	Poster Botanikertagung in Hamburg 2007 – 125 Jahre Deutsche Botanische Gesellschaft	177

Danksagung

Dank gehört allen, die mich in dieser Zeit ertragen haben oder mussten. Vielen, vielen lieben Dank!

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Tamara Murzabekova. Ohne Ihre Hilfe und Geduld wäre diese Arbeit niemals fertig geworden. Meinen Eltern danke ich ebenso für Ihre Unterstützung. Sie haben immer an mich geglaubt und waren stets an meiner Seite.

Besonderen Anteil gehört meinem Doktorvater Prof. Dr. Hendrik Küpper¹⁾! Er hat mir Tugenden wie Fleiß, Geduld, oder Präzision beim eigenständig wissenschaftlichen Arbeiten vorgelebt und sie mir dadurch erst wirklich nah gebracht. Und grade aufgrund unserer oftmals unterschiedlichen Auffassung der Dinge und dem damit einhergehenden Diskurs, hat sich die Natur mir, wie ich denke, mit ihren wahren Gesetzen offenbart. Darüber bin ich dir Hendrik sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön auch an Prof. Dr. Iwona Adamska¹⁾. Ihre freundliche Unterstützung mit Rat und Tat ist nicht hoch genug zu schätzen! Ihre Ermutigungen haben zur Beendigung dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Darüberhinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Nathalie Schuster, Dr. Marcel Kremer¹⁾ und Dr. Aravind Parameswaran bedanken. Auch ihr Beistand in dieser Zeit hat mir sehr geholfen.

Zuletzt danke ich allen Personen und Arbeitsgruppen, die an dieser Arbeit oder im Kontext kooperierend mitgewirkt haben: Den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Adamska¹⁾ (Jens Lohscheider¹⁾, Martina Strittmatter¹⁾), und Herrn Prof. Dr. Peter Kroneck¹⁾ in Konstanz, Prof. Dr. Ilana Berman-Frank⁴⁾ und Orly Levitan⁴⁾ der Arbeitsgruppe aus Israel, sowie Ivan Šetlik^{2), 3)} nebst seiner lieben Frau Eva Šetlikova^{2), 3)} und Ondrej Prášil^{2), 3)} aus Třeboň, wie auch Martin Trtlek⁵⁾ in Czechien. Meinen Vertiefungskursstudenten Verena Rösch¹⁾ und Christian Lang¹⁾ für ihre tolle Mitsammenarbeit, und meiner Laborkollegin der Doktorandin Barbara Leitenmaier¹⁾ für die gute Zusammenarbeit, gehört ebenso ein dickes Danke.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Verantwortlichen der Uni-Konstanz für die langjährige finanzielle und persönliche Unterstützung, sowie der DFG für die Bereitstellung der Mittel für mein Projekt: KU1495/4-1

1) Universität Konstanz; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion; Fachbereich Biologie; D-78457 Konstanz; Germany

2) Faculty of Biological Sciences and Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budejovice, Czech Republic

3) Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Microbiology, Dept. of Autotrophic Microorganisms, Opatovický mlýn, CZ-37981 Třeboň, Czech Republic

4) Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar Ilan University, Ramat Gan, 52900, Israel

5) Mikroskop- und FluorCam-Software --- Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic

Addendum

(hinzugefügt nach der mündlichen Prüfung)

Abgrenzung der Eigenleistung von Publikationen der AG Küpper:

Beim der Eisenmangelstress-Publikation (Küpper, H., I. Šetlík *et al.* (2008). "Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation." *New Phytol* 179(3): 784-798) habe ich an der letzten von insgesamt vier Messkampagnen teilgenommen.

Bei der Publikation über die Quantifizierung von Pigmenten via spektraler Analyse in *Analytical Chemistry* (Küpper, H., S. Seibert *et al.* (2007). "Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra." *Anal Chem* 79(20): 7611-7627) wurden drei von insgesamt 28 als GPS-Spektren publizierte Pigmente von mir gereinigt und in GPS überführt.

Nach dem Ende meiner Laborarbeit in der AG Küpper wurde die Analyse der Kopplung der Phycobiliproteine von Küpper *et al.*, sowie die Lichtakklimationsexperimente von Andresen *et al.* komplett wiederholt. Dies führte zu anderen Ergebnissen als in dieser Arbeit beschrieben (Küpper H, Andresen E, Wiegert S, Šimek M, Leitenmaier B, Šetlík I (2009) Reversible coupling of individual phycobiliprotein isoforms during state transitions in the cyanobacterium *Trichodesmium* analysed by single-cell fluorescence kinetic measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* (section Bioenergetics) 1787, 155-167; Andresen E, Lohscheider J, Šetlíková E, Adamska I, Šimek M, Küpper H (2010) Acclimation of *Trichodesmium erythraeum* ISM101 to high and low irradiance analysed on the physiological, biophysical and biochemical level. *New Phytologist* 185, 173-188).