

Bachelorarbeit

Vergleich unterschiedlicher Methoden zur
Erfassung von Wachstumsraten und
photosynthetischen Parametern in polaren
Diatomeen

Lisa-Marie Henken

Bremerhaven, den 31.08.2018

Matrikelnr.: 7004935

Fachbereich: Technik, Abteilung Naturwissenschaftliche Technik

Studiengang: Biotechnologie mit dem Schwerpunkt Bioinformatik

E-Mail: l.henken@web.de

Erstprüfer: Prof. Dr. Gerhard Kauer, Hochschule Emden/Leer, Fachbereich
Naturwissenschaftliche Technik

Zweitprüfer: Dr. Bánk Beszteri, Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar
und Meeresforschung, AG Hustedt-Zentrum für Diatomeen-Forschung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	IX
Abstract	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Diatomeen.....	1
1.1.1 Struktur der Diatomeen	1
1.1.2 Lebenszyklus und Fortpflanzung von Diatomeen	2
1.1.3 <i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	3
1.2 Die Photosynthese	4
1.2.1 Chloroplasten	5
1.2.2 Chlorophyll	5
1.2.3 Lichtsammelkomplex (=light harvesting complex, LHC)	6
1.2.4 Licht- und Dunkelreaktion.....	8
1.3 Chlorophyllfluoreszenz.....	9
1.3.1 Fluoreszenzquenching und Photoinhibition.....	10
1.3.2 Bestimmung der Umwelanpassung von Algen	11
1.4 Zielsetzung und Aufgabenstellung	13
2. Material	14
2.1 Kulturmateriale	14
2.1.1 Probenahme und Isolierung von <i>Fragilariopsis kerguelensis</i> Stämmen	14
2.1.2 Unterteilung der Spezies <i>Fragilariopsis kerguelensis</i> in drei Unterarten.....	14
2.2 Lösungen und Chemikalien	16
2.3 Geräte.....	16

2.4 Software und Datenbanken	17
3. Methoden.....	18
3.1 Zellkultivierung von <i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	19
3.1.1 Herstellung von angereichertem Phytoplankton-Medium	19
3.1.2 Inokulation von Testkulturen	20
3.1.3 Inokulation von experimentellen Kulturen	20
3.1.4 Herstellung von Backup- bzw. Animpfkulturen.....	21
3.2 Erfassung von Zellzahlen für die Erstellung von Wachstumskurven.....	21
3.2.1 Zählprobenahme und Fixierung	21
3.2.2 Vorbereitung von Utermöhl-Kammern	22
3.2.3 Auszählen von Utermöhl-Kammern	22
3.3 Auswertung der Zellzahlen.....	24
3.3.1 Bestimmung der Zellzahl/ml einer gesamten Utermöhl-Kammer	24
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl/ml eines einzelnen Streifens	24
3.3.3 Berechnung der durchschnittlichen Kettenlänge und Standardabweichung	25
3.3.4 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate und Generationszeit	25
3.4 Bestimmung von Zellgrößen und Biovolumina	25
3.5 Raster-Elektronen-Mikroskopie	27
3.6 Pulsamplitudenmodulation-Fluorometrie	28
3.6.1 Wichtige Parameter für die PAM-Fluorometrie (Walz GmbH, 2014)	28
3.6.2 Relevante Fluoreszenzmessgrößen eines Fluorometers (Walz GmbH, 2014)	29
3.6.3 Vorbereitung des Imaging-PAM-Fluorometers	31
3.6.4 Testmessungen.....	32
3.6.5 Messung von F_0F_m	33
3.6.6 Aufnahme von Induktionskurven.....	34

3.6.7 Aufnahme von Lichtkurven	34
3.6.8 Vergleich von F_v/F_m vor und nach der Messung einer Induktions- und Lichtkurve	35
3.7 Fast Repetition Rate Fluorometer	35
4. Ergebnisse	37
4.1. Vergleich der Settings durch das Testexperiment	38
4.2 Auswertung der Zellzahlen.....	38
4.2.1 Anfangszellzahlen/ml	38
4.2.2 Durchschnittliche Kettenlängen.....	39
4.2.3 Variabilitätstest der Zählmethoden 1 und 2	39
4.2.4 Maximal erreichte Zellzahlen/ml	40
4.2.5 Biovolumina.....	41
4.3 Zellwachstum	43
4.3.1 Aufnahme von Wachstumskurven über die Zellzahl/ml.....	43
4.3.2 Spezifische Wachstumsraten und Generationszeiten über die Zellzahl/ml	45
4.3.3 Aufnahme von Wachstumskurven über die Grundfluoreszenz F_0	47
4.3.4 Spezifische Wachstumsraten und Generationszeiten über F_0	49
4.3.5 Korrelation der Wachstumskurven zwischen Grundfluoreszenz und Zellzahl/ml	51
4.4 Induktionskurven.....	52
4.5 Imaging-PAM versus FRRF.....	53
4.5.1 F_v/F_m Messung mit der Imaging-PAM versus mit dem FRRF.....	53
4.5.2 Vergleich der Lichtkurven von Imaging-PAM und FRRF	54
4.6 FRRF Lichtkurven; Vergleich zwischen Norden und Süden	55
5. Diskussion.....	58
5.1 Zustand der südlichen Stämme.....	58
5.2 Zellkultivierung und Zählmethoden	59

5.2.1 Kultivierungsmethoden und Umgebungsbedingungen	59
5.2.2 Vergleich der Zählmethoden 1 und 2.....	60
5.2.3 Biovolumina.....	62
5.2.4 Vergleich der Aufnahmemethoden für Wachstumskurven	62
5.2.5 Temperatureinfluss von 0°C und 4°C	64
5.3 Imaging-PAM versus FRRF.....	65
5.3.1 Eignung der Imaging-PAM und des FRRF zur Aufnahme von Lichtkurven.....	65
5.3.2 F_v/F_m vor und nach Lichtstress	66
5.3.3 Induktionskurven.....	67
5.3.4 Lichtkurven	68
5.4 Fazit	70
Literaturverzeichnis.....	XI
Abbildungsverzeichnis.....	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
Anhang	XIX
A. Zusätzliche Ergebnisse	XIX
A.1 Wachstumskurven der südlichen Stämme von Exp.1 anhand der Zellzahlen/ml.....	XIX
A.2 Korrelation zwischen Fluoreszenz und Zellzahl/ml der südlichen Stämme (Exp.2).....	XIX
A.3 Lichtkurve von Stamm 2-44 in Exp.1 bei 4°C	XX
B. Protokolle	XX
B.1 Herstellung von angereichertem Seewasser für Phytoplankton-Kulturen	XX
B.2 Präparation von Diatomeen für die Raster-Elektronen-Mikroskopie	XXI
Eidesstattliche Versicherung	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
ACC	Antarktischer Zirkumpolarstrom
ADP	Adenosindiphosphat
AOI	Area of Interest
ATP	Adenosintriphosphat
BV	Biovolumen
C	Kohlenstoff
CCD	Charge-coupled device (Ladungsgekoppeltes Gerät)
Chl	Chlorophyll
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTD	Conductivity, Temperature, Depth (Gerät zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit, der Temperatur und des Wasserdrucks bzw. -tiefe)
d [Einheit]	Tag bzw. Tage
d (Rechnung)	Durchmesser [mm]
et al.	Und Andere
ETR	Elektronentransportrate
Exp.1	Experiment 1 (40 ml Probenkulturen)
Exp.2	Experiment 2 (200 ml Probenkulturen)
F	Fluoreszenzausbeute
F _m	Maximale Fluoreszenzausbeute nach Dunkeladaption
F _m '	Maximale Fluoreszenzausbeute von belichteten Proben
F ₀	Grundfluoreszenz- oder Dunkelfluoreszenzausbeute
FRRF	Fast Repetition Rate Fluorometer
F _t	Aktuelle Fluoreszenzausbeute
F _v /F _m	Maximale Photosystem II Quantenausbeute nach Dunkeladaption
F _q '/F _m '	Effektive Photosystem II Quantenausbeute von belichteten Proben
<i>F. kerguelensis</i>	<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>
G	Gain (Signalverstärkung)
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
hν	Absorbierte Anregungsphotonen
hν*	Abgegebene Anregungsphotonen
Imaging-PAM	Imaging-Pulsamplitudenmodulation(-Fluorometer)

LED	Light-emitting diode (Licht emittierende Diode)
LHC	Light-harvesting-complex (Lichtsammelkomplex)
ML	Measuring Light (Messlicht)
MQ	maximaler F_v/F_m nach Einwirkung von Lichtstress [%]
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduzierte Form
O ₂	Sauerstoff
PAR	Photosynthetically active radiation (Photosynthetisch aktive Strahlung) [$\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2 \cdot \text{s} = \mu\text{Einstein}$]
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
P680	Reaktionszentrum 680 vom PS II
P700	Reaktionszentrum 700 vom PS I
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
s	Standardabweichung
s ²	Varianz
SP	Saturation Pulse (Sättigungsimpuls)
t _d	Generationszeit [d]
upm	Umdrehungen pro Minute
μ	spezifische Wachstumsrate [1/d]
x	Kettenlänge für Zählprobe _n
\bar{x}	Ø Kettenlänge (Mittelwert)

Zusammenfassung

Diatomeen gehören zu den phototrophen Protisten und machen einen großen Teil der in den Meeren und Süßgewässern lebenden Algen aus. Zur Primärproduktion in den Ozeanen tragen sie etwa 50-70 % bei und sind daher unabhkmmlich für das marine Ökosystem und Nahrungsnetz. Sie besitzen eine starre, sehr widerstandsfähige Schale (Frustel) aus Silikat, dem Anhydrid der Kieselsäure. Aufgrund ihres hohen Aufkommens tragen Diatomeen etwa 40 % zur weltweiten Sauerstoffproduktion in den Ozeanen bei. Auch in die Erdatmosphäre wird der für die heterotrophen Lebewesen lebensnotwendige Sauerstoff eingetragen. Die Photosynthese und die damit verbundene CO₂-Assimilation und Sauerstoffproduktion der Diatomeen sind damit von unschätzbarem Wert. Die Spezies *Fragilariopsis kerguelensis* ist für die Forschung von besonderem Interesse. Sie ist ein Indikator für silikatreiche Meeresabschnitte. Ihre Schalen bilden auf dem Grund des Südozeans den Opalgürtel. Daher ist es von großem Nutzen, schnelle und effektive Methoden zur Bestimmung von Wachstumskurven und photosynthetischen Parametern dieser Spezies zu kennen. Anhand von sechs *F. kerguelensis* Stämmen aus zwei Habitaten der Antarktis wurden unterschiedliche Methoden zur Erfassung von Wachstumskurven und photosynthetischen Parametern durchgeführt. Zunächst wurden zwei Methoden zur Zellkultivierung und -Inkubation angewandt. Die Aufnahme von Wachstumskurven erfolgte durch die Entnahme von Zählproben an unterschiedlichen Kultivierungstagen und das Auszählen in Utermöhl-Kammern durch zwei Zählmethoden. Außerdem wurden Wachstumskurven durch das Messen der Grundfluoreszenz von dunkeladaptierten Kulturen durch Imaging-Pulsamplitudenmodulation (PAM)-Fluorometrie erstellt. Während der Erfassung der Wachstumskurven wurde bereits deutlich, dass die Mehrzahl der angesetzten Kulturen keine ausreichende Dichte für die Messung mittels Imaging-PAM erreichten. Zu den photosynthetischen Parametern gehörten des Weiteren die Aufnahme von Induktions- und Lichtkurven mittels zweier unterschiedlicher Fluorometer. Die Messung der Kurven erfolgte innerhalb der exponentiellen Wachstumsphasen der unterschiedlichen *F. kerguelensis* Stämme. Das hochsensible Fast Repetition Rate Fluorometer (FRRF) ist in der Forschung bereits ein etabliertes Gerät zur Aufnahme von Lichtkurven. Zusätzlich wurden Lichtkurven mittels Imaging-PAM, einem weniger sensiblen Fluorometer, erstellt und mit denen des FRRF verglichen. Durch die niedrigen Kulturdichten und die geringe Sensibilität der Imaging-PAM haben die Lichtkurvenmessungen der *F. kerguelensis* Kulturen nach der Auswertung keine reproduzierbaren Ergebnisse ergeben. Die Mehrzahl der Fluoreszenz-Werte lag in einem negativen oder nicht bewertbaren Bereich. Mit dem FRRF konnten hingegen Lichtkurven erzielt werden. Letztendlich eignet sich das Imaging-PAM-Fluorometer nur zur Messung von ausreichend dichten *F. kerguelensis* Kulturen. Auch das Auszählen von Utermöhl-Kammern und die Erstellung von Wachstumskurven machen nur Sinn, wenn die angesetzten Kulturen eine mittlere bis hohe Dichte aufweisen.

Abstract

Diatoms belong to the phototrophic protists and form a huge part of the algae living in the seas and fresh waters. They account for about 50-70 % of the primary production of the oceans and are therefore very important for the marine ecosystem and food web. They have a solid, very resistant shell (Frustule) of silicate. About 40 % of the world's oxygen production in the ocean is generated by Diatoms and the oxygen produced in the ocean again gets into the atmosphere. The photosynthesis of diatoms is indispensable due to their CO₂-assimilation and oxygen production. The species *Fragilariopsis kerguelensis* is of particular interest for research as it is an indicator of siliceous ocean areas for research. The shells of *Fragilariopsis kerguelensis* build up the opal belt at the bottom of the southern ocean. Therefore it is very important to know effective methods for determining growth curves and photosynthetic parameters of these species. Different methods were applied to record growth curves and photosynthetic parameters using six *Fragilariopsis kerguelensis* strains of the Antarctic. First of all two methods of cell culturing and incubation were used. Growth curves were recorded by taking for counting samples on different cultivation days. Counting in Utermöhl chambers was performed using two different counting methods. Growth curves were also generated by measuring the dark fluorescence yield of dark-adapted samples using Imaging Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry. The majority of the cultures could not be measured using Imaging-PAM because of a too low density. The recording of induction and light curves using two different fluorometers was also part of the assessment of photosynthetic parameters. In research the highly Fast Repetition Rate Fluorometer (FRRF) is already an established device for recording light curves. Additionally light curves were created using the Imaging-PAM, which is a less sensible fluorometer. Subsequently the measured curves were compared with those of the FRRF. Due to the low sensitivity of the Imaging-PAM, the measurements of the light curves of the *F. kerguelensis* cultures did not yield any reproducible results. The majority of the fluorescence values were in a negative or not assessable range. In contrast it was possible to measure valid using the FRRF. With the Imaging-PAM fluorometer only sufficiently dense *F. kerguelensis* cultures can be measured. Also the counting of Utermöhl chambers and the generation of growth curves only makes sense if the cultivated cultures have a medium to high density.

1. Einleitung

1.1 Diatomeen

Diatomeen oder Kieselalgen besiedeln sowohl die Meere, als auch Süßgewässer (Elicki, et al., 2016, S. 254). Sie gehören als wichtigste Primärproduzenten in den polaren und subpolaren Gebieten der Meere zu den phototrophen Protisten (Wrede, et al., 2013, S. 160). Mit etwa 50-70 % tragen sie einen großen Teil zur weltweiten Primärproduktion in den Ozeanen bei (Nelson, et al., 1995, S. 359 ff.) und sind daher unabkömmlich für das marine Ökosystem und Nahrungsnetz. Auch im terrestrischen Ökosystem machen sie einen ungefähr gleich großen Teil aus (Klaas, et al., 2010, S. 2). Das Aufkommen dieser Mikroalgen ist bis in das Zeitalter des Jura zurückzuführen. Seitdem sind sie als bedeutende Sedimentbildner unterhalb des Südozeans bekannt (Elicki, et al., 2016, S. 254). Ihre Lebensweise kann sowohl planktischer (frei im Wasser) als auch benthischer (am Boden lebend) Art sein. Benthische Diatomeen besiedeln Oberflächen wie zum Beispiel Felsen, Steine, Muscheln oder als Epiphyten andere Wasserpflanzen (Elicki, et al., 2016, S. 254). Bisher sind weltweit etwa 30.000 Diatomeenarten bekannt, wobei diese wohl nur einen kleinen Teil der noch zu erforschenden Arten ausmachen (Mann, et al., 2013, S. 414 ff.). Durch den besonders hohen Anteil an Siliciumdioxid, dem Anhydrid der Kieselsäure, den die Diatomeen besitzen, erhielten diese ihren Trivialnamen „Kieselalgen“ (Wrede, et al., 2013, S. 160).

Diatomeen gehören zu den Kohlenstoffdioxidassimilierenden Organismen. Ca. Ein Fünftel der globalen CO₂-Fixierung ist auf die Kieselalgen zurückzuführen (Groß, 2012, S. 148). Das heißt, sie betreiben in ihren Chloroplasten eine lichtgesteuerte Fixierung von Kohlenstoffdioxid aus der Atmosphäre und den Gewässern und wandeln es während der Photosynthese in Kohlenstoff und Sauerstoff um. Der Kohlenstoff wird in für die Zelle wichtige Stoffe, in organische Kohlenstoff-Verbindungen, synthetisiert (Neukirchen, et al., 2014, S. 286). Sauerstoff gelangt als Photosyntheseprodukt zurück in die Ozeane und in die Erdatmosphäre. Etwa 40 % des Sauerstoffs in den Meeren wird von Kieselalgen produziert (Wrede, et al., 2013, S. 160).

1.1.1 Struktur der Diatomeen

Charakteristisches Merkmal der Diatomee ist ihre äußere Zellwand, welche als „Frustel“ bezeichnet wird. Durch die für jede Diatomeenart spezifische Schalenstruktur lassen sich die Kieselalgen unterscheiden (Crawford, et al., 2001, S. 543 ff.). Die Frustel wird nach erfolgter Aufnahme von im Wasser gelöstem Silikat synthetisiert und häufig auch als Glasschale bezeichnet (Klaas, et al., 2010, S. 2). Sie besteht aus zwei unterschiedlich großen Hälften, den Theken, welche wie eine Schachtel ineinandergreifen. Die größere Hälfte, der Schalendeckel, wird Epitheka genannt. Der untere kleinere Schalenboden wird als Hypotheka bezeichnet. Jede Theka besteht aus einer oberen bzw. unteren Schalenfläche (Valva) und aus um die Zelle herumlaufende Gürtelbänder (Pleura) (Crawford, et al., 2001, S. 543 ff.). Außerdem können Diatomeenschalen durch Kanäle, den Raphen durchbrochen sein. Eine Form der Raphe einer Kieselalge befindet sich längs der Apikalachse und liegt in der Mitte der Schale. Verbunden wird sie durch einen Zentral-

und zwei Endknoten, welche Verdickungen der Medianrippe im Bereich der Zentralachse sind. Es gibt auch solche Formen, die am Schalenrand entlanglaufen, wie auch bei *Fragilariopsis kerguelensis* (Ruhland, 1962, S. 901). Besitzt eine Kieselalge eine Raphe, dann dient sie als Verbindung zwischen Zelle und Umgebung und kann als Bewegungsorganell fungieren. Es gibt pennate und zentrische Diatomeen. Die Fortbewegung mittels Raphe ist nur bei pennaten Kieselalgen vorzufinden auch wenn nicht jede Art eine besitzt. In der Gruppe der zentrischen Kieselalgen liegen keine Raphen vor. Arten ohne Raphe zeigen kaum aktive Bewegungen, wohingegen Diatomeen mit Raphe mittels extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) gleitende Bewegungen ausführen (van den Hoek, et al., 1993, S. 115 f.). Zur Verdeutlichung des Schalenaufbaus ist die Frustel einer Diatomee in Abb. 1 schematisch dargestellt.

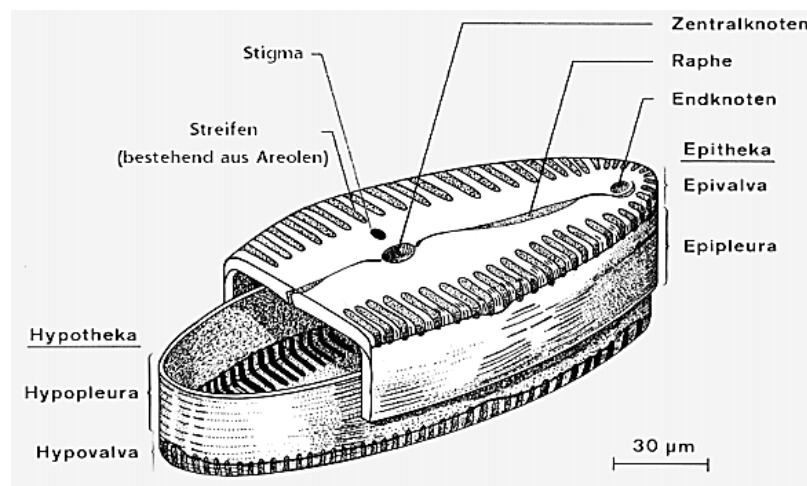


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Frustel einer pennaten Diatomee (Hofmann, 2005, S. 3)

Durch die Form ihrer Schalen lassen sich im Allgemeinen zwei Typen von Diatomeen unterscheiden. Zum einen die centrales oder zentrisch geformten Kieselalgen, welche häufig eine runde, aber auch dreieckig geformte Schale aufweisen. Zum anderen pennales oder pennate Kieselalgen, welche meist stab- oder schiffchenförmige, zuweilen auch bogen- oder s-förmige Frusteln besitzen. Der hohe Siliciumdioxidanteil in den Diatomeen, wird vornehmlich durch die Frustel bestimmt, welche aus dem Anhydrid der Kieselsäure besteht (Fritsche, 2016, S. 226). Dadurch ist die Schale besonders robust und schützt die Kieselalgen vor Fressfeinden und mechanischen Einflüssen, wie Reibungs-, Druck- oder Schlagkräfte, die in ihren Lebensräumen wirken können (Fuchs, et al., 2013, S. 411). Nach dem Absterben der Kieselalgen können die Schalen als Sedimentablagerungen im Meer zurückbleiben und liefern der paläontologischen Forschung wichtige Informationen über vergangene Klimaperioden (Cypionka, 2010, S. 52 f.).

1.1.2 Lebenszyklus und Fortpflanzung von Diatomeen

Der innere Zellkörper einer Diatomee wächst und teilt sich unter optimalen Bedingungen fortwährend. Allerdings ist die starre, aus Kieselsäure bestehende Schale nicht zum Wachstum fähig. Sobald der Zellkörper eine bestimmte Größe überschreitet, setzt die asexuelle Vermehrung durch mitotische Längsteilung ein. Die beiden Theken der Mutterzelle werden auseinandergeschoben, die beiden Schalenhälften werden jeweils als Epitheka verwendet und die

Hypotheka wird neu synthetisiert, sodass man aus einer Mutterzelle zwei Tochterzellen erhält. Im nächsten Teilungszyklus werden die beiden Hälften erneut als Epitheka verwendet. So muss immer eine neue, kleinere Hypotheka hergestellt werden. Die Tochterzellen der Ausgangsepitheka behalten ihre ursprüngliche Größe, dennoch nimmt bei diesem Teilungsprozess im Laufe der Zeit die Zellgröße der Population sukzessiv ab (van den Hoek, et al., 1993, S. 117). Die Abnahme der Zellgröße während der mitotischen Teilungen ist in Abb. 2 dargestellt.

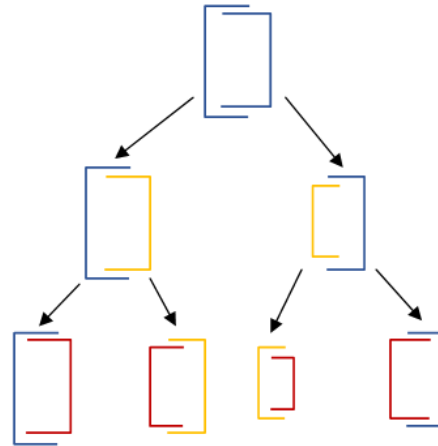


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Abnahme der Zellgröße nach zwei mitotischen Teilungszyklen. Die Tochterzellen des linken Astes behalten ihre Ursprungsgröße.

Sobald eine minimale Zellgröße erreicht wird, setzt die sexuelle Fortpflanzung in Form der Meiose ein. Sie dient nicht nur zur Wiederherstellung der Zellursprungsgröße, sondern auch zum Transfer von Genen zwischen den Zellen. Pennate Kieselalgen pflanzen sich durch Konjugation fort. Zunächst legen sich zwei potentiell geschlechtliche Zellen aneinander und umgeben sich mit einer Gallerte. Beide Partnerzellen bilden jeweils zwei haploide Gameten. Diese vereinigen sich miteinander und bilden eine zweikernige (diploide) Zygote. Die Zygote umhüllt sich mit einer Zygotenwand (Pektinmembran), schwillt an und wird somit zu einer Auxospore. Weil das Zellinnere zu diesem Zeitpunkt von keiner starren Kieselmembran umgeben ist, kann die Auxospore ihr Volumen bis auf ein Maximum steigern. Die Theken werden neu synthetisiert und die Ursprungsgröße ist wieder erreicht. Nachdem sich die Zelle wieder mehrfach mitotisch geteilt hat, beginnt die Konjugation erneut (van den Hoek, et al., 1993, S. 119 f.). Zentrische Kieselalgen betreiben Oogamie (van den Hoek, et al., 1993, S. 119-122).

1.1.3 *Fragilariopsis kerguelensis*

Die Spezies *Fragilariopsis kerguelensis* (O'Meara) Hustedt 1992 hat ihren Lebensraum im Südpolarmeer. Vornehmlich ist sie in der Wassersäule, hauptsächlich im antarktischen Zirkumpolarstrom (ACC) zu finden. Durch ihren hohen Kieselsäuregehalt gehört *F. kerguelensis* zu den wichtigsten Kieselalgen im globalen Silikatkreislauf und dient als Indikatorspezies für Siliciumdioxid reiche Meeresabschnitte (Fuchs, et al., 2013, S. 411 f.). Andere Diatomeenarten werden im Südozean zurückgedrängt, da der Kieselsäurebedarf von *F. kerguelensis* besonders

stark ausgeprägt ist (Klaas, et al., 2010, S. 2 f.). Daher ist *F. kerguelensis* die abundanteste Diatomee im Sediment unterhalb des Südozeans (Fuchs, et al., 2013, S. 411).

Fragilariopsis kerguelensis gehört zu den pennaten Kieselalgen und betreibt Konjugation zur Fortpflanzung. Eine *F. kerguelensis* Zelle kann bis zu 120 µm lang werden (Kloster, et al., 2017 S. 9). Außerdem bilden sie bandförmige Ketten von bis zu 100 Zellen (Klaas, et al., 2010, S. 2). Durch ihre besonders dickwandige und robuste Schalenarchitektur wird sie oft als „stark verkieselt“ bezeichnet. Sterben *F. kerguelensis* Zellen, dann bleiben die Schalen zurück und sinken auf den Grund unterhalb des Südozeans, wo sie den Opalgürtel bilden. Dieser stellt das größte bekannte Reservoir an biogenem Silikat dar. Das Sediment besteht zu 90 % aus den Schalen von *F. kerguelensis*, da die dünnwandigen Schalen von anderen Diatomeenarten bis zum Eintreffen auf den Ozeanboden bereits überwiegend lysiert sind (Fuchs, et al., 2013, S. 411). Wie bereits beschrieben können durch Sedimentprobenahmen und -analysen vergangene Klimaperioden erforscht werden (siehe 1.1.1). Außerdem können die Schalenflächen und -formen im Sediment für die Rekonstruktion von vergangenen Nährstoffkonzentrationen im Südpolarmeer genutzt werden (Cortese, et al., 2007).

1.2 Die Photosynthese

Das Sonnenlicht ist eine der ältesten Energiequellen der Erde. Die Nutzbarmachung dieser Lichtenergie durch photoautotrophe Organismen wird Photosynthese genannt. In der Natur ist die Photosynthese eine der grundlegendsten chemischen Reaktionen und der Ursprung vieler Lebewesen. Eine der wichtigsten Arten der Photosynthese ist die oxygene Photosynthese. Sie bildet die Grundlage einer Vielzahl biologischer Kreisläufe und wird stets durch Licht betrieben. Für die Reaktion der oxygenen Photosynthese werden sowohl das Photosystem I (PS I) als auch das Photosystem II (PS II) benötigt. Es erfolgen die Licht- und die Dunkelreaktion. Zu den phototrophen Organismen, welche oxygene Photosynthese betreiben, gehören eukaryotische Algen, prokaryotische Cyanobakterien und höhere Pflanzen. *Fragilariopsis kerguelensis* lässt sich somit in die Gruppe der oxygenen Photosynthese betreibenden Organismen einordnen. Durch einstrahlendes Licht werden Elektronen aus Wasser als Reduktionsmittel gewonnen. Somit werden Elektronenakzeptoren und Reduktionsäquivalente autonom hergestellt (Kohler, 2005, S. 1). Lebewesen, die oxygene Photosynthese betreiben sind also nicht auf einen externen Elektronenakzeptor für den Atmungsprozess angewiesen. Während dieser Art Photosynthese wird CO₂ aus der Luft fixiert und in Glukose umgewandelt. Außerdem erfolgt die Abgabe von molekularem Sauerstoff in das umliegende Medium. Die resultierende Reaktionsgleichung lässt sich folgendermaßen formulieren:

Oxygene Photosynthese: $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{Lichtenergie} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ (Kohler, 2005 S. 1 f.).

Am Anfang fast jeder Nahrungskette stehen Photosynthese betreibende Organismen. Sie liefern organische Moleküle für den Aufbau von wichtigen Körperfunktionen, dienen als Energielieferanten, bilden lebensnotwendigen Sauerstoff und stellen somit die Basis der meisten heterotrophen Lebewesen dar (Nabors, 2007, S. 209 f.). Aber auch Photosynthese betreibende

Organismen stehen in einer gewissen Abhängigkeit zu heterotrophen Lebewesen. Das Abfallprodukt der Photosynthese (O_2) geht als Edukt in die Zellatmung von heterotrophen Organismen ein, wobei das Produkt der Zellatmung (CO_2) wiederum als Edukt in der Photosynthese photoautotropher Organismen verwertet werden kann. Photoautotrophe und heterotrophe Lebewesen stehen somit in wechselseitiger Abhängigkeit (Munk, 2009, S. 173).

Die Photosynthese läuft in zwei Schritten ab, einer Licht- und einer Dunkelreaktion. Bei der Lichtreaktion wird das einfallende Licht eingefangen und Sauerstoff als Produkt hergestellt. Außerdem liefert sie Energie, um in der Dunkelreaktion das Produkt (Glukose) herzustellen (Nabors, 2007, S. 210).

1.2.1 Chloroplasten

In den Chloroplasten findet während der Photosynthese die Umsetzung von Lichtenergie in ATP zur Betreibung des Zellstoffwechsels statt. Sie gehören zu den Zellorganellen und befinden sich im Zytoplasma von eukaryotischen, phototrophen Organismus. Der Durchmesser eines Chloroplasts kann von 3 bis 5 μm variieren. Außerdem können sie kugelförmig oder langgestreckt sein (Nabors, 2007, S. 210). Wie Abb. 3 darstellt, werden sie von einer Doppelmembran umschlossen, deren äußere permeabel, also für kleinere Moleküle durchlässig ist. Die innere Membran umschließt einen zentralen Raum, das Stroma. Dieses ist das Plasma der Chloroplasten und enthält unter anderem Enzyme für den Calvin-Zyklus. Zwischen den Chloroplastenmembranen befindet sich ein intermembranöser Spalt. Innerhalb des Stromas befinden sich die Thylakoide. Sie bestehen aus einem System gefalteter Säcke. In ihrer Membran befindet sich das farbgebende, photochemische Pigment Chlorophyll. Außerdem beinhalten sie Enzyme der Elektronentransport-Kette und eine ATPase (Hirsch-Kauffmann, et al., 2009, S. 41 f.).

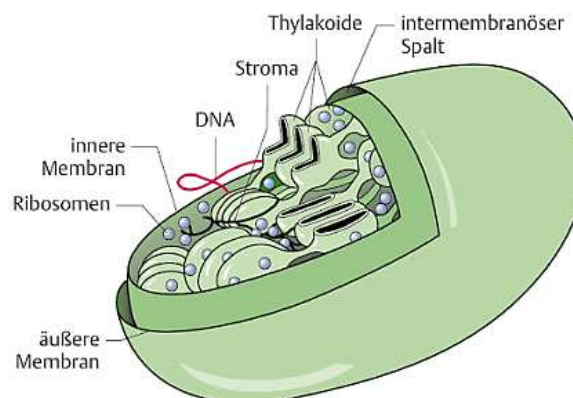


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Innenraumes eines Chloroplasts (Hirsch-Kauffmann, et al., 2009, S. 42)

1.2.2 Chlorophyll

Chlorophyll ist ein lichtabsorbierendes und farbgebendes Pigment, welches die Photosynthese durch sogenannte Lichtsammelkomplexe erst ermöglicht. Es kann innerhalb der Chloroplasten entweder an der Membran der Thylakoide gebunden oder ein Teil von ihnen sein. Es ist das

einziges Pigment, das unmittelbar an dem Prozess der Photosynthese beteiligt ist. Die grüne Färbung des Chlorophylls wird durch dessen Fähigkeit, blaues (400-500 nm) und rotes (600-700 nm) Licht (Abb. 4) des sichtbaren Spektrums zu absorbieren, hervorgerufen (Nabors, 2007, S. 212). Abb. 4 zeigt zwischen den Wellenlängen 500 und 600 nm die sogenannte „Grünlücke“. Dieser Wellenlängenbereich wird vom Chlorophyll nicht absorbiert und reflektiert so die Wellenlängen des grünen Spektrums. Das menschliche Auge nimmt Chlorophyll enthaltene Organismen somit als grün wahr (Munk, 2009, S. 178 f.). Außerdem zeigt die Abb. 4 die Absorptionsmaxima von Chlorophyll a, welche bei etwa 430 und 660 nm liegen. Zusätzlich wird in Kieselalgen das Pigment Chlorophyll c tätig. Es besitzt ein Absorptionsmaxima bei etwa 450 nm und weitere Peaks bei 580 und 630 nm (Coral Biome, 2013).

Absorption %

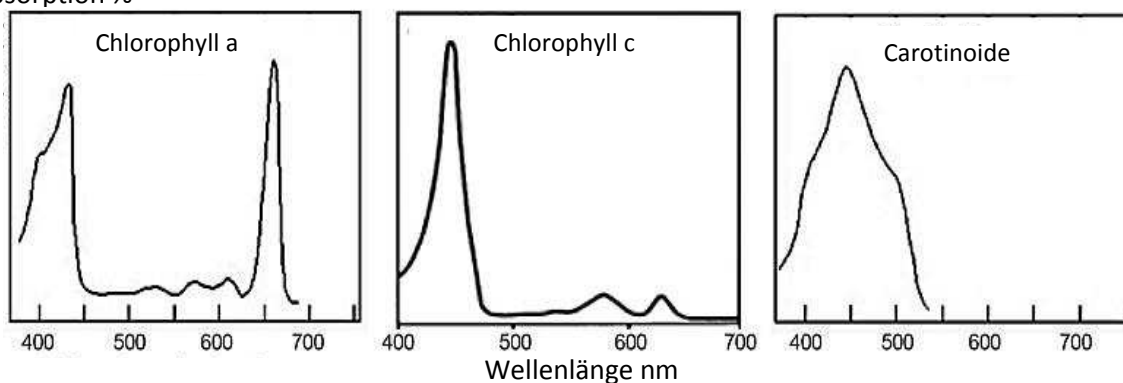


Abbildung 4: Spektren der Pigmente Chlorophyll a, c und Carotin. Die Absorptionsmaxima liegen für Chl a bei 450 und 690 nm, für Chl b bei 480 und 640 nm und für Carotin bei 480 und 520 nm. Die Farbskala zeigt das absorbierte Farbspektrum an (vgl. Coral Biome, 2013).

Grundlegend unterscheidet man zwischen Chlorophyll a und c anhand ihrer unterschiedlichen Seitengruppe, welche sich am Ringgerüst ihrer chemischen Verbindung befindet. Allerdings kommt nicht jedes Chlorophyll-Pigment in einem der Photosynthese betreibenden Organismus vor. Hauptbestandteil der Photosynthese stellt das Pigment Chlorophyll a dar. Chlorophyll c tritt zusätzlich in Algen auf. Es nimmt nicht direkt an der Lichtreaktion der Photosynthese teil, sondern überträgt die absorbierte Energie an die direkt beteiligten Chl-a-Moleküle. Daher wird es auch als akzessorisches Pigment (Hilfspigment) bezeichnet (Nabors, 2007, S. 212 f.).

Außer dem Chlorophyll c gibt es auch andere akzessorische Pigmente, die an der Photosynthese beteiligt sind. Dazu gehören vor allem die Carotinoide. Carotinoide verringern zusätzlich die „Grünlücke“ (Munk, 2009, S. 178), weil sie Licht im Bereich zwischen ca. 400 und 520 nm absorbieren (Abb. 4).

1.2.3 Lichtsammelkomplex (=light harvesting complex, LHC)

Chlorophylle schließen sich zu photochemischen Reaktionseinheiten, die man Lichtsammelkomplexe nennt, zusammen. Gemeinsam mit Proteinen bilden sie ein Protein-Pigment-Komplex, die Photosysteme. Diese Komplexe befinden sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten und beinhalten etwa 300 Pigmentmoleküle (Munk, 2009, S. 186). Jedes dieser Pigmente kann Licht absorbieren und es in Form von Energie weiterleiten. Allerdings kann nur ein

Molekül, das an einer besonders aktiven Stelle am aktiven Zentrum des Photosystem-Proteins sitzt, diese Energie für den Prozess der Photosynthese nutzen. Bei diesem Molekül handelt es sich um Chlorophyll a. Es bildet das Reaktionszentrum (aktive Zentrum) eines Photosystems. Für die Photochemie ist es von großer Bedeutung, da es für die Weiterleitung von Energie durch Elektronenübertragung zuständig ist (Alberts, et al., 2008, S. 953-956).

Stellt man sich das Photosystem II als eine Art Trichter (Antennenkomplex) vor, dann „sammeln“ die oben gelegenen Pigmente (Antennenpigmente) das Licht in Form von Lichtquanten (Photonen) ein. Durch die Anregung der Chl-Moleküle wird ein Elektron auf ein höheres Elektronenniveau gehoben. Dadurch befindet sich das angeregte Molekül in einem instabilen Zustand und strebt danach in seinen Grundzustand zurück. Durch die Übertragung der Anregungsenergie auf ein benachbartes Chl-Molekül kehrt das ursprünglich angeregte Molekül in seinen Grundzustand zurück. So entsteht eine Energieübertragung zum Reaktionszentrum, einem Chlorophyll a Molekül. Dieses ist an ein Protein gebunden und besitzt eine erhöhte Absorptionsfähigkeit (Alberts, et al., 2008, S. 953 f.). Abb. 5 stellt schematisch den Transportweg der Energie zum Reaktionszentrum dar.

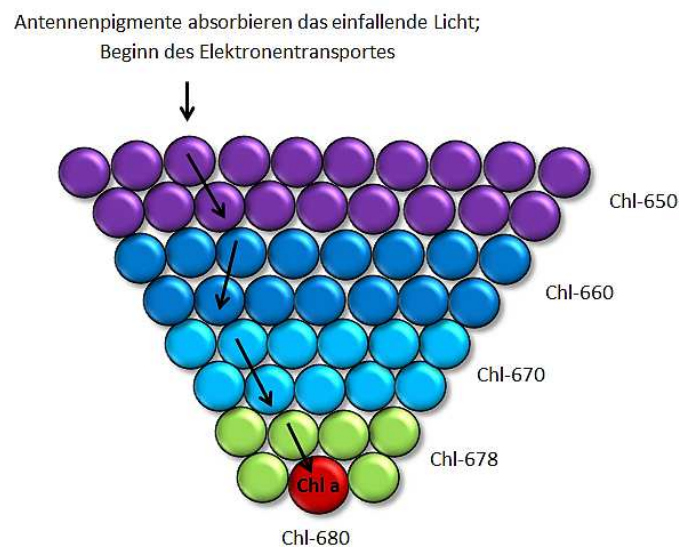


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lichtsammelkomplexes vom PS II. Durch Lichtabsorption beginnt der Elektronentransport in den Antennenpigmenten. Die Pfeile stellen die Anregungsenergie dar, die auf niedrigere Niveaus abgegeben und zum aktiven Chl-a-Protein-Komplex geleitet wird (vgl. Helmich, 2016).

Das Absorptionsmaximum des Chl-a-Protein-Komplexes bestimmt die Benennung der Photosysteme I und II. Das Reaktionszentrum vom PS I besitzt ein Chlorophyll-a-Protein-Komplex, welcher ein Absorptionsmaximum von 700 nm aufweist. Daher wird dieses Reaktionszentrum auch P700 genannt. Photosystem II besitzt einen Chlorophyll-a-Protein-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 680 nm, daher die Bezeichnung des Reaktionszentrums P680 (Fritsche, 2016, S. 159). Die im Reaktionszentrum gesammelte Energie wird anschließend in eine Elektronentransportkette eingeschleust (Alberts, et al., 2008, S. 956).

1.2.4 Licht- und Dunkelreaktion

Die Lichtreaktion findet in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten statt. Sie beginnt mit dem Auffangen von einfallendem Licht auf das PS II (Hartmann, 2015, S. 3). Abb. 6 stellt schematisch die Elektronentransportkette ausgehend vom PS II zum PS I dar. Die einzelnen Schritte dieses Prozesses werden im untenstehenden Text erläutert.

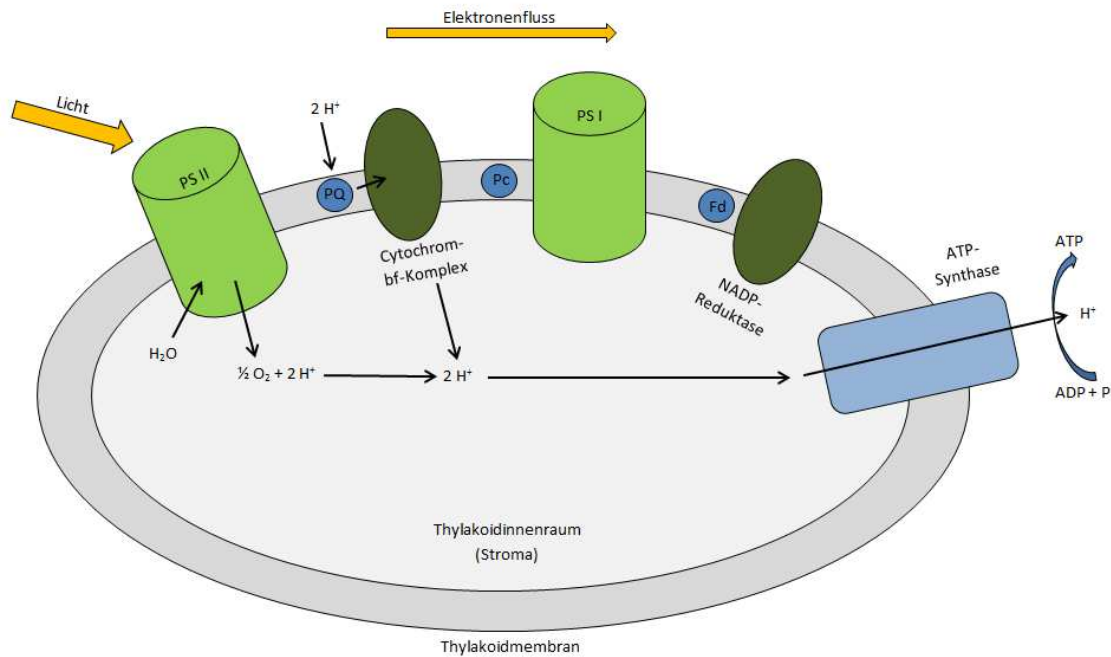


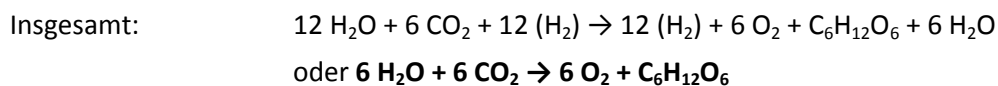
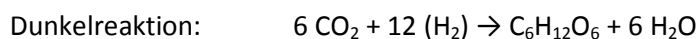
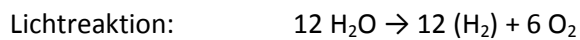
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette. Beginn der Lichtabsorption beim PS II. Übertragung von Elektronen durch die Elektronenüberträger Plastochinon (PQ) einen Cytochrom-bf-Komplex und Plastocyanin (Pc) auf das PS I. Entstehung von reduziertem Ferredoxin (Fd) und Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch eine NADP-Reduktase. Parallele Photophosphorylierung von $\text{ADP} + \text{P}$ zu ATP und Erreichen eines H^+ -Gradienten durch die ATP-Synthase (vgl. Nabors, 2007, S. 217).

Wie oben bereits beschrieben wird das Licht durch einen Antennenkomplex, dem PS II, eingefangen. Die Elektronen der Antennenpigmente werden durch die Energie des Lichtes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Durch diese Anregung der Elektronen beginnt die Elektronentransportkette. Tiefer liegende Pigmente werden durch die Elektronen angeregt und leiten diese an das Reaktionszentrum weiter. Das Reaktionszentrum P680, bestehend aus einem Chlorophyll-a-Protein-Komplex, wird angeregt (Alberts, et al., 2008, S. 953 f.). Das angeregte Elektron wird anschließend auf einen Elektronenakzeptor übertragen, der Chl-a-Protein-Komplex wird oxidiert. Weil ein Elektron abgegeben wird, entsteht eine Elektronenlücke am P680. Durch die Spaltung von Wasser (Photolyse) wird diese wieder aufgefüllt (Koolman, et al., 2003, S. 130). Während der Photolyse wird ein Wasser-Molekül in seine Bestandteile, Wasserstoff und molekularen Sauerstoff, aufgespalten. Durch die Spaltung von zwei H_2O -Molekülen entstehen somit 4 Elektronen, 4H^+ und 2O_2 -Moleküle nach folgender Reaktionsgleichung: $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- + \text{O}_2$ (Munk, 2009, S. 189). Die Elektronen werden ausgehend vom PS II bis zum PS I durch die Elektronenüberträger Plastochinon und Plastocyanin über einen Cytochrom-bf-Komplex (einem zusätzlichen Elektronentransporter) transportiert (Horton, et al., 2008, S. 613). Im PS I entsteht durch die Lichtabsorption und Elektronenübertragung vom PS II, reduziertem Ferredoxin

(Elektronenakzeptor). Das Ferredoxin wird dazu genutzt, Elektronen zu verteilen und mit Hilfe einer NADP-Reduktase NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$, einem chemischen Energieträger, zu reduzieren (Munk, 2009, S. 194 ff.). Außerdem werden H^+ -Moleküle, zum Aufbau eines H^+ -Gradienten, durch eine ATP-Synthase durch die Membran geschleust. Dadurch synthetisiert die ATP-Synthase während der sogenannten Photophosphorylierung $\text{ADP} + \text{P}$ zu ATP, einem wichtigen chemischen Energieträger (Nabors, 2007, S. 234). Abschließend werden die chemischen Energielieferanten NADPH und ATP in der Dunkelreaktion zur Bildung von Glukose verwendet. Die Zellen können nur bedingte Mengen NADPH und ATP speichern, sodass die Dunkelreaktion indirekt von der Lichtreaktion abhängig ist. Sie kann also nicht vollständig ohne Licht auskommen (Nabors, 2007, S. 218 f.).

Die Dunkelreaktion oder Lichtunabhängige Reaktion findet im umgebenden Bereich der Thylakoide, dem Stroma, der Chloroplasten statt. Sie wird auch nach ihrem Entdecker, Melvin Calvin, als Calvin-Zyklus bezeichnet (Nabors, 2007, S. 218 f.). Die Dunkelreaktion kann erst nach erfolgter Lichtreaktion ablaufen und lässt sich in drei Schritte unterteilen. Dem ersten Schritt, die CO_2 -Fixierung durch Ribulose-1,5-bisphosphat, wodurch zwei 3-Phosphoglycerat-Moleküle gebildet werden. Im nächsten Schritt werden die 3-Phosphoglycerat-Moleküle zu Hexosen (z.B. Glukose) reduziert. Abschließend werden Ribulose-1,5-bisphosphate regeneriert, um weiteres CO_2 zu fixieren (Berg, et al., 2018, S. 690).

Abschließend erhält man für die Licht- und Dunkelreaktionen folgende Teilgleichungen, die sich zu einer Reaktionsgleichung zusammenfassen lassen (Bannwarth, et al., 2007, S. 338):



1.3 Chlorophyllfluoreszenz

In der Forschung macht man sich die Chlorophyllfluoreszenz aufgrund der zerstörungsfreien Messung der Photosyntheseaktivität zu Nutze. Chlorophyllfluoreszenz wird ausschließlich vom Pigment Chl a des PS II wiedergegeben. Durch Messungen mit einem Chlorophyllfluorometer und deren Auswertung lassen sich Aussagen zum Zustand des PS II machen. So können die stressphysiologischen Reaktionen des PS II ermittelt und analysiert werden (Maxwell, et al., 2000, S. 659). Die vom Organismus aufgenommene Lichtenergie kann im Photosystem für drei verschiedene Prozesse verwendet werden. Zum einen für die Photochemie, zu der alle Prozesse gehören, die für das Betreiben des Photosystems notwendig sind. Desweiteren können nicht-photochemische Prozesse ablaufen, bei denen Energie entweder als Wärme oder als Chlorophyllfluoreszenz abgegeben wird (Maxwell, et al., 2000, S. 659 f.).

Zur Freisetzung von Wärme oder Fluoreszenz kommt es dann, wenn ein Chlorophyll a Molekül durch die Absorption von Licht (Photonen) in einen angeregten Zustand versetzt wird. Ein Elektron wird aus dem Grundzustand S_0 in einen angeregten Singulettzustand S_1 oder S_2 gehoben. Durch die Anregung im Blaulichtbereich wird das Elektron in den energiereicheren Singulettzustand S_2 gehoben und durch die Anregung im Rotlichtbereich wird es auf den energieärmeren Singulettzustand S_1 gehoben. Durch den instabilen Zustand und das schnelle Abfallen eines Elektrons in ein anderes Elektronenniveau (Singulettzustand) wird Schwingungsenergie in Form von Wärme zurückgegeben (Schwingungsrelaxation). Die übrige Energie wird als elektromagnetische Welle emittiert. Dadurch hat das emittierte Licht eine größere Wellenlänge (also eine geringere Energie) als das ursprünglich absorbierte Licht. Innerhalb von wenigen Nanosekunden nach der Anregung erfolgt die Abstrahlung der emittierten Lichtenergie in Form von Fluoreszenz (Emission) (Abb. 7) (Munk, 2009, S. 180 f.).

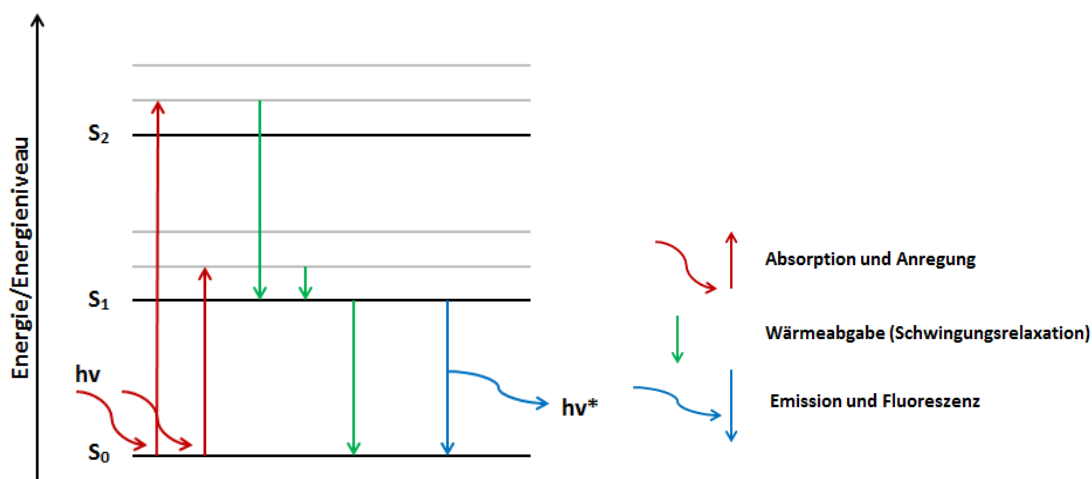


Abbildung 7: Elektronenniveaus oder Singulettzustände, die bei der Lichtabsorption bzw. Wärme- und Fluoreszenzabgabe entstehen können. $h\nu$ stellt Anregungsphotonen dar, die vom System absorbiert werden. $h\nu^*$ stellt Photonen dar, die vom System als Emission zurückgegeben werden (vgl. Wagner, 2010).

1.3.1 Fluoreszenzquenching und Photoinhibition

Im Gegensatz zu den Prozessen die zur Fluoreszenzemission führen, gibt es auch solche, die eine Fluoreszenzlöschung, das sogenannte photosynthetische- oder Fluoreszenzquenching, hervorrufen. Hierzu gehören alle Vorgänge, die eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenz zur Folge haben. Der angeregte Zustand wird dabei entweder strahlungsfrei in den Grundzustand überführt oder gar nicht erst erreicht. Das Fluoreszenzquenching dient als wichtiges Hilfsmittel zur Beschreibung komplexer Systeme. Dabei lassen sich Aussagen zur Effizienz und Kinetik des Quenching machen. Außerdem erhält man Informationen über die Art und Position des Fluorophors (fluoreszierende chemische Verbindung). Grundsätzlich unterscheidet man unter den statischen und dynamischen Quenching-Effekten. Beim dynamischen Quenching kommt es zu der strahlungsfreien Überführung eines angeregten Fluorophors in seinen Grundzustand. Ein sogenanntes Quencher-molekül kollidiert mit dem Fluorophor, dessen Energie oder Elektron auf das Quencher-molekül übertragen wird. Dieser Prozess ist von der Konzentration der Quencher-moleküle abhängig (Röder, 1999, S. 145). Durch die Komplexbildung eines Fluorophors

mit einem Quenchemolekül kommt es zum statischen Quenching-Effekt. Nach der Lichtabsorption geht der gebildete Komplex strahlungslos in den Grundzustand über (Röder, 1999, S. 148).

Nimmt nicht die Wiedergabe von Fluoreszenz, sondern der Elektronentransport in den Photosystemen ab, spricht man von Photoinhibition. Die Photoinhibition ist der durch hohe Lichtintensitäten ausgelöste Verlust der Elektronentransportaktivität. Das Reaktionszentrum kann sich in einem oxidierten („offenen“) und einem reduzierten („geschlossenen“) Zustand befinden. Oxidiert ist er dann, wenn das Reaktionszentrum für die Aufnahme von Licht bereit ist und der Elektronentransport in den Photosystemen stattfindet. Durch hohe Belichtungsstärken wird es in einen reduzierten Zustand versetzt, um die Photosysteme vor Photoinhibitionsschäden zu schützen. Dadurch wird der Elektronentransport inhibiert (Tyystjärvi, 2013).

1.3.2 Bestimmung der Umwelanpassung von Algen

Die Umwelanpassung von einzelnen Algen kann durch Laborexperimente bestimmt werden. Während dieser Experimente setzt man Kulturen der zu untersuchenden Algen unterschiedlichen Umweltbedingungen aus. Durch verschiedene Methoden lassen sich die physiologischen Reaktionen der Algen beobachten und mit Hilfe unterschiedlicher Parameter untersuchen. In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden folgende Analysemethoden für die Bestimmung der Umwelanpassung angewendet:

- Aufnahme von Wachstumskurven durch Zellzählung oder Chlorophyllfluoreszenz-Messung (Bestimmung der Absorption ist ebenfalls möglich), daraus erfolgt die Berechnung von Wachstumsraten und Generationszeiten
- Höchste erreichte Zellzahl/ml in der stationären Phase durch Zellzählung
- Zellgrößen- und Biovolumenbestimmung durch die Aufnahme von Mikrofotos mit einem inversen Lichtmikroskop
- Ermittlung des maximalen Verhältnisses der Quantenausbeuten F_v und F_m nach der Einwirkung von Lichtstress durch Chlorophyllfluoreszenz-Messung mit unterschiedlichen Fluorometern
- Ermittlung von maximalen Elektronentransportraten des PS II durch Chlorophyllfluoreszenz-Messung
- Bestimmung der Lichtreaktion des PS II durch die Aufnahme von Induktionskurven mittels gleicher Lichtintensitäten über einen definierten Zeitraum (Chlorophyllfluoreszenz-Messung)
- Ermittlung der Lichtanpassungsfähigkeit des PS II durch die Aufnahme von Lichtkurven mittels schrittweise erhöhten Lichtintensitäten (Chlorophyllfluoreszenz-Messung)

Für die Fluoreszenz-Messungen wurden in dieser wissenschaftlichen Arbeit zwei unterschiedliche Fluorometer verwendet. Die hier beschriebenen Vorgehensweisen können je nach Organismus variieren.

Imaging-Pulsamplitudenmodulation-Fluorometrie (Imaging-PAM)

Bei der Pulsamplitudenmodulation-Fluorometrie wird Licht in einer Reihe definierter Impulse abgegeben. Das Fluoreszenzsignal wird abgetastet und mittels Imaging-PAM Software dargestellt. Die Imaging-PAM wird als Forschungsinstrument für viele Forschungsprojekte verwendet. Es lassen sich feste Proben, wie Blätter, aber auch flüssige Kulturen direkt in ihren Kulturflaschen messen. Mit dem Fluorometer können unterschiedliche Parameter bestimmt werden. Nicht nur die Abgabe von Fluoreszenz, sondern auch das Fluoreszenzquenching und die Elektronentransportrate lassen sich unter anderem ermitteln. Für die Anregung des Reaktionszentrums vom PS II können unterschiedliche Lichtarten und -stärken eingestellt werden. Direkt nach dem Einschalten der Imaging-PAM beginnt automatisch das sogenannte „Messlicht“, kontinuierliche LED-Impulse abzugeben. Es kann unterschiedliche Wiederholungsfrequenzen zwischen 1 und 8 Hz (Wiederholungen pro Sekunde) annehmen. Außerdem kann die Chlorophyllfluoreszenz mittels starken blauen Lichtimpulsen (Sättigungsimpulsen) angeregt werden. Dadurch wird der photosynthetische Elektronentransport vorangetrieben. Für die Messungen von Induktions- und Lichtkurven gibt es zusätzlich photosynthetisch aktive Strahlung (PAR), deren Intensität je nach Bedarf ausgewählt werden kann. Um das Reaktionszentrum für die Messungen zu Beginn in einen lichtaufnahmefähigen, oxidierten Zustand zu versetzen, wird die zu messende Probe zunächst mindestens 15 Minuten dunkeladaptiert. Die Erstellung von Induktionskurven erfolgt durch die Abgabe von Sättigungsimpulsen (alle 20 Sekunden) mit einem konstanten PAR. Bei der Aufnahme von Lichtkurven wird alle 10 Sekunden ein Sättigungsimpuls abgegeben und der PAR schrittweise erhöht. Um das Reaktionszentrum bereits vor der Aufnahme einer Lichtkurve an das Licht zu adaptieren wird zunächst eine Induktionskurve erstellt. Die Messzeit variiert und benötigt je nach Art nur wenige Sekunden bis etwa 12 Minuten (Walz GmbH, 2014).

Fast Repetition Rate Fluorometer (FRRF)

Das Fast Repetition Rate Fluorometer ist ein hochempfindliches, weit verbreitetes Messinstrument zur Ermittlung von unterschiedlichen Fluoreszenz-Parametern. Es handelt sich um ein Fluorometer mit sehr schneller Wiederholungsrate. Das heißt, die Abgabe von Messlicht-Impulsen erfolgt innerhalb von wenigen Mikrosekunden. Dadurch reagiert es im Vergleich zu anderen Fluorometern sehr viel empfindlicher auf die Fluoreszenz von phototrophen Organismen. Im Gegensatz zur Imaging-PAM lassen sich ausschließlich Proben in flüssiger Form messen. Wie bei der Imaging-PAM können unter anderem die Fluoreszenzwiedergabe, das Fluoreszenzquenching und die Elektronentransportrate bestimmt werden.

Auch die Lichtarten und -stärken können je nach Messung variieren. Die Aufnahme von Induktions- und Lichtkurven ist ebenfalls möglich. Es ist aber keine Messung einer Induktionskurve vor der Aufnahme einer Lichtkurve notwendig. Bei der Aufnahme einer Lichtkurve mit dem FRRF wird jeder PAR sechsmal wiederholt, bevor eine Erhöhung stattfindet. Die Proben werden ebenfalls vor jeder Messung mindestens 15 Minuten dunkeladaptiert, um das Reaktionszentrum in einen oxidierten Zustand zu versetzen. Obwohl im Gegensatz zur Imaging-PAM die Messungen innerhalb von wenigen Mikrosekundenintervallen stattfinden, kann der Zeitaufwand einer

Messung je nach Art zwischen wenigen Mikrosekunden bis hin zu mehreren Stunden stark variieren. (Oxborough, 2012).

1.4 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Seit der Entdeckung der Diatomeenspezies *Fragilariopsis kerguelensis* ging man davon aus, dass es nur eine, zusammenfassende Art gibt. Vor kurzem entstand jedoch durch molekulare Untersuchungen die Annahme, dass eher drei Arten voneinander zu divergieren sind. Diese Arten wurden bisher durch die Bestimmung der Rectangularity, durch die Analyse von ITS-Sequenzen und durch Kreuzungsexperimente unterschieden (Glemser, 2018). Ob es sich wirklich um drei verschiedene Arten handelt gilt es aber noch zu untersuchen. Dadurch kam es noch zu keiner separaten Namensgebung.

Durch den Vergleich von unterschiedlichen Methoden zur Erfassung von Wachstumsraten und photosynthetischen Parametern sollen erste praktische Vorgehensweisen bestimmt werden, welche eine physiologische Differenzierung der drei Arten ermöglichen. Die Bestimmung von Wachstumskurven und -Raten gehört dabei zu den grundlegendsten Verfahren, um Unterschiede zwischen verschiedenen Organismen festzustellen. Aber auch die Erfassung von photosynthetischen Parametern, wie der Zustand des Photosystems, Photosyntheseaktivitäten, Fluoreszenzwiedergabe, oder die Quantenausbeute sind wichtige Indikatoren, die für jede morphologische Art spezifisch sein können.

Vorangestelltes Ziel ist es, Parameter für die Zellkultivierung, die Bestimmung von Wachstumskurven und -Raten, sowohl durch Zellzahlbestimmung, als auch durch Pulsamplitudenmodulation-Fluorometrie und für die Erfassung des Zustandes des Photosystems für die Spezies *Fragilariopsis kerguelensis* zu ermitteln und miteinander zu vergleichen. Hierzu sollen Lichtkurven mittels Imaging-PAM und FRRF aufgenommen und verglichen werden. Dafür sollen drei nördliche und drei südliche Stämme aus einer der drei morphologischen *F. kerguelensis* Arten bei zwei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert und untersucht werden. Die experimentellen Ansätze werden je zweimal mit unterschiedlichen Zellanfangszahlen angesetzt und durch zwei unterschiedliche Zählmethoden ausgezählt. Die Vorgehensweisen mittels Utermöhl-Verfahren, PAM-Fluorometer und Fast Repetition Rate Fluorometer werden detailliert im Methodenteil beschrieben. Im Ergebnisteil werden die ermittelten Wachstums- und photosynthetischen Werte zusammengefasst dargestellt und in einer abschließenden Diskussion beurteilt.

2. Material

2.1 Kulturmaterial

2.1.1 Probenahme und Isolierung von *Fragilariopsis kerguelensis* Stämmen

Die Route der Polarsternexpedition PS 103 startete am 16. Dezember 2016 in Cape Town (Kapstadt, Südafrika) und endete am 03. Februar 2017 in Punta Arenas (Chile, Südamerika). Während dieser Expedition erfolgten mit Hilfe von Phytoplanktonhandnetzen mit einer Maschenweite von 20 µm und einem CTD-Gerät mit Wasseraufnahmefunktion die Probenahmen von *Fragilariopsis kerguelensis* Populationen (Boebel, 2017, S. 2). Die für diese Arbeit verwendeten Stämme wurden ausschließlich aus den Probenahmen der Handnetze aus 20 m Meerestiefe an Bord der Polarstern (Expeditionsschiff) gebracht und isoliert.

In den Laboren an Bord der Polarstern wurden für Analysen und experimentelle Forschungen klonale Kulturen der *F. kerguelensis* Populationen isoliert. Die Isolierung erfolgte durch die Entnahme von einzelnen Zellketten und wiederholtes Waschen in steril filtriertem F/2-Medium unter einem inversen Mikroskop. Die Isolate wurden nach erfolgter Inokulation bei 3-4°C und einem Licht-/Dunkel-Zyklus von 18:6 Stunden inkubiert. Durch regelmäßige Kontrollen und erneute Isolierungen wurden die Kulturen frei von Verunreinigungen gehalten. Für den Transport in die Heimlabore überführte man die Kulturen in 15 ml Falcon-Röhrchen und 2 ml Eppendorf-Gefäße. Die Charakterisierung der einzelnen Stämme erfolgte in den Heimlaboren. Hierfür wurden die Kulturen in frisches F/2 +Si-Medium überführt und bei ähnlichen Bedingungen (4°C und einem Licht-/Dunkel-Zyklus von 19:5 Stunden) kultiviert. Die Bezeichnungen der Stämme setzen sich aus zwei Ziffern zusammen. Dabei definiert die erste Ziffer die Station der Probenahme und die zweite Ziffer beschreibt den isolierten Stamm. Die regelmäßigen Untersuchungen auf bakterielle Verunreinigungen wurden im Heimlabor fortgeführt und durch erneute Isolierungen beseitigt (Boebel, 2017, S. 114 ff.). Zur Erhaltung der isolierten Stämme für weitere Projekte und Forschungen wird das Kulturmaterial alle 4 bis 5 Wochen in neue Kulturflaschen mit frischem F/2+Si-Medium umgesetzt.

2.1.2 Unterteilung der Spezies *Fragilariopsis kerguelensis* in drei Unterarten

Durch eine vorangegangene wissenschaftliche Arbeit entstand die Hypothese, dass sich die Spezies *Fragilariopsis kerguelensis* in drei unterschiedliche Unterarten einteilen lässt. Die Differenzierung erfolgte durch verschiedene molekulare und morphologische Untersuchungen. Dazu gehörten die Analyse von ITS-Sequenzen, Kreuzungsexperimente und die Bestimmung der Rectangularity, welche mit der Software SHERPA erfolgte. Aufgrund dieser Analysen wurden verschiedene *Fragilariopsis kerguelensis* Stämme der Polarsternexpedition PS 103 in die drei morphologischen Unterarten, Low-Rectangularity-Nord, Low-Rectangularity-Nord/Süd und High-Rectangularity-Süd, eingeteilt. Nord und Süd beschreiben dabei das bevorzugte Habitat des jeweiligen Stammes. Durch die noch fehlende Bestätigung der Annahme dreier unterschiedlicher

Arten erfolgte noch keine Namensgebung, daher wurde die Einteilung der Stämme anhand ihrer Rectangularity definiert. (Glemser, 2018). Die Einordnung der analysierten Stämme in ihre jeweilige Unterart wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung der drei morphologischen Unterarten von *Fragilariopsis kerguelensis*. LR-N: Low-Rectangularity-Nord, LR-NS: Low-Rectangularity- Nord/Süd, HR-S: High-Rectangularity-Süd (Glemser, 2018)

LR-N	LR-NS	HR-S	LR-N	LR-NS	HR-S
1-09	1-07	14-01	2-16	2-22	4-08
1-48	1-20	14-02	2-18	2-44	4-16
1-51	1-59	14-04	2-32	4-03	4-24
1-52	14-14	14-09	2-38	4-33	4-30
1-54	14-18	14-17	2-41		4-32
1-56	14-19	14-25	2-52		4-36
1-58	14-23	14-26			4-42
1-60	14-24	14-29			4-44
1-61	14-27	14-30			4-47

Die Auswahl der in dieser wissenschaftlichen Arbeit analysierten Kulturen beschränkte sich auf die Unterart Low-Rectangularity-Nord/Süd. Von dieser Art wurden die Stämme 1-07, 2-22, 2-44, 14-18, 14-23, 14-19 und 14-27 untersucht. Dabei wurden die Stämme 1-07, 2-22, 2-44 in der Nähe des nördlichen Randes des Verbreitungsgebietes von *F. kerguelensis* und die Stämme 14-18 (14-23), 14-19 und 14-27 im südlichsten Gebiet (Antarktis) der Polarstern Route PS 103 entnommen. Die genauen Breiten- und Längengrade der Probenahmestationen sind in Tabelle 2 definiert. Außerdem sind in Abb. 8 die Route der Polarsternexpedition und die relevanten Stationen eingezeichnet.

Tabelle 2: Genauer Standort der Probenahmestationen 1, 2 und 14 mit Breiten- und Längengradangabe. (Boebel, 2017, S. 116 f.).

Stationsnr.	Breitengrad	Längengrad
1	-45,96	6,29
2	-49,02	2,84
14	-68,01	0,01

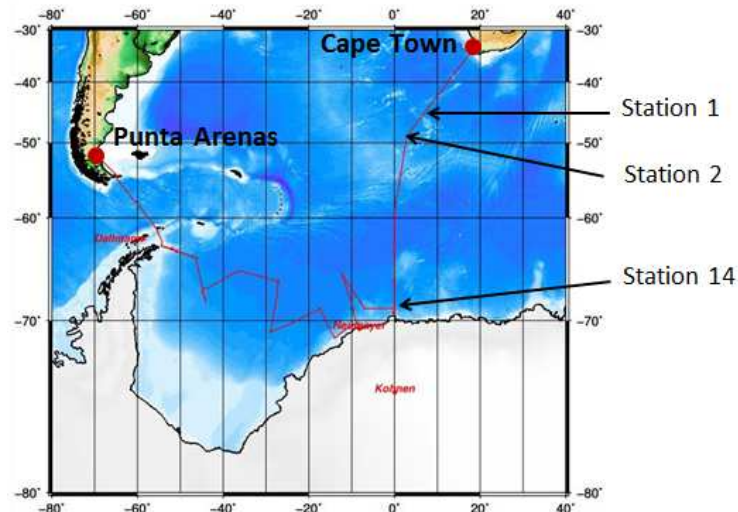


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Route von der Polarsternexpedition PS 103 inklusive der eingezeichneten Probenahmestationen 1, 2 und 14 (Alfred-Wegener-Institut, 2017)

2.2 Lösungen und Chemikalien

Stocklösungen für die Herstellung von F/2+Si-Kulturmedium (Natriumnitrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriummetasilikat, eine Metall-Mix-Lösung (bestehend aus Zinksulfat, Kupfersulfat, Cobaltsulfat, Mangansulfat, Eisenchlorid, Natriummolybdat, Tritriplex III), Vitamin-Mix-Lösung (bestehend aus Vitamin B12, Biotin)), Domol, Ethanol, Lugolsche-Lösung 1ml/200ml, antarktisches Meerwasser, Fluoreszierende Textmarker-Tinte

2.3 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der für diese wissenschaftliche Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe des Verwendungszweckes und des Herstellers

Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
LI-1000 DataLogger; LI COR	Lichtintensitätsmessung	Walz
Axiovert 135;	Lichtmikroskop zum Auszählen	Zeiss
Hera Safe	Sterilwerkbank	Heraeus
Centrifuge 5804	Probenaufbereitung REM	Eppendorf
Imaging-PAM Chlorophyll Fluorometer	PAM-Fluorometer	Walz
AVT Manta 145 NIR (Maxi)	PAM-Kamera	Walz
Sputter Coater SC7640	Sputtern der REM Proben	Emitech
Raster-Elektronen-Mikroskop FEI Quanta FEG 200	REM Aufnahmen	FEI Company
Axiovert 35	Lichtmikroskop zum Erstellen von Mikrofotos	Zeiss

Utermöhl-Kammern	Auszählen der Zellen	Hydro-Bios Kiel
Fast Repetition Rate Fluorometer	PAM-Fluorometer	Chelsea Technologies Group

Desweiteren wurden folgende Laborgeräte und -materialien verwendet:

Manuelle und elektrische Eppendorf-Pipetten, Messpipetten, Glaspipetten, Schraubdeckelgläser, sterile 40 ml und 200 ml Kulturflaschen, Stups, kleine und große Deckgläser, eine Heizplatte, sterile 15 ml Falcon-Röhrchen, Autoklav, eine Peristaltikpumpe, sterile Filter-Kartuschen von Sartorius, sterile Filter Satobran P 0,65 + 0,45 µm Porendurchmesser und Satobran P 0,45 + 0,1 µm Porendurchmesser, sterile Laborschläuche, ein Haubenaufsatz für Schottflaschen, sterile 1 und 2 Liter Schottflaschen, mit Aluminiumfolie isolierte Pappschachteln

2.4 Software und Datenbanken

Tabelle 4: Auflistung der für diese wissenschaftliche Arbeit verwendeten Softwareprogramme und Datenbanken mit Angabe des Verwendungszweckes und des Herstellers

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
ImagingWin v2 46; FW MultiGigE2b	PAM-Software	Walz
Calibration-w-grey-redfilter.par	PAM-AL-List	Walz
Fast Pro 8	PAM-Software	Chelsea Technologies Group
analySIS docu	Mikrofotos der Zellen	Olympus
ImageJ-win64 (Fiji)	Vermessen der Zellen	ImageJ
R-Studio	Statistische Auswertung	R Core Team
Excel 2010	Datenverarbeitung	Microsoft
Word 2010	Textbearbeitung	Microsoft
SHERPA	Auswertungen	Michael Kloster
PubMed	Literaturdatenbank	National Library of Medicine
Photoshop CS6	Bildbearbeitung	Adobe

3. Methoden

Um einen ersten Überblick über die Abfolgen der in dieser wissenschaftlichen Arbeit angewandten Methodiken zu geben, wurden die Arbeitsschritte in dem untenstehenden Schema dargestellt (Abb. 9). Die Messungen mit den Chlorophyll-Fluorometern und das Auszählen, bzw. Fotografieren der Zellen erfolgte parallel. Für das Abschätzen der exponentiellen Phasen wurden die Wachstumskurven mit Hilfe der Grundfluoreszenz F_0 (siehe Punkt 3.6.2 „Relevante Fluoreszenzmessgrößen eines Fluorometers“ und Punkt 3.6.5 „Messung von F_0F_m “) bereits während der Laborarbeiten ausgewertet.

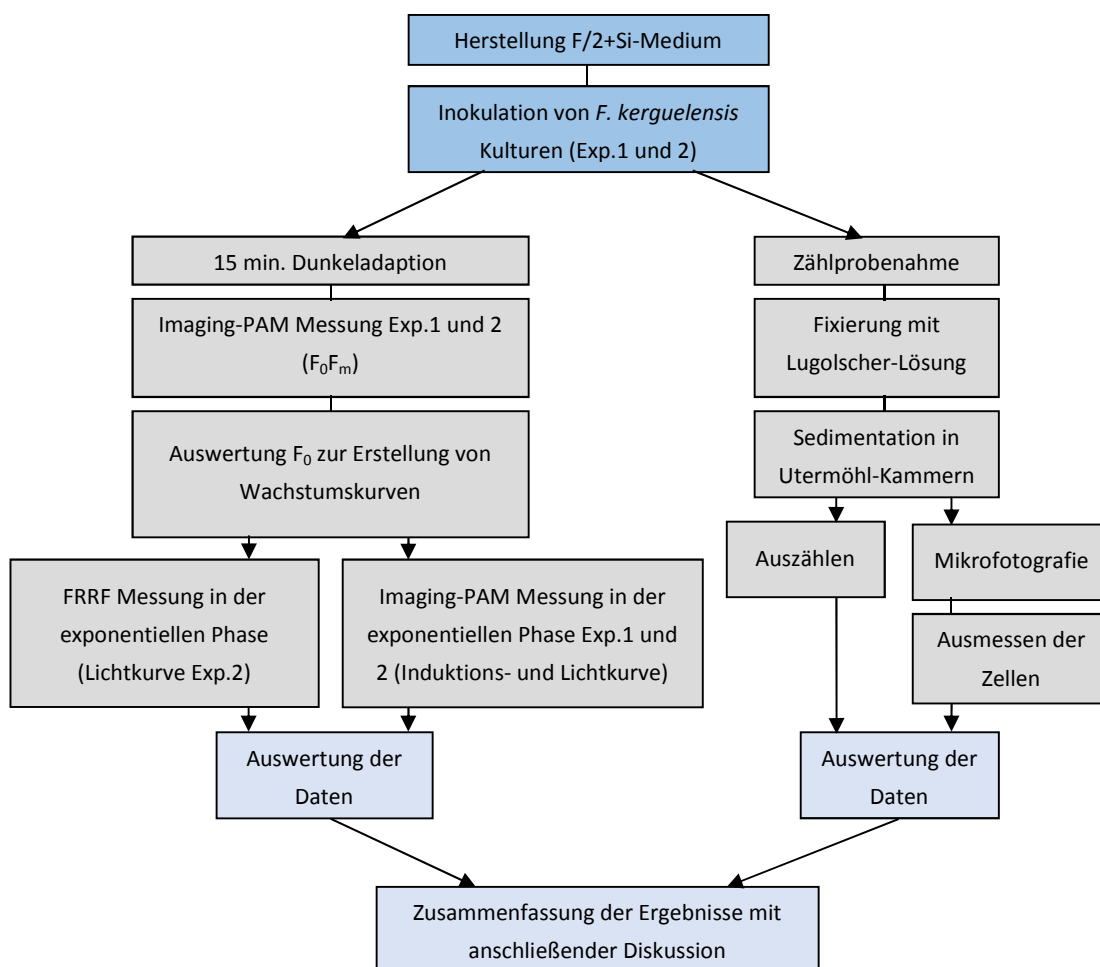


Abbildung 9: Schematische Darstellung der in dieser wissenschaftlichen Arbeit angewandten Arbeitsmethoden

3.1 Zellkultivierung von *Fragilariopsis kerguelensis*

Alle Arbeitsschritte, für die das Öffnen der Kulturflaschen notwendig war, fanden ausschließlich unter sterilen Bedingungen statt.

3.1.1 Herstellung von angereichertem Phytoplankton-Medium

Als Kulturmedium wurde F/2-Medium, ein speziell für Phytoplankton entwickeltes Medium, verwendet. F/2 bedeutet, dass die Konzentration der Originalformulierung (F-Medium von Guillard und Ryther 1962) um die Hälfte reduziert wurde. Je nach Art wird geographisch abgestimmtes Meerwasser mit spezifischen Stammlösungen angereichert (Andersen, 2005, S. 507). Für *Fragilariopsis kerguelensis* verwendet man angereichertes antarktisches Meerwasser mit einem hohen Silikatanteil. Das Medium wird dann als F/2+Si-Medium bezeichnet.

In einen 10 Liter und einen 20 Liter Kanister wurde antarktisches Meerwasser, welches in großen Tanks gelagert wird, gepumpt. Je 1000 ml wurden ein, bzw. zwei ml von spezifischen Stocklösungen mit einer Messpipette hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde das Medium gut durchmischt. In Tabelle 5 sind die Stocklösungen und das jeweils eingesetzte Volumen angegeben.

Tabelle 5: Stocklösungen für die Herstellung von F/2(+Si)-Medium mit dem jeweils eingesetzten Volumen (Protokoll zur Herstellung befindet sich im Anhang unter Punkt B.1 „Herstellung von angereichertem Seewasser für Phytoplankton-Kulturen“).

Stocklösung	Volumen
NaNO ₃ (Natriumnitrat)	1 ml
Na ₂ HPO ₄ (Di-Natriumphosphat)	1 ml
Na ₂ SiO ₃ (Natriummetasilikat)	2 ml für F/2+Si-Medium (<i>F. kerguelensis</i>), 1 ml für F/2-Medium
Metall-Mix-Lösung	1 ml
Vitamin-Mix-Lösung	1 ml

Für die sterile Filtration des Mediums wurde eine Filteranlage aus einer Peristaltikpumpe, zwei Filter-Kartuschen, einem Vorfilter (0,65 + 0,45 µm Porendurchmesser), einem Hauptfilter (0,45 + 0,1 µm Porendurchmesser) und einem Haubenaufsatz für Schottflaschen aufgebaut. Das Verbinden der einzelnen Komponenten erfolgte mit sterilen Laborschläuchen. Vor dem Gebrauch der Filteranlage wurde die Pumpe auf 200 Umdrehungen pro Minute (upm) eingestellt. Um die Filter vor Gebrauch vollständig mit F/2+Si-Medium zu spülen, wurden ca. 500 ml des Mediums durch die Anlage gepumpt und anschließend in einer Abfallflasche verworfen. Nach dem Spülen des Systems wurde eine autoklavierte Schottflasche (je nach Bedarf 1 oder 2 Liter) bis zum Flaschenhals mit filtriertem F/2+Si-Medium befüllt. Die Befüllung einer neuen Schott-Flasche erfolgte nach dem Abschalten der Pumpe. Mit einer schnellen Bewegung wurde der

Haubenaufsatz auf die nächste Schottflasche gesetzt. Nach Verwendung der Filteranlage wurde diese durch Spülen mit VE-Wasser von Salzresten befreit und mit Ausnahme der Peristaltikpumpe für die nächste Verwendung autoklaviert.

3.1.2 Inokulation von Testkulturen

Für die Bestimmung der Settings, welche die Grundeinstellungen der Imaging-PAM darstellen und für das Messen unentbehrlich sind, gingen den eigentlichen experimentellen Ansätzen sechs Testkulturen voraus. Dafür impfte man 40 ml F/2+Si-Medium mit je einem ml der Stämme 1-07, 2-22, 2-44, 14-19, 14-23 und 14-27 in 40 ml Kulturflaschen an. Die Inkubation erfolgte in einem 4°C Kulturraum bei einem Licht-/Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden. Die einstrahlende Lichtintensität der im Kulturraum installierten Lampen auf die Kulturen lag bei ca. 45-55 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Der Kultivierungszeitraum erstreckte sich über einen Zeitraum von 43 Tagen. (Aufgrund des geringen Zellwachstums von Stamm 14-23 wurde dieser für die experimentellen Ansätze, Exp.1 und 2, durch den Stamm 14-18 ersetzt).

3.1.3 Inokulation von experimentellen Kulturen

Für die Inokulation der Kulturen standen Animpfkulturen bereit. Die Menge der benötigten Kultur zum Animpfen richtete sich nach der jeweiligen Kulturdichte. Diese wurde vor dem Inokulieren mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops abgeschätzt. Von den Stämmen 1-07, 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 wurden jeweils zwei Kultur-Ansätze hergestellt. Ein Ansatz in 40 ml Kulturflaschen und einer in 200 ml Kulturflaschen. Von jedem Stamm wurden je zwei Kulturen angesetzt und bei zwei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert. Die Inokulation der Kulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen in F/2+Si-Medium. Die anschließende Kultivierung fand in einem 0°C und einem 4°C Kulturraum bei einem Licht-/Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden statt.

Experiment 1 (Exp.1): Inokulation von 40 ml Probenkulturen

Da die Animpfkulturen der Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 bereits im Vorfeld eine sehr geringe Kulturdichte und ein langsames Wachstum aufwiesen, wurde die Zelldichte aus bereitgestellten 40 ml Animpfkulturen aufkonzentriert. Dafür positionierte man die Kulturflaschen aufrecht unter einer Sterilwerkbank, sodass die Zellen auf die Böden der Flaschen sedimentierten. Anschließend wurden 30 ml Medium abpipettiert und verworfen. Der Rückstand der Animpfkultur wurde bei 4°C für 15 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute in 15 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert. 6 ml des Überstandes wurden erneut verworfen. Die Zellen am Falconboden wurden wieder suspendiert und jeweils 2 ml der aufkonzentrierten Kultur in zweimal 38 ml F/2+Si-Medium inokuliert. Für die Stämme 1-07, 2-22 und 2-44 wurden jeweils 2 ml von nicht aufkonzentrierten Animpfkulturen ebenfalls in je zweimal 38 ml F/2+Si-Medium inokuliert. Demnach erhielt man 12 Probenkulturen, von jedem Stamm zwei, von denen jeweils eine Kulturflasche im 0°C und eine im 4°C Kulturraum inkubiert wurde. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 58 Tagen.

Experiment 2 (Exp.2): Inokulation von 200 ml Probenkulturen

Während der Messungen der Kulturen aus Exp.1 stellte sich heraus, dass die südlichen Stämme eine sehr geringe Zelldichte erreichten. Infolgedessen wurde ein zweites Experiment (Exp.2) angesetzt. Die Herstellung der 200 ml Probenkulturen erfolgte etwa drei Wochen nach dem Animpfen der 40 ml Probenkulturen. Für die Stämme 1-07, 2-22 und 2-44 wurden jeweils ca. 3 ml einer Animpfkultur in Kulturflaschen überführt und mit F/2+Si-Medium auf 200 ml aufgefüllt. Für die Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 wurden etwa 10 ml einer mindestens zwei Monate inkubierten Animpfkultur in Kulturflaschen pipettiert und ebenfalls auf 200 ml mit F/2+Si-Medium aufgefüllt. Auch hier wurden von jedem Stamm 2 Probenkulturen hergestellt, von denen jeweils eine im 0°C und eine im 4°C Kulturraum inkubiert wurde. Die Kultivierung der Probenkulturen erfolgte über einen Zeitraum von 44 Tagen. (Diese Kulturen wurden ursprünglich zur Herstellung von Biomassen für die Messung von Chlorophyllpigmenten angesetzt. Als deutlich wurde, dass die Zellzahlen in Exp.1 zu niedrig waren, wurden diese Ansätze für das Exp.2 verwendet. Daher weichen die Animpfvolumina voneinander ab. Daraus resultierend wurden unterschiedliche Anfangs-Zellzahlen zwischen den Replikaten erzielt.)

Nach dem Platzieren der Kulturen in den Kühlräumen wurde die einstrahlende Lichtintensität der Lampen auf die experimentellen Ansätze gemessen. Hierfür wurde der Sensor des Lichtmessgerätes „LI-1000 DataLogger“ unmittelbar oberhalb der Kulturen positioniert. Alle Probenkulturen wurden sowohl im 0°C, als auch im 4°C Kulturraum einer einstrahlenden Lichtintensität von etwa 45-55 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ausgesetzt.

3.1.4 Herstellung von Backup- bzw. Animpfkulturen

Um gegebenenfalls auf Kulturen der verwendeten Stämme zurückgreifen oder neue Kulturen animpfen zu können, wurden Backup-/Animpfkulturen hergestellt. Dafür pipettierte man unter sterilen Bedingungen jeweils 1 ml von bereitgestellten Animpfkulturen auf 40 ml F/2+Si-Medium. Die Inkubation erfolgte im 4°C Kulturraum bei einem Licht-/Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden. Die einstrahlende Lichtintensität lag zwischen 45-55 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Das Umsetzen der Backup-/Animpfkulturen in frisches Medium erfolgte vor dem Erreichen der Absterbephase in einem Rhythmus von etwa 4-5 Wochen. Regelmäßige Kontrollen der Kulturen unter einem inversen Lichtmikroskop ermöglichten das Abschätzen der nächsten Umsetzung.

3.2 Erfassung von Zellzahlen für die Erstellung von Wachstumskurven**3.2.1 Zählprobenahme und Fixierung**

Bis zum Erreichen der stationären Phase erfolgten etwa zweimal pro Woche mit mindestens zwei Tagen Abstand Zählprobeentnahmen aus jeder Kultur. Für eine gleichmäßige Verteilung der *F. kerguelensis*-Zellen in den Kulturflaschen wurden diese vor der Probeentnahme durch schwenken homogenisiert. Anschließend wurde sowohl aus Exp.1 als auch aus Exp.2 je 1 ml Probe entnommen und in ein Schraubdeckelglas überführt. Um beim späteren Zählen den Zeitaufwand zu minimieren, wurden die Zählproben mit F/2+Si-Medium verdünnt. Die Verdünnungen wurden

je nach Kulturdichte und Zählmethode bestimmt. Für Exp.1 wurde eine kontinuierliche Verdünnung von 1:4 gewählt. Beim Exp.2 variierte die Verdünnung zwischen 1:5 bis maximal 1:9. Zur Vermeidung von einem zu hohen Kulturverlust wurden die 40 ml Kulturen aus Exp.1 nach Entnahme der Zählprobe wieder mit 1 ml Medium auf 40 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Über den Einfluss der Zugabe des Milliliters Medium kann keine Aussage getroffen werden. Bei der Zählprobeentnahme aus den 200 ml Kulturen wurde auf die Zugabe des fehlenden Milliliters verzichtet, da durch das hohe Gesamtvolumen nur ein geringer Kulturverlust entstand. Die Einflussnahme auf das Zellwachstum kann auch hier nicht bestimmt werden.

Die Fixation der Zellen fand unter einem Abzug statt. Es wurde pro Milliliter Zählprobe (Kultur + Medium) 1 Tropfen Lugolsche-Lösung mit einer Glaspipette in das Schraubdeckelglas hinzugegeben und homogenisiert. Durch das Fixieren wurden die Zellen getötet und konserviert, dadurch ließ sich der Zustand der zeitlich abhängigen Probe auch zu einem späteren Zeitpunkt noch nachvollziehen. Außerdem erhielten die Zellen eine kontrastreichere Farbe, sodass sie unter dem Lichtmikroskop leichter zu zählen waren. Die Verwendung eines Glasbehälters war unumgänglich, da Lugolsche-Lösung in Plastikoberflächen einzieht. Schon nach kurzer Zeit hätten sich die Zellen entfärbt und die Probe wäre für weitere Analysen unbrauchbar geworden.

3.2.2 Vorbereitung von Utermöhl-Kammern

Das Zählen der Zellen fand in sogenannten „Utermöhl-Kammern“ statt. Diese haben bei einem Durchmesser von 26 mm ein Fassungsvermögen von 2,973 ml. Unter einem Abzug wurden zunächst 3,1 ml der fixierten Zählproben langsam und in gleichbleibenden Bewegungen in die Utermöhl-Kammern pipettiert. Zum Verschließen einer Kammer wurde ein Deckglas mit etwas Druck über die Kammer geschoben und somit blasenfrei verschlossen. Die überschüssige Kultur, welche mit dem Deckglas zur Seite geschoben wurde, entfernte man mit einem fusselfreien Tuch. Um das Sedimentieren der Zellen auf die Böden der Utermöhl-Kammern zu ermöglichen, wurden diese mindestens eine Stunde unter einem Abzug platziert. Überschüssige Reste der Zählproben wurden unter Licht- und Wärmeausschluss bis zum Abschluss der Experimente aufbewahrt.

3.2.3 Auszählen von Utermöhl-Kammern

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit einem inversen Lichtmikroskop bei Phasenkontrast und einer Objektivvergrößerung von 40x. Eine Utermöhl-Kammer wurde auf dem Objektisch fixiert. Während des Zählens wurden die Kettenlängen und die darin enthaltenen toten Zellen notiert. Bei der Auswertung wurden dann sowohl die Toten-, als auch die Lebendzellzahlen berücksichtigt. Außerdem wurden die durchschnittlichen Kettenlängen der Stämme berechnet. Für das Zählen der Probenkulturen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zusätzlich wurde eine dritte Zählmethode durchgeführt, um die Variabilität der ersten Methode (das Auszählen von zwei Streifen) zu kontrollieren.

Zählmethode 1: Auszählen von zwei Streifen

Die erste Methode wurde bei dem Exp.1 angewandt. Zunächst wurde die gesamte Utermöhl-Kammer ausgezählt. Erreichte die gezählte Zellzahl einen Wert von über 3500 Zellen, wurde in Streifen weitergezählt. Hierbei wurden jeweils ein vertikaler und ein horizontaler Streifen der Utermöhl-Kammer ausgezählt (Abb.10). In einem der beiden Okulare befanden sich zwei parallel verlaufende Linien. Der Zwischenraum dieser Linien wird als Sichtfeld bezeichnet. Bei einer Vergrößerung von 40x hat das Sichtfeld eine Breite von 0,2449 mm. Durch Drehen des Okulars ließ sich das Sichtfeld in eine beliebige Position ausrichten. Durch vertikales oder horizontales (hoch/runter oder links/rechts) Verschieben des Objektisches konnte man mit Hilfe des Sichtfeldes einzelne Streifen einer Utermöhl-Kammer auszählen. Kreuzende Ketten und Zellen mit der linken und oberen Linie des Sichtfeldes wurden nicht berücksichtigt. Mitgezählt wurden die Zellen und Ketten, welche die rechte oder untere Linie kreuzten. Bei weniger als 250 Zellen innerhalb dieser beiden Streifen wurde die ganze Kammer ausgezählt. Wurden mehr als 2000 Zellen innerhalb der zwei Streifen ermittelt, wurde die Kultur verdünnt und in eine neue Utermöhl-Kammer pipettiert. Anschließend erfolgte eine erneute Sedimentation und Auszählung.

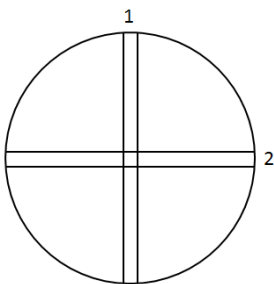


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Utermöhl-Kammer. Eingezeichnet sind die zwei bei Zählmethode 1 ausgezählten Streifen. 1: vertikal, 2: horizontal

Zählmethode 2: Auszählen einer gesamten Utermöhl-Kammer

Beim Zählen der Kulturen des Exp.2 wurde immer die gesamte Kammer ausgezählt. Dabei wurde der Objektisch so verschoben, dass sich die Kammer in viele vertikale Streifen auszählen ließ. Da der Zeitaufwand bei dieser Methode mindestens um das doppelte anstieg, wurden die vorangegangenen Verdünnungen erhöht.

Variabilitätstest: Auszählen von Streifen vs. Auszählen der gesamten Kammer

Um die Variabilität des Auszählens von einzelnen Streifen zu bestimmen, wurden bei einer Zählprobe des Stammes 2-44 aus dem Exp.1 bei 4°C Inkubation 6 Streifen ausgezählt (Abb. 11). Auch hier wurden nur die kreuzenden Ketten und Zellen mit der rechten und unteren Linie des Sichtfeldes beachtet. Um einen direkten Vergleich der Variabilität zu den Zellzahlen aus einer ganzen Kammer zu erhalten, wurde diese ebenso ausgezählt.

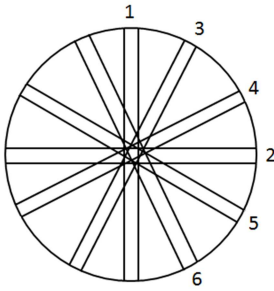


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Utermöhl-Kammer. Eingezeichnet sind die sechs bei Zählmethode 2 ausgezählten Streifen. 1: vertikal, 2: horizontal, 3+4: rechts diagonal, 5+6: links diagonal

3.3 Auswertung der Zellzahlen

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden die erreichten Zellzahlen/ml für jeden Stamm an jedem Tag einer Zählprobenahme berechnet. Dabei wurde unterschieden, ob die ganze Kammer oder nur einzelne Streifen ausgezählt wurden.

3.3.1 Bestimmung der Zellzahl/ml einer gesamten Utermöhl-Kammer

Zur Berechnung der Zellzahl/ml aus der Auszählung der gesamten Kammer wurden zunächst die Lebendzellzahlen bestimmt. Dafür wurde die Anzahl der toten Zellen von der insgesamt gezählten Zellzahl subtrahiert. Außerdem wurden der Verdünnungsfaktor und das Volumen einer Utermöhl-Kammer berücksichtigt.

$$\frac{\left((Zellzahl_{gesamt} - Zellzahl_{tot}) * Verdünnungsfaktor \right)}{V_{Utermöhl-Kammer} [ml]} = \frac{Zellzahl}{ml}$$

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl/ml eines einzelnen Streifens

Für die Bestimmung der Zellzahl/ml eines einzelnen Streifens musste das Volumen eines Streifens berechnet werden. Dafür wurde vorerst die Oberfläche einer Utermöhl-Kammer und die eines Streifens ermittelt:

$$\frac{d_{Utermöhl-Kammer}^2 [mm] * \pi}{4} = A_{Utermöhl-Kammer} [mm^2]$$

$$d_{Utermöhl-Kammer} [mm] * Breite_{Sichtfeld} [mm] = A_{Streifen} [mm^2]$$

Durch die berechneten Oberflächen und das gegebene Volumen einer Utermöhl-Kammer (2.973 ml) wurde nachfolgend das Volumen eines Streifens bestimmt:

$$\frac{V_{Utermöhl-Kammer} [ml]}{A_{Utermöhl-Kammer} [mm^2]} * A_{Streifen} [mm^2] = V_{Streifen} [ml]$$

Im letzten Schritt unter Berücksichtigung der Lebendzellzahl und des Verdünnungsfaktors (aus der Zählprobenahme) wurde die Zellzahl/ml berechnet:

$$\frac{((Zellzahl_{gesamt} - Zellzahl_{tot}) * Verdünnungsfaktor)}{V_{streifen}[ml]} = Zellzahl/ml$$

Für die Berechnung der Zellzahl/ml von zwei oder mehr Streifen wurde das Volumen eines Streifens je nach Anzahl multipliziert.

3.3.3 Berechnung der durchschnittlichen Kettenlänge und Standardabweichung

Es wurden sowohl die Kettenlängen für jede Zählprobe, als auch über den gesamten Zeitraum der Experimente berechnet. Zur Berechnung der Kettenlänge für eine Zählprobe wurde die Gesamt-Zellzahl durch die Anzahl der gezählten Ketten für jede Zählprobe dividiert.

$$\frac{Zellzahl_{gesamt}}{\sum Ketten} = Kettenlänge \text{ für Zählprobe}_n = x$$

Für die Berechnung der durchschnittlichen Kettenlängen über den gesamten Zeitraum der Experimente wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\sum Kettenlänge \text{ für Zählprobe}_n}{\sum Ketten} = \emptyset Kettenlänge = \bar{x}$$

Zur Ermittlung der Standardabweichung wurde anschließend mit Hilfe von x und \bar{x} die Varianz berechnet:

$$\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{\sum Ketten} = s^2$$

Abschließend wurde folgende Formel für die Berechnung der Standardabweichung verwendet:

$$\sqrt{s^2} = s$$

3.3.4 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate und Generationszeit

Die Berechnungen für die spezifischen Wachstumsraten mit Hilfe der Zellzahlen erfolgten für die exponentiellen Phasen mit folgender Formel:

$$\frac{(\ln(x_1) - \ln(x_0))}{\text{delta}(t)} = \mu [1/d]$$

Zur Berechnung der Generationszeiten wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\ln(2)}{\mu} = t_d [d]$$

3.4 Bestimmung von Zellgrößen und Biovolumina

Die ausgezählten Utermöhl-Kammern wurden in ein inverses Lichtmikroskop gespannt. Mit dem Softwareprogramm „analySIS docu“ wurden von jedem Stamm so viele Ketten fotografiert, dass

sich mit Hilfe der Software „ImageJ-win64 (Fiji)“ jeweils 20 Zellen vermessen ließen (für die Stämme 14-18, 14-23, 14-19 und 14-27 konnten teilweise nur 5 Zellen fotografiert und vermessen werden). Die Auswahl der ausgemessenen Zellen erfolgte willkürlich, sodass man einen Gesamteindruck der Zellgrößen erhielt.

Abb. 12 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme (Objektivvergrößerung 40x, Phasenkontrast) der Kettenbildung von *F. kerguelensis* Zellen vom Stamm 1-07. Die Fixierung erfolgte wie unter dem Punkt 3.2.1 beschrieben. Es sind die Kieselsäureschalen, die grün-gelben Chloroplasten, Lipideinlagerungen und die Zellkerne der Zellen zu erkennen. Durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen konnten bereits erste Eindrücke über den Zustand der Kulturen erfasst werden. Da sich die Ketten mit dem Lichtmikroskop nur in Seitenlage fotografieren ließen, konnten nur die Längen und Tiefen der Zellen vermessen werden. Beim Vermessen wurden die Schalen nicht berücksichtigt. Es wurde ausschließlich der Innenraum einer Zelle vermessen.

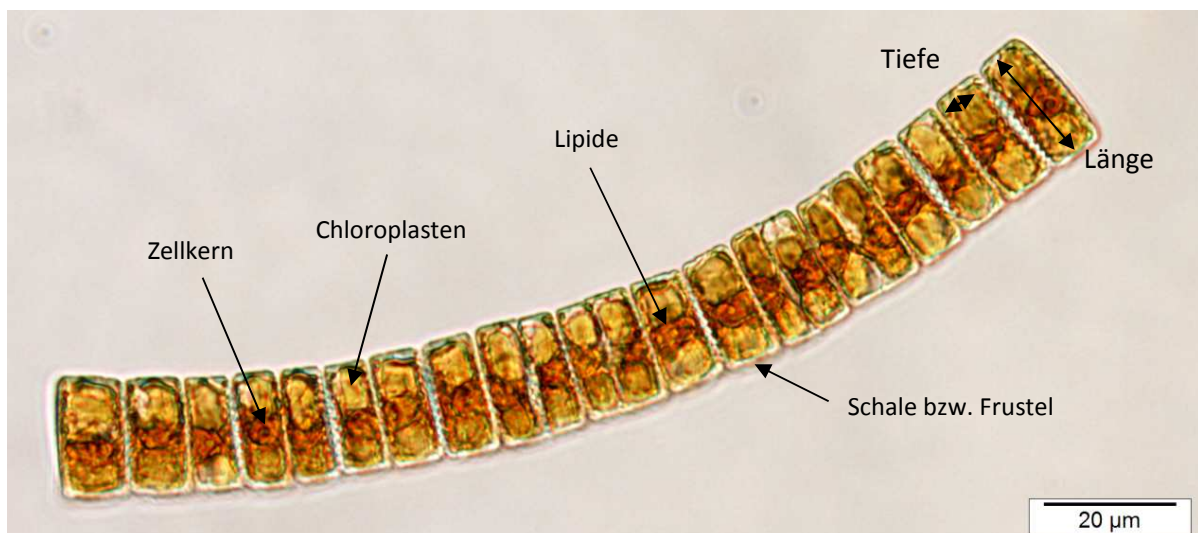


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kettenbildung von *F. kerguelensis* Zellen mit Beschriftung des Zellaufbaus und einer Maßstabangabe von 20 µm.

Für die Berechnung der Biovolumina benötigte man zusätzlich die Breiten der Zellen. Da diese durch die Mikrofotos nicht ermittelt werden konnten, wurde eine lineare Regression von bereits vollständig vermessenen Zellen erstellt. Die Daten stammten aus einem vorangegangenen Projekt und wurden mit der Software SHERPA ermittelt (Glemser, 2018).

Mit Hilfe der Programmiersprache R wurden die logarithmierten Werte der Zelloberflächen und -Längen gegeneinander geplottet. Anschließend wurde eine lineare Regression durch die Datenpunkte gelegt (Abb. 13).

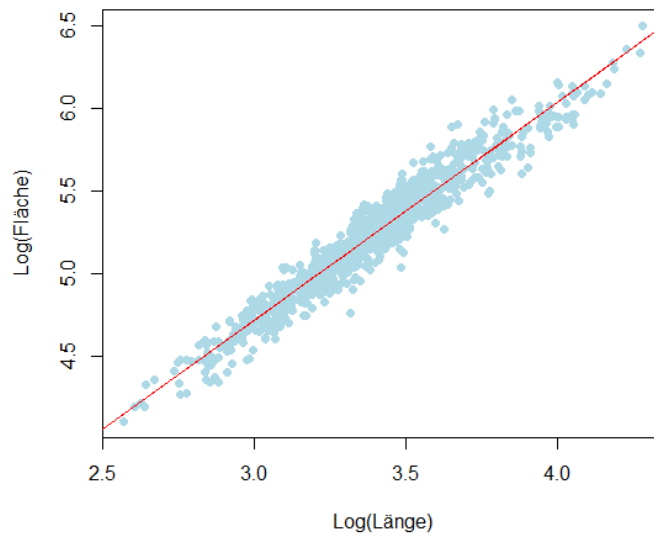


Abbildung 13: Lineare Regression zur Bestimmung der Regressionskoeffizienten für die Berechnung der Zelloberflächen und Biovolumina. Es sind die Flächen und Breiten von einer Vielzahl vermessener *F. kerguelensis* Zellen gegeneinander geplottet.

Für die Gleichung

$$a + b * \log(Länge) = \log(A)$$

erhielt man für den Y-Achsenabschnitt a einen Wert von 1.316 und für die Steigung b einen Wert von 0.769. Diese Werte wurden dann für die Berechnung der Fläche der fotografierten Stämme verwendet. Dafür wurden zunächst die Mittelwerte der Längen und Tiefen berechnet. Anschließend wurde mit folgender Formel die Fläche berechnet.

$$1.316 + 0.769 * \log(\varnothing Länge_{Zelle}) = \log(\varnothing A_{Zelle}) [\mu m^2 / Zelle]$$

Zur Berechnung der Biovolumina pro Zelle wurde anschließend folgende Formel verwendet:

$$\varnothing Tiefe_{Zelle} * A_{Zelle} = \varnothing BV_{Zelle} [\mu m^3 / Zelle]$$

Außerdem wurden die Biovolumina pro ml Kultur unter Berücksichtigung der Zellzahlen/ml Kultur berechnet:

$$\varnothing BV_{Zelle} * Zellzahl/ml = \varnothing BV [\mu m^3 / ml]$$

3.5 Raster-Elektronen-Mikroskopie

Zusätzlich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden Raster-Elektronen-Mikroskopische Aufnahmen gemacht. Durch dieses hochauflösende Mikroskop können Details von unterschiedlichen Objekten bis zu 200.000-fach vergrößert dargestellt werden (Weißbach, 2010, S. 394). Die Vorgehensweise beim Fixieren und Sputtern der Zellen wird im Anhang unter Punkt B.2 „Präparation von Diatomeen für die Raster-Elektronen-Mikroskopie“ erläutert. Die Bildaufnahmen mit dem Raster-Elektronen-Mikroskop sollen einen kurzen, detaillierten Einblick auf die Struktur von *F. kerguelensis* geben.

Abb. 14 zeigt sechs Aufnahmen der Schalen von *F. kerguelensis*. In Abb. 14 A ist die Valve einer Zelle abgebildet. Außerdem sind die Streifen und Areolen der Frustel zu sehen. Die Aufnahme ist in Abb. 14 B noch einmal detailliert dargestellt. Zu sehen sind ebenfalls die Streifen und Areolen der Schalenoberfläche. Verschiedene Seitenansichten einer Schale sind in den Abb. 14 C, D und E dargestellt. Gut zu erkennen sind auch hier die Valven, also die oberen und unteren Flächen der Schale. Außerdem erkennt man die Zusammensetzung der beiden Schalenhälften aus der oberen Epitheka und der unteren Hypotheka. Auch die Gürtelbänder Epipleura und Hypopleura sind zu erkennen. In Abb. 14 E ist das voneinander Lösen von Epitheka und Hypotheka zu beobachten. Abb. 14 F zeigt die Ansammlung einer Vielzahl von *F. kerguelensis* Schalen.

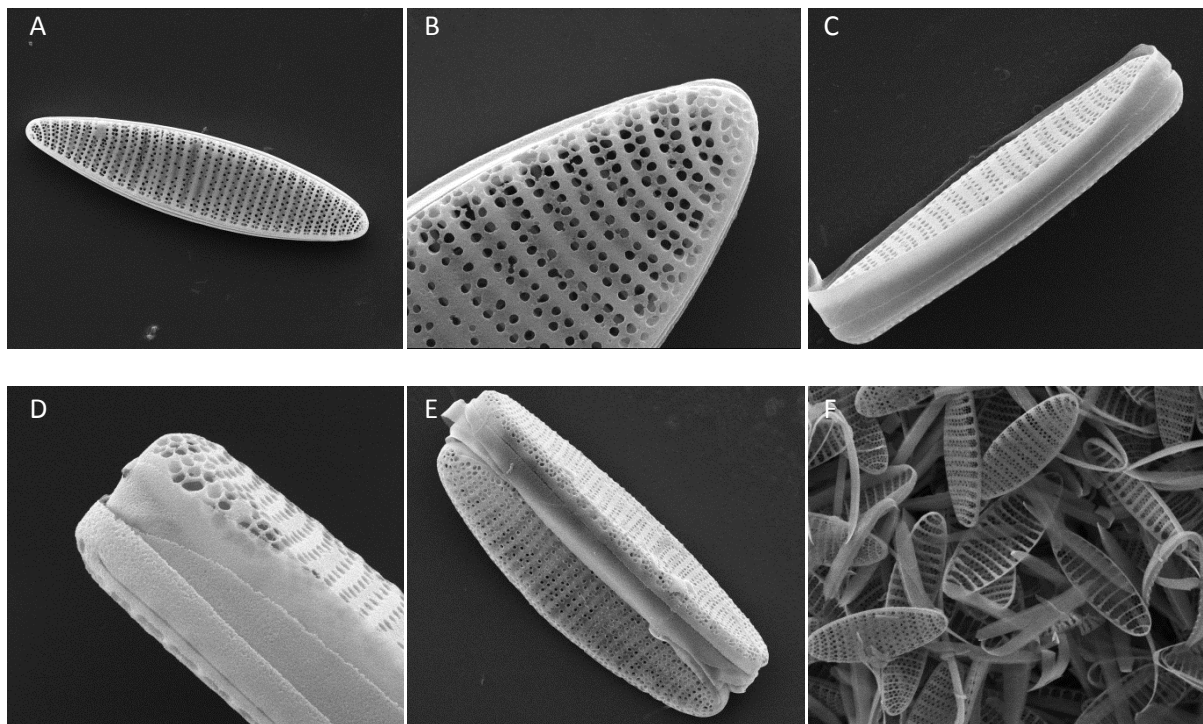


Abbildung 14: Raster-Elektronen-Mikroskopische Aufnahmen von *Fragilariopsis kerguelensis* Zellen.

A: Valvenansicht, B: Streifen und Areolen, C: Epitheka, Hypotheka und die Gürtelbänder Epipleura und Hypopleura, D: Detaillierte Ansicht der Schalenhälften und Gürtelbänder, E: Auseinanderlösen der Schalenhälften, F: Ansammlung einer Vielzahl von Schalen

3.6 Pulsamplitudenmodulation-Fluorometrie

Die Pulsamplitudenmodulation (PAM)-Fluorometrie wurde mit dem Imaging-PAM Chlorophyll Fluorometer von Walz durchgeführt. Für das allgemeine Verständnis einer Pulsamplitudenmodulation wurden zunächst die für diese wissenschaftliche Arbeit relevanten Fluoreszenzparameter und -Messgrößen beschrieben (gelten ebenfalls für das Fast Repetition Rate Fluorometer, FRRF der Chelsea Technologies Group).

3.6.1 Wichtige Parameter für die PAM-Fluorometrie (Walz GmbH, 2014)

Messlicht (ML): Das Fluoreszenz-Messlicht wird beim Einschalten des PAM-Fluorometers automatisch aktiviert. Es besteht aus kurzen LED-Pulsen unterschiedlicher Intensitäten und sollte

in einer möglichst geringen Wiederholungsfrequenz (ca. 1-8 Hz) gewählt werden, um keinen Einfluss auf den Zustand des Reaktionszentrums zu nehmen.

Gain: (= Verstärkung) Der Gain verstärkt das Fluoreszenzsignal. So können auch Proben mit geringer Fluoreszenz gemessen werden. Allerdings sollte er nicht zu hoch eingestellt werden, da er das Hintergrundrauschen der Flaschen und der CCD-Kamera erheblich erhöhen kann.

Sättigungsimpuls (SP): Der Sättigungsimpuls sättigt die Lichtaufnahme des Reaktionszentrums, indem durch das Auslösen des Buttons F_0F_m ein kurzer Lichtimpuls abgegeben wird. Durch die Messung mit einem SP lassen sich alle unter dem Punkt 3.6.2 „Relevante Fluoreszenzmessgrößen eines PAM-Fluorometers“ beschriebenen Fluoreszenzmessgrößen bestimmen.

PAR: (= photosynthetisch aktive Strahlung) Der PAR ist die Lichteinstrahlung, die ein Photosynthese betreibender Organismus aktiv für die Photosynthese nutzen kann. Die Einheit wird in $\mu\text{mol Einstein}$ oder $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ angegeben.

Farbskala: Das Softwareprogramm „ImagingWin v2 46“ der Imaging-PAM arbeitet sowohl mit der Ausgabe von Messwerten, als auch durch das Anzeigen von Bildern, welche von den Kulturflaschen mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen werden. Dabei wird die Intensität der wiedergegebenen Fluoreszenz durch unterschiedliche Farben dargestellt. Abb. 15 stellt die Farbskala der Imaging-PAM dar. Eine schwarze Färbung entsteht dann, wenn keine Fluoreszenz wiedergegeben wird. Eine hohe Fluoreszenzwiedergabe wird durch eine violette Färbung im Bild definiert.



Abbildung 15: Farbskala einer Imaging-PAM. Schwarz zeigt keine und violett eine sehr hohe Fluoreszenzwiedergabe an.

Induktionskurve: Die Induktionskurve wird nach der Dunkeladaption durchgeführt. Bei der Induktionskurve werden über einen definierten Zeitraum zu einem kontinuierlich leuchtenden Licht zusätzliche Sättigungsimpulse ausgelöst, um die zeitliche Variation der Chlorophyllfluoreszenz zu messen.

Lichtkurve: Die Lichtkurve wird von lichtadaptierten Proben direkt nach dem Messen einer Induktionskurve gemessen (beim FRRF ohne vorherige Induktionskurve). Die kontinuierlich einstrahlende Lichtintensität wird schrittweise erhöht und nach jeder Erhöhung wird ein Sättigungsimpuls ausgelöst. Durch das Messen einer Lichtkurve werden Werte ausgegeben, durch die man Informationen über die Elektronentransportrate vom PS II erhält.

3.6.2 Relevante Fluoreszenzmessgrößen eines Fluorometers (Walz GmbH, 2014)

F_t : Die aktuelle Fluoreszenzausbeute wird nach der Dunkeladaption unter dem Einfluss von Messlicht kontinuierlich gemessen.

F: Die Fluoreszenzausbeute wird nach der Dunkeladaption in Verbindung mit einem Sättigungsimpuls gemessen. Nach dem Auslösen eines Sättigungsimpulses aber unmittelbar vor der Messung wird der F_T -Wert für drei Sekunden gemittelt und als F übernommen.

F_0 : Die Grundfluoreszenz- oder Dunkelfluoreszenzausbeute wird nach erfolgter Dunkeladaption, wenn sich alle PS II Reaktionszentren in einem oxidierten Zustand befinden, gemessen. Dieser Messparameter ist ausschlaggebend für die Erstellung von Wachstumskurven.

F_m : Die maximale Fluoreszenzausbeute wird zusammen mit F_0 nach erfolgter Dunkeladaption gemessen. Der F_m -Wert wird nach einem Plateau-Level bestimmt, welches nach der Anwendung eines Sättigungsimpulses erreicht wird.

F_m' : Die maximale Fluoreszenzausbeute F_m' wird von beleuchteten Proben gemessen. Der Wert ist F_m gegenüber gesenkt. Er wird nach der Betätigung eines Sättigungsimpulses auf einem Plateau gemessen. Das Messlicht wird automatisch auf eine maximale Frequenz umgestellt.

F_v/F_m : Die maximale PS II Quantenausbeute wird nach der Dunkeladaption bestimmt. Alle Reaktionszentren sind oxidiert, die nicht-photochemische Energiedissipation ist minimal und die maximale Fluoreszenz wird durch einen Sättigungsimpuls erreicht. Ist dieser Zustand erreicht, dann sind die variable Fluoreszenz F_v und die PS II Quantenausbeute maximal. F_v/F_m wird über die F_0 - und F_m -Werte berechnet. Es können ausschließlich Werte zwischen 0 und 1 angenommen werden.

$$\frac{(F_m - F_0)}{F_m} = F_v/F_m$$

F_q'/F_m' : Die effektive PS II Quantenausbeute wird während der Aufnahme einer Lichtkurve, also von lichtadaptierten Proben, gemessen. Der Wert gibt an, wie viele Elektronen das PS II während der Lichteinstrahlung effektiv für die Photosynthese verwenden konnte. Es können ausschließlich Werte zwischen 0 und 1 angenommen werden. Literatur zur Formel: (Oxborough, 2012 S. 39)

$$\frac{(F_m' - F)}{F_m'} = F_q'/F_m'$$

ETR: (= Elektronentransportrate) Durch die Bestimmung der ETR lässt sich der Elektronentransport der Photosynthese bei unterschiedlich starken Lichtintensitäten (PAR) ermitteln. Literatur zur Formel: (Oxborough, 2012 S. 97)

$$F_q'/F_m' * PAR = ETR$$

Die Fluoreszenzmessgrößen werden in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben.

Alle Messungen mit der Imaging-PAM wurden ausschließlich in einem abgedunkelten 15°C Raum durchgeführt (Messungen mit dem FRRF in einem 2°C Raum).

3.6.3 Vorbereitung des Imaging-PAM-Fluorometers

Area of Interest

Eine Area of Interest (AOI) definiert den Bereich eines Objektes, der für das Messen von Interesse ist. Das Softwareprogramm mittelt innerhalb einer AOI alle von den Pixeln wiedergegebenen Fluoreszenzwerte. Um ein konstantes System zur Messung der Probenkulturen mit der Imaging-PAM zu ermöglichen, wurden die AOI's mit Hilfe der Software „ImagingWin v2 46“ vor Beginn der Experimente erstellt. Diese dienten als eine Art Schablone, welche vor jeder neuen Probenkulturmessung geöffnet wurden. Für die Erstellung wurden drei 40 ml Kulturflaschen und eine 200 ml Kulturflasche bis zur Markierung mit fluoreszierender Textmarker-Tinte befüllt. Aufgrund der Größe der 40 ml Flaschen ließen sich drei Flaschen gleichzeitig an der Orientierungsschiene unter der Imaging-PAM-Kamera positionieren. Die 200 ml Flasche lag separat auf dem Objektisch unterhalb der CCD-Kamera (Abb.16). Durch die fluoreszierende Tinte wurden die später zu messenden Bereiche der Kulturflaschen sichtbar. Für die 40 ml Flaschen wurden drei (für jede Flasche eine) Area of Interests generiert. Für die 200 ml Flasche wurde eine AOI erstellt. In Abb. 16 stellen die weißen Rechtecke die AOI's dar. Die Färbungen der Flaschen wurden durch die fluoreszierende Textmarker-Tinte hervorgerufen. Durch das Abspeichern der erstellten AOI's konnten diese beliebig oft aufgerufen werden.

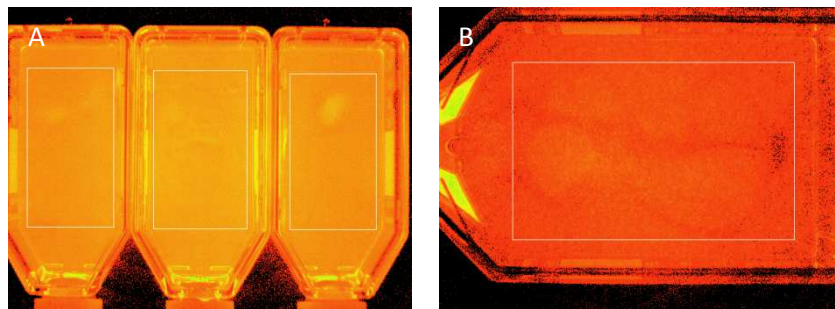


Abbildung 16: PAM-Aufnahmen zur Erstellung von AOI's.

A: Drei mit fluoreszierender Textmarker-Tinte befüllte 40 ml Kulturflaschen mit drei erstellten AOI's, B: Eine mit fluoreszierender Textmarker-Tinte befüllte 200 ml Kulturflasche mit einer erstellten AOI

Mean over AOI: (= Mittelwert über AOI) Ist der Mean over AOI aktiviert, werden alle Pixelwerte über die Fläche des definierten AOI gemittelt und der Durchschnittswert wird angezeigt.

Bei Deaktivierung des Mean over AOI werden nur die Pixelwerte des definierten AOI gemittelt, für die $F_v/F_m > 0$ gilt. Der angegebene Wert entspricht demnach nur Pixeln, die photosynthetische Aktivität anzeigen.

Für alle Messungen mit der Imaging-PAM wurde der Mean over AOI deaktiviert, da so das Hintergrundrauschen verringert werden kann.

Settings

Die Einstellungen der Settings sind für jeden Organismus spezifisch. Das Messlicht (ML) sollte dabei in einer möglichst niedrigen Wiederholungsfrequenz und Intensität gewählt werden. Auch der Gain (G) darf nicht zu hoch eingestellt werden, da er das Hintergrundrauschen erheblich erhöhen kann. Es gilt also ein Verhältnis von ML und G zu finden, um möglichst hohe

Fluoreszenzwerte, aber ein niedriges Hintergrundrauschen zu erhalten. Während eines bereits abgeschlossenen Experiments von der Arbeitsgruppe haben sich folgende Settings für *Fragilariopsis kerguelensis* als gut erwiesen:

ML: Intensität = 4; Frequenz = 1 Hz

G: Einstellung = 7

SP: Intensität = 10; Länge des Impulses = 840 ms

Mean over AOI: deaktiviert

Die Einstellungen der Settings wurden während eines Testexperiments (siehe Punkt 3.6.4 „Testmessungen“) mit den Testkulturen 14-19, 14-23 und 14-27 überprüft und anschließend für die Experimente 1 und 2 übernommen. Vor jeder weiteren Messung mit der Imaging-PAM wurden diese Settings aufgerufen.

Blanks

Sowohl die Flaschen, als auch die CCD-Kamera können ein Hintergrundrauschen verursachen. Dieses hätte in späteren Auswertungen zu fehlerhaften Werten geführt, daher war es unerlässlich, Blanks zu erstellen und in jede Berechnung mit einzubeziehen. Für die Erstellung wurden eine 200 ml Kulturflasche und drei 40 ml Flaschen bis zur Markierung mit F/2+Si-Medium befüllt. Auch hier wurden drei 40 ml Flaschen gleichzeitig und die 200 ml Flasche separat auf den Objektisch der PAM gelegt und die vorher erstellten AOI-Schablonen geöffnet. Anschließend wurde F_0F_m (siehe Punkt 3.6.5 „Messung von F_0F_m “) mit den festgelegten Settings gemessen. Dadurch erhielt man für alle relevanten Fluoreszenzmessgrößen einen Wert. Die erhaltenen Blank-Werte wurden später von den Werten der Probenmessungen subtrahiert.

Dunkeladaption

Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 15 Minuten in mit Aluminiumfolie isolierten Pappschachteln dunkeladaptiert. Die Dunkeladaption fand in dem gleichen Kühlraum statt, in dem auch die Kultivierung erfolgte. Um die Zeit effektiv auszunutzen, wurde mit überlappenden Adaptionszeiten gearbeitet. Zunächst wurde eine und nach vier Minuten die nächste Kultur dunkel gestellt. Nach dem Ablauf der Zeit wurde die erste dunkeladaptierte Kultur gemessen und eine weitere dunkel gestellt. So wurde weiter verfahren, bis alle Kulturen dunkeladaptiert und gemessen waren.

Da die Messungen der Induktions- und Lichtkurven einen Zeitraum von etwa 10 Minuten benötigten, wurde jede Kultur separat für 15 min. dunkeladaptiert.

Durch die Dunkeladaption wird das Reaktionszentrum des PS II zunächst in einen oxidierten (offenen) Zustand versetzt. Wird das Reaktionszentrum anschließend dem Einfluss von Lichtimpulsen ausgesetzt, dann geht es in einen reduzierten (geschlossenen) Zustand über.

3.6.4 Testmessungen

Vor dem Messen der experimentellen Ansätze wurden die durch die Arbeitsgruppe ermittelten Settings durch weitere Testmessungen überprüft. Dafür wurden mit den Testkulturen 14-19, 14-23 und 14-27 Messungen mit unterschiedlichen Einstellungen der Settings (ML, G) durch das

Messen von F_0F_m (siehe Punkt 3.6.5 „Messung von F_0F_m “) durchgeführt (ML Frequenz konstant bei 1 Hz). Folgende Einstellungen wurden verglichen:

ML: Intensität = 4; G: 7

ML: Intensität = 3; G: 10

ML: Intensität = 3; G: 13

ML: Intensität = 3; G: 9

Es wurde mit den südlichen Stämmen gemessen, da bereits zu Beginn der Testmessungen nur sehr geringe Fluoreszenzwerte und Zellzahlen zu erwarten waren. Um bestmögliche Werte zu erhalten wurden die Settings daher nach den südlichen Stämmen ausgerichtet. Der Stamm 14-23 wurde für die experimentellen Ansätze durch den Stamm 14-18 ersetzt. Es stellte sich relativ früh heraus, dass sich dieser Stamm gar nicht für die Erfassung von Wachstumskurven oder das Erstellen von Fluoreszenz-Messwerten eignete.

3.6.5 Messung von F_0F_m

Bevor die dunkeladaptierten Kulturen aus dem Kühlraum geholt wurden, stellte man alle Settings wie bereits beschrieben ein. Außerdem wurden die AOI's geöffnet. Das Bild der Imaging-PAM wurde zunächst auf „Live Video“ gestellt.

Für die Messung von F_0F_m wurden die dunkeladaptierten Kulturen zunächst homogenisiert. Außerdem wurden die Kulturflaschen aufgrund des Transports von den Kulturräumen zum Messraum und der hohen Außentemperaturen mit einem fusselfreien Tuch von Kondenswasser befreit. Um eine konstante Messmethode zu gewährleisten, wurde jede Kultur gleichbleibend behandelt. Anschließend legte man die Flaschen an die Orientierungsschiene auf den Objektisch der PAM. Nach Ablauf der 15-Minütigen Dunkeladaption wurde das „Live Video“-Bild geschlossen, sodass sich das ML eingeschaltet hat. Für 20 Sekunden wurden die Kulturen unter den Einfluss des ML gestellt. Dann wurden durch einen SP die Werte für F_0F_m gemessen. Aus dieser Messung resultierten die Fluoreszenz-Messgrößen, welche unter dem Punkt 3.6.2 „Relevante Fluoreszenz-Messgrößen eines PAM-Fluorometers“ beschrieben wurden. Mit Hilfe von Excel wurden die Blanks von den ermittelten Werten subtrahiert.

Für die Aufnahme von Induktions- und Lichtkurven war es notwendig, den Zeitpunkt der exponentiellen Phasen abschätzen zu können. Dafür wurden mit Hilfe der Grundfluoreszenz F_0 Wachstumskurven erstellt. Die Berechnungen der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten erfolgte ebenso wie bei den Zellzahlen/ml mit Hilfe der exponentiellen Wachstumsphasen. Allerdings wurden hier die Wachstumskurven, aufgenommen durch die Grundfluoreszenz, verwendet.

Die Formel für die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten entspricht der aus dem Punkt 3.3.4. Anstatt der Zellzahlen/ml werden die Grundfluoreszenzwerte logarithmiert.

$$\frac{(\ln(F_{0_1}) - \ln(F_{0_0}))}{\text{delta}(t)} = \mu_{F_0} [1/d]$$

Die Berechnung der Generationszeiten erfolgt aus den spezifischen Wachstumsraten berechnet mit Hilfe der Grundfluoreszenzwerte.

$$\frac{\ln(2)}{\mu} = t_{d_{F_0}} [d]$$

3.6.6 Aufnahme von Induktionskurven

Die Induktionskurven wurden innerhalb der exponentiellen Wachstumsphasen von jedem *F. kerguelensis* Stamm gemessen. Der Messung einer Induktionskurve ging zunächst die Messung von F_0F_m durch das Auslösen eines Sättigungsimpulses (SP) voraus. Die Messdauer belief sich auf etwa 5-6 Minuten. Über diesen Zeitraum wirkte alle 20 Sekunden eine konstante, photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) von $20 \mu\text{mol Quanten/m}^2\cdot\text{s}$ auf die Proben ein. Durch die Imaging-PAM Software wurde 15-17-mal (alle 20 Sekunden) ein SP abgegeben und somit F_q'/F_m' gemessen.

Tabelle 6: Anzahl der abgegebenen Lichtimpulse bei der Messung von Induktionskurven mit der Imaging-PAM. Der PAR lag für jede Messung bei $20 \mu\text{mol Quanten/m}^2\cdot\text{s}$.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
PAR	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Zum Auswerten der Induktionskurven wurde zunächst die effektive PS II Quantenausbeute F_q'/F_m' für jeden Messpunkt ermittelt. Danach wurde die Elektronentransportrate berechnet. Da der PAR konstant bei einem Wert lag, wurde die Elektronentransportrate gegen die Sekunden geplottet.

$$\frac{(F_m' - F)}{F_m'} = F_q'/F_m'$$

$$F_q'/F_m' * PAR = ETR$$

3.6.7 Aufnahme von Lichtkurven

Die Lichtkurven wurden zum gleichen Zeitpunkt der exponentiellen Phase im Anschluss an die Induktionskurven gemessen. Um die gemessenen Werte der Lichtkurve des Imaging-PAM-Fluorometers und des Fast Repetition Rate Fluorometers miteinander vergleichen zu können, wurden die Lichtkurven mit beiden Methoden am selben Tag aufgenommen. Für die Erstellung einer Lichtkurve wurde 18-mal alle 10 Sekunden ein SP abgegeben und der PAR ab dem zweiten Schritt nach jeder Messung erhöht.

Tabelle 7: Anzahl der abgegebenen Lichtimpulse bei der Messung von Lichtkurven mit der Imaging-PAM. Der PAR wurde ab dem zweiten SP schrittweise erhöht.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
PAR	0	0	1	3	10	20	33	48	65	85	108	134	163	227	301	401	533	726

Die Berechnungen und Auswertungen der Lichtkurven erfolgten wie die der Induktionskurven (Punkt 3.6.6 „Aufnahme von Induktionskurven“). Zunächst wurde die effektive PS II Quantenausbeute F_v'/F_m' berechnet. Folgend wurde die Elektronentransportrate berechnet. Zur Erstellung eines Diagramms wurde die ETR gegen den jeweiligen PAR-Wert aufgetragen.

3.6.8 Vergleich von F_v/F_m vor und nach der Messung einer Induktions- und Lichtkurve

Je nach Belichtungslänge und -stärke kann die maximale PS II Quantenausbeute unterschiedliche Werte annehmen. Durch den Vergleich lassen sich zusätzliche Informationen über den Zustand des Photosynthese-Systems von *F. kerguelensis* einholen. Beispielsweise kann die Reaktion des Organismus auf den Lichtstress während der Lichtkurve ermittelt werden. Werden hohe F_v/F_m -Werte nach Lichtkurvenmessung und erneuter Dunkeladaption erzielt, erkennt man, wie gut sich das PS II und die Elektronentransportkette nach einer Belastung durch Lichtstress wieder erholen können.

Um für jeden Stamm einen gleichbleibenden Vergleich zu ermöglichen wurden vor und nach jeder Induktions- und Lichtkurvenmessung die Fluoreszenz-Messgrößen F_m und F_0 zur Berechnung von F_v/F_m durch das Auslösen eines SP ermittelt. Das Auslösen des SP erfolgte zunächst unmittelbar vor der Messung von den Induktions- und Lichtkurven. Nach dem Messen der Kurven erfolgte eine erneute 15-minütige Dunkeladaption und anschließend eine weitere Messung durch das Auslösen eines SP. Berechnet wurde der prozentuale Anteil der maximalen Quantenausbeute, der nach der zweiten Dunkeladaption erreicht wurde:

$$\frac{100}{F_v/F_m \text{ vorher}} * F_v/F_m \text{ nachher} = \text{max. } F_v/F_m \text{ nach Lichtstress [\%]}$$

Zur Vereinfachung wurde das maximal erreichte Verhältnis der beiden Quantenausbeute F_v und F_m nach der Einwirkung von Lichtstress als MQ abgekürzt.

3.7 Fast Repetition Rate Fluorometer

Mit dem Fast Repetition Rate Fluorometer (FRRF) wurden nur die Lichtkurven von Exp.2 gemessen. Die Messungen erfolgten am selben Tag wie die Messungen der Lichtkurven mit der Imaging-PAM. Auch hier wurde mit einer Dunkeladaption von 15 Minuten gearbeitet. Allerdings erfolgte keine vorherige Messung einer Induktionskurve. Der Vergleich von F_v/F_m erfolgte hier durch automatische Messungen vor und nach der Aufnahme einer Lichtkurve. Das FRRF-Gerät wurde vor jedem Gebrauch an dem Messort aufgestellt und für mindestens eine Stunde an die Umgebungstemperatur angepasst. Für die Auswertung der Lichtkurven wurden die PAR-Werte der FastPro8 Software zunächst durch mit einem Lichtintensitätsmessgerät ermittelte Werte ausgetauscht. Einer mit dem FRRF-Gerät (der Chelsea Technologies Group) arbeitenden Arbeitsgruppe fielen beim Messen unterschiedliche Lichtintensitäten zwischen der FastPro8 Software und dem eigentlichen PAR auf.

Für das Messen mit dem FRRF wurde zunächst eine Probe aus dem Exp.2 entnommen. Dafür wurden unter sterilen Bedingungen 3 ml in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Das Messen mit dem FRRF erfolgte in einem 2°C Raum. Nach der Dunkeladaption wurde die Probe in ein Reagenzglas überführt und zur Messung in das FRRF gestellt. Um die richtigen Parameter zu ermitteln, wurde die erste Probe zunächst mit Standardeinstellungen gemessen. Nach der Messung wurden die Werte begutachtet und die Parameter für *F. kerguelensis* entsprechend angepasst. Die Messung einer Lichtkurve erfolgte über einen Zeitraum von 80 Minuten. Wie in Tabelle 8 dargestellt, wurden die Proben bei elf verschiedenen PAR-Werten gemessen, wobei jede PAR-Messung sechsmal wiederholt wurde. Die Nullwerte zu Beginn und am Ende der Lichtkurve stellen zusätzliche Dunkeladaptionen dar.

Tabelle 8: Anzahl und Wiederholungen der Lichtimpulsschritte mit ansteigendem PAR für die Messung von Lichtkurven mit dem FRRF.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Wiederholungen	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
PAR FastPro8	0	29	48	86	143	290	402	576	771	941	0
PAR Kalibrierung	0	50.8	71.8	113.1	172.9	323.3	442.6	630.2	839.2	1032.2	0

Die Berechnungen und Auswertungen der Lichtkurven erfolgten wie die der Induktionskurven (Punkt 3.6.6 „Aufnahme von Induktionskurven“). Auch hier wurde zunächst die effektive PS II Quantenausbeute F_q'/F_m' berechnet. Anschließend wurden die ETR für die sechs gemessenen Werte pro PAR berechnet und gemittelt. Zur Erstellung eines Diagramms wurden die ETR gegen den jeweiligen PAR-Wert aufgetragen.

Der Vergleich von F_v/F_m vor und nach der Aufnahme einer Lichtkurve wurde auch bei der Messung mit dem FRRF generiert. Für die Berechnung wurden die sechs gemessenen Werte während der Wiederholungen mit 0 PAR vor und nach der Lichtkurve gemittelt. Die Formel zur Ermittlung von MQ ist die gleiche, wie unter Punkt 3.6.8 „Vergleich von F_v/F_m vor und nach der Messung einer Induktions- und Lichtkurve“ beschrieben.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit sollten ursprünglich die Wachstums- und Fluoreszenzparameter von nur einem experimentellen Ansatz durch unterschiedliche Methoden und bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht werden. Während des Testexperimentes und nach drei Wochen Laborarbeit mit dem Experiment 1 (Exp.1) stellte sich heraus, dass sich die südlichen Stämme nur noch durch hohen Zeitaufwand kultivieren und auf eine mit der Imaging-PAM und dem FRRF messbare Zelldichte bringen lassen. Daher wurden diese im Ergebnisteil nur bedingt berücksichtigt. Aus dem Exp.1 wurden ausschließlich die Zellzahlen und Biovolumina der Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 berücksichtigt. Weitere Auswertungen der Zellzahlen der südlichen Stämme befinden sich zusammengefasst im Anhang (A.1 und A.2).

Um dennoch Fluoreszenzwerte für die südlichen Stämme zu erhalten, wurde zusätzlich das Experiment 2 (Exp.2) erstellt. Die maximalen Zellzahlen sind durch das erhöhte Animpfvolumen zwar deutlich angestiegen, allerdings konnten auch hier aufgrund der geringen Zellgrößen und Kulturdichten kaum Fluoreszenzwerte gemessen werden. Außerdem konnten aufgrund von zeitlicher Limitierung nicht alle Stämme bis zum vollständigen Absterben der Kulturen verfolgt werden. Ausschlaggebend für die Auswertungen waren die exponentiellen Wachstumsphasen. Es wurden nur die Induktionskurven von den Stämmen 1-07 und 2-44 und die Lichtkurven vom Stamm 1-07 ausgewertet, da diese die besten Werte erzielten. Die Kurvenmessungen für die Stämme 2-22, 14-18, 14-19 und 14-27 haben keine auswertbaren Werte erzielt.

Für alle auswertbaren Ergebnisse werden die Wachstums- und Fluoreszenzparameter ausgewertet und zusammengefasst. In der Diskussion sollen mit Hilfe der Ergebnisse die unten aufgeführten Forschungsfragen resultierend aus den angewandten Methoden beantwortet, bzw. bewertet werden.

1. Eignen sich sowohl die Bestimmung von Zellzahlen, als auch das Messen von Fluoreszenzwerten mit der Imaging-PAM für die Ermittlung von Wachstumskurven?
2. Haben die unterschiedlichen Flaschengrößen von 40 ml und 200 ml einen Einfluss auf das Zellwachstum?
3. Unterscheidet sich das Zellwachstum bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen?
4. Führen unterschiedliche Zählmethoden zu unterschiedlichen Zellzahlen?
5. Nehmen Lichtkurven vergleichbare Werte beim Messen mit den unterschiedlichen Fluorometern, Imaging-PAM und FRRF, an?
6. Haben die unterschiedlichen Kulturbedingungen eine Auswirkung auf die in dieser Arbeit ermittelten physiologischen Zellparameter?

4.1. Vergleich der Settings durch das Testexperiment

Beim Vergleich der unterschiedlichen Settings wurden mit der Imaging-PAM ausschließlich negative Werte detektiert. Diese konnten nur als Hintergrundrauschen interpretiert werden. Deshalb wurden die Settings aufgrund von Erfahrungen der Arbeitsgruppe aus vorherigen Imaging-PAM Experimenten mit *F. kerguelensis* übernommen. Die besten Werte konnten mit einem Messlicht von 4 und einem Gain von 7 erzielt werden. Alle Messungen in den Experimenten 1 und 2 wurden mit Hilfe dieser Messparameter ausgeführt.

4.2 Auswertung der Zellzahlen

4.2.1 Anfangszellzahlen/ml

Wie sich während des Testexperimentes und des Exp.1 herausstellte, haben die Anfangszellzahlen einen ausschlaggebenden Einfluss auf das Wachstum und die Fluoreszenzmessungen der Kulturen. Aufgrund der unterschiedlichen Animpfkulturen, Kettenlängen und dem kontinuierlichen Wachstum der Zellen war es nicht möglich, für alle Ansätze eine gleiche Anfangszellzahl zu generieren. Auch eine hohe Animpf-Zellzahl konnte nicht erreicht werden. Vor allem die Zellzahlen der südlichen Stämme ließen sich nur bedingt erhöhen. Das Aufkonzentrieren der Animpfkulturen für das Exp.1 hat nicht den gewünschten Effekt erzielt. Die Zellzahlen haben dessen ungeachtet sehr niedrige Werte zwischen 2 und 3 Zellen pro ml Kultur erreicht. Auch die Anfangszellzahlen der nördlichen Stämme beim Exp.1 haben deutlich geringere Werte als beim Exp.2 angenommen (Tabelle 9).

Da die Kulturen von Exp.2 ursprünglich für ein anderes Experiment geplant waren, wurden nur ungefähre Animpfvolumina eingesetzt. Daraus resultieren die unterschiedlichen Anfangszellzahlen zwischen den Replikaten der Stämme 2-22 und 2-44 (siehe Punkt 3.1.3 „Inokulation von experimentellen Kulturen“, Exp.2).

Durch das Animpfen der südlichen Stämme in Exp.2 mit einer mindestens zwei Monate inkubierten Animpfkultur konnten die Anfangszellzahlen erheblich erhöht werden (Tabelle 9). Für ein Wachstumsexperiment dieser Art mit der Spezies *F. kerguelensis* wären Anfangszellzahlen zwischen 500-1000 Zellen/ml optimal gewesen. Diese Werte sind Erfahrungswerte von Prof. Dr. Scarlett Trimborn Leiterin der Arbeitsgruppe „EcoTrace-Rolle von Spurenelementen auf die Ökologie von antarktischem Phytoplankton“ (Sektion Marine Biogeowissenschaften) am Alfred-Wegener-Institut (Trimborn, 2018).

Tabelle 9: Zellzahlen/ml ermittelt am Tag des Animpfens der Exp.1 und 2 bei 0°C und 4°C

Stamm	Anfangszellzahl/ml Exp.1 (0°C)	Anfangszellzahl/ml Exp.1 (4°C)	Anfangszellzahl/ml Exp.2 (0°C)	Anfangszellzahl/ml Exp.2 (4°C)
1-07	37	37	168	112
2-22	28	28	982	280
2-44	37	37	533	1571
14-18	2	2	140	196
14-19	3	3	729	841
14-27	2	2	519	659

4.2.2 Durchschnittliche Kettenlängen

Die durchschnittlichen Kettenlängen wurden jeweils am Ende der Experimente berechnet. In beiden Experimenten und bei beiden Temperaturen haben die Kettenlängen vom Stamm 1-07 sehr ähnliche Werte erreicht. Auch die Ketten der Stämme 2-22 und 2-44 aus dem Exp.1 liegen auf dem gleichen Wertenniveau von durchschnittlich über 10 Zellen pro Kette. Mit Kettenlängen von 9 und 7 Zellen liegen die Stämme 2-22 und 2-44 noch über den Werten der südlichen Stämme (durch die geringen Kulturdichten nur für das Exp.2 auswertbar). Hier liegen die durchschnittlichen Kettenlängen sowohl bei 0°C, als auch bei 4°C bei 6 Zellen pro Kette. Obwohl die Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 teilweise eine höhere Anfangszellzahl (Tabelle 9 Exp.2) als die nördlichen Stämme erreichten, haben sie deutlich kürzere Ketten gebildet (Tabelle 10). Mit steigender Kettenlänge nimmt auch die Standardabweichung zu. Somit erreicht der Stamm 1-07 Standardabweichungen von 2 bis 6 Zellen. Die niedrigsten Standardabweichungen erreichen die Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 mit einer Zelle.

Tabelle 10: Durchschnittlich erreichte Kettenlängen bei Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C mit Angabe der Standardabweichungen. *nicht auswertbar

Stamm	Exp.1 (0°C)	Stabw. Exp.1 (0°C)	Exp.1 (4°C)	Stabw. Exp.1 (4°C)	Exp.2 (0°C)	Stabw. Exp.2 (0°C)	Exp.2 (4°C)	Stabw. Exp.2 (4°C)
1-07	10	5	13	6	13	5	10	2
2-22	12	4	11	5	7	2	7	1
2-44	12	4	13	5	9	2	9	4
14-18	*	*	*	*	6	1	6	1
14-19	*	*	*	*	6	1	6	1
14-27	*	*	*	*	6	1	6	1

4.2.3 Variabilitätstest der Zählmethoden 1 und 2

Während des Zählens der Zählproben aus dem Exp.1 kam der Verdacht auf, dass die Zellzahlen je nach Zählmethode stark variieren können. Beim Sprung vom Auszählen der ganzen Kammer zum Auszählen von einzelnen Streifen nahmen die Zellzahlen innerhalb von zwei Tagen bis zu fünfmal höhere Werte an. Durch den Variabilitätstest wurde die Beobachtung der unterschiedlichen

Zellzahlen bestätigt. Zählt man die gesamte Kammer aus, so erhält man eine um fast die Hälfte kleinere Zellzahl/ml als beim Auszählen von 2, 3 oder 4 Streifen. Auch die Werte beim Auszählen von 5 und 6 Streifen sind deutlich erhöht. Nur beim Zählen von einem Streifen liegt der Wert etwa im gleichen Bereich wie die Zellzahl/ml der ganzen Kammer (Abb. 17). Daher ist anzunehmen, dass die maximalen Zellzahlen/ml in Exp.1 deutlich höhere Werte angenommen haben (als sich Zellen in den Kulturen befanden). Daraus resultierend haben auch die Wachstumskurven von Exp.1 einen deutlich höheren Verlauf genommen, als die von Exp.2. Durch die Erkenntnis aus diesem Test wurde in Exp.2 ausschließlich die gesamte Utermöhl-Kammer ausgezählt. Grund für die unterschiedlich hohen Werte kann eine unregelmäßige Verteilung der Ketten in der Utermöhl-Kammer sein.

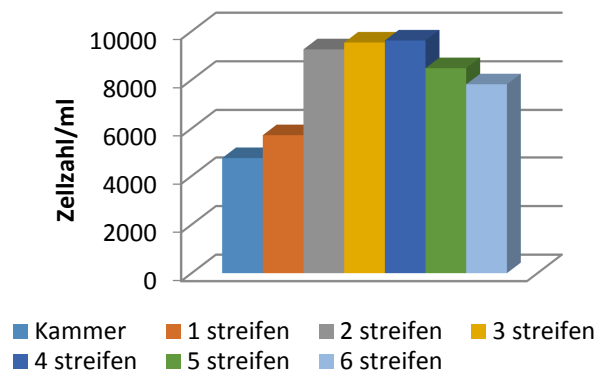


Abbildung 17: Variabilitätstest der Zählmethoden 1 und 2 von Stamm 2-44 aus Exp.1 bei einer Kultivierungstemperatur von 4°C. Verglichen wurden die ermittelten Zellzahlen/ml aus der Zählung einer ganzen Kammer und den Zählungen von sechs einzelnen Streifen.

4.2.4 Maximal erreichte Zellzahlen/ml

In Abb. 18 fällt zunächst der etwa fünfmal höhere Wertebereich von Exp.1 auf. Die maximalen Zellzahlen/ml der nördlichen Stämme liegen deutlich über denen von Exp.2. Da in Exp.1 hauptsächlich Streifen ausgezählt wurden, lässt sich dieser Zustand durch den Variabilitätstest der Zählmethoden 1 und 2 erklären. Demnach sind weder die erreichten Zellzahlen/ml, noch die Wachstumsraten und Generationszeiten aus Exp.1 ernst zu nehmen. Demnach sind sie auch nicht vergleichbar mit den Werten aus Exp.2. In Exp.2 haben die südlichen Stämme durch die erhöhten Anfangszellzahlen/ml ebenso höhere maximale Zellzahlen/ml erreicht. Trotzdem reichen die Werte von bis zu 1600 Zellen/ml nicht an die der nördlichen Stämme heran. Auffallend ist vor allem, dass alle bei 0°C inkubierten Kulturen (außer 14-27 Exp.2) geringere maximale Zellzahlen/ml erreicht haben, als die Kulturen, die bei 4°C inkubiert wurden. Durch den besonders guten Zustand der Zellen von Stamm 1-07 war anzunehmen, dass diese Kulturen mit 45000 (Exp.1 4°C Abb. 18 A) und fast 10000 (Exp.2 4°C Abb. 18 B) die höchsten maximalen Zellzahlen/ml erreichen. Bei einer Inkubationstemperatur von 0°C waren die Werte um etwa 2000 bis 5000 Zellen/ml geringer. Auch die Kulturen von Stamm 2-44 haben mit etwa 32000 Zellen/ml in Exp.1 bei 4°C und 8000 Zellen/ml in Exp.2 bei 4°C hohe Werte erzielen können. Die Zellzahlen/ml bei 0°C Inkubation haben wiederum nur etwa die Hälfte der Werte erreicht. Für den Stamm 2-22 liegen die Zellzahlen/ml mit 12000 Zellen/ml in Exp.1 bei 4°C und 2000 Zellen/ml in Exp.2 bei 4°C

sehr viel niedriger als es durch ihren Zustand zu erwarten war. Sowohl in Exp.1 als auch in Exp.2 konnten bei 0°C Inkubation gerade einmal ca. 1800 bis 2000 Zellen/ml erreicht werden.

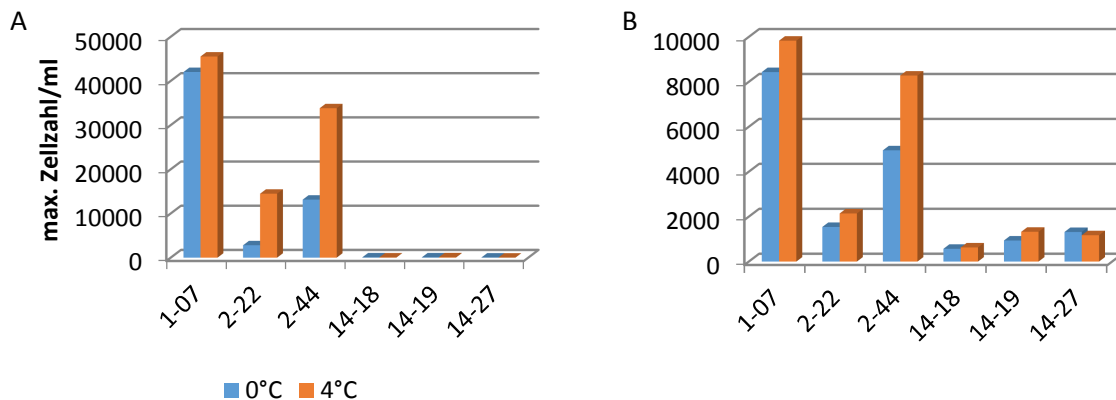


Abbildung 18: Maximal erreichte Zellzahlen/ml beim Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. A: Exp.1, B: Exp.2

4.2.5 Biovolumina

In Abb. 19 sind die durchschnittlichen Werte der Biovolumina pro Zelle aus Exp.1 und 2 zusammengefasst. Als erstes stechen die erhöhten Werte des Stammes 1-07 heraus. In beiden Ansätzen und bei beiden Temperaturen hat 1-07 die höchsten Werte mit annähernd 60 $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ in Exp.1 und etwa 50 bis 52 $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ in Exp.2 erreicht. Dieser Eindruck entstand bereits beim Auszählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop. Schon mit bloßem Auge ließen sich Zellgrößenunterschiede zwischen dem Stamm 1-07 und den anderen Stämmen erkennen (Abb. 20). Zusätzlich fällt auf, dass die Biovolumina pro Zelle in Exp.1 etwas über denen von Exp.2 liegen. Die südlichen Stämme liegen mit um die 40 $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ in Exp.1 und etwa 30 $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ etwa im gleichen Wertebereich wie die Stämme 2-22 und 2-44. Es ist darauf zu achten, dass es sich bei Abb. 19 um durchschnittliche Biovolumina pro Zelle handelt. Werden die Werte von $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ für die Berechnung von $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ Kultur verwendet, dann werden viel höhere Biovolumina erreicht.

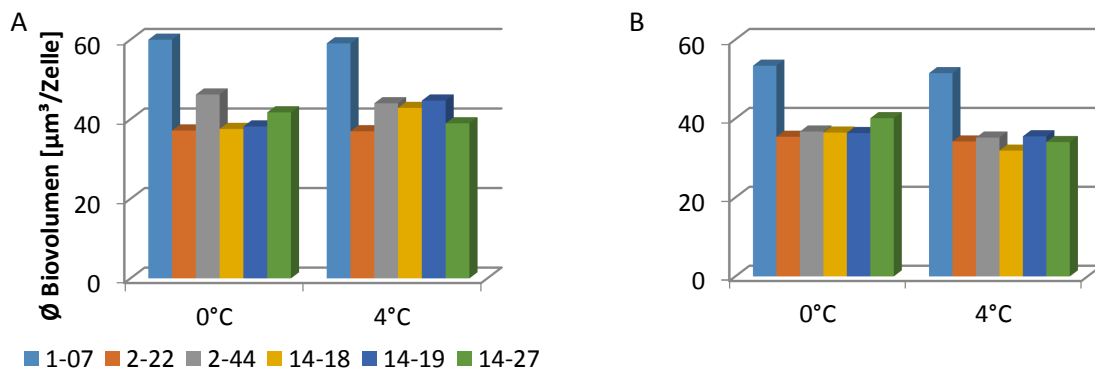


Abbildung 19: Durchschnittliche Biovolumina in $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ von *F. kerguelensis* von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. A: Exp.1, B: Exp.2



Abbildung 20: Mikrofotos der verwendeten *F. kerguelensis* Stämme aus dem Exp.2.
A: 1-07, B: 2-22, C: 2-44, D: 14-18, E: 14-19, F: 14-27

Der große Unterschied der durchschnittlichen Biovolumina ($\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$) zwischen Stamm 1-07 und den Stämmen 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 wird durch die visuelle Darstellung in Abb. 20 verdeutlicht. Abb. 20 A, B und C zeigen die Mikrofotos der nördlichen Stämme. In Abb. 20 D, E und F sind die Mikrofotos der südlichen Stämme dargestellt. Vor allem der Stamm 1-07 (Abb. 20 A) sticht durch seine Größe und gute Zellmorphologie hervor. Der Stamm 2-22 (Abb. 20 B) besitzt die kleinsten Zellen. Die Stämme 2-44 (Abb. 20 C), 14-18 (Abb. 20 D), 14-19 (Abb. 20 E) und 14-27 (Abb. 20 F) haben in etwa die gleichen Zellgrößen erreicht.

Die Biovolumina pro ml Kultur wurden sowohl für Exp.1, als auch für Exp.2 logarithmisch dargestellt. Das erleichtert das Ablesen der hohen Werte.

Durch die Auswertung der Biovolumina pro ml Kultur wird deutlich, dass die südlichen Stämme zwar ähnliche Zellgrößen wie die Stämme 2-22 und 2-44 haben, allerdings haben sie durch die geringe Zellzahl ein niedrigeres Biovolumen pro ml erreicht (Abb. 21). Das heißt, je mehr Zellen/ml in einer Kultur vorhanden sind, desto höher wird das Biovolumen pro ml in einer Kultur. Außerdem steigen die $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ Werte mit steigender Kultivierungsdauer tendenziell an. Erreicht eine Kultur die Absterbephase, dann nimmt auch das Biovolumen pro ml wieder ab. Auch hier haben die Kulturen von Stamm 1-07 durch die hohen Zellzahlen/ml und die Zellgröße die höchsten Werte erzielt. Die Stämme 2-22 und 2-44 liegen ebenfalls in einem guten Wertebereich unterhalb von Stamm 1-07, aber oberhalb der südlichen Stämme. Das Verhältnis zwischen der Inkubation bei 0°C und 4°C ist in Exp.2 ausgeglichen. In Exp.1 sind die Werte bei einer Inkubationstemperatur von 0°C leicht erhöht.

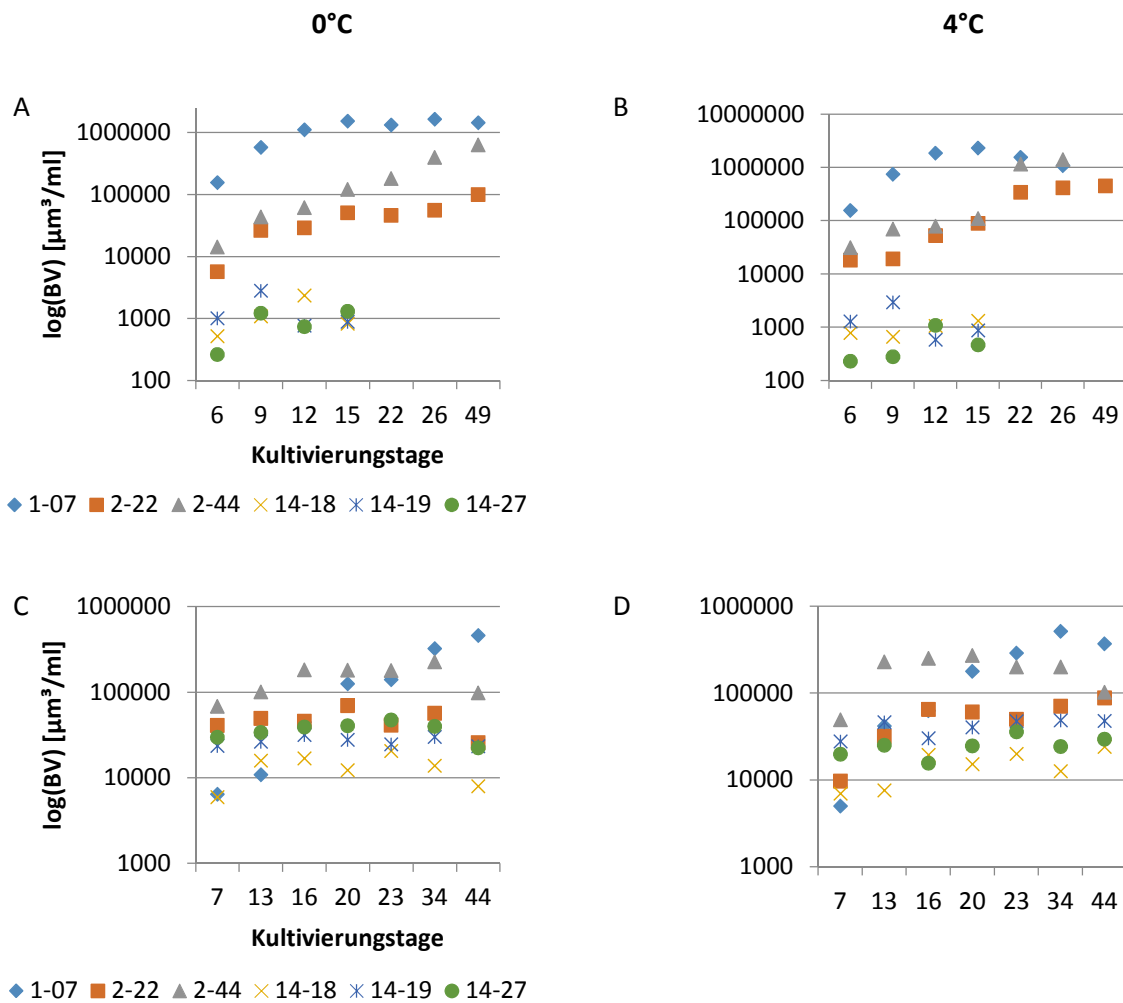


Abbildung 21: Biovolumen in $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ von *F. kerguelensis* aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage. Das Biovolumen steigt mit steigender Zellzahl/ml. Nicht vergleichbar mit dem Biovolumen in $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$.

A: Exp.1 0°, B: Exp.1 4°C, C: Exp.2 0°C, D: Exp.2 4°C

Zu beachten ist, dass die maximalen Werte in Exp.1 im 10 Millionen- und in Exp.2 im 1 Millionenbereich ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) liegen. Diese Abweichung kann ebenfalls auf die unterschiedlichen Zählmethoden zurückgeführt werden, da die Zellzahlen/ml in die Berechnung der $\mu\text{m}^3/\text{ml}$ mit einbezogen wurde.

4.3 Zellwachstum

4.3.1 Aufnahme von Wachstumskurven über die Zellzahl/ml

In Abb. 22 sind die Wachstumskurven von Exp.1 und 2 dargestellt. Es sind die Zellzahlen/ml gegen die Anzahl der Kultivierungstage geplottet. Abb. 22 A und B zeigen das Wachstum der Zellen von den Kulturen der Stämme 1-07, 2-22 und 2-44 aus Exp.1 bei 0°C und 4°C Inkubation. Abb. 22 C und D bilden die Wachstumskurven von den Kulturen der Stämme 1-07, 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 aus Exp.2 ebenfalls bei einer Inkubationstemperatur von 0°C und 4°C. Bei dem Stamm 2-22 aus Exp.1 bei 0°C und den südlichen Stämmen aus Exp.2 kann man nicht von

Wachstumskurven mit den ursprünglich definierten Wachstumsphasen sprechen. Durch die starken Schwankungen der Zellzahlen/ml lassen sich keine exponentiellen, stationären oder Absterbephase festlegen.

Auch hier fallen zunächst wieder die erhöhten Werte von Exp.1 auf. Durch die Erstellung des Variabilitätstests ist anzunehmen, dass die Werte um etwa die Hälfte kleiner sein müssten. Dessen ungeachtet sind die einzelnen Wachstumsphasen von den Stämmen 1-07 und 2-44 gut zu erkennen. Besonders fällt auf, dass die Zellzahlen/ml in beiden Experimenten bei einer Inkubationstemperatur von 0°C geringere Werte angenommen haben. Außerdem kam es bei den im 0°C Kulturraum inkubierten Kulturen zu langgestreckten stationären Phasen und dadurch zu einer erhöhten Kultivierungsdauer. Dadurch war der Zeitraum bis zum vollständigen Absterben der Kulturen deutlich erhöht, sodass aus Zeitgründen nicht alle Wachstumskurven bis zum Ende verfolgt werden konnten. Bei den im 4°C Kulturraum inkubierten Kulturen sind die stationären Phasen sehr kurz (ca. 1 bis 2 Tage) und das Absterben erfolgte schnell. Auffällig steil verlaufen die exponentiellen Phasen von Stamm 1-07. Innerhalb von 10 bis 15 Tagen wurde bereits die maximale Zellzahl/ml und somit das Ende der exponentiellen Phase erreicht.

Schwankungen der Zellzahlen/ml in Exp.1 (Stamm 1-07 0°C und 2-22 4°C) können durch ungleichmäßige Verteilungen der Zellen in der Utermöhl-Kammer verursacht worden sein. Durch das Zählen von einzelnen Streifen ist die Variabilität der Zellzahlen/ml durch die geringe Anzahl von gezählten Ketten sehr hoch. Außerdem können unterschiedliche Kettenlängen bei der Zählmethode 1 in Exp.1 einen Einfluss auf die Zellzahlen/ml genommen haben. Bei Exp.2 sind keine erheblichen Schwankungen zu sehen, was an der gleichbleibenden Zählung ganzer Utermöhl-Kammern oder an dem schnellen Erreichen der Absterbephase liegen könnte (keine bzw. verkürzte stationäre Phase, dadurch keine gleichbleibende Zellzahl/ml bei der ein Zählfehler auffallen würde). Schwankungen bei den Stämmen 2-22, 14-18, 14-19 und 14-27 können allerdings auch durch Verdünnungsfehler oder durch eine ungleichmäßige Verschiebung des Objektisches beim Zählen herbeigeführt worden sein.

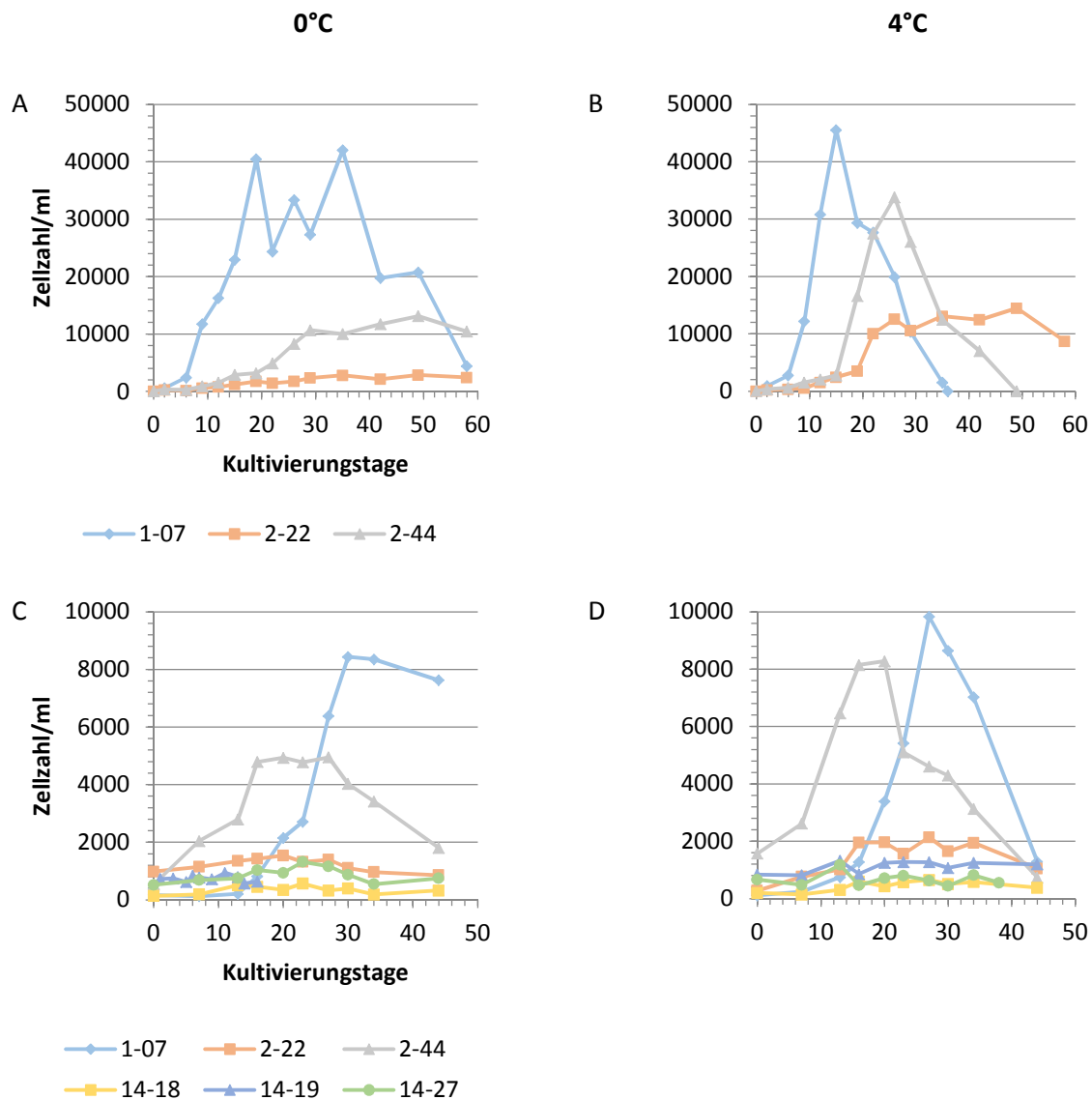


Abbildung 22: Wachstumskurven von *F. kerguelensis* von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. Aufgetragen sind die Zellzahlen/ml gegen die Kultivierungstage.
A: Exp.1 0°C, B: Exp.1 4°C, C: Exp.2 0°C, D: Exp.2 4°C

4.3.2 Spezifische Wachstumsraten und Generationszeiten über die Zellzahl/ml

Die spezifischen Wachstumsraten (Tabelle 11) und die daraus resultierenden Generationszeiten (Tabelle 12) wurden für die exponentiellen Wachstumsphasen aus Abb. 22 bestimmt. Für die südlichen Stämme konnten keine spezifischen Wachstumsraten ermittelt werden. Für den Stamm 2-22 konnte die spezifische Wachstumsrate lediglich für das Exp.1 bei 4°C Inkubation berechnet werden. Der Wert liegt mit 0.352/Tag zwar im gleichen Bereich, wie die Werte vom Stamm 1-07 und 2-44, allerdings ist er durch die kurze exponentielle Phase nicht sehr aussagekräftig. Der Stamm 1-07 hat mit Werten zwischen 0.162/tag und 0.403/Tag die höchsten Wachstumsraten erreicht. Durch die steilen Steigungen der Wachstumskurven in Abb.22 war dies anzunehmen. Auch hier erkennt man einen Unterschied zwischen den Inkubationstemperaturen von 0°C und 4°C. Die spezifischen Wachstumsraten der bei 0°C inkubierten Kulturen haben durch die etwas verlängerten exponentiellen Phasen niedrigere Werte als bei einer Inkubationstemperatur von

4°C erreicht. Für das Exp.2 lässt sich kein allgemeiner Trend festlegen. Der Stamm 1-07 wächst bei einer Inkubation von 4°C schneller und der Stamm 2-44 hat ein schnelleres Wachstum bei einer Inkubation im 0°C Kulturraum.

Tabelle 11: Spezifische Wachstumsraten berechnet aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Wachstumskurven aus Abb. 22. Es sind die Werte aus den Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C zusammengefasst. *nicht auswertbar

Stamm	μ Exp.1 (0°C) [1/d]	μ Exp.1 (4°C) [1/d]	μ Exp.2 (0°C) [1/d]	μ Exp.2 (4°C) [1/d]
1-07	0.217	0.403	0.162	0.186
2-22	*	0.352	*	*
2-44	0.121	0.328	0.180	0.126
14-18	*	*	*	*
14-19	*	*	*	*
14-27	*	*	*	*

Die Generationszeiten und spezifischen Wachstumsraten drücken das gleiche aus. Allerdings werden die Generationszeiten durch die Berechnungen resultierend aus den Wachstumsraten auf einer anderen Werteskala dargestellt (Tabelle 12). Daher ist hier zu beachten, dass die Generationszeiten bei hohen spezifischen Wachstumsraten kleinere Werte annehmen. Das heißt im Umkehrschluss, je kleiner die spezifischen Wachstumsraten einer Kultur, desto mehr Tage benötigen die Zellen für eine Zellteilung. Auch anhand der Generationszeiten lässt sich erkennen, dass das Zellwachstum bei einer Inkubation von 0°C gegenüber einer Inkubation von 4°C tendenziell verlangsamt ist. In Exp.1 bei 4°C Inkubation haben die Kulturen der Stämme 1-07, 2-22 und 2-44 etwa 2 Tage für eine Verdopplung benötigt. Die maximale Generationszeit ist beim Stamm 2-44 in Exp.1 bei 0°C Inkubation mit etwa 6 Tagen für eine Zellteilung am höchsten. Auch hier kann für das Exp.2 kein Trend hinsichtlich der Temperaturen bestimmt werden. Eine Zellteilung von Stamm 1-07 benötigt mit 3.727 Tagen bei einer Inkubation im 4°C Kulturraum weniger Zeit, als bei der Inkubation bei 0°C. Dahingegen teilen sich die Zellen von Stamm 2-44 bei der Inkubationstemperatur von 0°C mit 3.857 Tagen schneller als bei 4°C.

Tabelle 12: Generationszeiten berechnet aus den spezifischen Wachstumsraten der exponentiellen Wachstumsphasen der Wachstumskurven aus Abb. 22 (Tabelle 11). *nicht auswertbar

Stamm	t_d Exp.1 (0°C) [d]	t_d Exp.1 (4°C) [d]	t_d Exp.2 (0°C) [d]	t_d Exp.2 (4°C) [d]
1-07	3.195	1.720	4.271	3.727
2-22	*	1.972	*	*
2-44	5.708	2.115	3.857	5.495
14-18	*	*	*	*
14-19	*	*	*	*
14-27	*	*	*	*

Abb. 23 dient zur Verdeutlichung der obenstehenden Tabellen 11 und 12.

Beim direkten Vergleich ist das Verhältnis von spezifischer Wachstumsrate und Generationszeit noch einmal gut zu erkennen. Der Stamm 1-07 von Exp.1 hat bei einer Inkubation im 4°C Kulturraum die höchste spezifische Wachstumsrate erreicht und benötigt somit am wenigsten Tage für eine Zellteilung.

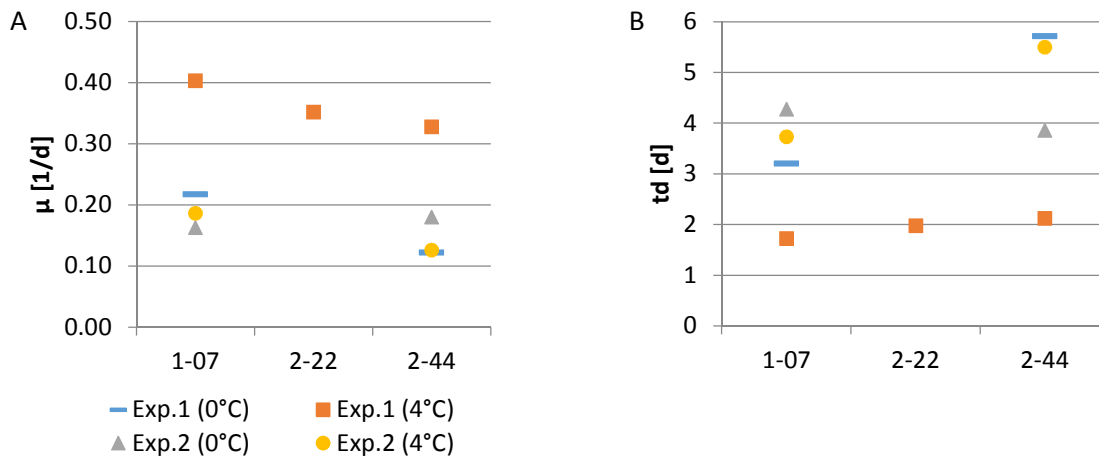


Abbildung 23: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten, ermittelt aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Zellzahlen/ml.

A: Spezifische Wachstumsraten [1/d], B: Generationszeiten t_d [d]

4.3.3 Aufnahme von Wachstumskurven über die Grundfluoreszenz F_0

Die Oberflächen der Zellen und die daraus resultierenden Biovolumina sind ausschlaggebend für die Höhe der Fluoreszenz. Je größer eine Zelle und je höher das Biovolumen einer Kultur, desto mehr Chlorophyllmoleküle befinden sich in dieser. Das heißt, es ist zu erwarten, dass die Fluoreszenzintensität mit steigendem Biovolumen ebenfalls zunimmt. Durch die Auswertung der Zellzahlen/ml, Biovolumina und Fluoreszenz-Werte lässt sich diese Annahme bestätigen. Daher lassen sich neben dem Auszählen von Utermöhl-Kammern auch durch die Messung der Grundfluoreszenz Wachstumskurven aufnehmen.

Grundsätzlich haben die Wachstumskurven beider Aufnahmemethoden (Auszählen und Grundfluoreszenzmessung) ähnliche Verläufe genommen. Allerdings kann die Fehlerquelle der unterschiedlichen Zellzahlen/ml durch die Zählmethoden 1 und 2 bei der Messung der Fluoreszenz ausgeschlossen werden. Dafür musste bei der Anwendung der Imaging-PAM auf die Vermeidung anderer Fehlerquellen geachtet werden. Zum Beispiel kam es durch die hohen Außentemperaturen während der Bearbeitung der Experimente vermehrt zur Kondenswasserbildung an den Kulturflaschen. Dieses wurde allerdings unmittelbar vor jeder Messung mit einem fusselfreien Tuch entfernt. Trotzdem können dadurch kleine Messfehler entstanden sein, welche letztendlich zu Schwankungen in den Kurven führen.

Die Grundfluoreszenzwerte für alle Kulturen aus Exp.2 liegen über denen aus Exp.1. Bei den unterschiedlichen Flaschengrößen von 40 ml und 200 ml ist das auch zu erwarten. Die Flüssigkeitsschicht in den 200 ml Flaschen ist größer, sodass bei gleicher Zellkonzentration pro

Volumeneinheit eine höhere Konzentration pro Flächeneinheit erzielt wird. Außerdem konnten durch die erhöhten Anfangszellzahlen/ml in Exp.2 geringe Werte für die südlichen Stämme detektiert werden. In Exp.1 bei 0°C Inkubation (Abb. 24 A) wurden keine und in Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 4°C (Abb. 24 B) nur sehr niedrige Fluoreszenzwerte für den Stamm 2-22 erreicht. Auch hier erkennt man die langgestreckten stationären Phasen vom Stamm 1-07 bei den im 0°C Kulturraum inkubierten Kulturen. Die bei einer Temperatur von 4°C inkubierten Kulturen der Stämme 1-07 und 2-44 besitzen, verglichen mit den 0°C inkubierten Kulturen, Wachstumskurven mit kürzeren exponentiellen und stationären Phasen.

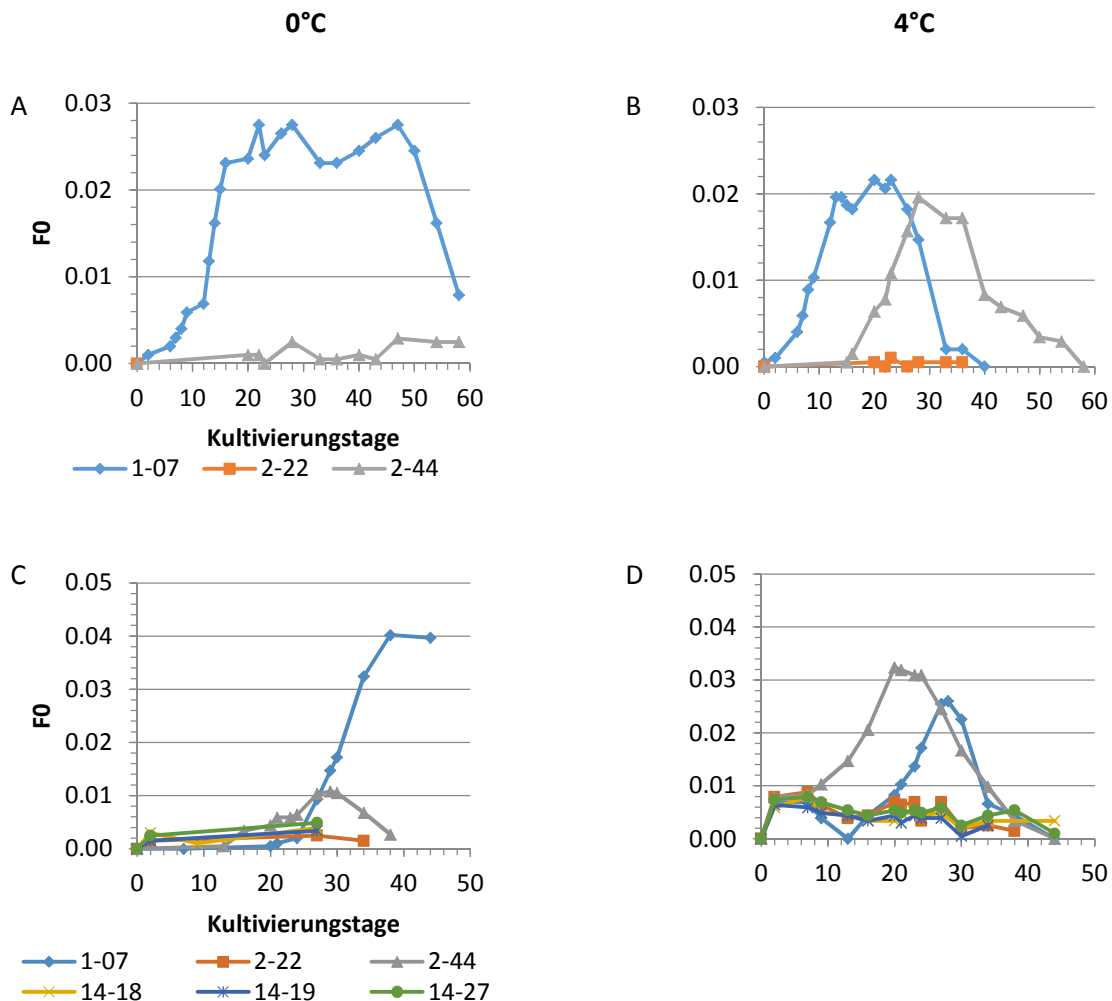


Abbildung 24: Wachstumskurven von *F. kerguelensis* von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. Aufgetragen sind die Zellzahlen/ml gegen die Anzahl der Kultivierungstage.

A: Exp.1 0°C, B: Exp.1 4°C, C: Exp.2 0°C, D: Exp.2 4°C

Demnach wird auch hier deutlich, dass die bei 0°C inkubierten Kulturen einen erhöhten Kultivierungszeitraum benötigen. Dafür werden höhere Grundfluoreszenzwerte beim Messen mit der Imaging-PAM erreicht. Der Kultivierungszeitraum bei einer Inkubation im 4°C Kulturraum ist durchschnittlich um etwa 10 bis 15 Tage verkürzt. Allerdings sind auch die detektierten Messwerte niedriger.

4.3.4 Spezifische Wachstumsraten und Generationszeiten über F_0

Die Berechnungen der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten konnten für die exponentiellen Wachstumsphasen der Wachstumskurven aus Abb. 24 (aufgenommen durch die Grundfluoreszenz) nur für die Stämme 1-07 und 2-44 erfolgen. Alle ermittelten Werte liegen mit den spezifischen Wachstumsraten der Zellzahlen/ml aus Tabelle 11 in einem ähnlichen Bereich. Die Werte sind durchgehend um etwa 0.01 1/d niedriger. Außerdem ist der Unterschied der Werte zwischen 0°C und 4°C etwa genauso groß wie bei den spezifischen Wachstumsraten der Zellzahlen/ml (Tabelle 13). Auch hier weist der Stamm 1-07 in Exp.2 bei 4°C Inkubation eine erhöhte spezifische Wachstumsrate gegenüber einer Inkubation bei 0°C auf. Der Stamm 2-44 hat wiederum bei einer Inkubationstemperatur von 0°C einen besseren Wert erzielt. Die höchsten spezifischen Wachstumsraten der Kulturen hat der Stamm 1-07 in Exp.1 sowohl bei der Inkubation im 0°C, als auch im 4°C Kulturraum erreicht.

Tabelle 13: Spezifische Wachstumsraten berechnet aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Grundfluoreszenz. Es sind die Werte aus Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C zusammengefasst. *nicht auswertbar

Stamm	μ Exp.1 (0°C) [1/d]	μ Exp.1 (4°C) [1/d]	μ Exp.2 (0°C) [1/d]	μ Exp.2 (4°C) [1/d]
1-07	0.245	0.238	0.133	0.160
2-22	*	*	*	*
2-44	*	0.214	0.159	0.105
14-18	*	*	*	*
14-19	*	*	*	*
14-27	*	*	*	*

Auch bei den Generationszeiten der Grundfluoreszenz (Tabelle 14) ergibt sich ein ähnlicher Wertebereich, wie bei den Zellzahlen/ml (Tabelle 12). Allerdings sind die Generationszeiten durch die niedrigeren spezifischen Wachstumsraten etwas erhöht. In Exp.1 bei Stamm 1-07 haben die Zellen sowohl bei 0°C, als auch bei 4°C etwa 3 Tage für eine Verdopplung benötigt. Bei Exp.2 hat der Stamm 1-07 bei 0°C Inkubation etwa 1 Tag länger für eine Zellteilung benötigt, als bei 4°C. Der Stamm 2-44 hat bei einer Inkubationstemperatur von 4°C über 2 Tage länger für eine Verdopplung benötigt als bei 0°C.

Tabelle 14: Generationszeiten berechnet aus den spezifischen Wachstumsraten der Grundfluoreszenz (Tabelle 13). *nicht auswertbar

Stamm	t_d Exp.1 (0°C) [d]	t_d Exp.1 (4°C) [d]	t_d Exp.2 (0°C) [d]	t_d Exp.2 (4°C) [d]
1-07	2.833	2.910	5.209	4.339
2-22	*	*	*	*
2-44	*	3.236	4.370	6.616
14-18	*	*	*	*
14-19	*	*	*	*
14-27	*	*	*	*

Durch die recht ähnlichen Werte der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten bieten auch die Diagramme (Abb. 25) einen entsprechenden Anblick, wie die Diagramme aus den Zellzahlen/ml (Abb. 23). Der Stamm 1-07 hat im Durchschnitt die höchsten Wachstumsraten und dadurch die niedrigsten Generationszeiten erzielt. Die Zellen haben zwischen 3 und 5 Tage für eine Verdopplung benötigt. Bei Stamm 2-44 liegt die Verdopplungszeit zwischen 3 und etwa 6.5 Tage.

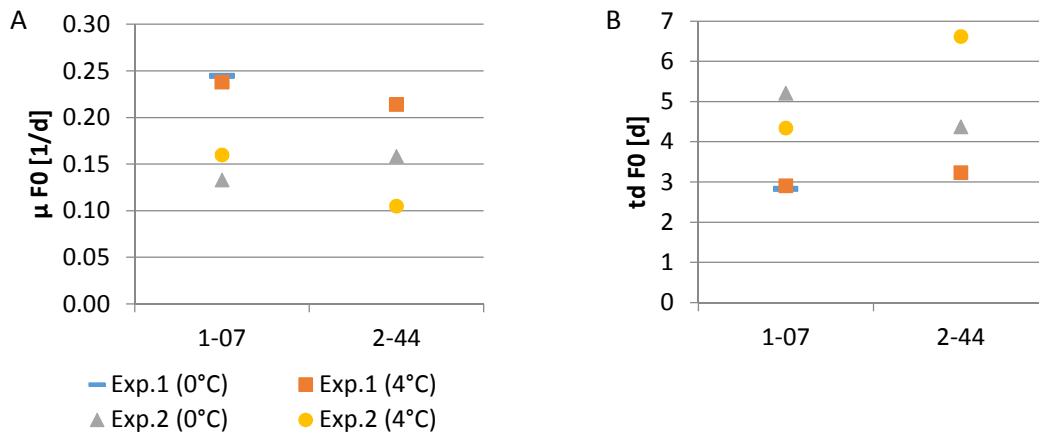


Abbildung 25: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten, ermittelt aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Grundfluoreszenz.

A: Spezifische Wachstumsraten [1/d], B: Generationszeiten t_d [d]

Eine statistische Auswertung der Wachstumsraten und Generationszeiten ist aufgrund der niedrigen Anzahl an erfolgreichen Experimenten nicht möglich. Um dennoch einen genaueren Überblick über die spezifischen Wachstumsraten zu erhalten, sind in Abb. 26 die Wachstumsraten aus der Zellzählung und die aus der Grundfluoreszenz dargestellt. Nur bei Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 4°C ist ein Unterschied zwischen den spezifischen Wachstumsraten zu erkennen. Die Wachstumsraten aus der Zellzählung sind für die Stämme 1-07, 2-22 und 2-44 deutlich erhöht. Alle anderen Wachstumsraten liegen für beide Bestimmungsmethoden in dem gleichen Wertebereich zwischen 0.10 und 0.25.

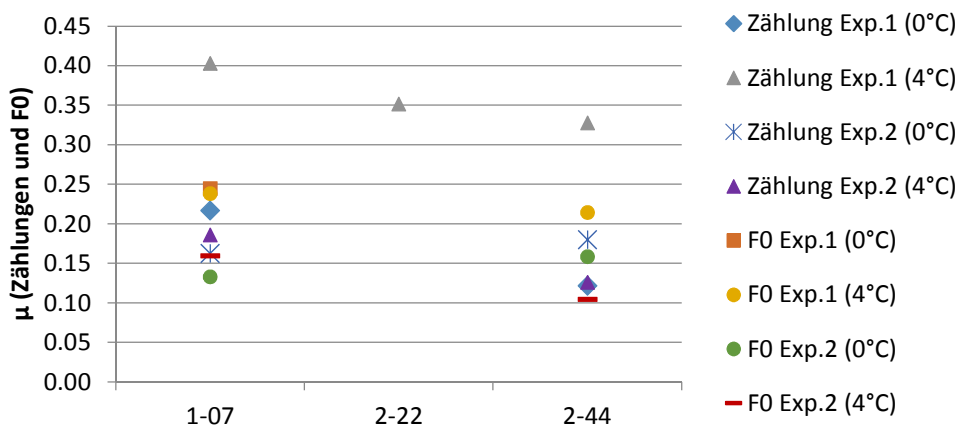


Abbildung 26: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten berechnet aus der Zellzählung und aus der Grundfluoreszenz.

4.3.5 Korrelation der Wachstumskurven zwischen Grundfluoreszenz und Zellzahl/ml

Jede Zelle enthält einen bestimmten Anteil an Chl-Molekülen. Durch die mitotische Zellteilung vermehrt sich auch die Anzahl der Chl-Moleküle, wodurch die Fluoreszenzwiedergabe mit steigender Zellzahl ebenfalls ansteigt. Dadurch entstehen Korrelationen zwischen der Grundfluoreszenz F_0 und der Zellzahl/ml, die durch eine gemeinsame Darstellung in einem Diagramm sichtbar gemacht werden können (Abb. 27).

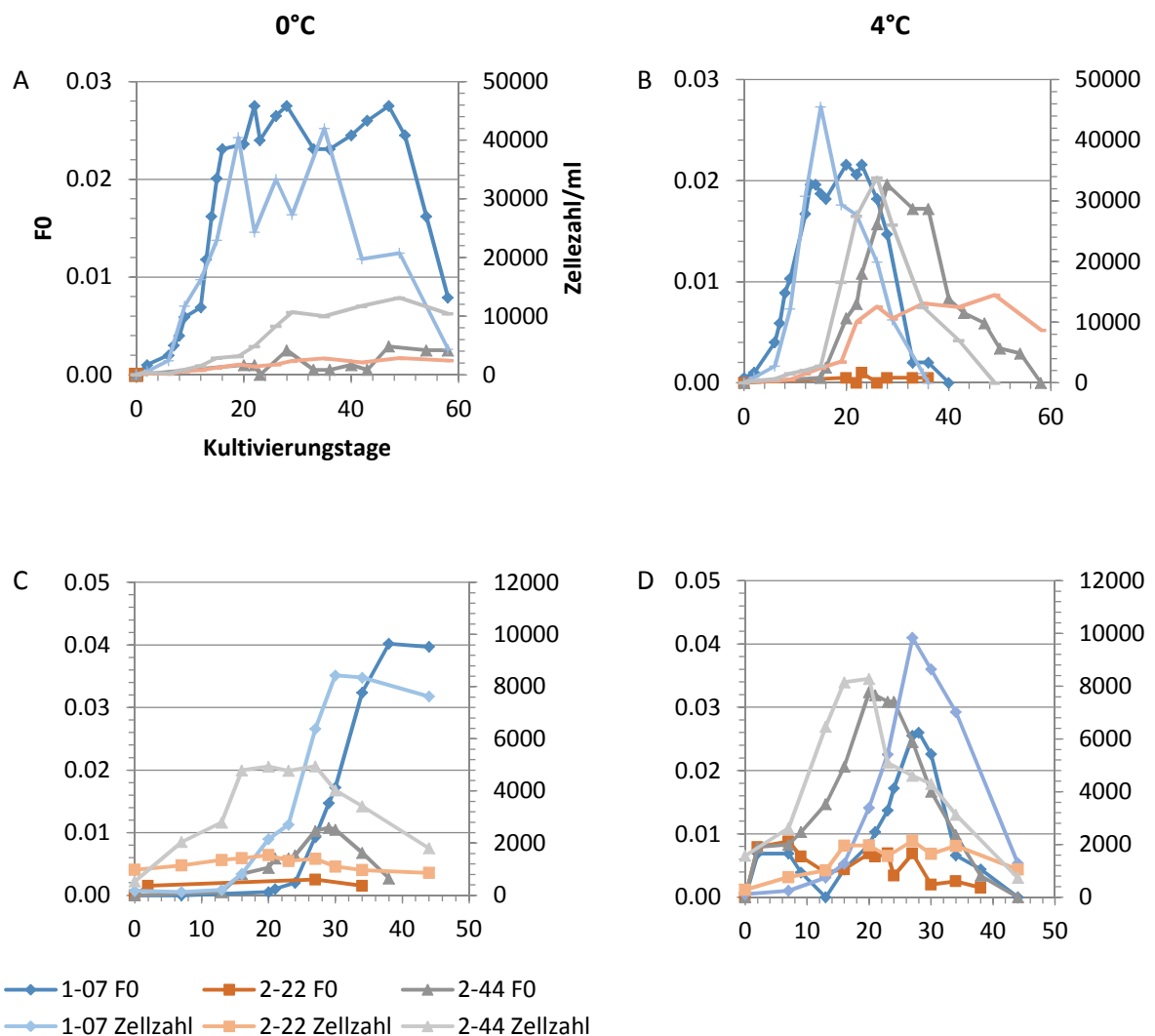


Abbildung 27: Korrelation zwischen den Zellzahlen/ml und der Grundfluoreszenz F_0 von *F. kerguelensis*.

A: Exp.1 0°C, B: Exp.1 4°C, C: Exp.2 0°C, D: Exp.2 4°C

Für die Diagramme in Abb. 27 wurden sowohl die Grundfluoreszenz F_0 , als auch die Zellzahlen/ml gegen die Anzahl der Kultivierungstage aufgetragen. Die Kurven beider Parameter haben sehr ähnliche Verläufe angenommen. Durch den direkten Vergleich lässt sich gut erkennen, dass hohe Zellzahlen ausschlaggebend für die Abgabe von Fluoreszenz sind. Demnach konnte, wie in Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C zu sehen, durch die geringe Kulturdichte des Stammes 2-22 keine Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 27 A). Auch in Exp.1 bei 4°C Inkubation wurden trotz der höheren Zellzahlen nur sehr niedrige Fluoreszenzwerte erreicht (Abb. 27 B). In Exp.1 sind die Zellzahlen mit Werten von bis zu 45.000 Zellen/ml zwar sehr hoch, allerdings sind die

Fluoreszenzwerte niedriger als die in Exp.2. Das weist wiederum auf eine verfälschte Zellzahl/ml beim Auszählen durch die Streifenzählung hin. Schwankungen treten sowohl in den Zellzahlen/ml, als auch in der Grundfluoreszenz auf.

Um die Linearität der exponentiellen Phasen zu beschreiben wurden in Abb. 28 (für die Stämme 1-07 und 2-44 aus Exp.2) zusätzlich die Grundfluoreszenzwerte gegen die Zellzahl/ml aufgetragen. Für den Stamm 1-07 ist eine lineare Korrelation zwischen Grundfluoreszenz und Zellzahl/ml zu erkennen. Die Ausreißer bei einer Zellzahl/ml von 0, 900, 1200 und etwa 7000 definieren den Anstieg (Übergangsphase 1) bzw. den Abfall (Absterbephase) der Wachstumskurve. Auch für den Stamm 2-44 lässt sich eine lineare Korrelation identifizieren. Allerdings sind mehr Ausreißer zu erkennen, die bedingt durch die Schwankungen in der Wachstumskurve zu definieren sind.

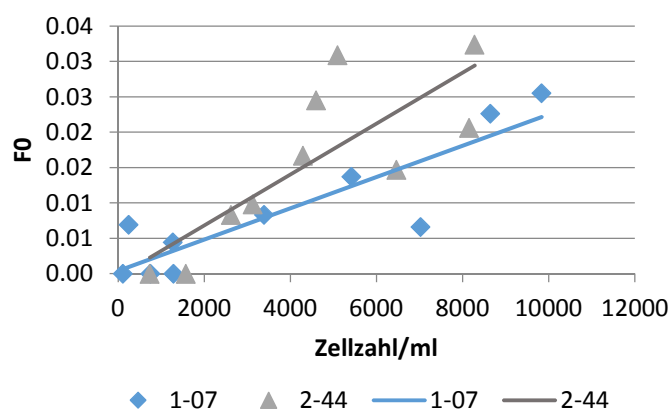


Abbildung 28: Darstellung der Linearität zwischen Zellzahl/ml und Grundfluoreszenz anhand der Stämme 1-07 und 2-44 von Exp.2 bei der Inkubationstemperatur 4°C.

4.4 Induktionskurven

Für den Vergleich der Induktionskurven zwischen den beiden experimentellen Ansätzen und den beiden Inkubationstemperaturen wurden ausschließlich die Stämme 1-07 (Abb. 29 A-D) und 2-44 (Abb. 29 E und F) dargestellt. Die Kurven der Stämme 2-22, 2-44 (0°C Exp.1 und 2), 14-18, 14-19 und 14-27 lassen sich durch eine zu niedrige Signalintensität nicht auswerten und somit auch nicht vergleichen.

Die ermittelten Induktionskurven weisen keine reproduzierbaren Ergebnisse auf. Das heißt, der Verlauf der Kurven ist nicht nachvollziehbar und kann mit typischen Induktionskurven aus der Literatur (siehe Punkt 5.3.3 „Induktionskurven“) nicht verglichen werden. Die Schwankungen der ETR sind sehr stark und ungleichmäßig. Die maximalen ETR liegen bei allen Kurven in einem Wertebereich von 6 bis 8. Außerdem weist die erste Messung aller Kurven bei etwa 30 Sekunden einen ähnlichen Peak bei einer ETR von 5 auf. Genauere Aussagen über die Kurven und die damit zusammenhängenden Prozesse im PS II können nicht getroffen werden.

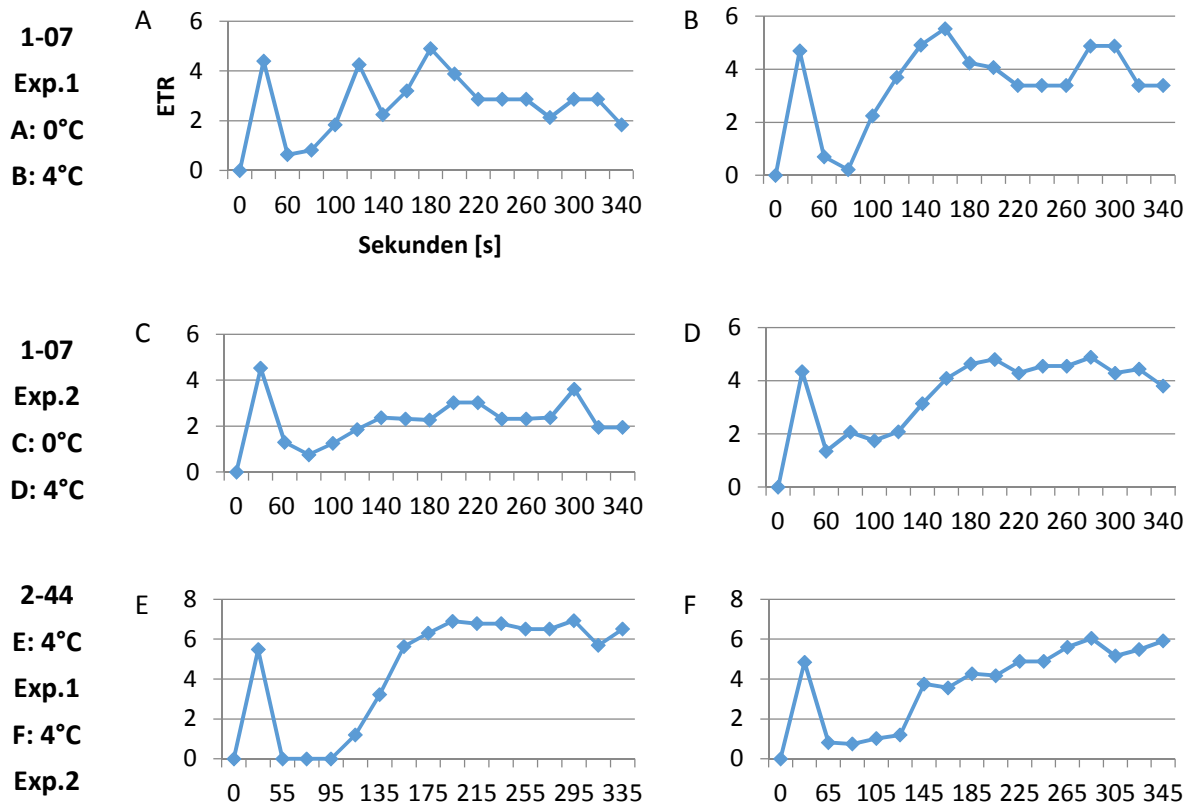


Abbildung 29: Induktionskurven von den Stämmen 1-07 A-D und 2-44 E-F.
A: Exp.1 0°C, B: Exp.1 4°C, C: Exp.2 0°C, D: Exp.2 4°C, E: Exp.1 4°C, F: Exp.2 4°C

4.5 Imaging-PAM versus FRRF

4.5.1 F_v/F_m Messung mit der Imaging-PAM versus mit dem FRRF

Der MQ-Vergleich konnte nur für die Stämme 1-07 und 2-44 erstellt werden, weil die anderen Stämme keine bewertbaren Messungen erbrachten (Tabelle 15). Da die Lichtkurven und somit der Vergleich zwischen F_v/F_m vor und nach dem Einfluss von Lichtstress bei Exp.1 mit dem FRRF nicht gemessen wurden, liegen dafür keine Werte vor. Zwischen den Experimenten 1 und 2 sieht man eine relativ gute Übereinstimmung der MQ-Werte. Außerdem scheint die Erholung des PS II bei der Inkubationstemperatur von 4 °C besser erfolgt zu sein, als bei 0°C.

Der Stamm 1-07 konnte bei beiden Experimenten und bei den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen von 0°C und 4°C sehr gut mit dem Lichtstress umgehen konnte. Die bei 4°C inkubierten Kulturen haben nach den Messungen mit der Imaging-PAM fast 90 % ihrer ursprünglichen maximalen PS II Quantenausbeute erzielt. Auch die bei 0°C inkubierten Kulturen haben etwa 80 % ihrer Quantenausbeute erreicht. Beim Messen mit dem FRRF kam der Stamm 1-07 von Exp.2 sogar auf 110 % bei 0°C und auf 121 % bei 4°C Inkubation ihrer maximalen Quantenausbeute nach dem Lichtstress. Der Stamm 2-44 konnte ebenfalls gut mit dem Lichtstress umgehen. Nur bei Exp.2 bei 0°C Inkubation konnte keine Auswertung erfolgen. Allerdings haben die Kulturen bei 4°C Inkubation mit der Imaging-PAM-Messung über 100 % ihrer ursprünglichen Quantenausbeute erreicht. Bei Exp.1 bei der Inkubation im 0°C Kulturraum sind es mit 65 % noch

weit über 50 % der vorher erreichten F_v/F_m -Werte. Mit dem FRRF wurden Werte von 69 % bei 0°C und 89 % bei 4°C Inkubation erreicht. Auch diese Werte weisen auf eine gute Reaktion des PS II auf Lichtstress hin.

Tabelle 15: Imaging-PAM und FRRF Vergleich der maximalen Quantenausbeute nach der Einwirkung von Lichtstress auf das Photosynthese-System II von *F. kerguelensis*.

*nicht auswertbar; - nicht auswertbar, weil nicht gemessen

Stamm	MQ Exp.1 (0°C) [%]	MQ Exp.1 (4°C) [%]	MQ Exp.2 (0°C) [%]	MQ Exp.2 (4°C) [%]
1-07 PAM	79	99	76	90
1-07 FRRF	-	-	110	121
2-44 PAM	65	112	*	115
2-44 FRRF	-	-	69	89

4.5.2 Vergleich der Lichtkurven von Imaging-PAM und FRRF

Der Vergleich der Lichtkurven erfolgt mit den experimentellen Ansätzen aus dem zweiten Experiment (Abb. 30). Durch das Messen mit der Imaging-PAM konnten nur Werte zum Erstellen von „Kurven“ für die Stämme 1-07 (0°C und 4°C Inkubation) und 2-44 (4°C Inkubation) ermittelt werden. Mit dem FRRF wurden für alle Stämme und Kulturen verwendbare Werte erreicht.

Um einen Vergleich zwischen Imaging-PAM und FRRF darzustellen, sind in Abb. 30 die Diagramme der messbaren Imaging-PAM-Kurven mit den am gleichen Tag gemessenen FRRF-Kurven dargestellt. Die PAR-Werte der beiden Fluorometer waren zwar unterschiedlich eingestellt, lagen aber in dem gleichen Wertebereich. Bei der Imaging-PAM liegen die Werte zwischen 0 und 726 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ und beim FRRF zwischen 0 und 1032.2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Die Messungen sollten demzufolge vergleichbare ETR und einen ähnlichen Kurvenverlauf bis zum Erreichen von 726 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ aufweisen. Bereits beim ersten Vergleich fallen allerdings die sehr unterschiedlichen Kurvenverläufe und der unterschiedliche ETR-Wertebereich auf. Vergleicht man jedoch die Lichtkurven der Imaging-PAM untereinander, weisen sie vergleichbare Charakteristika auf. Die erzielten Ergebnisse zeigen sehr niedrige ETR und einen Abfall auf ETR=0 nach dem Erreichen von etwa 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Der Anstieg der Kurven bis zum Erreichen der maximalen ETR verläuft linear und das Maximum der ETR liegt beim Stamm 1-07 (0°C Inkubation) bei 1,5 (Abb. 30 A), für 1-07 (4°C Inkubation) bei 3,5 (Abb. 30 C) und für den Stamm 2-44 (4°C Inkubation) bei 4,5 (Abb. 30 E).

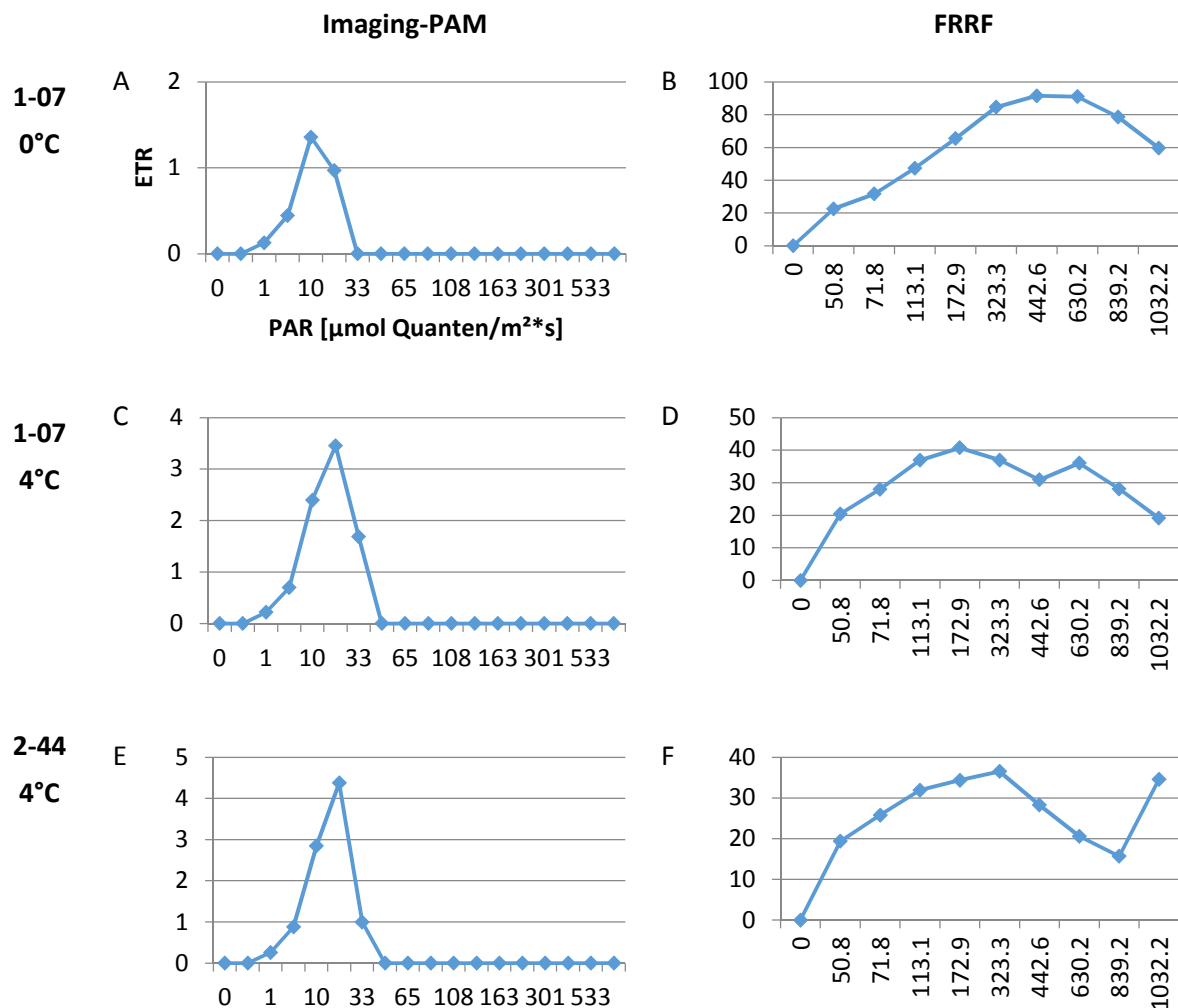


Abbildung 30: Lichtkurvenvergleich von Stamm 1-07 A-D und 2-44 4°C E-F der Imaging-PAM mit dem FRRF. A: PAM Exp.2 0°C, B: FRRF Exp.2 0°C, C: PAM Exp.2 4°C, D: FRRF Exp.2 4°C, E: PAM Exp.2 4°C, F: FRRF Exp.2 4°C

Auch die Lichtkurven, die mit dem FRRF aufgenommen wurden zeigen untereinander einen vergleichbaren Verlauf, wobei die ETR zwischen 40 und 100 variieren. Einen typischen Lichtkurvenverlauf zeigt die Kurve von Stamm 1-07 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C (Abb.30 B). Zunächst ist ein linearer Anstieg zu beobachten, der nach dem Erreichen einer maximalen ETR (beim Erreichen der höchsten PAR-Werte) wieder sinkt. Bei den Kurven 1-07 bei 4°C Inkubation (Abb. 30 D) und 2-44 bei ebenfalls 4°C Inkubation (Abb. 30 F) sind vorübergehende Absenkungen der ETR zu sehen, die kurz darauf wieder ansteigen.

4.6 FRRF Lichtkurven; Vergleich zwischen Norden und Süden

Nach den durchgehend negativen Ergebnissen der südlichen Stämme war zunächst nicht davon auszugehen, dass mit dem FRRF Lichtkurven erzielt werden können. Trotzdem wurde die Messung der Kurven durchgeführt. In Abb. 31 D, E und F sind die Lichtkurven der Stämme 14-18, 14-19 und 14-27 durch die Aufnahme mit dem FRRF-Gerät dargestellt. Die Kurven weichen zwar von dem Verlauf einer typischen Lichtkurve ab, aber es konnten Werte detektiert werden. Die Kurve von Stamm 1-07 bei 0°C Inkubation (Abb. 31 A) hat das beste Ergebnis erzielt. Sie hat eine gleichmäßige, lineare Steigung. Bei einem PAR von 442,6 μmol Quanten/m²*s und einer ETR von

etwa 90 erreicht die Kurve ihr Maximum und fällt danach wieder ab (typischer Verlauf einer Lichtkurve). Bei den übrigen Kurven lässt sich kein Maximum bei einem gleichen oder ähnlichen PAR festlegen. Auch die maximale ETR ist bei jedem Stamm sehr unterschiedlich. Die Kurven der Stämme 1-07 und 2-44 sind am ausschlaggebendsten. Auch wenn für die Stämme 2-22, 14-18, 14-19 und 14-27 Kurven ermittelt werden konnten, sind die erzielten Werte mit hoher Wahrscheinlichkeit (durch die geringen Kulturdichten) nicht aussagekräftig. Vergleicht man die Stämme zwischen den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen von 0°C und 4°C, dann fallen vermehrt Unterschiede auf. Bei Stamm 1-07 bei 0°C Inkubation ist der Kurvenverlauf gleichmäßig bei 1-07 bei 4°C Inkubation (Abb. 31 A) erkennt man einen vorübergehenden Abfall der ETR bei einem PAR von 172,9 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Außerdem liegt das Maximum der ETR bei 40. Beim Stamm 2-22 sind beide Kurven sehr ungleichmäßig, haben allerdings ein gleiches ETR Maximum bei etwa 90 und einem PAR von 839,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Der Anstieg beider Kurven verläuft sehr flach. Außerdem fallen die Kurven bei einem PAR von 442,6 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ auf einen ETR-Wert von etwa 25 ab (Abb. 31 B). Das ETR Maximum von Stamm 2-44 bei den Inkubationstemperaturen von 0°C und 4°C liegt bei dem gleichen Wert von etwa 38. Allerdings unterscheiden sich die PAR-Werte. Bei 2-44 0°C Inkubation liegt der PAR-Wert bei 1032,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ und bei 4°C Inkubation bei 323,3 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (Abb. 31 C). Das ETR Maximum von Stamm 14-18 ist bei beiden Temperaturen sehr unterschiedlich. Bei 0°C liegt der Wert bei etwa 110 bei einem PAR von 1032,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ und bei 4°C bei etwa 55 bei einem PAR von 389,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (Abb. 31 D). Die ETR Maxima der Lichtkurven von Stamm 14-19 befinden sich beide bei einem PAR von 1032,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Sie liegen bei der Inkubationstemperatur von 0°C bei etwa 110 und bei 4°C bei etwa 75 (Abb. 31 E). Bei Stamm 14-27 liegen die ETR Maxima ebenfalls bei einem PAR von 1032,2 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Bei 0°C liegt der Wert für die ETR bei ca. 40 und bei 4°C bei etwa 75 (Abb. 31 F).

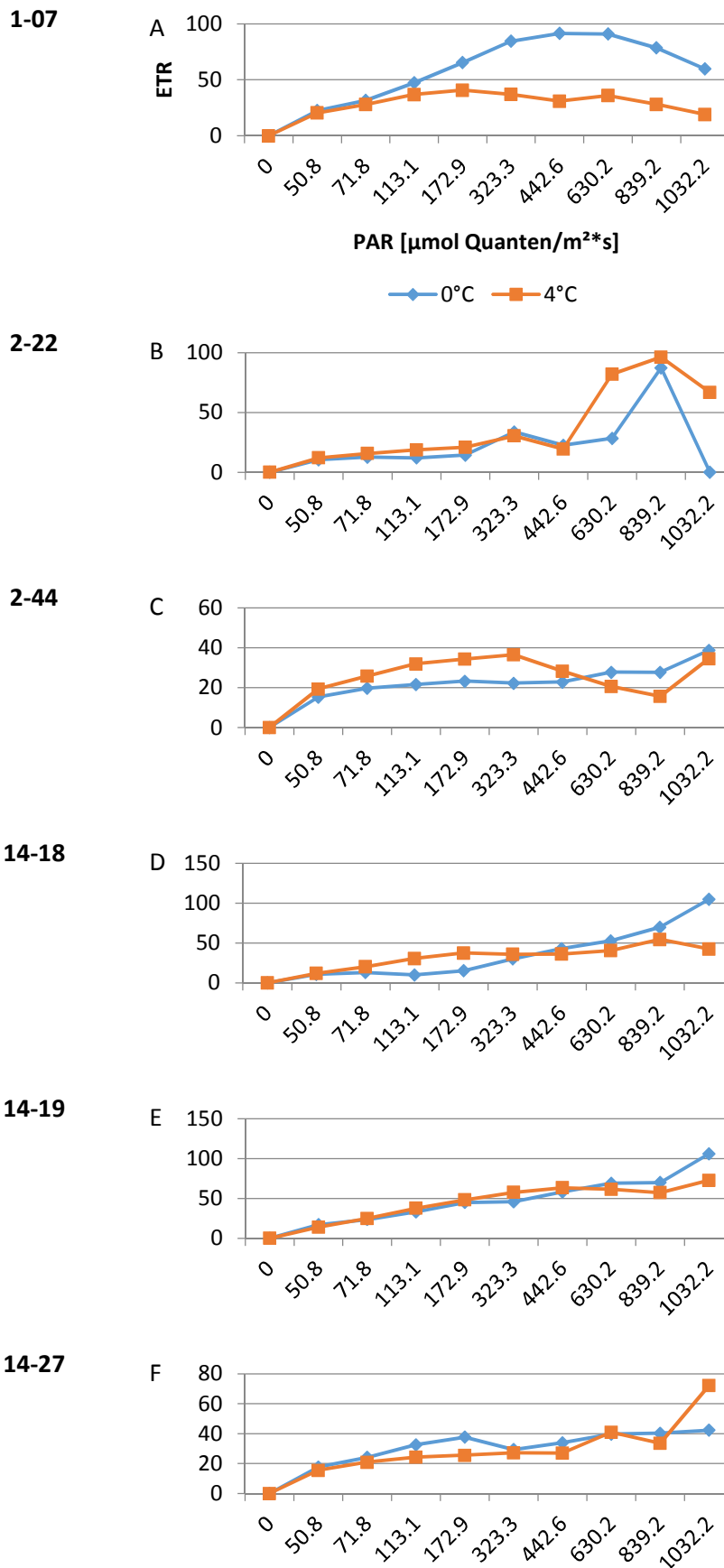


Abbildung 31: Lichtkurven aufgenommen mit dem FRRF der *F. kerguelensis* Stämme 1-07, 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 von Exp.2.
A: 1-07, B: 2-22, C: 2-44, D: 14-18, E: 14-19, F: 14-27

5. Diskussion

5.1 Zustand der südlichen Stämme

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe verhielten sich die südlichen Stämme in Zellwachstum, -physiologie und Fluoreszenzwiedergabe wie die Stämme aus den nördlichen Probenahmeregionen. Während des Testexperimentes und der Experimente 1 und 2 mit den Stämmen 14-18, 14-19, 14-23 und 14-27 ist jedoch deutlich geworden, dass sich diese Stämme nicht mehr für ein Experiment dieser Art eignen. Durch die geringen Kulturdichten war es nicht möglich, mit Hilfe der Imaging-PAM-Messung Wachstumskurven zu erstellen. Auch durch das Zählen der Zellen mit der Utermöhl-Methode konnte kein typisches Wachstum in unterscheidbaren Wachstumsphasen dargestellt werden. Der Stamm 14-23 hat während des Testexperimentes keinerlei Anzeichen für ein fortschreitendes Wachstum gezeigt. Die Zellen die unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden konnten, waren sehr klein (teilweise tot), hatten andersartige Färbungen und besaßen undefinierte, zum Teil gebrochene Schalen. Durch das Ersetzen des Stammes 14-23 durch den Stamm 14-18 sollte die Aussicht auf Wachstumskurven und Fluoreszenzwerte erhöht werden. In Experiment 1 konnten trotz des Aufkonzentrierens der Animpfkulturen keine Werte für die südlichen Stämme ermittelt werden. Das lässt darauf schließen, dass die Kulturdichte und der physiologische Zustand der Zellen in den Animpfkulturen ausschlaggebend für die experimentellen Ansätze sind. Auch in Experiment 2 konnten nur sehr niedrige Werte ermittelt werden. Von den südlichen Stämmen wiesen die Stämme 14-19 und 14-27 das „beste“ Wachstum auf. Der Stamm 14-18 ließ sich zwar ebenfalls auswerten, zeigt aber die niedrigsten Werte. Auch das lässt sich auf die Zellphysiologie zurückführen. In Experiment 2 hat der Stamm 14-18 eine geringere Zellgröße und dadurch ein geringeres durchschnittliches Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ und $\mu\text{m}^3/\text{ml}$) erreicht (Abb. 19 und 21). Je kleiner die Zellgröße und je niedriger die Anzahl der Zellen in der Kultur, desto weniger Chlorophyll-Moleküle liegen vor. Dadurch kann weniger Fluoreszenz mit Hilfe der Imaging-PAM gemessen werden. Zudem besteht Anlass zur Annahme, dass die südlichen Stämme auf Grund ihrer insgesamt geringen Zellgrößen kurz vor der sexuellen Fortpflanzung standen. Das heißt, die Zellen haben durch mitotische Zellteilungen ihre minimale Zellgröße erreicht und müssen durch Konjugation zu ihrer Ursprungsgröße zurückkehren, um eine mit der Imaging-PAM messbare Zellgröße und Chlorophyll-Molekül-Anzahl zu erreichen. Wenn sich keine potentiell geschlechtlichen Zellen innerhalb der Kulturen (und vorher in den Animpfkulturen) befanden, dann konnte keine Fortpflanzung stattfinden. Die Zellgrößenreduktion von *F. kerguelensis* wurde unter anderem in dem Artikel „Genetic characterization and life cycle of the diatom *Fragilariopsis kerguelensis*“ behandelt. In einem Experiment mit 47 *F. kerguelensis* Stämmen stellte sich heraus, dass sich die apikale Länge der Zellen innerhalb von 24 Monaten um 0.13 bis 1.77 μm verringert. Außerdem wurde die sexuelle Fortpflanzung der Stämme nur eingeleitet, wenn sich potentiell geschlechtliche Zellen innerhalb der Kulturen befanden (Fuchs, et al., 2013, S. 411-426).

Ein weiterer Grund für das schlechte Zellwachstum kann der Zeitraum der Inkubation sein. Während des Aussortierens von alten Back-up Kulturen stellte sich heraus, dass Kulturen der südlichen Stämme mit einem Kultivierungszeitraum von zwei bis drei Monaten deutlich höhere Kulturdichten und eine bessere Zellbeschaffenheit aufwiesen. Allerdings wurden diese Back-up Kulturen nicht für das Animpfen der experimentellen Ansätze verwendet, da sie bereits über die exponentielle und stationäre Phase hinausgewachsen waren und für eine Inokulation zu viele tote Zellen beinhaltet haben. Demnach besteht die Annahme, dass die südlichen Stämme mit der Zeit ein verlangsamtes Wachstum entwickelt haben. Um diese Annahme zu bestätigen wäre ein weiteres Experiment mit längeren Inkubationszeiträumen notwendig. Aufgrund von zeitlicher Limitierung waren für die in dieser wissenschaftlichen Arbeit generierten Experimente keine langen Kultivierungszeiten möglich. Zusätzlich fiel ein erhöhter Bakterienbewuchs der südlichen Kulturen auf. Starkes Bakterienwachstum weist zusätzlich auf einen schlechten gesundheitlichen Zustand der Stämme hin.

5.2 Zellkultivierung und Zählmethoden

5.2.1 Kultivierungsmethoden und Umgebungsbedingungen

Für die Zellkultivierung von *F. kerguelensis* sind die Zellphysiologie und die Kulturdichte der Animpfkulturen von großer Bedeutung. Diese Annahme lässt sich aufgrund von Fremd- (Trimborn, 2018) und Eigenerfahrungen bestätigen. Sind die Zellen in einer Animpfkultur bereits „angeschlagen“, das heißt sie haben beschädigte Schalen oder weisen eine geringe Zellgröße auf, dann eignet sich diese Kultur nicht mehr zur Inokulation für wichtige experimentelle Forschungen. Auch ein erhöhter Bakterienbewuchs innerhalb der Kulturen nimmt Einfluss auf das Zellwachstum. Daher ist besonders darauf zu achten, alle Arbeiten mit Animpf- oder experimentellen Kulturen unter einer Sterilwerkbank durchzuführen. Die Größe der Kulturflaschen beeinflusst das Wachstum und die Zellzahl/ml nicht. Allerdings ist das zur Verfügung stehende Volumen einer Kultur ausschlaggebend für die Erstellung von weiteren Experimenten. Sollen zusätzliche Versuche mit den gleichen Kulturen generiert werden, bietet sich die Zellkultivierung in 200 ml Kulturflaschen (größte Kulturflasche, die sich noch mit der Imaging-PAM messen lässt) an.

Das Erstellen von ähnlichen Anfangszellzahlen/ml für jeden Stamm ist nur bedingt möglich. Die Kettenlängen, Zellgrößen und die unterschiedlichen Animpfkulturen nehmen einen großen Einfluss darauf. Daher ist es wichtig, zunächst die Zellzahlen/ml für jede Animpfkultur zu bestimmen. Daraus resultierend lässt sich das benötigte Inokulationsvolumen für die Erstellung von experimentellen Ansätzen berechnen. Eine optimale Anfangszellzahl/ml in den experimentellen Kulturen 1 und 2 hätte bei etwa 500 bis 1000 Zellen/ml gelegen (Trimborn, 2018). Ausgehend von den (für das Exp.1) vorgesehenen Animpfkulturen wurden die Verdünnungen für alle Stämme zu hoch gewählt. Das Aufkonzentrieren von Animpfkulturen macht nur dann Sinn, wenn sich die Zellen in einem guten physiologischen Zustand befinden und eine ausreichende Dichte (schätzungsweise eine mittlere Dichte) aufweisen. In Exp.2 liegen die

Werte der Anfangszellzahlen/ml in einem deutlich höheren Bereich. Die Animpfkulturen für das Exp.2 waren in einem besseren Zustand und wiesen höhere Kulturdichten auf. Der Stamm 1-07 hat auch bei Anfangszellzahlen von 37 bis 168 Zellen/ml ein gutes Wachstum gezeigt. Die Zellgröße und -physiologie der Animpfkulturen waren in einem sehr guten Zustand. Trotz der höheren Anfangszellzahlen/ml der Stämme 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 gegenüber dem Stamm 1-07 wurden niedrigere Wachstumskurven erzielt. Dadurch lässt sich erahnen, was für einen bedeutenden Einfluss der Zustand einer Animpfkultur auf das Wachstum in daraus generierten Kulturen nimmt. Die Animpfkulturen der Stämme 2-22 und 2-44 waren zwar ohne Bakterienbewuchs und enthielten eine mittlere Zelldichte, allerdings waren die Zellgrößen sehr niedrig (2-22 noch kleiner als 2-44). Die experimentellen Kulturen der südlichen Stämme haben im Exp.1 (trotz Aufkonzentrieren der Animpfkultur) mit 2 bis 3 Zellen/ml keine erwähnenswerte Dichte erreicht. Obwohl die Anfangszellzahlen/ml in Exp.2 über denen von Stamm 1-07 lagen, wurden auch hier keine guten Messungen erzielt. Die Zellen in den Animpfkulturen waren nicht nur sehr klein, sondern auch in einem schlechten physiologischen Zustand.

F. kerguelensis Populationen wachsen in ihrer natürlichen Umgebung bei Temperaturen, die je nach Jahreszeit und geographischer Lokalität zwischen -1°C und 8°C variieren (Esper, et al., 2010). Außerdem erreicht die natürliche Lichteinstrahlung der Sonne durch die Wasseroberfläche im Dezember (südlicher Sommer) Höchstwerte von $60 \text{ mol Quanten/m}^2\cdot\text{d} = 694,44 \text{ }\mu\text{mol Quanten/m}^2\cdot\text{s}$ und im Juni (südlicher Winter) $5 \text{ mol Quanten/m}^2\cdot\text{d} = 57,87 \text{ }\mu\text{mol Quanten/m}^2\cdot\text{s}$ (55°S und 130°W) (Mitchell, et al., 1991). Durch die Bewegung der *F. kerguelensis* Zellen in der Wassersäule sind sie nicht durchgängig einer gleichbleibenden Lichtintensität ausgesetzt. Diese Bedingungen wurden in den Kultivierungsräumen mit 0°C und 4°C und verdunkelten Lampen imitiert. Der Einfluss von unterschiedlichen Lichtintensitäten während der Zellkultivierung wurde innerhalb dieser Arbeit nicht ermittelt, da die einstrahlende Lichtintensität auf alle Kulturen im gleichen Bereich bei 45 bis $55 \text{ }\mu\text{mol Quanten/m}^2\cdot\text{s}$ lag (entspricht der natürlichen Sonneneinstrahlung im Juni in der Antarktis). Allerdings kann auch dieser Parameter das Wachstum der Kulturen beeinträchtigen oder fördern. Einen Einblick über die Auswirkung von unterschiedlichen Lichtverhältnissen erhält man unter anderem auch durch die Aufnahme von Lichtkurven. Diese werden in Punkt 5.3.4 „Lichtkurven“ diskutiert.

5.2.2 Vergleich der Zählmethoden 1 und 2

Die Utermöhl-Methode ist in der Forschung und für die Analyse von Gewässern weit verbreitet. Mittels der Auszählung von Mikroorganismen (wie Phytoplankton) werden unter anderem der Zustand und die Qualität von Gewässern (zum Beispiel Seen und Flüsse) bewertet. Die Methoden zur Zellzählung weichen je nach Organismus, Experiment und Equipment voneinander ab. Beim Utermöhl-Verfahren wird vermehrt die Streifenzählung bevorzugt. Dabei wird häufig auf zusätzliche Sedimentationskammern zurückgegriffen (Plambeck, et al., 2015, S. 10).

Der Zeitaufwand der Exp.1 und 2 richtete sich unter anderem nach der verwendeten Zählmethode. Das Auszählen einer ganzen Utermöhl-Kammer nimmt deutlich mehr Zeit in

Anspruch, als das Auszählen von einzelnen Streifen. Ein Streifen lässt sich je nach Kulturdichte und gewählte Verdünnung innerhalb von 10 bis 15 Minuten auszählen. Das Auszählen einer ganzen Kammer kann den doppelten bis dreifachen (etwa 30 bis 45 Minuten) Zeitaufwand bedeuten. Der Zeitfaktor spielt hier also mit steigender Kultur- und Probenahmezahl eine bedeutende Rolle. Auch in der Literatur wird die Zeit als wichtiger Faktor dargestellt. Es wird beschrieben, dass er nicht nur von der Art der Zählmethode, sondern auch von der Probenkonservierung, sowie von der Qualifikation und Erfahrung des Auszählenden anhängig ist (Plambeck, et al., 2015, S. 12).

Wie bei der Zellkultivierung und der Temperaturwahl ist auch hier darauf zu achten, welches Ziel mit dem Experiment verfolgt werden soll. Durch den Variabilitätstest konnte verdeutlicht werden, dass das Auszählen von einzelnen Streifen zu ungenauen und zu hohen Zellzahlen/ml führt. Alle Zellzahlen/ml in Exp.1 sind deutlich erhöht und durch die Zählmethode 1 (Auszählen von zwei Streifen) verfälscht. Diese ungenauen Werte können bereits durch das Einfüllen einer Zählprobe in eine Utermöhl-Kammer entstanden sein. Beim Betrachten der Kammern unter dem inversen Lichtmikroskop fiel mehrfach die Ansammlung von Zellen am Rand der Kammern auf. Durch das Pipettieren der Proben in die Kammern könnte ein Strom nach außen entstanden sein, der die Zellen an den Rand spülte. Daher ist ein langsames und gleichmäßiges Überführen der Zählproben in die Utermöhl-Kammern notwendig. Außerdem nehmen auch die unterschiedlichen Kettenlängen einen Einfluss auf die endgültige Zellzahl/ml. Durch eine ungleichmäßige Verteilung in den Utermöhl-Kammern werden die Zellzahlen/ml bei der Auszählung eines Streifens verfälscht. Des Weiteren ist die Wahl der Verdünnungen bei der Zählprobenahme ein wichtiger Faktor für die Genauigkeit der Zellzahlen/ml. Muss die Verdünnung innerhalb eines Experimentes erhöht werden, dann ist darauf zu achten, dass die Verdünnungen nicht zu stark voneinander abweichen. Dadurch können Fehler vermieden werden. Soll durch das Zählen der Zellen von einzelnen Streifen nur der Verlauf von Wachstumskurven (und der Zeitpunkt des Erreichens von einzelnen Wachstumsphasen) verfolgt werden, dann ist diese Zählmethode ausreichend genau. Wenn man sich für das Auszählen von einzelnen Streifen entschieden hat, dann ist darauf zu achten, ausschließlich mit dieser Methode zu arbeiten, da sonst große Differenzen in den Zellzahlen entstehen können.

Sind die Wachstumskurven für weitere Auswertungen notwendig (zum Beispiel die Bestimmung von spezifischen Wachstumsraten oder der Vergleich von Zellzahlen/ml), dann sollten ganze Utermöhl-Kammern ausgezählt werden. Diese Zählmethode nimmt zwar mehr Zeit in Anspruch, dafür erhält man genauere Zellzahlen und somit auch exaktere Ergebnisse. Bei dieser Methode nehmen die vermehrten Ansammlungen der Zellen am Utermöhl-Rand keinen Einfluss auf das Endergebnis. Ebenso führen die unterschiedlichen Kettenlängen nur zu geringen Abweichungen in den Zellzahlen/ml. Auch bei der Wahl dieser Zählmethode ist auf eine gleichbleibende Durchführung innerhalb des gleichen Experimentes zu achten.

Um variierende Zählungen während eines Experimentes grundsätzlich zu vermeiden, sollte das Zählen nur von einer Person durchgeführt werden. Auch das Einfüllen der Zählprobe in eine Utermöhl-Kammer und die Art der Zählmethode muss gleichbleibend ausgeführt werden. Für die in dieser wissenschaftlichen Arbeit angewandten Zählmethoden mit der Spezies *F. kerguelensis*

sind in der Literatur keine Quellen auszumachen. Auch die starke Variabilität der Zählmethoden wird in anderen Zählexperimenten nicht diskutiert.

Bei den Zählprobenahmen von einem Milliliter aus den 40 ml und 200 ml Kulturflaschen wurden ebenfalls unterschiedliche Methoden angewendet. Hierbei war darauf zu achten, wie viel Kulturvolumen für ein Experiment zur Verfügung stand. Um den Verlust von zu viel Kulturvolumen zu vermeiden, wurde nach der Probenahme aus den 40 ml Kulturen der fehlende Milliliter Kultur durch F/2+Si-Medium ersetzt. Bei den 200 ml Kulturen konnte durch das erhöhte Volumen auf die Zugabe des fehlenden Milliliters verzichtet werden. Ob die unterschiedlichen Zählprobenahme-Methoden einen Einfluss auf die Wachstumskurven genommen haben lässt sich aufgrund der verfälschten Zellzahlen/ml aus dem Exp.1 nicht ermitteln.

5.2.3 Biovolumina

Da das gesamte Biovolumen aus den ermittelten Zellzahlen/ml resultiert und diese Werte in Exp.1 verfälscht sind, liegen die Biovolumenwerte vermutlich doppelt bis dreifach so hoch, als sie ursprünglich in den Kulturen vorlagen. Durch die erhöhten Zellzahlen/ml in Exp.1 ist also klar, dass auch die Biovolumina ($\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ und $\mu\text{m}^3/\text{ml}$) in Exp.1 höhere Werte erreicht haben. Auch der Anstieg der Biovolumina ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) mit steigender Anzahl der Kultivierungstage war anzunehmen. Je mehr Zellen sich in einer Kultur befinden, desto mehr Biovolumen erhält man. Als die Kulturen die Absterbephase erreicht haben, nahmen auch die Biovolumina ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$) wieder ab. Der große Unterschied von Stamm 1-07 zu den anderen Stämmen in den durchschnittlichen $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ -Werten war bereits beim Betrachten unter dem Lichtmikroskop anzunehmen. Bei der visuellen Betrachtung erschienen die Zellen sowohl in ihren Längen, als auch in ihren Tiefen fast doppelt so groß.

Das Biovolumen berechnet sich je nach Form von einem Organismus. In dem Artikel „Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae“ werden unterschiedliche Formeln zur Berechnung von Biovolumen angegeben (Hillebrand, et al., 2002). Für das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Berechnung von Biovolumen konnten keine entsprechenden Quellen gefunden werden.

5.2.4 Vergleich der Aufnahmemethoden für Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven ist für viele Experimente mit lebenden Zellkulturen von großer Bedeutung. Das Zellwachstum kann durch die Generierung von Wachstumsexperimenten anhand ihrer Wachstumsphasen verfolgt werden. Dabei ist die exponentielle Phase ausschlaggebend für die Berechnung von spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten. In der Forschung und Produktion von Biomasse können unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Wachstumskurven angewendet werden. Eine häufig angewandte Methode ist das Messen der optischen Dichte. Überdies können „packed cell volume“ (PCV)-Zellmessröhrchen oder die „oxygen uptake rates“ (OUR) für die Aufnahme verwendet werden (Schoenherr, et al., 2000). Auch über die Wachstumskurvenaufnahme mittels Chlorophyllfluoreszenz sind Quellen in der

Literatur vorhanden (Gustavs, et al., 2009). Für die in dieser Arbeit angewandten Methoden (gleiche Parameter, gleiche Spezies) zur Bestimmung von Wachstumskurven ist keine Literatur zu finden.

Die während den in Exp.1 und 2 angewandten Methoden zur Aufnahme von Wachstumskurven sind nur zwei von vielen möglichen Verfahren. Die Erstellung von Wachstumskurven mit Hilfe von den in dieser Arbeit angewandten Zählmethoden ist eine der zeitaufwendigsten und arbeitsintensivsten Bestimmungsmethoden. Allerdings bekommt man durch die regelmäßigen lichtmikroskopischen Ansichten einen sehr guten Eindruck über den Zustand der verwendeten Kulturen. Erstellt man einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Stämmen einer Spezies, erhält man dadurch einen ersten visuellen Eindruck über das Aussehen der Zellen. Bereits zu Beginn von Exp.1 konnten so die unterschiedlichen Zellgrößen der nördlichen und südlichen Stämme erkannt werden. Somit wurde auch schnell deutlich, weshalb die Messungen der südlichen Stämme mit der Imaging-PAM keine Werte erzielt haben. Außerdem fiel der große Zellgrößenunterschied zwischen dem Stamm 1-07 und den anderen Stämmen direkt auf. Die Aufnahme von Wachstumskurven über die Zellzahlen/ml ist sehr variabel in ihrer Methodik. Je nach Bedarf und angestrebtem Ziel kann eine Zählmethode ausgewählt werden.

Die Aufnahme von Wachstumskurven durch die Messung von Chlorophyllfluoreszenz mit Hilfe der Imaging-PAM ist eine schnelle Methode ohne Kulturverlust. Durch die Möglichkeit, die Fluoreszenz direkt in den Kulturflaschen ohne Probenahme zu messen, ist ein Verlust von Kulturvolumen vermeidbar. Dadurch können experimentelle Ansätze in kleineren 40 ml Kulturflaschen angesetzt werden. Das wiederum hat den Vorteil, dass sich drei 40 ml Kulturflaschen gleichzeitig mit der Imaging-PAM messen lassen (Zeitaufwand auf ein Drittel reduziert). Sollte dennoch zusätzliches Volumen für weitere Experimente benötigt werden, ist auch eine Messung von 200 ml Kulturflaschen möglich. Nachteil dieser Messmethode ist, dass man keinen direkten Eindruck von dem Aussehen und der Zahl der Zellen bekommt. Voraussetzung für die Aufnahme von Wachstumskurven mit der Imaging-PAM ist eine mittlere bis hohe Kulturdichte (Schätzung erforderlich). Für phototrophe Organismen, die nachweislich nur dünne Kulturdichten erreichen, ist die Kurvenaufnahme durch Messung der Grundfluoreszenz mit dem Imaging-PAM-Gerät nicht geeignet. Fehler bei der Wachstumskurvenaufnahme können durch gleichbleibende Dunkeladaptionszeiten, gleichmäßiges Homogenisieren der Kulturen und der Vermeidung von Kondenswasser gemieden werden.

Durch die Korrelation der beiden Bestimmungsverfahren (Abb. 27) erkennt man, dass sich beide Methoden gut zur Aufnahme von Wachstumskurven eignen. Hier hängt die Wahl der Methode besonders von der Kulturdichte ab. Eine wenig dichte Kultur kann nicht mit der Imaging-PAM gemessen werden. Aber auch das Ziel des Experimentes spielt eine Rolle. Soll das Kulturvolumen konstant bleiben und der Zeitaufwand verringert werden, dann sind bei ausreichender Kulturdichte Messungen mit der Imaging-PAM zu empfehlen.

Vor allem für die Bestimmung von spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten ist das Erreichen von eindeutigen exponentiellen Wachstumsphasen erforderlich. Wachstumsraten können auch aus den Wachstumskurven, ermittelt durch die optische Dichte oder PCV, berechnet werden (Schoenherr, et al., 2000). Für die Experimente 1 und 2 konnten nur Ergebnisse für die Stämme 1-07 und 2-44 (2-22 Exp.1 und 2 bei 4°C Inkubation) erzielt werden. Die Ergebnisse der Auswertung lagen in einem ähnlichen Wertebereich. Ob diese Aussage sich pauschal für alle Stämme treffen lässt kann durch die fehlenden Werte der Stämme 2-22, 14-18, 14-19 und 14-27 nicht bestätigt werden.

5.2.5 Temperatureinfluss von 0°C und 4°C

Da *F. kerguelensis* Populationen in ihrer natürlichen Umgebung Temperaturen von -1°C bis 8°C (Esper, et al., 2010) ausgesetzt sind, wurden für die Experimente 1 und 2 Inkubationstemperaturen innerhalb von diesem Temperaturbereich ausgewählt. Es wurde jeweils ein Replikat eines Stammes einer Temperatur von 0°C ausgesetzt. Das andere Replikat wurde in einem 4°C Kulturraum inkubiert. Die in dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendeten *F. kerguelensis* Stämme haben ein besseres Wachstum bei der Inkubationstemperatur von 4°C gezeigt.

Durch die verfälschten Zellzahlen/ml in Exp.1 kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen einen Einfluss auf die Kulturen hatten. Trotzdem ist eine deutliche Neigung der Stämme bei den maximalen Zellzahlen/ml zu erkennen (Abb. 18). Alle Stämme aus beiden Experimenten (Ausnahme 14-27 Exp.2 4°C) haben bei der Inkubation von 4°C höhere Werte erreicht. Außerdem haben die Wachstumskurven sowohl durch das Zählen als auch durch die Aufnahme der Grundfluoreszenz einen höheren Verlauf genommen. Die Ausnahme ist der Stamm 1-07. Er hat in den Exp.1 und 2 bei einer Inkubation von 0°C deutlich höhere Werte als bei 4°C erreicht. Disqualifiziert man die Ergebnisse von Exp.1, dann ist das Wachstum von 50 % der Probenkulturen bei 4°C und 50 % bei 0°C besser. In dem Fall lässt sich anhand der Grundfluoreszenz keine konkrete Aussage über eine bessere oder schlechtere Inkubationstemperatur machen. Der Beginn der exponentiellen Phasen ist bei 0°C Inkubation tendenziell um etwa 5 Tage nach hinten verschoben. Weil die Empfindlichkeitsgrenze der Imaging-PAM sehr hoch ist kann der Anfang der exponentiellen Phasen erst verspätet detektiert worden sein. Demnach kann auch dieses Ergebnis durch die geringe Sensibilität der Imaging-PAM verfälscht sein.

Die stationären Phasen sind langgestreckt und fallen nach dem Erreichen des Maximums nicht direkt in die Absterbephase ab (Abb. 22 A und C, Abb. 24 A), wie es bei einer Inkubation bei 4°C der Fall ist (Abb. 22 B und D, Abb. 24 B und D). Bei der Wahl der Temperatur ist also darauf zu achten, welches Ziel man mit einem Experiment verfolgt. Möchte man eine schnelle exponentielle Phase erreichen und mit weniger Zeitaufwand Wachstumsphasen ermitteln, dann ist eine Inkubation bei 4°C erforderlich. Für langgestreckte stationäre Phasen, aus denen eventuell benötigte Daten gezogen werden sollen, ist eine Inkubationstemperatur von 0°C angemessen. Die

Wahl der Temperatur ist ebenfalls abhängig von der bevorzugten Aufnahmemethode durch ein Fluorometer. Die Unterscheidung der Wachstumsphasen bei 0°C mit Hilfe der Imaging-PAM konnte lediglich für den Stamm 1-07 erfolgen. Um Kulturen bei 0°C Inkubationstemperatur mit einem Imaging-PAM-Gerät zu messen sind mittlere bis hohe Kulturdichten erforderlich (Schätzung erforderlich). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *F. kerguelensis* Kulturen bei einer Inkubationstemperatur von 0°C ein verzögertes und verlängertes Wachstum aufweisen. Bei einer Inkubation in einem 4°C Kulturraum erreichen die Kulturen schnell die exponentielle Phase, haben eine verkürzte stationäre Phase und fallen schnell in die Absterbephase ab.

In der Forschung wurden bereits Experimente mit *F. kerguelensis* bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt (Fuchs, et al., 2013, S. 411-426). Allerdings ist keine Quelle zu finden in der ein Vergleich des Wachstums von *F. kerguelensis* bei unterschiedlichen Temperaturen generiert wurde. Demnach kann auf kein literarisches Werk zur Untermauerung der Vermutung von einem besseren Wachstum bei 4°C zurückgegriffen werden.

5.3 Imaging-PAM versus FRRF

5.3.1 Eignung der Imaging-PAM und des FRRF zur Aufnahme von Lichtkurven

Grundsätzlich sollten sich die beiden Fluorometer, Imaging-PAM und FRRF, zur Aufnahme von Lichtkurven eignen. Während der Exp.1 und 2 stellte sich aber heraus, dass die Messungen mit der Imaging-PAM keine typischen Lichtkurven ergaben. Alle Lichtkurven fielen unmittelbar nach dem Erreichen von einem PAR von etwa 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ auf ein Minimum von $\text{ETR}=0$ ab. Für die südlichen Stämme und den Stamm 2-22 konnten keine Lichtkurven generiert werden. Zu erwarten war, dass mindestens die Imaging-PAM-Messung von Stamm 1-07 eine Lichtkurve ergibt. Das weist darauf hin, dass auch für die Aufnahme von Lichtkurven eine Mindestdichte vorhanden sein muss. Außerdem spielt die Lichtintensität während der Inkubation in den Kühlräumen eine bedeutende Rolle (siehe 5.3.4 „Lichtkurven“).

Vorteil der Imaging-PAM ist wiederum die kurze Messzeit von etwa 12 Minuten (reine Messzeit ohne Dunkeladaptation), die sowohl das Messen von F_0F_m und die Aufnahme von Induktions- und Lichtkurve beinhaltet. Mit Hilfe des FRRF-Gerätes ließen sich wiedererwartend für alle Stämme Lichtkurven aufnehmen (Auch für die südlichen Stämme). Demnach ist das FRRF für die Messung von Lichtkurven für die in diesen Experimenten verwendeten *F. kerguelensis* Stämme besser geeignet. Nachteil des FRRF ist die besonders hohe Messzeit von 1,33 Stunden pro Probe (Messzeit gilt für die Einstellungen der Settings siehe Tabelle 8; reine Messzeit ohne Dunkeladaptation). Die Messungen an sich sind mit beiden Fluorometern einfach durchzuführen. In Tabelle 16 sind die Vor- und Nachteile von der Bedienung und Messung der Imaging-PAM und des FRRF noch einmal zusammenfassend gegenübergestellt.

Tabelle 16: Vor- und Nachteile in der Anwendung und Messung der beiden Fluorometer Imaging-PAM und FRRF bei der Aufnahme von Fluoreszenzwerten, insbesondere von Lichtkurven

	Imaging-PAM	FRRF
Vorteile	Schnelle Messungen innerhalb von wenigen Sekunden bis höchstens 12 Minuten	Es lassen sich auch dünn bewachsene Kulturen messen (erhöhte Sensibilität)
	Keine Probenahme erforderlich	Schnelle Messungen innerhalb von wenigen Mikrosekunden (Ausnahme Lichtkurven)
	Mehrere Proben gleichzeitig messbar	Keine Vorbereitung von AOI's oder Blanks notwendig
	Kein Aufbau des Gerätes notwendig (kann am Messort stehen bleiben)	Einfache Bedienung
	Einfache Bedienung	
Nachteile	Es lassen sich nur mittlere bis hohe Kulturdichten messen (geringe Sensibilität)	Lange Messzeiten von etwa 1,33 Stunden pro Probe (für Lichtkurven)
	Vorbereitung von AOI's und Blanks notwendig	Eine sterile Probenahme von etwa 3 ml ist notwendig
		Vor jeder Messung muss das Gerät neu aufgestellt und temperiert werden

Die Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile zeigt, dass mehr Punkte für die Messung mit der Imaging-PAM sprechen. Allerdings kann die Imaging-PAM den wichtigsten Punkt, das Messen von Lichtkurven dünnbewachsener *F. kerguelensis* Kulturen, nicht erfüllen. Für das Messen von Lichtkurven empfiehlt sich demnach der Gebrauch des FRRF. Alle weiteren Fluoreszenz-Messgrößen lassen sich bei gegebener Kulturdichte schneller und effektiver mit der Imaging-PAM bestimmen.

5.3.2 F_v/F_m vor und nach Lichtstress

Mittels der Messung von F_v/F_m vor und nach der Messung von einwirkendem Lichtstress auf das Photosystem lässt sich der Zustand von diesem ermitteln. Je höher die MQ-Werte, desto besser konnte das Photosystem von den *F. kerguelensis* Stämmen auf die Lichteinwirkungen reagieren. Durch die besonders hohe Zellgröße von Stamm 1-07 und die dadurch vermehrte Ansammlung von Chl-Molekülen bestand der Verdacht, dass dieser Stamm besonders hohe MQ-Werte erreichen wird. Sowohl beim Messen mit der Imaging-PAM, als auch mit dem FRRF konnten sehr gute MQ-Werte erzielt werden. Bei der Inkubation im 4°C Kulturraum konnte der Stamm 1-07 durch das Messen mit der Imaging-PAM MQ-Werte von 99 % (Exp.1) und 90 % (Exp.2) erreichen.

Diese hohen Werte geben an, dass sich das Photosystem von Stamm 1-07 innerhalb von 15 Minuten Dunkeladaption vollständig regeneriert hat. Auch bei der Inkubationstemperatur von 0°C hat sich das Photosystem mit 79 % und 76 % gut erholt. Beim Messen von Stamm 2-44 wurden teilweise MQ-Werte von über 100 % erzielt. Durch andere Lichtexperimente mit *F. kerguelensis* ist bekannt, dass diese Spezies besonders viel Chl-a und eine sehr hohe Konzentration an funktionalen Photosystemen II besitzt. Somit kann durch die Masse der Pigmente eine hohe Lichtintensität gut „abgepuffert“ werden (Trimborn, et al., 2016).

5.3.3 Induktionskurven

Bei der Erstellung von Induktionskurven lässt sich der Kautsky-Effekt beobachten.

Wird eine dunkeladaptierte Kultur schnell über einen kurzen Zeitraum dem Licht ausgesetzt, dann steigt der Fluoreszenzwert von F_0 auf einen hohen F_m -Wert an. Dieser Wert nimmt allerdings über die gesamte Zeitspanne der Messung ab, bis er ein gleichbleibendes und niedriges Niveau erreicht hat. Der Fluoreszenzabfall ist ein Maß für das Fluoreszenzquenching. Dieser Effekt entsteht, weil das PS II erst nach einer gewissen Zeit aktiv wird (Schopfer, et al., 2010 S. 210).

Durch die Auswertung der gemessenen Induktionskurven wurden keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt. Die ETR der erstellten Kurven weisen starke Schwankungen auf. Dadurch kann das Phänomen des Kautsky-Effektes in den Diagrammen der Induktionskurven (Abb. 29) nicht beobachtet werden. Es werden keine besonders hohen ETR gemessen und ein Abfall der Werte auf ein gleichbleibendes Niveau ist ebenfalls nicht zu erkennen. In dem Artikel „The fast and slow kinetics of chlorophyll-a-fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint“ wurden Induktionskurven von der Alge „*Chlorella pyrenoidosa*“ ermittelt. Diese zeigen den typischen Verlauf vom Kautsky-Effekt (Papageorgiou, et al., 2007).

Um besser definieren zu können, wie die ungleichmäßigen Induktionskurven der Exp.1 und 2 entstanden sind, wurden in Abb. 32 zusätzlich die Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' (für den Stamm 1-07 aus Exp.1 bei 0°C und 4°C Inkubation) dargestellt. Durch die geringe Sensibilität der Imaging-PAM ist das Verhältnis zwischen F_q' und F_m' sehr klein. Die niedrigen Fluoreszenzwerte können durch die Imaging-PAM nicht ausreichend detektiert werden. Das führt zu ungenauen Werten und dadurch zu nicht reproduzierbaren Induktionskurven.

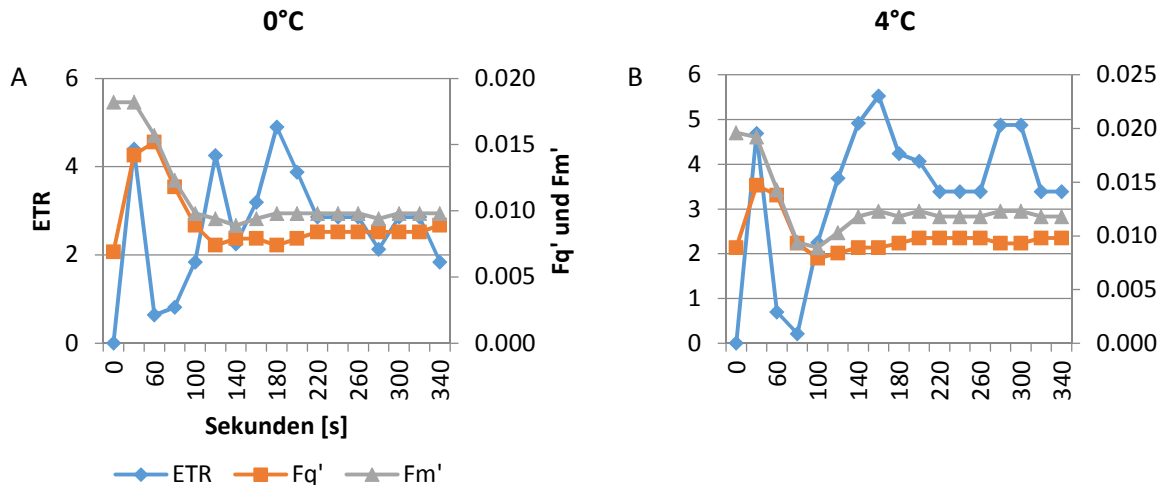


Abbildung 32: Induktionskurven von Stamm 1-07 aus Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C und 4°C. Zusätzlich werden die beiden Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' dargestellt.

5.3.4 Lichtkurven

Die Aufnahme von Lichtkurven der verwendeten *F. kerguelensis* Stämme mit der Imaging-PAM haben keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt. Das heißt, dass keine Lichtkurven detektiert werden konnten. Die Messung einer beginnenden Kurve war nur bei den am dichtesten bewachsenen Stämmen 1-07 (0°C und 4°C) und 2-44 (4°C) möglich. Der Kurvenabfall auf eine minimale ETR von 0 liegt bei allen Stämmen nach dem Erreichen eines PAR's von etwa 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Dadurch, dass die Lichtintensität während der Inkubation in den Kühlräumen einen PAR von 45 bis 55 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ besaß, bestand zunächst die Annahme, dass sich die Kulturen an diese Lichtintensität „gewöhnt“ haben. Durch die schnelle Erhöhung der PAR-Werte während der Aufnahme einer Lichtkurve können die Photosysteme der *F. kerguelensis* Kulturen den vermehrten Lichtstress nicht bewältigen. Demnach reagiert das PS II auf den Lichtstress mit Photoinhibition. Durch die Energieübersättigung des Lichtsammelkomplexes wird der Lichtsättigungspunkt erreicht und das PS II kann keine weiteren Elektronen über die Elektronentransportkette weiterleiten. Das Reaktionszentrum P680 befindet sich dadurch in einem reduzierten (geschlossenen) Zustand und es wird vermehrt Wärme produziert. Allerdings haben die Kurvenmaxima nicht einmal den PAR von 45 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (Lichteinstrahlung während der Inkubation) erreicht. Daher kann die Annahme nicht bestätigt werden. Für die schlechten Lichtkurven kann vielmehr die geringe Sensibilität der Imaging-PAM verantwortlich gemacht werden. In Abb. 33 sind zusätzlich zur Lichtkurve von Stamm 1-07 aus Exp.2 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C die Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' dargestellt. Durch die geringe Empfindlichkeit der Imaging-PAM sind die F_q' und F_m' -Werte kaum unterscheidbar und erreichen dadurch zu niedrige Werte für die Messung von Lichtkurven. Bei einem PAR-Wert von etwa 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ fallen die Werte von F_m' unter denen von F_q' . Dadurch erhält man für F_q'/F_m' negative Werte, die für die Berechnung der ETR nicht geeignet sind (F_q'/F_m' kann nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen). Der Absturz der Lichtkurve ist demnach auf die geringe Sensibilität der Imaging-PAM zurückzuführen. Aber auch die Kulturdichten können einen Einfluss auf die Fluoreszenzmessungen mit der Imaging-PAM genommen haben. Um das zu untersuchen

müssten in einem Folgeexperiment Kulturen mit einer höheren Dichte angesetzt und gemessen werden. Auch die Erhöhung der PAR-Werte sollte in kleineren Schritten und höheren Zeitintervallen stattfinden. Hat das PS II mehrere Minuten Zeit, sich an die gegebene Lichtintensität zu „gewöhnen“, wird die Chance wahrscheinlich erhöht, dass das Reaktionszentrum P680 nicht direkt den Lichtsättigungspunkt und einen reduzierten Zustand erlangt.

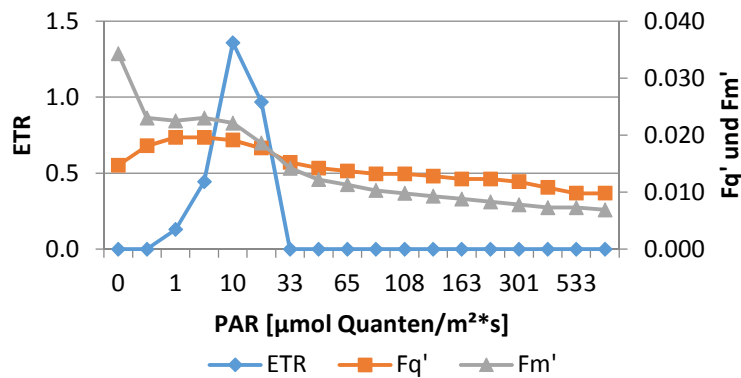


Abbildung 33: Lichtkurve von Stamm 1-07 aus Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C. Zusätzlich sind die beiden Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' dargestellt.

Um mit dem FRRF reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, sollten die Kulturen ebenfalls eine mittlere bis hohe Dichte aufweisen. Durch die erhöhte Sensibilität und die niedrige Empfindlichkeitsgrenze des FRRF war zwar eine Messung der dünn bewachsenen südlichen Kulturen möglich, allerdings stellen die Lichtkurven keine ausschlaggebenden Ergebnisse dar. Außerdem weisen die Kurven vermehrt vorübergehende Absenkungen auf. Das könnte einen kurzen Einbruch in der Übertragung von Elektronen mittels der Elektronentransportkette bedeuten.

Bei den Messungen mit dem FRRF liegt die Gewöhnungsphase an die Erhöhungen der Lichtintensitäten in Form von 6 Wiederholungen pro PAR-Wert vor. Da mit dem FRRF Kurven ermittelt werden konnten liegt die Vermutung nahe, dass sich das PS II schrittweise an die Erhöhung der PAR-Werte gewöhnen muss. Demnach kann das wiederholte Messen bei dem gleichen PAR-Wert (zusätzlich zur Hochsensibilität des FRRF) zur Registrierung von Lichtkurven beigetragen haben. Im Gegensatz zur Messung mit der Imaging-PAM wird der Lichtsättigungspunkt nicht direkt erreicht. Der Elektronentransport kann weitergeführt werden. Der „typische“ Verlauf einer Lichtkurve wurde nur mit dem Stamm 1-07 bei der Inkubationstemperatur von 0°C erreicht. Der Anstieg der Kurve erfolgt linear bis auf ein ETR-Maximum von etwa 90. Danach fällt die Kurve wieder ab. Es wurden keine Schwankungen im Verlauf der Kurve detektiert. Eine vergleichbare Lichtkurve die unter den gleichen Umgebungsbedingungen aufgenommen wurde ist in der Literatur nicht auszumachen. Allerdings wurde in einem Experiment von Prof. Dr. Scarlett Trimborn (et al.) ein ähnlicher Lichtkurvenverlauf ermittelt. Die Lichtintensität lag während der Inkubation bei etwa 242 ± 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ und erfolgte in einem 4°C Kulturraum. Die PAR-Werte der Experimente sind vergleichbar. Auch die Kurve steigt linear an und erreicht ein ETR-Maximum von etwa 80.

Allerdings bleibt der Verlauf auch nach dem Erreichen von einem PAR-Wert von etwa 1000 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ stationär (Trimborn, et al., 2016).

5.4 Fazit

Abschließend wird ermittelt, ob durch die Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse alle Forschungsfragen beantwortet werden können.

1. Eignen sich sowohl die Bestimmung von Zellzahlen, als auch das Messen von Fluoreszenzwerten mit der Imaging-PAM für die Ermittlung von Wachstumskurven?

Eine konkrete Aussage lässt sich nicht treffen. Grundsätzlich eignen sich beide Methoden für die Aufnahme von Wachstumskurven. Allerdings ist dabei für die in dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendeten Stämme der Spezies *F. kerguelensis* eine wichtige Voraussetzung zu erfüllen. Für die Aufnahme von Wachstumskurven ist sowohl für das Auszählen von Zählproben, als auch für die Messung der Grundfluoreszenz eine Mindestdichte der experimentellen Kulturen erforderlich (Schätzung erforderlich). Ist diese Dichte nicht gegeben, dann können keine Wachstumskurven ermittelt werden. Erreichen die Kulturen eine gewisse Dichte, dann eignen sich beide Methoden sehr gut für die Aufnahme von Wachstumskurven.

2. Haben die unterschiedlichen Flaschengrößen von 40 ml und 200 ml einen Einfluss auf das Zellwachstum?

Nein! Die unterschiedlichen Flaschengrößen haben keinen Einfluss auf das Wachstum der experimentellen *F. kerguelensis* Kulturen genommen. Die Zellkultivierung hat sowohl in 40 ml, als auch in 200 ml Kulturflaschen sehr gut funktioniert.

3. Führen unterschiedliche Zählmethoden zu unterschiedlichen Zellzahlen?

Ja! Durch den Variabilitätstest konnte bestätigt werden, dass die Zählmethode einen großen Einfluss auf die Zellzahlen/ml hat. Zählmethode 1 (Auszählen von zwei Streifen) ist weniger zeitintensiv, dafür aber ungenau in ihren Ergebnissen. Genauere Zellzahlen erhält man mit Zählmethode 2 (Auszählen einer gesamten Utermöhl-Kammer), welche allerdings das doppelte bis Dreifache an Zeit benötigt. Entscheidet man sich für eine Zählmethode (Zählmethode 1 oder 2), dann muss diese gleichbleibend durchgeführt werden.

4. Unterscheidet sich das Zellwachstum bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen?

Ja! Die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen nehmen einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum. Bei der Inkubation im 0°C Kulturraum wurde das Zellwachstum verlangsamt. Tendenziell haben die bei 4°C inkubierten Kulturen höhere Zellzahlen/ml und Fluoreszenzwerte erreicht. Außerdem wurde das Wachstum bei einer Inkubationstemperatur von 4°C beschleunigt

5. Nehmen Lichtkurven vergleichbare Werte beim Messen mit den unterschiedlichen Fluorometern, Imaging-PAM und FRRF, an?

Nein! Die Lichtkurven, aufgenommen mit der Imaging-PAM und dem FRRF, sind nicht annähernd vergleichbar. Durch die erhöhte Sensibilität vom FRRF wurden auswertbare Lichtkurven für alle *F. kerguelensis* Stämme und Kulturen von Exp.2 ermittelt. Die Kurvenaufnahme mit der Imaging-PAM war nicht möglich. Es konnten ausschließlich Werte für die Stämme 1-07 und 2-44 detektiert werden. Die daraus generierten Kurven sind beim Erreichen von 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ auf einen ETR=0 abgestürzt. Die Imaging-PAM ist für die Lichtkurvenaufnahme der verwendeten *F. kerguelensis* Stämme durch ihre geringe Sensibilität nicht geeignet.

6. Haben die unterschiedlichen Kulturbedingungen eine Auswirkung auf die in dieser Arbeit ermittelten physiologischen Zellparameter?

Durch die niedrige Anzahl der erfolgreichen Experimente kann keine genaue Aussage über die Auswirkungen der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die physiologischen Zellparameter getroffen werden. Die Kulturbedingungen haben auf die spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten, ermittelt aus den Zellzahlen/ml, nur einen geringen Einfluss genommen. Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C wurden tendenziell bessere Werte erzielt. Die Werte, ermittelt aus der Grundfluoreszenz, haben keine ausgeprägten Unterschiede gezeigt. Auch die Biovolumina ($\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$ und $\mu\text{m}^3/\text{ml}$) liegen in dem gleichen Wertebereich.

Literaturverzeichnis

- Alberts B. [et al.]** Molekularbiologie der Zelle [Buch]. - Göttingen : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008,. - Bd. 5. Auflage : S. 953-956. - ISBN: 978-3-527-32384-5.
- Alfred-Wegener-Institut** Pangaea.de [Online] // awi.de. - 26. Juni 2017. - 17. Juli 2018. - https://www.awi.de/fileadmin/user_upload/MET/PolarsternExpeditionMaps/PS103.pdf.
- Andersen R.A.** Algal Culturing Techniques [Buch]. - 2005,. - S. 507. - ISBN: 0-12-088426-7.
- Astor E. [et al.]** Tierparadiese unserer Erde - Polargebiete [Buch]. - München Gütersloh : Wissen Media Verlag GmbH, 2008. - Bd. Band 4 : S. 178. - 978-3-577-07704-0.
- Bannwarth H., Kremer B.P. und Schulz A.** Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2007,. - S. 338. - ISBN: 978-3-540-71238.
- Berg J.M. [et al.]** Biochemie [Buch]. - Deutschland : Springer Verlag, 2018,. - Bd. 8. Auflage : S. 690. - ISBN: 978-3-662-54619-2.
- Boebel O.** Berichte zur Polar- und Meeresforschung [Online] // epic.awi. - 07. Oktober 2017,. - 23. April 2018. - http://epic.awi.de/45596/1/BzPM_0710_2017.pdf. - 1866-3192.
- Boenigk J. und Wodniok S.** Biodiversität und Erdgeschichte [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2014,. - S. 40-43. - ISBN: 978-3-642-55388-2.
- Coral Biome A.** HQI versus LED [Online] // coralbiome.de / Hrsg. Aquaculture Coral Biome. - 13. Mai 2013. - 13. August 2018. - <https://www.coralbiome.com/en/2013/05/13/hqi-versus-led/>.
- Cortese G. und Gersonde R.** Morphometric variability in the diatom *Fragilariopsis kerguelensis*: Implications for Southern Ocean paleoceanography [Artikel] // Earth and Planetary Science Letters. - 2007. - 257. - S. 526-544. - DOI: 10.1016/j.epsl.2007.03.021.
- Crawford S.A. [et al.]** Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy [Artikel] // Journal of Phycology. - 2001,. - 4 : Bd. 37. - S. 543-554. - DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.037004543.
- Cypionka H.** Grundlagen der Mikrobiologie [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2010,. - Bd. 4. Auflage : S. 52 f.. - 978-3-642-05095-4.
- Elicki O. und Breitzkreuz C.** Die Entwicklung des Systems Erde [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2016,. - S. 254. - 978-3-662-47191-3.
- Esper O., Gersonde R. und Kadagies N.** Diatom distribution in southern Pacific surface sediments and their relationship to modern environmental variables [Artikel] // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. - [s.l.] : Elsevier, 01. März 2010. - 287. - S. 1-27. - doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.12.006.

Fluence Bioengineering Absorption Spectrum va Action Spectrum [Online] // fluence.science. - Fluence Bioengineering, Inc., 2018. - 25. Juli 2018. - <https://fluence.science/do-plants-use-green-light/>.

Fritsche O. Mikrobiologie [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2016,. - S. 226. - ISBN: 978-3-662-49728-9.

Fuchs N. [et al.] Genetic characterization and life cycle of the diatom *Fragilariopsis kerguelensis* [Artikel] // European Journal of Phytology. - Milton : Taylor and Francis Group, 28. Oktober 2013,. - Edition 48. - Ausgabe 4. - S. 411-426. - DOI: 10.1080/09670262.2013.849360. - 1469-4433.

Glemser B. Genetic and morphologic characterisation of possible cryptic species of the diatom *Fragilariopsis kerguelensis* // Bachelorarbeit. - Bremerhaven : [s.n.], Mai 2018.

Groß M. Von Geckos, Garn und Goldwasser [Buch]. - Weinheim : Wiley-VCH, 2012,. - Bd. 1. Auflage : S. 148. - ISBN: 978-3-527-33272-4.

Gustavs L. [et al.] In vivo growth fluorometry: accuracy and limits of microalgal growth rate measurements in ecophysiological investigation [Artikel] // Aquatic Microbial Ecology. - 2009. - 55. - S. 95-104. - DOI: 10.3354/ame01291.

Hartmann H. Die Photosynthese als erneuerbare Energie - Zukünftige Produktion von Biowasserstoff aus Sonnenlicht [Buch]. - Wiesbaden : Springer Spektrum, 2015,. - S. 3 ff.. - ISBN: 978-3-658-09186-6.

Helmich U. Helmichs Biologie-Lexikon [Online] // u-helmich.de. - 19. Juni 2016. - 17. Juli 2018. - <http://www.u-helmich.de/bio/lexikon/L/lichtsammelkomplex.html>.

Hillebrand H. [et al.] Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae [Artikel] // Journal of Phycology. - [s.l.] : Wiley Online Library, 2002. - 35. - S. 403-424. - DOI: 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x.

Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M. und Schweiger M.-R. Biologie und molekulare Medizin [Buch]. - Berlin : Georg Thieme Verlag KG, 2009,. - Bd. 7. Auflage. - ISBN: 978-3-13-706507-4.

Hofmann G. Diatomeen als Biologische Qualitätskomponente zur Umsetzung der EU-WRRRL [Online] // flussgebiete.hessen.de. - 2005,. - Mai 2018. - http://flussgebiete.hessen.de/fileadmin/dokumente/5_service/veranstaltungen_2005_06/diatomeen_hofmann.pdf.

Horton R. [et al.] Biochemie [Buch]. - Deutschland : Pearson Studium, 2008,. - Bd. 4. Auflage : S. 613. - ISBN: 978-3-8273-7312-0.

Klaas C. und Assmy P. *Fragilariopsis kerguelensis*- eine Schlüsselart für den globalen Silikatkreislauf [Artikel]. - Bremerhaven : Naturwissenschaftliche Rundschau, 2010,. - 8 : Bd. 63. - S. 2 f..

Kloster M. [et al.] Large-Scale Permanent Slide Imaging and Image Analysis for Diatom Morphometrics [Artikel] // applied sciences. - [s.l.] : MDPI, 28. März 2017. - S. 9. - DOI: 10.3390/app7040330.

Kohler S. Dissertation // Photosynthetische Reaktionszentren-Struktur- und Funktionsuntersuchungen mittels Infrarotspektroskopie und Ligand-Docking Rechnungen. - Freiburg im Breisgau : [s.n.], 2005,. - S. 1 f..

Koolman J. und Röhm K.-H. Taschenatlas der Biochemie [Buch]. - Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2003,. - Bd. 3. Auflage : S. 130. - ISBN: 3-13-759403-0.

Mann D. G. und Vanormelingen P. An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species [Artikel] // The Journal of Eukaryotik Mikrobiology / Hrsg. Protistologists International Society of. - 02. Mai 2013,. - S. 414-420. - DOI: 10.1111/jeu.12047.

Maxwell K. und Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide [Artikel] // Journal of Experimental Botany. - Oxford : Oxford University Press, April 2000,. - Edition 51. - Ausgabe 345. - S. 659-668.

Mitchell B.G. [et al.] Light limitation of phytoplankton biomass and macronutrient utilization in the Southern Ocean [Artikel] // Association for the Sciences of Limnology and Oceanography. - [s.l.] : The American Society of Limnology and Oceanography, Inc., 1991. - 36. - S. 1662-1677. - <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.4319/lo.1991.36.8.1662>.

Munk K. Botanik-Taschenlehrbuch Biologie [Buch]. - Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2009,. - ISBN: 978-3-13-144851-4.

Nabors M.W. Botanik [Buch]. - München : Pearson Studium, 2007,. - S. 210-234. - ISBN: 978-3-8273-7231-4.

Nelson D.M. [et al.] Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation [Artikel] // Global Biochemical cycle. - September 1995,. - 3 : Bd. 9. - S. 359-372. - DOI: 10.1029/95GB01070.

Neukirchen F. und Ries G. Die Welt der Rohstoffe-Lagerstätten, Förderung und wirtschaftliche Aspekte [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer Spektrum, 2014,. - S. 286. - ISBN: 978-3-642-37738-9.

Oxborough K. FastPro8 GUI and FRRf3 systems documentation. - [s.l.] : Chelsea Technologies Group, 2012. - S. 39 + 97. - EDNS: 2230-801-HB.

Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M. und Stamatakis K. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint [Artikel] // Photosynthesis Research. - 2007. - 94. - S. 275-290. - DOI: 10.1007/s11120-007-9193-x.

Plambeck G. und Schaumburg J. Handbuch für die Seenbewertung mittels Plankton-Phyto-See-Index und PhytoLoss-Modul Zooplankton. - Wielenbach, Bayern : [s.n.], 2015,. - S. 10. - DOI: 10.13140/RG.2.1.1484.3043.

Podola B. Entwicklung von selektiven Biosensoren mit immobilisierten Mikroalgen [Buch]. - Göttingen : Cuvillier Verlag, 2004. - 1. Auflage : S. 23. - 3-86537-302-X.

Röder B. Einführung in die molekulare Photobiophysik [Buch]. - Leipzig : Springer Fachmedien Wiesbaden, 1999,. - S. 145-148. - ISBN: 978-3-519-03241-0.

Ruhland W. Handbuch der Pflanzenphysiologie [Buch]. - Berlin : Springer-Verlag, 1962,. - Bd. 17 : S. 901. - ISBN: 978-3-642-94853-4.

Schoenherr I., Stapp T. und Ryll T. A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up [Artikel] // Biotechnology Progress. - 2000. - 16. - S. 815-821. - DOI: 10.1021/bp000074e.

Schopfer P. und Brennicke A. Pflanzenphysiologie [Buch]. - Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. - Bd. 7. Auflage : S. 210. - ISBN: 978-3-662-49879-8.

Trimborn S. [et al.] Two Southern Ocean diatoms are more sensitive to ocean acidification and changes in irradiance than the prymnesiophyte *Phaeocystis antarctica* [Artikel] // Physiologia Plantarum. - [s.l.] : John Wiley & Sons Ltd, 2016. - 160. - S. 155-170. - DOI:10.1111/ppl.12539.

Trimborn S. Wachstum von *Fragilariopsis kergulensis* [Interview]. - Bremerhaven : [s.n.], 2018.

Tyystjärvi E. Photoinhibition of Photosystem II [Artikel] // International Review of Cell and Molecular Biology. - [s.l.] : Elsevier, 2013. - 300. - S. 243-303. - doi.org/10.1016/B978-0-12-405210-9.00007-2.

van den Hoek C., Jahns H. M. und Mann D. G. Algen [Buch]. - Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 1993,. - 3. Auflage : S. 117-120. - 3-13-551103-0.

Wagner W. Didaktik der Chemie [Online] // uni-bayreuth.de. - 12. November 2010. - 17. Juli 2018. - <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/fluoreszenz/fluoreszenz.htm>.

Walz GmbH Heinz IMAGING-PAM, M-series, Chlorophyll Fluorometer, Instrument Description and Information for Users. - Effeltrich : [s.n.], März 2014. - Bd. 5. revised Edition.

Weißbach W. Werkstoffkunde Strukturen, Eigenschaften, Prüfung [Buch]. - Wiesbaden : Vieweg und Teubner, 2010,. - Bd. 17. Auflage : S. 394. - ISBN: 978-3-8348-0739-7.

Wrede P. und Wrede S. Charles Darwin: Die Entstehung der Arten [Buch]. - [s.l.] : Wiley-VCH, 2013,. - Bd. Kommentierte und illustrierte Ausgabe : S. 160. - 978-3-527-66873-1.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung der Frustel einer pennaten Diatomee (Hofmann, 2005, S. 3)	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Abnahme der Zellgröße nach zwei mitotischen Teilungszyklen. Die Tochterzellen des linken Astes behalten ihre Ursprungsgröße.....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Innenraumes eines Chloroplasts (Hirsch-Kauffmann, et al., 2009, S. 42)	5
Abbildung 4: Spektren der Pigmente Chlorophyll a, c und Carotin. Die Absorptionsmaxima liegen für Chl a bei 450 und 690 nm, für Chl b bei 480 und 640 nm und für Carotin bei 480 und 520 nm. Die Farbskala zeigt das absorbierte Farbspektrum an (vgl. Coral Biome, 2013).	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lichtsammelkomplexes vom PS II. Durch Lichtabsorption beginnt der Elektronentransport in den Antennenpigmenten. Die Pfeile stellen die Anregungsenergie dar, die auf niedrigere Niveaus abgegeben und zum aktiven Chl-a-Protein-Komplex geleitet wird (vgl.Helmich, 2016).	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette. Beginn der Lichtabsorption beim PS II. Übertragung von Elektronen durch die Elektronenüberträger Plastochinon (PQ) einen Cytochrom-bf-Komplex und Plastocyanin (Pc) auf das PS I. Entstehung von reduziertem Ferredoxin (Fd) und Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch eine NADP-Reduktase. Parallele Photophosphorylierung von $\text{ADP} + \text{P}$ zu ATP und Erreichen eines H^+ -Gradienten durch die ATP-Synthase (vgl. Nabors, 2007, S. 217).	8
Abbildung 7: Elektronenniveaus oder Singulettzustände, die bei der Lichtabsorption bzw. Wärme- und Fluoreszenzabgabe entstehen können. $\text{H}\nu$ stellt Anregungsphotonen dar, die vom System absorbiert werden. $\text{H}\nu^*$ stellt Photonen dar, die vom System als Emission zurückgegeben werden (vgl. Wagner, 2010).	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Route von der Polarsternexpedition PS 103 inklusive der eingezeichneten Probenahmestationen 1, 2 und 14 (Alfred-Wegenr-Institut, 2017).....	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der in dieser wissenschaftlichen Arbeit angewandten Arbeitsmethoden	18
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Utermöhl-Kammer. Eingezeichnet sind die zwei bei Zählmethode 1 ausgezählten Streifen. 1: vertikal, 2: horizontal	23
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Utermöhl-Kammer. Eingezeichnet sind die sechs bei Zählmethode 2 ausgezählten Streifen. 1: vertikal, 2: horizontal, 3+4: rechts diagonal, 5+6: links diagonal	24

Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kettenbildung von <i>F. kerguelensis</i> Zellen mit Beschriftung des Zellaufbaus und einer Maßstabangabe von 20 μm	26
Abbildung 13: Lineare Regression zur Bestimmung der Regressionskoeffizienten für die Berechnung der Zelloberflächen und Biovolumina. Es sind die Flächen und Breiten von einer Vielzahl vermessener <i>F. kerguelensis</i> Zellen gegeneinander geplottet.....	27
Abbildung 14: Raster-Elektronen-Mikroskopische Aufnahmen von <i>Fragilariopsis kerguelensis</i> Zellen.....	28
Abbildung 15: Farbskala einer Imaging-PAM. Schwarz zeigt keine und violett eine sehr hohe Fluoreszenzwiedergabe an.....	29
Abbildung 16: PAM-Aufnahmen zur Erstellung von AOI's.....	31
Abbildung 17: Variabilitätstest der Zählmethoden 1 und 2 von Stamm 2-44 aus Exp.1 bei einer Kultivierungstemperatur von 4°C. Verglichen wurden die ermittelten Zellzahlen/ml aus der Zählung einer ganzen Kammer und den Zählungen von sechs einzelnen Streifen.....	40
Abbildung 18: Maximal erreichte Zellzahlen/ml beim Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C.....	41
Abbildung 19: Durchschnittliche Biovolumina in μm^3 /Zelle von <i>F. kerguelensis</i> von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C.....	41
Abbildung 20: Mikrofotos der verwendeten <i>F. kerguelensis</i> Stämme aus dem Exp.2.....	42
Abbildung 21: Biovolumen in μm^3 /ml von <i>F. kerguelensis</i> aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage. Das Biovolumen steigt mit steigender Zellzahl/ml. Nicht vergleichbar mit dem Biovolumen in μm^3 /Zelle.....	43
Abbildung 22: Wachstumskurven von <i>F. kerguelensis</i> von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. Aufgetragen sind die Zellzahlen/ml gegen die Kultivierungstage.....	45
Abbildung 23: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten, ermittelt aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Zellzahlen/ml.....	47
Abbildung 24: Wachstumskurven von <i>F. kerguelensis</i> von Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C. Aufgetragen sind die Zellzahlen/ml gegen die Anzahl der Kultivierungstage.....	48
Abbildung 25: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten und Generationszeiten, ermittelt aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Grundfluoreszenz.....	50
Abbildung 26: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten berechnet aus der Zellzählung und aus der Grundfluoreszenz.....	50

Abbildung 27: Korrelation zwischen den Zellzahlen/ml und der Grundfluoreszenz F_0 von <i>F. kerguelensis</i>	51
Abbildung 28: Darstellung der Linearität zwischen Zellzahl/ml und Grundfluoreszenz anhand der Stämme 1-07 und.....	52
Abbildung 29: Induktionskurven von den Stämmen 1-07 A-D und 2-44 E-F.	53
Abbildung 30: Lichtkurvenvergleich von Stamm 1-07 A-D und 2-44 4°C E-F der Imaging-PAM mit dem FRRF.....	55
Abbildung 31: Lichtkurven aufgenommen mit dem FRRF der <i>F. kerguelensis</i> Stämme 1-07, 2-22, 2-44, 14-18, 14-19 und 14-27 von Exp.2.	57
Abbildung 32: Induktionskurven von Stamm 1-07 aus Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C und 4°C. Zusätzlich werden die beiden Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' dargestellt.	68
Abbildung 33: Lichtkurve von Stamm 1-07 aus Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 0°C. Zusätzlich sind die beiden Fluoreszenzparameter F_q' und F_m' dargestellt.....	69
Abbildung 34: Zellzahlen/ml aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage der südlichen Stämme von Exp.1. A: Exp.1 bei 0°C, B: Exp.1 bei 4°C	XIX
Abbildung 35: Korrelation zwischen Grundfluoreszenz und Zellzahl/ml aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage der südlichen Stämme aus dem Exp.2. A: Exp.2 0°C, B: Exp.2 4°C... XIX	XIX
Abbildung 36: Imaging-PAM Lichtkurve von Stamm 2-44 in Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 4°C	XX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der drei morphologischen Unterarten von <i>Fragilariopsis kerguelensis</i> . LR-N: Low-Rectangularity-Nord, LR-NS: Low-Rectangularity- Nord/Süd, HR-S: High-Rectangularity-Süd (Glemser, 2018).....	15
Tabelle 2: Genauer Standort der Probenahmestationen 1, 2 und 14 mit Breiten- und Längengradangabe. (Boebel, 2017, S. 116 f.).....	15
Tabelle 3: Auflistung der für diese wissenschaftliche Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe des Verwendungszweckes und des Herstellers.....	16
Tabelle 4: Auflistung der für diese wissenschaftliche Arbeit verwendeten Softwareprogramme und Datenbanken mit Angabe des Verwendungszweckes und des Herstellers	17

Tabelle 5: Stocklösungen für die Herstellung von F/2(+Si)-Medium mit dem jeweils eingesetzten Volumen (Protokoll zur Herstellung befindet sich im Anhang unter Punkt B.1 „Herstellung von angereichertem Seewasser für Phytoplankton-Kulturen“)	19
Tabelle 6: Anzahl der abgegebenen Lichtimpulse bei der Messung von Induktionskurven mit der Imaging-PAM. Der PAR lag für jede Messung bei 20 $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$.	34
Tabelle 7: Anzahl der abgegebenen Lichtimpulse bei der Messung von Lichtkurven mit der Imaging-PAM. Der PAR wurde ab dem zweiten SP schrittweise erhöht	34
Tabelle 8: Anzahl und Wiederholungen der Lichtimpulsschritte mit ansteigendem PAR für die Messung von Lichtkurven mit dem FRRF.	36
Tabelle 9: Zellzahlen/ml ermittelt am Tag des Animpfens der Exp.1 und 2 bei 0°C und 4°C	39
Tabelle 10: Durchschnittlich erreichte Kettenlängen bei Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C mit Angabe der Standardabweichungen. *nicht auswertbar	39
Tabelle 11: Spezifische Wachstumsraten berechnet aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Wachstumskurven aus Abb. 22. Es sind die Werte aus den Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C zusammengefasst.	46
Tabelle 12: Generationszeiten berechnet aus den spezifischen Wachstumsraten der exponentiellen Wachstumsphasen der Wachstumskurven aus Abb. 22 (Tabelle 11)	46
Tabelle 13: Spezifische Wachstumsraten berechnet aus den exponentiellen Wachstumsphasen der Grundfluoreszenz. Es sind die Werte aus Exp.1 und 2 bei den Kultivierungstemperaturen 0°C und 4°C zusammengefasst.	49
Tabelle 14: Generationszeiten berechnet aus den spezifischen Wachstumsraten der Grundfluoreszenz (Tabelle 13). *nicht auswertbar	49
Tabelle 15: Imaging-PAM und FRRF Vergleich der maximalen Quantenausbeute nach der Einwirkung von Lichtstress auf das Photosynthese-System II von <i>F. kerguelensis</i> .	54
Tabelle 16: Vor- und Nachteile in der Anwendung und Messung der beiden Fluorometer Imaging-PAM und FRRF bei der Aufnahme von Fluoreszenzwerten, insbesondere von Lichtkurven	66

Anhang

A. Zusätzliche Ergebnisse

A.1 Wachstumskurven der südlichen Stämme von Exp.1 anhand der Zellzahlen/ml

Durch die geringen Zellzahlen/ml und die starken Schwankungen der Werte kann kein sinnvoller Vergleich oder eine Auswertung erfolgen (Abb.34). Die Beurteilung der Messungen mit dem Imaging-PAM-Fluorometer entfallen vollständig, da sich die ermittelten Werte in einem stark negativen Bereich befinden. Grund für diese niedrigen und negativen Werte kann die Größe der Zellen sein. Es ist anzunehmen, dass sich sehr viele Zellen der südlichen Stämme kurz vor der sexuellen Fortpflanzung befanden.

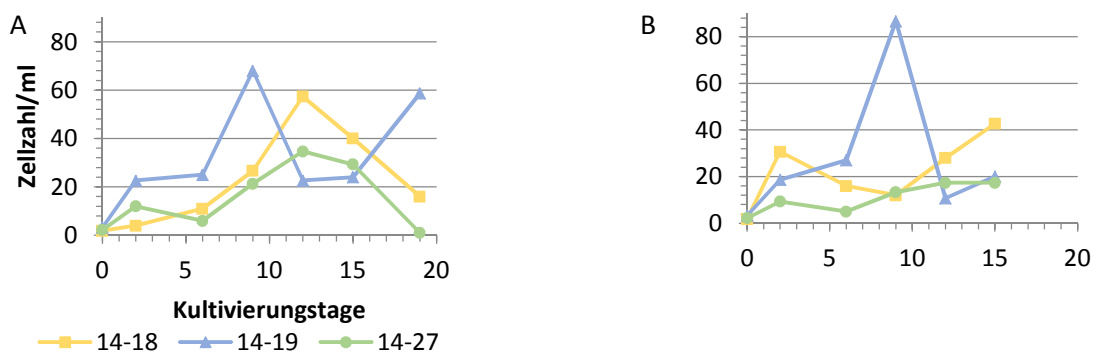


Abbildung 34: Zellzahlen/ml aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage der südlichen Stämme von Exp.1. A: Exp.1 bei 0°C, B: Exp.1 bei 4°C

A.2 Korrelation zwischen Fluoreszenz und Zellzahl/ml der südlichen Stämme (Exp.2)

Sowohl die Zellzahlen/ml, als auch die F_0 -Werte befinden sich in einem sehr niedrigen Bereich. Es erfolgte kein konstantes Wachstum, wodurch keine Wachstumsphasen erkennbar sind. Die Schwankungen der Werte sind für eine sinnvolle Auswertung zu hoch (Abb.35).

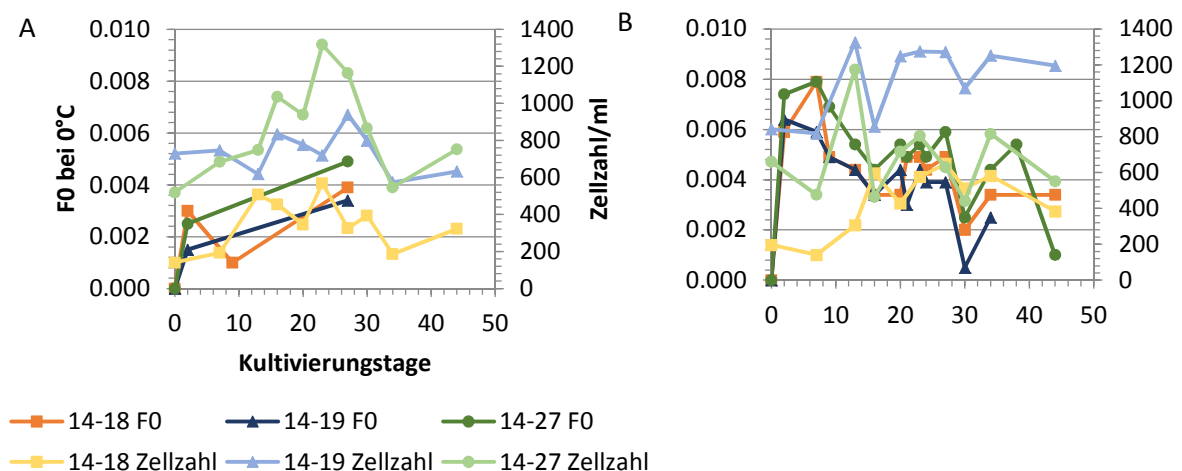


Abbildung 35: Korrelation zwischen Grundfluoreszenz und Zellzahl/ml aufgetragen gegen die Anzahl der Kultivierungstage der südlichen Stämme aus dem Exp.2. A: Exp.2 0°C, B: Exp.2 4°C

A.3 Lichtkurve von Stamm 2-44 in Exp.1 bei 4°C

Die Lichtkurve von Stamm 2-44 in Exp.1 bei einer Inkubation von 4°C hat ähnliche Werte angenommen, wie die von Stamm 1-07 und von Stamm 2-44 bei 4°C Inkubation. Die maximale ETR liegt bei etwa 5.9. Die Kurve bricht auch hier bei einem PAR von etwa 20 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ auf eine ETR von 0 ein (Abb. 36).

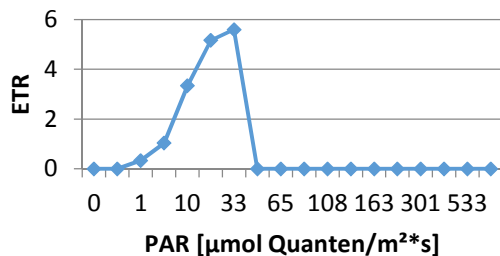


Abbildung 36: Imaging-PAM Lichtkurve von Stamm 2-44 in Exp.1 bei einer Inkubationstemperatur von 4°C

B. Protokolle

B.1 Herstellung von angereichertem Seewasser für Phytoplankton-Kulturen

F/2-Kulturmedium (nach Guillard, R. und Ryther, J., 1962 F/2_Rezept zur Kultivierung von Diatomeen modifiziert!)

Stocklösungen (bei 4°C im Kühlschrank lagern)

- 1. NaNO_3 (Natriumnitrat):** 75 g lösen in 1000 ml mit dest. H_2O
- 2. Na_2HPO_4 (Di-Natriumphosphat):** 5 g lösen in 1000 ml mit dest. H_2O
- 3. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ (Natriummetasilikat):** 15 g lösen in 1000 ml dest. H_2O (evtl. in kochendem H_2O lösen)

4. Metall-Mix-Lösung:

- a) – $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 150 mg (Zinksulfat)
– $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 100 mg (Kupfersulfat)
– $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 120 mg (Cobaltsulfat): lösen in 100 ml dest. H_2O
– $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 200 mg (Mangansulfat)
- b) – $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 5000 mg (Eisenchlorid): lösen in 100 ml dest. H_2O
- c) – $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 65 mg (Natriummolybdat): lösen in 100 ml dest. H_2O
- d) – $\text{Na}_2 \text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 5000 mg (Tritriplex III): lösen in 100 ml dest. H_2O

Mischung und Einstellung der Metall-Mix-Lösung:

100 ml der Lösung d)

+ 10 ml Lösung a)

+ 10 ml Lösung b)

+ 10 ml Lösung c)

Auffüllen auf 800 ml dest. H₂O, dann NaOH (0,2_n) auf pH 7,5 einstellen

5. Vitamin-Mix-Lösung (bei -20°C im Tiefkühlschrank lagern)

Vitaminsocklösungen herstellen:

- Vitamin B12: 10 mg/10 ml dest. H₂O = Sock B12

- Biotin: 10 mg/10 ml dest. H₂O = Stock Biotin

Mischung der Vitaminsocklösungen:

1 ml Stock B12

+ 1 ml Stock Biotin in 1000 ml dest. H₂O lösen

+ 200 mg Thiamin-HCL/1000 ml

Vitamin-Mix-Lösung in 10 ml Portionen bei -20°C als Vorrat einfrieren (bei -20°C bis zu einem Jahr haltbar)

Ansetzen des F/2 bzw. ANT-F/2(+Si)-Mediums

zu 1000 ml Nordseewasser oder antarktischem Seewasser folgendes hinzugeben:

- | | |
|--|---|
| 1. NaNO ₃ -Socklösung | 1 ml |
| 2. Na ₂ HPO ₄ -Stocklösung | 1 ml |
| 3. Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O | 1 ml für (ANT-)F/2-Medium
2 ml für ANT-F/2+Si-Medium |

4. Metall-Mix-Lösung 1 ml

5. Vitamin-Mix-Lösung 1 ml

→ Nach jeder Zugabe gut mischen

→ Der pH-Wert des fertigen Mediums sollte zwischen pH 8,0 bis 8,5 liegen (bei Bedarf den pH-Wert einstellen)

→ Sterilfiltration des fertigen Mediums mittels Filter-Kartuschen von Sartorius, einem Vorfilter (Satobran P 0,65 + 0,45 µm Porendurchmesser) und einem Hauptfilter (Satobran P 0,45 + 0,1 µm Porendurchmesser).

B.2 Präparation von Diatomeen für die Raster-Elektronen-Mikroskopie

1. 10 ml Kultur in 15 ml Falcon steril überführen
2. Bei 2000 upm für 10 min Zentrifugieren
3. Überstand verwerfen

4. Auf 10 ml mit VE-/dest. Wasser auffüllen und kurz vortexen
5. Bei 2000 upm für 5 min zentrifugieren
6. Überstand verwerfen

} Diese drei Schritte
5x wiederholen

7. 2 ml 1:10 verdünntes Domol hinzugeben
8. 7 min einwirken lassen
9. Bei 2000 upm 5 min zentrifugieren
10. Überstand verwerfen

11. Auf 10 ml mit VE-/dest. Wasser auffüllen und kurz vortexen
 12. Bei 2000 upm für 5 min Zentrifugieren
 13. Überstand verwerfen
- } Diese drei Schritte
} 5x wiederholen
14. Ca. 1 ml VE-/dest. Wasser mit einer Glaspipette in das Falcon geben
 15. Das Pellet durch Fingertipsen lösen
 16. Mit der Pipette auf und ab pipettieren
 17. Die gesamte Lösung in ein kleines Glasfläschchen überführen
 18. 3 Tropfen 99,9%igen Ethanol dazu tropfen
19. Runde Glasplättchen aus dem Ethanol-Gefäß nehmen und auf einer vorgeheizten 60°C Platte trocknen
 20. Auf die trockenen Glasplättchen ca. 2 Tropfen der Probe pipettieren; so lange auf der Heizplatte lassen, bis die Probe getrocknet ist.
 21. Klebepads mit Hilfe einer Pinzette auf Stubs kleben
 22. Glasplättchen mit der getrockneten Probe auf die Stubs kleben
 23. Sputtern
 24. REM → Wenn noch Proben im REM sind → Stickstoff aufdrehen → auf „Vent“ drücken, gegebenenfalls wiederholen → Proben raus/reinstellen → Stickstoff abstellen → Klappe von REM zudrücken → auf „Pump“ für Pumpe drücken → auf „HV“ für Hochvakuum drücken

Eidesstattliche Versicherung

Ich, der/die Unterzeichnende, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Quellenangaben und Zitate sind richtig und vollständig wiedergegeben und in den jeweiligen Kapiteln und im Literaturverzeichnis wiedergegeben. Die vorliegende Arbeit wurde nicht in dieser oder einer ähnlichen Form ganz oder in Teilen zur Erlangung eines akademischen Abschlussgrades oder einer anderen Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass falsche Angaben im Zusammenhang mit dieser Erklärung strafrechtlich verfolgt werden können.

Lisa-Marie Henken