

Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin

The effects of salinity and light intensity on the osmolyte concentrations, cell volumes and growth rates of the Antarctic sea-ice diatoms *Chaetoceros* sp. and *Navicula* sp. with emphasis on the amino acid proline

Jürgen Nothnagel

Jürgen Nothnagel

Universität Bremen
Fachbereich Biologie / Chemie
Meeresbotanik
D-28334 Bremen

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer Dissertation, die 1994 dem Fachbereich Biologie / Chemie der Universität Bremen vorgelegt wurde.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Fragestellung.....	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Kultivierung	13
2.2. Versuchsdurchführungen	13
2.2.1. Abernten der Stammkulturen	13
2.2.2. Langzeit-Dunkelinkubation	14
2.2.3. Hypoosmotischer Schock und die Veränderung der Prolinkonzentration in den Zellen und im Medium als Funktion der Zeit.....	15
2.2.4. Hypoosmotische Belastung mit unterschiedlicher Schockgröße	15
2.2.5. Hyperosmotische Belastung bei Licht und im Dunkeln	15
2.2.6. Hyperosmotische Belastung bei Licht und im Dunkeln unter Zugabe verschiedener N-Quellen und Glucose.....	15
2.2.7. Hyperosmotische Belastung mit dem organischen Osmolyten Sorbitol	16
2.3. Bestimmungsmethoden.....	16
2.3.1. Übersichtsschema der eingesetzten Methoden und Meßgrößen.....	16
2.3.2. Ionen.....	17
2.3.2.1. Kationen	17
2.3.2.2. Anionen	18
2.3.3. Aminosäuren.....	18
2.3.3.1. Prolin	19
2.3.4. β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)- Bestimmung	20
2.3.5. Organische Säuren.....	20
2.3.6. Quartäre Ammoniumverbindungen	21
2.3.7. Zellzahl und Wachstum	22
2.3.8. Mikroskopische Bestimmung des absoluten Zellvolumens	23
2.3.9. Elektronenmikroskopische bzw. lichtmikroskopische Bestimmung der relativen Anteile der Zellwand, des Cytoplasmas und der Vakuole am Gesamt-Zellvolumen.....	23
2.3.10. FRI (Fluorescence response index).....	25
3. Wachstum und Zellvolumina der Stammkulturen	26
3.1. Ergebnisse.....	26
3.1.1. Wachstum und Populationsdichte.....	26
3.1.2. Absolute Zellvolumina	28
3.1.3. Osmotische Zellvolumina und Vakuolenanteile.....	30
3.2. Diskussion.....	33

3.2.1. Wachstum und Populationsdichte	33
3.2.2. Absolute Zellvolumina	36
3.2.3. Osmotische Zellvolumina und Vakuolenanteile	38
4. Osmolyte der Stammkulturen	41
4.1. Ergebnisse	41
4.1.1. Ionen	41
4.1.2. Organische Osmolyte	44
4.1.3. Vitalität	52
4.2. Diskussion	53
4.2.1. Ionen	53
4.2.2. Organische Osmolyte	57
4.2.2.1. Aminosäuren	57
4.2.2.2. Organische Säuren	67
4.2.2.3. Homarin und DMSP	69
4.2.2.4. Vitalität	72
5. Langzeit-Dunkelinkubation	76
5.1. Ergebnisse	76
5.1.1. Prolinkonzentration und Populationsdichte nach Vorinkubation im Schwachlicht	76
5.1.2. Vitalität	78
5.1.3. Prolin, DMSP, Homarin und Populationsdichte in <i>Navicula</i> sp. nach Vorinkubation im Starklicht	79
5.2. Diskussion	81
6. Prolinstoffwechsel	86
6.1. Ergebnisse	86
6.1.1. Hypoosmotische Bedingungen	86
6.1.1.1. Schockgröße (Schwellenwert) zur Prolinfreisetzung	87
6.1.2. Hyperosmotische Bedingungen	88
6.1.2.1. Prolinkonzentration in Abhängigkeit von verschiedenen N-Quellen und Glucose im Licht und im Dunkeln	88
6.1.2.2. Hyperosmotischer Sorbitolschock	91
6.1.3. Temperatureinfluß	92
6.2. Diskussion	93
6.2.1. Hypoosmotische Bedingungen	93
6.2.2. Hyperosmotische Bedingungen	94
7. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	100
8. Literaturverzeichnis	106
9. Danksagungen	115

Zusammenfassung

Mit den antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* aff. *neogracile* und *Navicula* sp. wurden Laborversuche zum Einfluß von Lichtintensität und Salinität auf die Wachstumsraten, die Zellvolumina und die Osmolytgehalte durchgeführt.

Während im Starklicht ($50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) bei *Navicula* sp. kein nennenswerter Einfluß der Salinität im Bereich von 17 bis 51 PSU (= ‰) auf die Wachstumsraten und Zellvolumina zu messen war, zeigte *Chaetoceros* sp. differenzierte Reaktionen. Mit steigender Salinität nahmen Wachstumsraten und Zellvolumina ab. Im Schwachlicht ($5 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) waren die Wachstumsraten und Zellvolumina deutlich geringer, allerdings war kein Salzeffekt nachweisbar. Die Populationsdichte stieg dagegen unter Stark- und Schwachlicht mit zunehmender Salinität an.

Folgende osmotisch aktive Substanzen wurden quantifiziert: die Ionen K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} und die organischen Substanzen Homarin, Dimethylsulphoniumpropionat (DMSP), Aminosäuren und organische Säuren. K^+ und Prolin stellten die Hauptosmolyte beider Arten mit ansteigender Salinität dar. Prolin erreichte Konzentrationen von bis zu 41 % (*Chaetoceros* sp.) bzw. 53 % (*Navicula* sp.) am internen osmotischen Potential der Algen. DMSP konnte nur in *Navicula* sp. nachgewiesen werden. In beiden Arten bestand ein Anionendefizit, das möglicherweise zum Teil durch die negativen Ladungen organischer Säuren kompensiert wurde.

Die Arten sind als cytoplasmareich zu charakterisieren, da die Vakuolenanteile am osmotischen Volumen (Zellvolumen - Schale) im Durchschnitt bei 15 % (*Chaetoceros* sp.) und 25 % (*Navicula* sp.) lagen.

Die Arten können somit die Ionen nicht überwiegend in der Vakuole kompartimentieren.

Beide Eisalgen überlebten Langzeit-Dunkelinkubationen von 56 d bzw. 84 d. Die im Schwachlicht vorinkubierten Algen wiesen einen leichten Zellzahlanstieg und einen starken Abfall der Prolinkonzentration mit fortschreitender Inkubationsdauer auf. Die im Starklicht vorinkubierte *Navicula* sp. besaß eine verminderte Überlebensrate bei gleicher Tendenz des Prolingehalts. Dabei sank die Prolinkonzentration aller Ansätze nicht unter ein salinitätsabhängiges Minimum, dessen Konzentration mit der Salinität zunahm und artspezifisch war. Die DMSP- und Homarinkonzentrationen blieben in den im Starklicht vorinkubierten

Navicula-Proben konstant. Prolin hat während der Dunkelphase wahrscheinlich die Funktion einer Stickstoffquelle.

Zur Simulation der Salinitätsverhältnisse während Eisschmelze und Eisbildung wurden hypo- und hyperosmotische Schockexperimente mit *Chaetoceros* sp. durchgeführt und der Prolingehalt gemessen. Nach einem hyperosmotischen Schock im Licht führten alle angebotenen Substrate (NO_3^- , NH_4^+ , verschiedene Aminosäuren und Glucose) zu einer erhöhten Prolinsynthese. Im Dunkeln konnte keine nennenswerte Prolinsynthese durch die Zugabe dieser Substrate hervorgerufen werden. Es ist davon auszugehen, daß die Art in der Dunkelheit nicht in der Lage ist, nach einer hyperosmotischen Belastung Prolin zu synthetisieren. Daher ist eine osmotische Regulation durch Prolin unter den natürlichen Bedingungen in Eislaugenkanälen und -kavernen bei Schneebedeckung des Packeises nicht wahrscheinlich.

Der Schwellenwert für die Prolinabgabe ans Medium nach einer abrupten hypoosmotischen Belastung lag bei $> 8,5$ PSU. Im Frühjahr erfolgt die Verringerung der Salinität während der Eisschmelze kontinuierlich, es ist daher nicht von einem Prolinverlust an das umgebende Wasser auszugehen.

Ein additiver Effekt von Salinität und Lichtintensität bestand hinsichtlich der zunehmenden Populationsdichte von *Chaetoceros* sp.. Insgesamt kann keine eisalgenspezifische Osmoakklimatisation im Vergleich zu Algen gemäßigter Breiten konstatiert werden. Möglicherweise ist die Anpassung eher in einer Kombination verschiedener physiologischer Reaktionen begründet.

Summary

The effect of light intensity and salinity on growth rates, cell volume and concentrations of osmolytes of the Antarctic ice diatoms *Chaetoceros* aff. *neogracile* and *Navicula* sp. were investigated in laboratory experiments.

No severe effect of salinity on the growth rates and cell volumes could be observed in the range of 17 to 51 PSU (= ‰) at high photon flux density ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for *Navicula* sp., whereas *Chaetoceros* sp. showed significant responses: With increasing salinity growth rates and cell volumes decreased. Under low light conditions ($5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) growth rates and cell volumes were clearly reduced and no salinity effect could be detected. The population density increased with rising salinity at both, low and high light intensities.

The following osmotic active substances were determined: the ions K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} and the organic substances homarine, dimethylsulphoniopropionate (DMSP), amino acids and organic acids. K^+ and proline were the main osmolytes in both algae. Their concentrations increased with increasing salinity. Proline contributed up to 41 % (*Chaetoceros* sp.) and 53 % (*Navicula* sp.) of the internal osmotic potential of the algae. DMSP was found in *Navicula* sp. only. Both species exhibited anion deficiencies which may be compensated by negative charges of organic acids.

The average vacuole portions of the osmotic volume (cell volume - vacuole) were 15 % (*Chaetoceros* sp.) and 25 % (*Navicula* sp.) characterising both diatoms as cytoplasm-rich micro algae.

The ice algae survived long-term dark incubations of 56 d and 84 d. The diatoms, pre-incubated at low light intensities, showed a slight increase in cell number and a considerable decrease in proline concentration with advancing incubation period. The pre-incubation of *Navicula* sp. at high photon flux density resulted in a reduced survival rate with identical responses of the proline concentration. The proline concentration of all samples did not decrease below a salinity-dependent, species specific minimum, which was enhanced with increasing salinity. In the high light pre-incubated *Navicula* sp. samples the DMSP and homarine concentrations remained constant. Proline probably acts as nitrogen source during the dark period.

To simulate salinity stress during ice melting and ice formation hypo- and hyper-osmotic shock experiments were conducted and the proline concentration in

Chaetoceros sp. was measured. After a hyper-osmotic shock in the light all substrates (NO_3^- , NH_4^+ , several amino acids and glucose) resulted in an increased synthesis of proline. Supplying these substrates during the dark incubation only a negligible proline synthesis revealed. It is postulated that the species is not capable to synthesize proline in the dark under hyper-osmotic stress. Osmotic regulation with proline is unlikely under natural low light or dark conditions in brine channels and pockets of pack ice covered with snow.

The threshold value for proline exclusion into the surrounding medium after an abrupt hypo-osmotic shock amounts to $> 8,5$ PSU. It is assumed that there are no losses of proline to the surrounding media under natural conditions i.e. gradually changes of salinity during ice melting in spring.

In *Chaetoceros* sp. there were additive effects of salinity and light intensity regarding the population density which increased. In conclusion no ice-algae specific osmotic acclimation in comparison with algae of temperate regions was observed. Possibly a combination of several physiological responses account for the acclimation.

1. Einleitung

Die Meereisbedeckung der südlichen Hemisphäre unterliegt starken saisonalen Schwankungen. Im September erreicht sie ihr Maximum mit $20 \times 10^6 \text{ km}^2$, um dann im Südsommer auf ein Minimum von ca. $4 \times 10^6 \text{ km}^2$ abzufallen (Zwally et al., 1983) (Abb. 1).

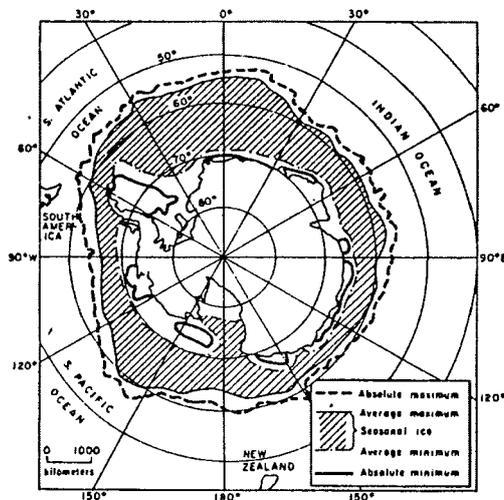


Abb. 1: Die Ausdehnung des Meereises in der südlichen Hemisphäre mit einer Bedeckung von mehr als 1/8 (aus Maykut, 1985).

Das Meereis bietet einer Vielzahl von Organismen einen zumeist ebenfalls saisonalen Lebensraum (Horner, 1985). Die Packeisbildung erfolgt im offenen Weddellmeer überwiegend unter stürmischen Bedingungen und niedrigen Temperaturen. Zur eindeutigen Kennzeichnung der Eistypen-Nomenklatur stehen die internationalen Bezeichnungen in Klammern. Dabei koagulieren 3-4 mm große Eiskristalle (frazil ice-crystals) an der Meeresoberfläche zu einem Eisbrei (grease ice). Unter ruhigeren Bedingungen frieren die Eiskristalle dann zu runden Tellern, dem Pfannkucheneis (pancake ice) zusammen (Lange et al., 1989). Daraufhin entsteht eine ca. 10 cm feste Schicht, die dann nur noch langsam an Dicke zunimmt. Aufgrund der Struktur wird dieses Eis als granuläres Eis (frazil ice) bezeichnet. Unter der festen Schicht folgt die Bildung meist säulenförmigen Eises (congelation ice). Den Prozessen während der Bildung des granulären Eises wird eine zentrale Rolle bei der Inkorporation von Organismen aus der Wassersäule ins Packeis zugeschrieben (Garrison et al., 1983; Garrison et al., 1989). Die kleinen Eiskristalle passieren als Folge der stürmischen Bedingungen

einen Teil der Wassersäule, um aufgrund ihres Auftriebs an die Oberfläche zu gelangen. Während dieses Aufstiegs assoziieren ("ernten") sie Organismen und tragen somit zur unspezifischen Aufkonzentrierung z.B. von Algen im entstehenden Packeis bei. Neben diesem "Straßenkehrereffekt" können auch Wellenfelder Wasser durch den Eisbrei pumpen, der die Organismen "aussiebt" und somit anreichert (Ackley et al., 1987).

Die im Eis eingeschlossenen Organismen sind in Abhängigkeit von der Eisdicke und Schneeeauflage z.T. sehr niedrigen Temperaturen (-30 °C im oberen Eissäulenbereich) und extremem Schwachlicht (ca. 0,2 µmol Photonen / m² s im unteren Eissäulenbereich) ausgesetzt (zur Übersicht: Kirst und Wiencke, 1994). Das im Packeis eingeschlossene Wasser friert als Funktion sehr niedriger Temperaturen (< -1,8 °C) aus, so daß Meerwasser mit erhöhter Salinität in den Eislakunen verbleibt. Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Temperatur und Salinität der im Meereis eingeschlossenen Sole.

Die Salinität der Sole läßt sich nach den Gleichungen von Assur (1958) er rechnen:

$$S = \frac{1000 T}{T-54,11} \quad \text{wenn } T > -8,2^{\circ}\text{C}$$

$$S = \frac{62,4-10,31 T}{1,0624-0,01031 T} \quad \text{wenn } -22,9^{\circ}\text{C} < T < -8,2^{\circ}\text{C}$$

(S = Salinität in PSU; T = Temperatur in °C)

Je nach Vorkommen in der Eissäule sind die Algen - überwiegend Diatomeen (Garrison et al., 1986) - somit unterschiedlichen Salinitäten der Solekavernen und -kanälen ausgesetzt. Im wesentlichen unterscheidet man nach Horner et al. (1992) 4 Gemeinschaften (Abb. 2): Oberflächen-, Innereis-, Boden- und Untereisgemeinschaft (surface, interior, bottom, sub-ice community).

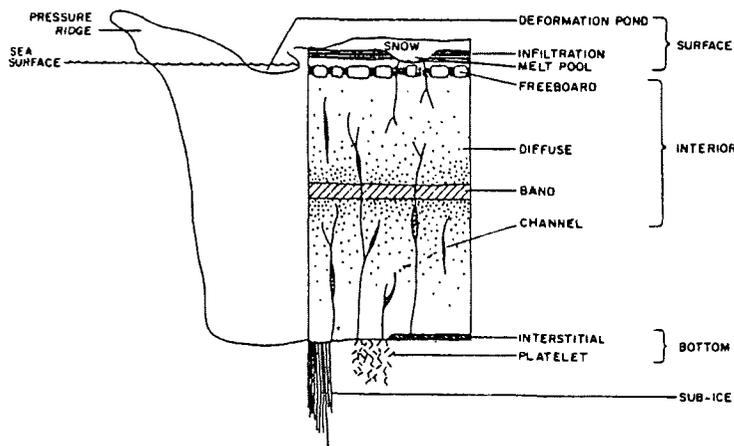


Abb. 2: Schematische Darstellung der im Meereis vorkommenden biologischen Gemeinschaften (aus Horner et al., 1992).

Von besonderer Bedeutung hinsichtlich der Salztoleranz sind die Schmelzwassertümpel (melt pools) mit hyposalinem und die Innereisgemeinschaften im oberen Eissäulenbereich mit hypersalinem Milieu. Der Lebensraum Packeis weist einen Salinitätsbereich zwischen ca. 3 PSU (Vargo et al., 1986) und 205 PSU auf (Weissenberger, 1992). Die dort lebenden Arten müssen sich also nicht nur an tiefe Temperaturen und niedrige Lichtintensitäten anpassen, sondern auch noch zur Osmoakklimatisation befähigt sein.

Reed (1984) definiert die Begriffe osmotische Anpassung, Osmoakklimatisation und Turgor- bzw. Volumenregulation als reversible biochemische und physiologische Änderungen in der zellulären Struktur und Funktion als Auswirkung auf einen Salzstreß. Dabei sind zwei Phasen der Anpassung zu unterscheiden (Kirst, 1990): Die erste Phase ist charakterisiert durch schnelle Veränderungen im Turgor (bei Zellen mit Zellwand) oder Volumen (bei Zellen ohne Zellwand), verursacht durch Wasserein- und ausstrom je nach osmotischem Gradienten zwischen Medium und Zelle. Diese Prozesse stehen nicht unter stoffwechselfysiologischer Kontrolle und sind schon nach wenigen Minuten abgeschlossen. Die Zelle zeigt ein passives Osmometerverhalten. Die zweite Phase ist durch zelluläre Konzentrationsänderungen der Osmolyte (osmotisch aktive Substanzen) bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts gekennzeichnet. Zum einen ändern sich die Ionenverhältnisse (vor allem $K^+ : Na^+$), zum anderen werden organische Osmolyte synthetisiert. Diese Phase dauert bei Mikroalgen mindestens 2 h und ist aufgrund der Syntheseleistung sehr energieaufwendig. Osmolyte, die die toxisch wirkenden Ionen (besonders Na^+) im Cytoplasma ersetzen, werden auch als kompatible Substanzen ("compatible

solutes") bezeichnet (Brown und Simpson, 1972). Die Fähigkeit zur Akkumulation solcher Verbindungen stellt einen evolutionsbiologischen Vorteil dar (Yancey et al., 1982). Sie ermöglichen vielen pro- und eukaryotischen Organismen das Überleben in einem großen Salinitätsbereich, während z.B. Halobakterien durch genetische Anpassung (Osmoadaptation) auf ein hypersalines Milieu angewiesen und beschränkt sind. Die verträglichen Substanzen besitzen folgende Eigenschaften (Kirst, 1994):

- a) hohe Löslichkeit
- b) Ladungsneutralität (Nettoladung) unter physiologischem pH-Wert
- c) keine Giftigkeit in hohen Konzentrationen
- d) schneller Auf- und Abbau der Substanz und Umsatz aus Reservestoffen
- e) metabolische Kontrolle über die verschiedenen enzymatischen Schritte

Kompatible Substanzen sind meist Haupt-Photosyntheseprodukte. Zu ihnen zählen Zucker, Polyole, Aminosäuren, quartäre Ammoniumverbindungen und tertiäre Sulphoniumverbindungen. Ihre Schutzwirkung nimmt mit geringerer Löslichkeit ab. Häufige und typische Verbindungen sind Glycerin, Prolin und Glycinbetain u.v.a.. Erklärungsansätze zu deren Wirksamkeit im Cytoplasma der Zelle faßt Galinski (1992) in drei Modellen zusammen:

1) Wasserersatz: Kompatible Substanzen ersetzen Wassermoleküle in der Hydrathülle von Proteinen und wirken somit einer verringerten Wasseraktivität entgegen. Dies gilt z.B. für Polyole (Yancey et al., 1982).

2) Modifikation der Proteinoberfläche: Hydrophobe Bereiche eines Proteins können durch "Minidetergenzien" maskiert werden, so daß die Affinität zum Wasser erhöht und eine Stabilisierung der Hydrathülle bewirkt wird. Prolin gilt als Beispiel für solch ein "Minidetergens". Der hydrophobe Bereich des Moleküls ist dem ebenfalls hydrophoben Bereich des Makromoleküls zugewandt. Dadurch tritt der hydrophile Molekülbereich der Iminosäure mit dem Lösungsmittel (Zellsaft) in Verbindung. Die hydrophoben Proteinbereiche werden somit in hydrophile "umgewandelt". Man spricht daher von hydrophober Hydratation (Schobert, 1979).

3) Ausschluß aus der Hydrathülle (Eis-Insel-Modell): Unter Berücksichtigung der Verhältnisse im Cytoplasma werden im Eis-Insel-Modell zwei Wasserp Populationen unterschiedlicher Dichte berücksichtigt:

In einem System mit Polyanionen (Proteine) können die Gegenionen (z.B. Na^+ und K^+) nicht gleichmäßig in der Lösung verteilt sein. Sie halten sich mit größerer Dichte in der Nähe der Polyanionen auf. Dies führt zur Verminderung der Wasseraktivität in den Hydrathüllen und damit zu einem erniedrigten

Wasserpotential. Das System reagiert mit der Veränderung des partiellen Molvolumens, d.h. durch Volumenverringern in den Hydrathüllen (Erhöhung des Wasserpotentials) und durch Volumenaufweitung im freien Wasser (Erniedrigung des Wasserpotentials). Es liegt nun dichtes Wasser in der Hydrathülle und weniger dichtes Wasser außerhalb vor. Dies hat einen Einfluß auf die Fähigkeit zur Lösung von Osmolyten: kleine Moleküle hoher Ladungsdichte sind überwiegend im Wasser hoher Dichte, während große Moleküle geringer Ladungsdichte im Nicht-Hydrat-Wasser verteilt sind. Somit liegen Na^+ und K^+ graduell in unterschiedlichen Wasserpopulationen vor: Na^+ überwiegend im Hydrat-Wasser, K^+ überwiegend im Nicht-Hydrat-Wasser. Die ladungsneutralen kompatiblen Substanzen sollten aufgrund ihrer großen stark gebundenen Hydrathüllen von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und im Nicht-Hydrat-Wasser verteilt sein.

Wasser an hydrophoben Grenzflächen hat ein größeres Potential, weil es weniger Wasserstoffbrücken ausbilden kann als freies Wasser. Der Autor geht von einer Aufweitung der Struktur an den Grenzflächen und einer Komprimierung des Restwassers aus. Da sich hydrophobe Bereiche eher in schwach strukturiertem Wasser hydratisieren lassen, führt die Integration von Salzen zur Destabilisierung von hydrophoben Wechselwirkungen. Die kompatiblen Substanzen, die die Salze ersetzen, haben eine Präferenz für das Nicht-Hydrat-Wasser und erhöhen somit unwesentlich die Dichte des Hydrat-Wassers. Die Funktion ist also in der Aufrechterhaltung einer "natürlichen" Hydrathülle zu sehen. Die molekulare Grundlage für die Präferenz kompatibler Substanzen für aufgeweitetes Wasser liegt also in der Ausbildung eisähnlicher Hydrathüllen, die strukturell aufgeweitetem Wasser ähnlich sind und sich somit gut in dieses integrieren lassen.

Über kompatible Substanzen in Eisalgen ist bisher wenig bekannt. In den Eisalgen-Inhaltsstoffuntersuchungen ist meist nur die Großgruppe der niedermolekularen Substanzen angegeben. Nur die Iminosäure Prolin ist bisher in Eisdiatomeen nachgewiesen worden (Bartsch, 1989; Nothnagel und Wanzek, 1989). Somit drängt sich die Erfassung organischer Osmolyte in Eisalgen, angesichts der großen Spannbreite des Salzgehalts in deren Habitat, geradezu auf.

Damit die Ergebnisse von Osmolytkonzentrationen mit denen anderer Autoren vergleichbar sind, müssen sie als Konzentrationsangaben in Bezug auf das Volumen vorliegen. Eine hier nicht aufzuführende Anzahl an Publikationen gibt Konzentrationen von Inhaltsstoffen in Bezug auf die Zelle oder den Chlorophyll a-Gehalt an. Da jedoch die Eisdiatomeen ein sehr weites Größenspektrum abdek-

ken, können Vergleiche, die nicht volumenbereinigt sind, zu Fehleinschätzungen führen. Gerade bei der Bestimmung von Osmolyten zur Aufstellung einer osmotischen Gesamtbilanz ist deren Bedeutung nur in molaren bzw. osmolalen Konzentrationen einzuschätzen. Schon bei Konzentrationsvergleichen von Inhaltsstoffen einer Art unter verschiedenen Versuchsbedingungen kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die gewählte Bezugsgröße (einschließlich Zellvolumen) nicht ebenfalls ändert. Die Volumenbestimmung von Diatomeen ist im Vergleich zu vielen anderen einzelligen Algenabteilungen besonders problematisch. Es kann nicht von einer konstanten Zellgröße ausgegangen werden. Die Variabilität der Zellgröße ist im Teilungsmodus begründet. Bei der vegetativen Fortpflanzung gleiten die beiden verkieselten Schalenhälften, die im Schalendurchmesser größere Epitheka und die kleinere Hypotheka, auseinander. Zur Bildung der neuen Zellen wird die jeweils fehlende Schalenhälfte immer als Hypotheka ergänzt. Die durchschnittliche Individuengröße in einer Diatomeenpopulation nimmt deshalb mit fortschreitenden Zellteilungen ab. Diese Zellverkleinerung schreitet in der Regel nur bis zu ca. $2/5$ der maximalen Größe voran, um dann die geschlechtliche Fortpflanzung einzuleiten (Geitler, 1932; Drebes, 1966; Werner, 1971a). Zur Auslösung der Gametogenese und der darauf folgenden Auxosporenbildung ist nicht nur die Zellgröße ausschlaggebend. Als äußere Signalgeber werden in der Literatur Licht (Smith, 1966; Drebes, 1966; Furnas, 1985; Vaultot und Chisholm, 1987; Armbrust und Chisholm, 1990), Temperatur (Drebes, 1966), Salinität (Schultz und Trainor, 1968) und Nährstoffangebot (Davis et al., 1973; French und Hargraves, 1985) diskutiert. Eine neuere Untersuchung deutet daraufhin, daß bei Abwesenheit eines äußeren Signals die Zellgröße die sexuelle Fortpflanzung einleitet, während bei Anwesenheit eines solchen Signals die genetische Information überschrieben wird (Armbrust und Chisholm, 1992). Somit könnte die Gametogenese schon vor dem Erreichen der kritischen Zellgröße eingeleitet, aber auch bei Erreichen derselben unterdrückt werden.

Es ist daher nur unter bestimmten Bedingungen eine Auxosporenbildung und damit die Wiederherstellung der maximalen Zellgröße in Form einer "Erstlingszelle", die aus der Auxospore hervorgeht, gewährleistet. Die Zellen, bei denen die Gametenbildung innerhalb des zumeist recht kleinen Größenbereichs nicht einsetzt, teilen sich zu Tode. Unter Bedingungen, die keine Auxosporenbildung zulassen, sind die Algen in der Lage (vegetative) Dauersporen anzulegen. Diese meist robusten und widerstandsfähigen Zellen keimen unter günstigen Bedingungen, womit das Überleben der Art auch unter für vegetative Zellen ungünstigen abiotischen Faktoren gesichert ist. Die Dauersporenbildung stellt

unter dem Gesichtspunkt der Zellverkleinerung aber nur einen Aufschub dar: Die Größe der Zelle, die aus der Dauerspore hervorgeht, ist genauso groß wie die der vegetativen Zelle, aus der die Dauerspore entstand. Im Normalfall sind Diatomeen also auf die sexuelle Fortpflanzung zur Wiederherstellung der Größe angewiesen. Für wenige Ausnahmen konnte die Kompensation der Zellverkleinerung auf vegetativem Wege nachgewiesen werden (Gallagher 1983; French und Hargraves, 1985; French und Hargraves, 1986).

Als Konsequenz aus dem besonderen Teilungsmodus ist die Ermittlung des mittleren Zellvolumens zum Versuchszeitraum zwingend notwendig, um aussagekräftige Osmolytkonzentrationen angeben zu können.

1.1. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit ist in 4 thematische Teilabschnitte untergliedert (Abb. 3): Im ersten Teil sollen Wachstum und Zellvolumina (einschließlich osmotischer Zellvolumina und Vakuolengröße) der Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. (nähere Beschreibung der Art in Kap. 2.1.) und *Navicula* sp. (Lyrataegruppe, persönliche Mitteilung von Dr. Richard Crawford) in Abhängigkeit von der Salinität und Lichtintensität bestimmt werden. Zur Beprobung werden die Stammkulturen drei Salinitäten 17, 34 und 51 PSU ausgesetzt, die hypo-, is- und hyperosmotische Bedingungen in Laborexperimenten simulieren.

Der zweite Teil befaßt sich mit der Erfassung organischer und anorganischer Osmolyte unter denselben Standardbedingungen.

Im dritten Teil werden winterliche Bedingungen durch die Langzeitinkubation der Algen im Dunkeln unter Meerwassersalinität und erhöhtem Salzgehalt hergestellt und die Konzentrationsveränderungen der Hauptosmolyte (Prolin), die Populationsdichte und die Vitalität erfaßt.

Der vierte Teil der Arbeit enthält Experimente zur näheren Charakterisierung von Synthese und Abbau der Iminosäure Prolin in *Chaetoceros* sp. unter hypoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen.

Sowohl die Kultivierung als auch die Experimente wurden bei 4 °C durchgeführt. Nur im temperaturrelevanten Versuch wurde von der Standardtemperatur abgewichen (Kap. 6.1.3.).

Sprachregelung: Die Lichtintensitäten von 50 und 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ werden zur besseren "sprachlichen Handhabung" auch als Stark- und Schwachlicht bezeichnet. Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß das Photosynthesemaximum von *Chaetoceros* sp. erst bei ca. 70 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ erreicht wird (Nothnagel und Wanzek, 1989).

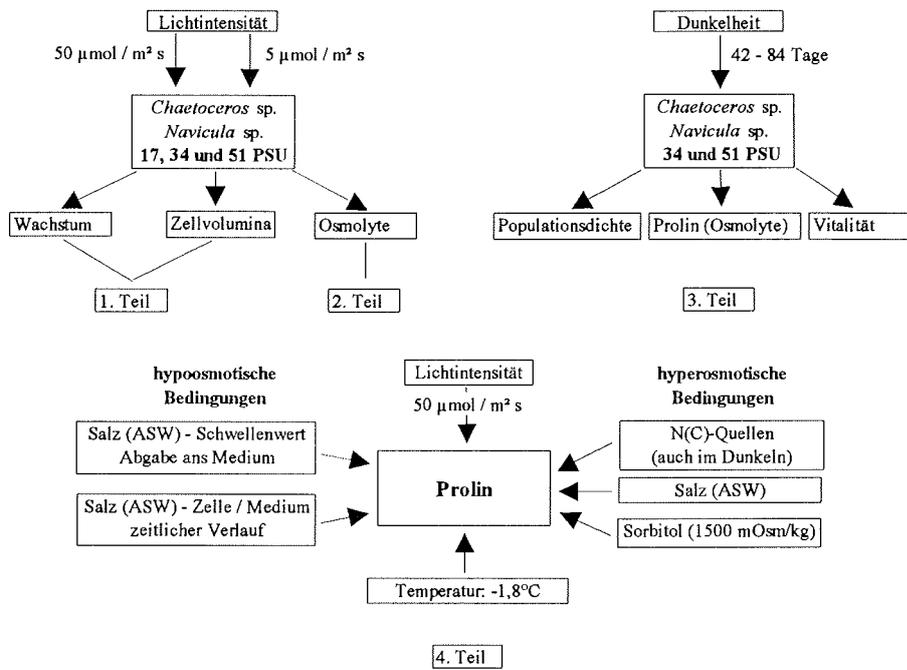


Abb. 3: Vereinfachte Zusammenfassung der durchgeführten Experimente mit Kennzeichnung der 4 Teilbereiche der Arbeit. ASW = künstliches Meerwasser; Schwellenwert = Schockgröße, ab der Prolin von den Zellen abgegeben wird; zeitlicher Verlauf = Prolinkonzentration in der Zelle und im Medium nach einem hypoosmotischen Schock im zeitlichen Verlauf.

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung

Die antarktischen Diatomeen (Bacillariophyceae) *Chaetoceros* sp. (Centrales) und *Navicula* sp. (Pennales) wurden aus Packeisproben des Weddellmeeres isoliert, die während der Antarktisexpedition "Winter Weddell Sea Project" (WWSP) mit dem Forschungsschiff "Polarstern" 1986 genommen wurden. Aufgrund fehlender taxonomischer Merkmale konnte die kleinzellige Form *Chaetoceros* sp. nicht bis zur Art bestimmt werden (persönliche Mitteilung von Dr. David Thomas). Möglicherweise handelt es sich um die bei Thomas et al. (1992) beschriebene *Chaetoceros*-Art. Oftmals werden die kleinzelligen antarktischen Vertreter dieser Gattung auch als *Chaetoceros neogracile* bezeichnet. *Chaetoceros* sp. wuchs in ca. 250 mL-Kulturröhren unter kontinuierlicher Belüftung mit Preßluft, während *Navicula* sp. in 250 mL-Erlenmeyerkolben angezogen wurde. Das künstliche Meerwassermedium (Firma Wiegandt GmbH und Co. KG, Krefeld, FRG) wurde mit der Nährlösung f/2-Beta (Bidwell, 1985) angereichert. Die Stammkulturen mit den Salinitäten von 17, 34 und 51 PSU wurden mit Tageslicht-Leuchtstoffröhren (Osram L36 / W11) bei einer Photonenflussrate von 5 und 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h beleuchtet. Die Kultivierungstemperatur lag bei 4 °C.

2.2. Versuchsdurchführungen

2.2.1. Abernten der Stammkulturen

Da alle Osmolyte (außer Prolin und DMSP) aus einem Extrakt bestimmt werden sollten, mußten die Algen zunächst aufkonzentriert (Pellet) und anschließend vom anhaftenden Medium befreit werden. Ansonsten hätten die hohen Medium-Ionenkonzentrationen die anschließenden Inhaltsstoff-Bestimmungen (besonders die Ionenbestimmungen) gestört. Dieses Verfahren konnte nicht mit den üblichen eiskalten CaNO_3 -Waschlösungen durchgeführt werden, weil erstens NO_3^- gemessen werden sollte und zweitens die Algen ausflockten und kein festes Pellet bildeten. Somit wurde ein Waschvorgang mit is-osmotischen Sorbitollösungen standardisiert. In Vorversuchen blieben nach zweimaligem Waschen mit Sorbitol (bei 4 °C) die Ionenkonzentrationen konstant, ohne die Zellen zu schädigen (mikroskopische Kontrolle). (Die Ergebnisse der Vorversuche sind in dieser Arbeit nicht dargestellt). Aufgrund der viskosen Waschlösungen mußten die Zentrifugationszeiten für die Waschvorgänge erhöht werden. Nach der sich anschließenden wäßrigen Extraktion wurden die hydrophoben Extraktbestandteile, die die HPLC-Bestimmungen gestört hätten, mit Chloroform ausgeschüttelt.

Generelle Angaben zu Versuchsdurchführungen:

Navicula sp. wurde bei 1500 g, *Chaetoceros* sp. und die Extrakte bei 4200 g abzentrifugiert. Alle Arbeitsschritte wurden - soweit möglich - bei 4 °C durchgeführt.

Pellet-Waschvorgang:

40 bis 80 mL der Stammkulturen wurden 8 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in is-osmotischem Sorbitol aufgenommen, die Zellen sorgfältig resuspendiert und nochmals 12 min zentrifugiert und abermals der Überstand verworfen. Daraufhin wurde der Sorbitol-Waschvorgang wiederholt und das Pellet in 3 bis 10 mL entionisiertem Wasser aufgenommen.

Extraktion:

Die Algen wurden 1 h im Wasserbad bei 100 °C in verschließbaren Zentrifugenröhrchen gekocht, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

Ausschütteln hydrophober Substanzen:

Es wurden ca. 30 % des Extraktvolumens an Chloroform zu diesem hinzugegeben. Anschließend wurde der Extrakt 30 s auf einem Mixer ausgeschüttelt. Der Ansatz wurde nochmals abzentrifugiert und die obere (wäßrige) Phase zu den verschiedenen Bestimmungen eingesetzt.

Prolin- und DMSP-Bestimmung: siehe Bestimmungsmethoden

Die Lagerungstemperatur für die nicht sofort gemessenen Extrakte betrug -18 °C in verschraubbaren 10 mL-Zentrifugenröhrchen oder 20 mL-Szintillationsgefäßen. Die Filter zur DMSP-Bestimmung wurden in einer Tiefkühltruhe bei -80 °C in gasdichten 20 mL-Probenfläschchen aufbewahrt.

2.2.2. Langzeit-Dunkelinkubation

Die Schwachlicht-Stammkulturen (5 µmol Photonen / m² s) mit den Salzgehalten von 34- und 51 PSU beider Eisalgen wurden 84 d im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurden Starklichtkulturen (50 µmol Photonen / m² s) der Art *Navicula* sp. mit einer Salinität von 34 PSU 42 d der Dunkelheit ausgesetzt. Die Schwachlichtansätze wurden alle 28 d, die Starklichtansätze von *Navicula* sp. nach 0, 21 und 42 d abgeerntet. Es wurden die Zellzahlen, der Osmolytgehalt

und die FRI-Werte (als Maß für die Photosynthesekapazität) der Kulturen bestimmt.

2.2.3. Hypoosmotischer Schock und die Veränderung der Prolinkonzentration in den Zellen und im Medium als Funktion der Zeit

Der Versuch wurde in 10 mL-Zentrifugenröhrchen unter Standardbedingungen durchgeführt. 10 mL einer 51 PSU-Kultur wurden 2 min bei 4200 g abzentrifugiert, der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe mit Pasteurpipette abgesaugt und anschließend das Pellet mit 2,5 mL 17 PSU-Medium resuspendiert ($t = 0$). 5 min vor dem Erntezeitpunkt (5 - 720 min) wurde die Suspension abzentrifugiert, 2 mL vom Überstand mit einer 1 mL-Eppendorff-Pipette abgenommen und der Rest des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zum verbleibenden Pellet wurden 2 mL 75 %ige Essigsäure zum Abtöten der Zellen ($t = \text{Erntezeitpunkt}$) und 2 mL Aqua bidest gegeben und die Proben eingefroren.

2.2.4. Hypoosmotische Belastung mit unterschiedlicher Schockgröße

Der Versuch wurde, wie unter 3.2.2. beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt:

Die Inkubationszeit betrug konstant 30 min. Als Ausgangsansätze dienten 51 PSU-Kulturansätze von *Chaetoceros* sp.. Die hypoosmotischen Schocks wurden durch die Verwendung von Medien zwischen 51 PSU und 17 PSU in ca. 4,2-4,3 PSU-Schritten reguliert. Es ergaben sich somit Schockgrößen zwischen 0 und 34 PSU.

2.2.5. Hyperosmotische Belastung bei Licht und im Dunkeln

Die 34 PSU-Algensuspension wurde abzentrifugiert und das Pellet mit 10 mL 51 PSU-Medium resuspendiert ($t = 0$) und in Kulturröhrchen unter Standardbedingungen bzw. im Dunkeln inkubiert. Der Versuch begann zum Anfang der Lichtphase. Die Probennahmezeitpunkte: 0, 4, 8, 12 und 48 h.

2.2.6. Hyperosmotische Belastung bei Licht und im Dunkeln unter Zugabe verschiedener N-Quellen und Glucose

In Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 5 mL 17 PSU- bzw. 34 PSU-Kultur gegeben, die Suspensionen abzentrifugiert, die Überstände mit Wasserstrahlpumpe und Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in 5 mL stickstofffreiem 51 PSU-Medium resuspendiert.

Anschließend wurde eine Auswahl aus den folgenden N-Quellen bzw. Glucose hinzugegeben:

keine N-Quelle
2 mol / m³ NaNO₃
2 mol / m³ NH₄Cl
2 mol / m³ Glutaminsäure
2 mol / m³ Glycin
2 mol / m³ Prolin
2 mol / m³ Glucose.

Die Proben wurden 24 h in Zentrifugenröhrchen unter Standardbedingungen und im Dunkeln inkubiert. 1 mL wurde zur Zellzahlbestimmung entnommen, die restlichen 4 mL zur Prolinbestimmung eingesetzt.

Der Versuchsansatz zur Bestimmung der Prolinkonzentration nach hyperosmotischer Belastung mit stickstofffreier Vorinkubation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Vorinkubation betrug 7 d, die Lichtintensität 50 µmol Photonen / m² s.

2.2.7. Hyperosmotische Belastung mit dem organischen Osmolyten Sorbitol

Jeweils 4 Stammkulturen (17 PSU) wurden abzentrifugiert und anschließend 1500 mOsm / kg Sorbitollösung (entspricht 51 PSU) zugegeben. Die Ansätze wurden nach 8 und 24 h abgeerntet, die Zellen mikroskopisch kontrolliert und der Prolingehalt bestimmt.

2.3. Bestimmungsmethoden

2.3.1. Übersichtsschema der eingesetzten Methoden und Meßgrößen

Abb. 4 gibt einen Überblick über die bestimmten Meßgrößen und die dazu eingesetzten Methoden. Neben den anorganischen Osmolyten (Ionen) Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, HPO₄⁻, Cl⁻, SO₄⁻ und NO₃⁻ wurden die organischen Osmolyte DMSP, quartäre Ammoniumverbindungen (QACs), organische Säuren, Aminosäuren und die Iminosäure Prolin bestimmt. Als Vitalitätstest wurde die Photosynthesekapazität über die Fluoreszenz bestimmt. Als Bezugsgröße diente für alle Analysen die Zellzahl. Die Zellgrößen der Algen wurden zur Volumenbestimmung gemessen, um zwischen den Arten vergleichbare Konzentrationsangaben machen zu können.

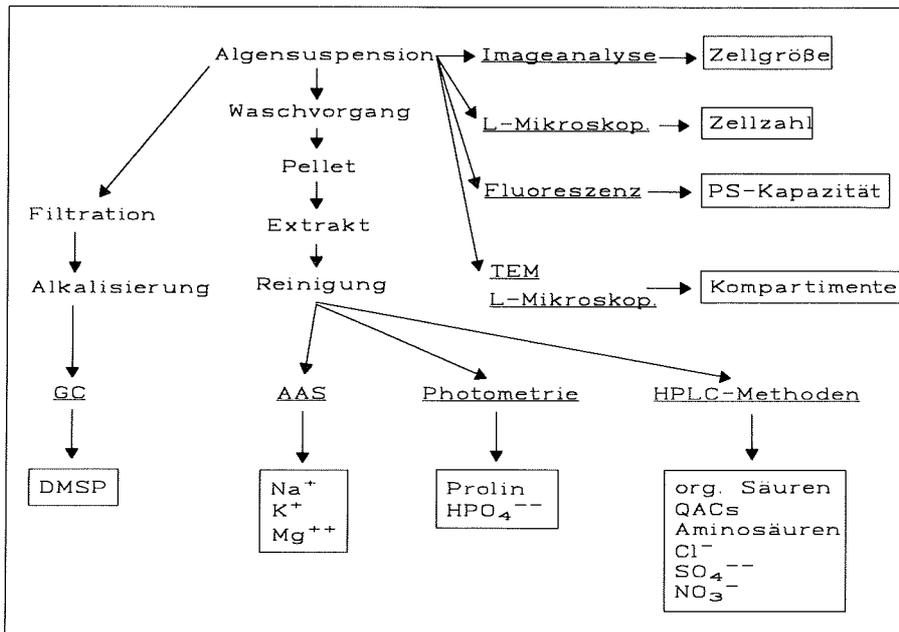


Abb. 4: Übersicht der für die Bestimmung der einzelnen Meßgrößen eingesetzten Methoden bzw. Verfahren.

Unterstrichen: Methode; Box: Meßgröße; PS: Photosynthese; AAS: Atomabsorptions-Spektrophotometrie; GC: Gaschromatographie; HPLC: High Performance Liquid Chromatography; L-Mikroskop.: Lichtmikroskopie; TEM: Transmissionselektronen-Mikroskopie; QACs: Quartäre Ammoniumverbindungen; org. Säuren: Organische Säuren.

2.3.2. Ionen

2.3.2.1. Kationen

Die über Membranfilter (0,45 µm) vorgereinigten Extrakte wurden zur Kationenbestimmung unverdünnt und in einer Verdünnung von 1 + 9 eingesetzt.

Die Kationen K^+ , Na^+ und Mg^{2+} wurden mit Hilfe des Atomabsorptions Spektrophotometer 2380 (Perkin-Elmer, Bodenseewerk Überlingen, GER) bestimmt.

Als Oxidans / Brenngas-Gemisch diente Luft / Acetylen.

Als Monochromatoren wurden elementspezifische Hohlkathodenröhren benutzt.

Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei folgenden Parametern:

Element	Spaltbreite [mm]	Wellenlänge [nm]
Natrium	0,2	589,0
Kalium	0,2	766,5
Magnesium	0,2	285,2

2.3.2.2. Anionen

Der Extrakt wurde durch ein 0,45 µm Membranfilter gereinigt und zur Bestimmung unverdünnt im Ionen-Chromatographen 690 (Methrom, Herisau, CH) eingesetzt. Das Gerät war mit einem Leitfähigkeitsdetektor und einer stählernen Hamilton PRP-X100 Säule (250 · 4,1 mm i.D.) ausgerüstet. Als Eluent wurde 2 mol / m³ Phthalsäure mit 5 % Aceton (v / v) (pH 5) mit einer Flußrate von 2 mL / min gewählt. Die Detektorsignale wurden mit einem Shimadzu CR-5A Integrator und entsprechenden Eichsubstanzen anhand der Retentionszeiten identifiziert und über die Peakflächen quantifiziert.

PO₄²⁻ konnte mit dem oben angegebenen Eluenten nicht nachgewiesen werden, deshalb wurde die photometrische Methode nach Gerlach und Deuticke (1963) eingesetzt.

2.3.3. Aminosäuren

Zunächst wurden die zu analysierenden Proben vollständig eingedampft. Anschließend erfolgte die Vorsäulenderivatisierung mit DABS-Cl (Dimethylaminoazobenzenesulfonyl Chloride) (Beckman Instruments, California, USA). Die HPLC-Bestimmung erfolgte mit einem Zwei-Pumpen-System zur Erzeugung eines Laufmittelgradienten. Zur Trennung der Aminosäuren diente eine Ultrasphere ODS 4,6 mm x 25 cm, 5 µm dp-Säule (Reversed Phase-Analyse). Folgende Laufmittel wurden eingesetzt:

A: 10 mol / m³ Zitronensäure mit 4 % DMF, pH 6,5 ± 0,05

B: 300 mL von A + 700 mL Acetonitril mit 4 % DMF

Gradientendaten:

Änderungszeitpunkt [min]	Dauer [min]	% A	% B
Start	-	71	29
0	12	49	51
12	5	14	86
20	1	100	0
27	0,25	71	29
35	Ende		

Die Flußrate betrug 1,4 mL / min mit Vorsäule (Ultrasphere ODS 4,6 mm x 4,5 cm, 5 µm dp) bzw. 1,2 mL / min ohne Vorsäule. Die Detektion erfolgte bei 436 nm (dem Absorptionsmaximum von DABS-Cl) mit einem Diodenarray-Detektor und einer Bandbreite von 4 nm.

Folgende Aminosäuren konnten nach dieser Methode erfaßt werden:

Aspartat, Glutamat, Serin, Threonin, Arginin, Glycin, Alanin, Prolin, Valin, Methionin, Leucin, Iso-Leucin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Histidin und Tyrosin.

Die Eichung erfolgte mit käuflichen 1 nmol-Standards. Vorversuche ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Aminosäurekonzentration bis zu 4 nmol.

2.3.3.1. Prolin

Eine photometrische Prolinbestimmung war aufgrund der sehr hohen Konzentrationen in den 34- und 51 PSU-Ansätzen notwendig. Die Prolinmengen hätten bei weitem den linearen Bereich der HPLC-Bestimmung der Aminosäuren überschritten. Die Prolinbestimmung erfolgte modifiziert nach Bates et al. (1973). Es wurden in der Regel 5-10 mL Algensuspension abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf 2 mL aufgefüllt, 2 mL 75 %ige Essigsäure dazu pipettiert, 2 mL eines Gemischs aus 75 %iger Essigsäure und 6 M H₃PO₄ (im Verhältnis 3 : 2) mit 40 mg Ninhydrin / mL hinzugegeben, geschüttelt und 1 h bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Die Reaktion wurde daraufhin im Eisbad gestoppt, 3 mL Toluol zum Extrakt gegeben, ca. 15 s mit dem Mixer (Whirlmix) geschüttelt und anschließend abzentrifugiert, um eine gute Phasentrennung zu erhalten. Der rote Überstand wurde bei 520 nm im Photometer gemessen. Die Nachweisgrenze lag bei 10 nmol.

2.3.4. β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)- Bestimmung

Zur DMSP-Bestimmung wurden 5 bis 10 mL *Navicula* sp.-Algensuspension bei einem Unterdruck von ca. 0,03 MPa auf ein Glasfaserfilter (Whatman, GF/F) abfiltriert, dieses sofort in ein gasdichtes Probenfläschchen (mit Teflon beschichtetem Septum) überführt und unverzüglich bei -80 °C gelagert. Zur Messung der *Chaetoceros* sp.-Proben wurden 2 mL konzentrierter Algensuspension in die Probengefäße pipettiert, da bei der Filtration die Schwefelfortsätze abgebrochen wären.

Die DMSP- Bestimmung erfolgte nach White (1982) indirekt über die Bestimmung des Gases Dimethylsulfid (DMS). Dieses entsteht unter alkalischen Bedingungen aus dem DMSP, das sich im Verhältnis 1:1 in DMS und Acrylsäure aufspaltet. Zur Herstellung alkalischer Bedingungen wurde jeder Ansatz mit 5 mL 25 %iger NaOH versetzt. Dieser alkalische Ansatz wurde unter ständigem Schütteln mit einem Mixer 4 h inkubiert. Aus dem Gasraum des Gefäßes wurden anschließend mit einer 500 μ l gasdichten Spritze aus jedem Versuchsansatz 500 μ l in den Injektionsport eingespritzt. Die Trennung erfolgte mit dem Shimadzu 9A Gaschromatograph (Shimadzu Seisakusho, Kyoto, Japan), der Trennsäule Chromosorb 101 (80/100 Mesh), die Quantifizierung mit einem Flammenphotometrischen Detektor (FPD) und die Integration der Fläche mit dem Shimadzu CR-3A Integrator. Preßluft und Wasserstoffgas dienten als Brenngasgemisch. Die Trägergasflußrate (N_2) betrug 65 mL / min, die Detektor- und Injektortemperaturen wurden auf 240 °C, die Gasflußrate für das Wasserstoffgas wurde auf 0,8 mL / min und die Preßluftzufuhr auf 0,7 mL / min eingestellt. Die Auftrennung erfolgte isotherm bei 190 °C. Die Retentionszeit für die DMS-Standards lag bei 0,9 min.

Der Gasraum der Probengefäße betrug 25,5 mL. Davon sind 5,0 mL NaOH abzuziehen. Es verblieb ein bei der Berechnung zu berücksichtigender Gasraum von 20,5 mL.

2.3.5. Organische Säuren

Die zu bestimmenden Proben wurden ausgedampft und dann in 0,5 mol / m³ H₂SO₄ aufgenommen. Diese Lösung wurde zunächst bei 7000 g scharf abzentrifugiert, um korpuskuläre Zellbestandteile zu entfernen. Die Proben wurden durch einen Nylonfilter in den Methrom Ionen-Chromatographen 690 (Methrom, Herisau, CH) manuell injiziert. Zur Trennung (Ionenausschlußchromatographie) wurde eine Hamilton PRP-X 300 Säule (250 · 4,1 mm i.D.) verwendet. Als Laufmittel diente 0,5 mol / m³ H₂SO₄. Die Eluentenleitfähigkeit betrug ca. 300 μ S / cm², die Flußrate 1,15 mL / min. Die Detektorsignale wurden mit einem

Shimadzu CR-5A anhand der Peakhöhen ausgewertet. Es wurden die Säuren Malat, Citrat, Lactat und Acetat bestimmt. Eine Analyse (ein "Lauf") dauerte ca. 12 min.

2.3.6. Quartäre Ammoniumverbindungen

Zur Bestimmung wurde die Methode von Gorham (1984) modifiziert. Die Proben wurden mit Kationenaustauscher (Amberlite IRC-50) in der H-Form und Anionenaustauscher (DOWEX 1 x 2-100) in der OH-Form im Verhältnis 1 : 2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Proben abzentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung eingesetzt. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Partisil 10-SCX-Säule (250 x 5 mm i. D., Ionenaustauschersäule) und einem 50 mol / m³ KH₂PO₄-Puffer mit 5 % Methanol, pH 4,6. Über einen automatischen Probengeber wurden 20 µL injiziert. Die Flußrate betrug 0,6 mL / min, die Temperatur der Säulentemperiereinheit 15 °C. Die beiden Kanäle des Diodenarray-Detektors (Beckman, 168) waren auf 195 bzw. 270 nm eingestellt.

Der Homarinstandard (N-Methyl-Picolinsäure) mußte synthetisiert werden, da er nicht käuflich zu erwerben war. Die Synthese erfolgte in zwei Schritten:

1) Synthese von 1-Methyl-2-carbethoxyppyridinium Jodid modifiziert nach Kosower et al. (1960):

1,8 mL 2-Picolinsäureäthylester [CAS: 2524-52-9] und 1 mL Methyljodid wurden in einem verschlossenen 25 mL Zweihalskolben bei Raumtemperatur gerührt. Beim Zusammengeben der beiden Lösungen trat eine leichte Braunfärbung auf. Nach ca. 5 min wurde die Lösung caramelfarben. Nach 10 min wurden 7 mL Essigsäureäthylester als Lösungsmittel dazugegeben und ca. 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 2 h mit Stickstoffgas belüftet und das überschüssige Methyljodid mit Hilfe eines mit Ammoniak gefüllten Blasenzählers entfernt. Der Ansatz wurde 3 d bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. 1-Methyl-2-carbethoxyppyridinium Jodid fiel in Form gelber Kristalle aus. Diese wurden abfiltriert und mit Essigsäureäthylester gewaschen. Ein NMR-Spektrum bestätigte die Substanz (Fachbereich Chemie der Universität Bremen).

2) Herstellung von Homarin [CAS: 445-30-7] aus 1-Methyl-2-carbethoxyppyridinium Jodid (aus dem 1. Syntheseschritt) modifiziert nach Kosower und Patton (1961):

Die Kristalle (88 mg) wurden in 1 mL dest. Wasser gelöst und auf eine mit Dowex 1 x 2 gefüllten und mit 1 N NaOH aktivierten Anionenaustauschersäule (Ø = 1,5 cm und 15 cm Füllhöhe) gegeben. Die Flußrate betrug ca. 3,3 mL / min. Das Homarin wurde mit dest. Wasser eluiert und in 2 mL-Fractionen ge-

sammelt. Von den einzelnen Fraktionen wurden Spektren zwischen 200 und 300 nm mit dem Spektralphotometer aufgenommen. Die Fraktionen, die bei 270 nm die größten Peaks aufwiesen, wurden eingedampft und anschließend in 2 mL Äthanol aufgenommen. Das NMR-Spektrum dieses Ansatzes zeigte leichte Verunreinigungen, so daß dieser Standard nur zur Identifikation, aber nicht zur Quantifizierung eingesetzt werden konnte.

Daß es sich bei der bestimmten Substanz tatsächlich um Homarin handelte, konnte durch zwei weitere Befunde belegt werden:

1) Aus der Literatur war bekannt, daß die Prasinophyceae *Tetraselmis subcordiformis* Homarin enthält (Dickson und Kirst, 1986). Die Retentionszeit konnte somit aus einem Extrakt der Art ermittelt werden. Sie betrug 6,1 min. Diese unterschied sich deutlich von der des Glycinbetains (5,5 min) und Trigonellins (7,1 min). Das Trigonellin hat dieselbe Summenformel wie Homarin, aber eine unterschiedliche Strukturformel.

2) Der synthetisierte Standard besaß wie die Extrakte von *T. subcordiformis* und *Chaetoceros* sp. bei 270 nm ein Absorptionsmaximum. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, daß es sich bei der Verbindung in den Eisalgenproben um Homarin handelt und bestätigt den dünn-schichtchromatographischen Befund von Homarin in *T. subcordiformis* von Dickson und Kirst (1986).

Die Quantifizierung erfolgte über die bei Gorham (1984) angegebenen molaren Response-Faktoren im Verhältnis zu Glycinbetain (Faktor = 1 gesetzt). Der Faktor für Trigonellin betrug 67 unter eigenen Laufbedingungen im Vergleich zu 71,9 bei Gorham (1984). Somit wurde der angegebene Faktor für Homarin (40,49) um 7 % nach unten auf 37,66 korrigiert.

2.3.7. Zellzahl und Wachstum

Als generelle Bezugsgröße für alle Inhaltsstoffuntersuchungen wurde die Zellzahl eingesetzt. Es wurden Zählkammern des Typs "Neubauer improved" mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,0025 mm² benutzt. Die Auszählflächeneinheiten der Kammern wurden so gewählt, daß mindestens 50 Zellen mit einer Auszählung erfaßt wurden. Zur statistischen Absicherung wurden 4 Flächeneinheiten pro Probe bestimmt.

Zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit in der logarithmischen Phase wurden die spezifischen Wachstumsraten der Stammkulturen für *Navicula* sp. und *Chaetoceros* sp. ermittelt. Die Schwachlicht-Kulturen von *Navicula* sp. konnten leider nicht erfaßt werden, da die Zellen schon bei geringer Zellzahl

durch eine "Mattenbildung" gekennzeichnet waren. Somit war keine zufällige (statistische) Verteilung der Zellen innerhalb der Zählkammern gewährleistet. Die spezifische Wachstumsrate errechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Spezifische Wachstumsrate } \mu = \frac{\ln X(1) - \ln X(0)}{t}$$

X(0) = Zellzahl zu Beginn der Messung; X(1) = Zellzahl zum Zeitpunkt t.

2.3.8. Mikroskopische Bestimmung des absoluten Zellvolumens

Das Zellvolumen der beiden Arten wurde jeweils für die Stammkulturen von 17, 34 und 51 PSU bestimmt. Es wurde das "Jupiter Image Analysis System" (Joyce Loeble, UK) mit der Software "Zeus 1.3" verwendet. Dazu wurden mikroskopische Bilder eines Umkehrmikroskops digitalisiert, auf einen Monitor übertragen (Auflösung: 512 x 512 Pixel) und dort vermessen. Der mikroskopische Abbildungsmaßstab betrug 630 : 1 (Öl). Die Eichung wurde mit einem Objektmikrometer durchgeführt.

Die Variablen zur Volumenbestimmung wurden nach dem Zufallsprinzip und der Formel $\text{Volumen} = a * b * h * \pi$ bestimmt (Edler, 1979). *Chaetoceros* sp. wurde zusätzlich zu Beginn der stationären Phase bei einer Kulturzellendichte von ca. 3,1 bis 3,2 Zellen * 10⁶ mL⁻¹ gemessen. a = Apikalachse / 2; b = Transapikalachse / 2; h = Pervalvarachse.

Art	Kultur-Phase	Lichtintensität [µmol Photonen/m ² s]	Anzahl (n)
<i>Chaetoceros</i> sp.	logarithmisch	50	200
<i>Chaetoceros</i> sp.	logarithmisch	5	100
<i>Chaetoceros</i> sp.	stationär	5	100
<i>Navicula</i> sp.	logarithmisch	50	100

2.3.9. Elektronenmikroskopische bzw. lichtmikroskopische Bestimmung der relativen Anteile der Zellwand, des Cytoplasmas und der Vakuole am Gesamt-Zellvolumen.

Fixierung, Entwässerung und Einbettung wurden modifiziert nach Tippit und Pickett-Heaps (1977) durchgeführt.

Fixierung:

Die Algensuspensionen wurden bei 5000 rpm abzentrifugiert, in Medikamentengläschen überführt und mit den jeweiligen Endkonzentrationen von 1 % igem Glutaraldehyd und 0,5 % igem Osmiumtetroxid semisimultan versetzt. Der

Ansatz wurde 20 min inkubiert, mit bidestilliertem Wasser gespült, in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert.

Entwässerung:

Die Proben wurden mit einer Acetonreihe von 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 und abs. Aceton (über Molekularsieb) jeweils zweimal 15 min entwässert.

Einbettung:

Zu jedem Pellet wurde das dreifache Volumen Spurr's Medium (mittel / hart: ERL: 10 g, DER: 5 g, NSA: 26 g, DMAE: 0,4 g) in abs. Aceton (Verhältnis: 1 + 2) gegeben. Dieser Ansatz wurde 6 h auf einem Rotor bewegt. Das Aceton wurde über Nacht auf dem Rotor abgedampft. Anschließend wurde der Ansatz in frisches Spurr's Medium überführt und in vorgetrockneten Gelatinekapseln bei 70°C für 14 h polymerisiert.

Mit einem Ultramikrotom und einem Diamantmesser wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat (2 % ig, wäßrig) und Bleicitrat nach Reynolds (1963).

Planimetrische und gravimetrische Bestimmung der Zellkompartimente:

Die Zellkompartimentflächen von Cytoplasma, Vakuole und die Gesamtfläche des Querschnitts (einschließlich Valvae) wurden für *Chaetoceros* sp. anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen planimetrisch bestimmt (Grafiktablett: Firma Kontron, München, GER). Dabei wurde zunächst der Valvenanteil vermessen und als Prozentsatz an der Gesamtzelle angegeben. Die Vakuolenfläche wurde als Prozentsatz der osmotischen Fläche (Zelle ohne Schalenanteil) ausgedrückt. Es ergeben sich folgende Berechnungen:

Gesamtfläche	=	gesamte Zellfläche einschließlich Valvae
"osmotische Fläche"	=	gesamte Zellfläche ohne Valvae
Cytoplasma	=	"osmotische Fläche" ohne Vakuolenfläche
Vakuole	=	"osmotische Fläche" ohne Cytoplasmafläche

Diese relativen Ergebnisse der Zellkompartimente wurden auf die Ergebnisse der Volumenbestimmung von *Chaetoceros* sp. übertragen, um eine Aussage über die absoluten Volumina der Zellkompartimente am Gesamtvolumen der Zelle zu erhalten.

Mit den *Navicula* sp.-Ansätzen wurde ähnlich verfahren wie mit denen von *Chaetoceros* sp.. Der Härtegrad von Spurr's Medium war "normal" (DER: 6 g).

Die Ultradünnschnitte wurden zur Bestimmung der Schalendicke im Transmissionselektronenmikroskop verwendet. Aufgrund der unbefriedigenden Schnittqualität wurde die Vakuolenbestimmung dieser Art anhand von mit Methylenblau-gefärbten Semidünnschnitten im Lichtmikroskop durchgeführt. Die aus den Semidünnschnitten angefertigten Dias wurden auf eine feste Leinwand projiziert, die Umrisse der Strukturen auf Papier übertragen, ausgeschnitten und gravimetrisch ausgewertet.

2.3.10. FRI (Fluorescence response index)

Zur Bestimmung der Photosynthesekapazität wurde die Fluoreszenzmessung *in vivo* eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C im Kulturschrank durchgeführt, da Fluoreszenzmessungen temperaturabhängig sind.

Der Boden einer 20 mL-Glas- bzw. Kunststoffküvette wurde mit einem Glasfaserfilter (Whatman GF / F) versehen, der mit 1 mL Medium befeuchtet war. Je nach Zelldichte wurden dann 20 bis 200 µL Algensuspension auf den Filter gegeben und die Fluoreszenz gemessen (F_N). Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 435$ nm. Anschließend wurden 200 µL einer 10^{-4} M DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff)-Lösung als Hemmstoff für das Photosystem II auf den Filter pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 2 min wurde die maximale Fluoreszenz gemessen (F_D). Dieser Meßwert beschreibt die maximale Fluoreszenz der Algen. Der FRI errechnet sich nach der Formel:

$$\text{FRI} = \frac{F_D - F_N}{F_D}$$

FRI = Fluorescence response index

F_D = maximale Fluoreszenz nach Zugabe von DCMU

F_N = Fluoreszenz vor Zugabe von DCMU

Der dimensionslose FRI liegt zwischen 0 und 1. Wenn der FRI den Wert 0 annimmt, liegt keine Photosynthese vor; beträgt er 1, so werden die Elektronen zu 100 % gelöscht ("gequencht") und optimal zur Photosynthese genutzt. Je höher der FRI ist, desto größer ist die Photosynthesekapazität. Der FRI stellt somit ein Maß für die Photosynthesekapazität dar.

3. Wachstum und Zellvolumina der Stammkulturen

3.1. Ergebnisse

3.1.1. Wachstum und Populationsdichte

Die Abb. 5 und 6 zeigen die Wachstumskurven von *Chaetoceros* sp. bei 5 und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und von *Navicula* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

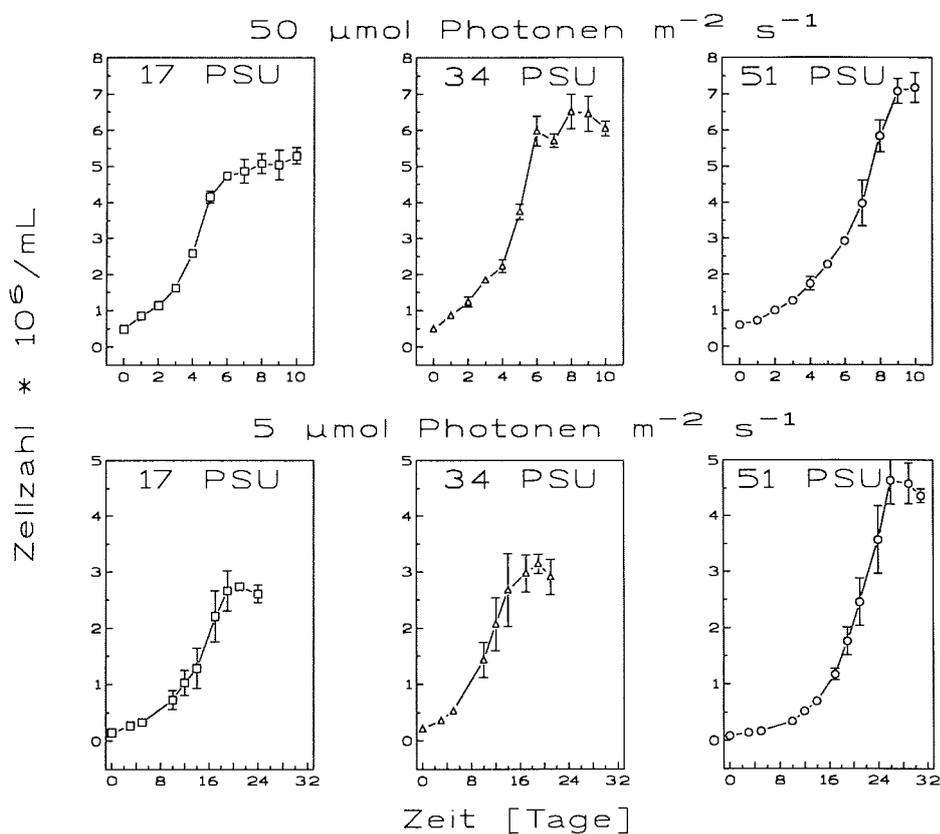


Abb. 5: Wachstumskurven von *Chaetoceros* sp. in Abhängigkeit von der Salinität bei 4 °C und zwei Lichtintensitäten: 5 und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

Die lag-Phasen waren für beide Arten bei 51 PSU am längsten. Bei *Chaetoceros* sp. stieg die maximale Zellzahl unter beiden Lichtintensitäten mit zunehmender Salinität an: von 5,29 bis 7,18 $\times 10^6$ Zellen/mL (Tab. 1). Im Schwachlicht halbierte sich die maximale Zellzahl nahezu im Vergleich zum Starklicht (von 2,74 bis 4,64 $\times 10^6$ Zellen / mL). Für *Navicula* sp. war nur eine geringfügige Zellzahl-Schwankung im Starklicht auszumachen. Betrug die maximale Zellzahl bei

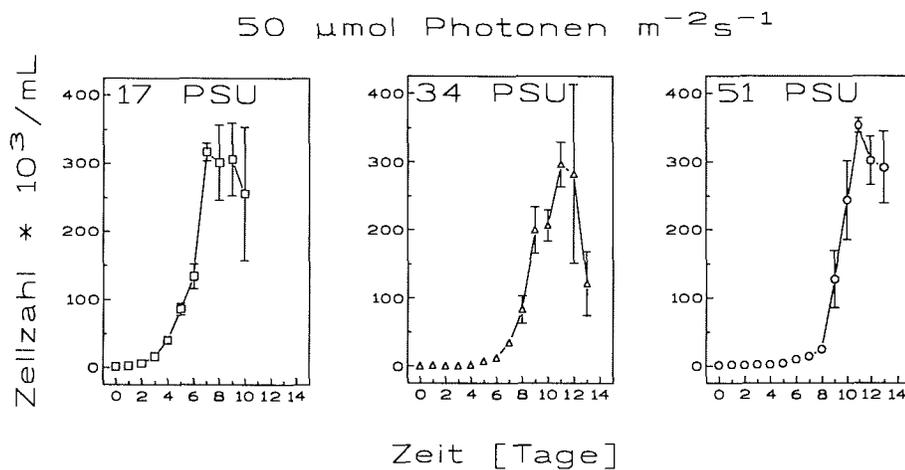


Abb. 6: Wachstumskurven von *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Salinität bei 4 °C und 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

17 PSU $0,32 \times 10^6$ Zellen / mL, so sank sie bei 34 PSU auf $0,3 \times 10^6$ Zellen / mL, um auf $0,35 \times 10^6$ Zellen bei 51 PSU anzusteigen.

Schwachlichtkurven von *Navicula* sp. konnten nicht ermittelt werden, da diese Art zur "Mattenbildung" neigte. Die Algen aggregierten in einer gelartigen Matrix auf dem Boden des Kulturgefäßes, so daß eine Zellzählung unmöglich war. Für Versuche mit *Navicula* sp. unter dieser Lichtintensität wurden daher nur Kulturen geringer Zelldichte eingesetzt.

Tab. 1: Populationsdichte von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Lichtintensität und Salinität. Alle Angaben in Zellen $\times 10^6$ / mL, sofern nicht anders angegeben. Für *Navicula* sp. wurden keine Schwachlichtwerte ermittelt. Es sind die Mittelwerte dargestellt ($n = 4$).

Salinität [PSU]	<i>Chaetoceros</i> sp.		<i>Navicula</i> sp.
	50 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$	5 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$	50 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$
17	5,29	2,74	0,32
34	6,52	3,14	0,30
51	7,18	4,64	0,35

Zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit in der logarithmischen Phase wurden aus den Daten der Wachstumskurven die spezifischen Wachstumsraten μ und die Verdoppelungszeit t_D errechnet (Tab. 2).

Tab. 2: Spezifische Wachstumsraten (Mittelwerte, n = 4) von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Salinität.

Art	Salinität [PSU]	Lichtintensität [$\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$]	Wachstumsrate μ [Teilung/Tag]	Verdopplungszeit t_D [h]
<i>Navicula</i> sp.	17	50	0,86	19
<i>Navicula</i> sp.	34	50	0,88	19
<i>Navicula</i> sp.	51	50	0,89	19
<i>Chaetoceros</i> sp.	17	50	0,47	35
<i>Chaetoceros</i> sp.	34	50	0,49	34
<i>Chaetoceros</i> sp.	51	50	0,30	56
<i>Chaetoceros</i> sp.	17	5	0,15	115
<i>Chaetoceros</i> sp.	34	5	0,16	107
<i>Chaetoceros</i> sp.	51	5	0,16	104

Die Wachstumsraten von *Navicula* sp. stiegen bei zunehmender Salinität geringfügig an. Sie waren bei 17 und 34 PSU ca. doppelt so groß wie die von *Chaetoceros* sp. bei derselben Lichtintensität, während sie bei 51 PSU ca. den Faktor 3 erreichten. Die Wachstumsraten von *Chaetoceros* sp. lagen unter vergleichbarer Lichtintensität bei 34 PSU am höchsten. Dabei waren sie im Schwachlicht unter allen Salinitäten nahezu gleich groß, während unter Starklicht und 51 PSU ein starker Abfall ($\mu = 0,30$) zu beobachten war. Der Vergleich der *Chaetoceros* sp.-Wachstumsraten im Stark- und Schwachlicht ergibt einen Faktor von 2-3.

3.1.2. Absolute Zellvolumina

Die Zellen der Stammkulturen zeigten ein weites Größenspektrum der Pervalvarachse und der beiden Durchmesser der in der Valvaransicht ellipsoid geformten Algen (Tab. 3).

Tab. 3: Lichtmikroskopische Zellgrößenbestimmung mittels Image-Analyse von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Salinität bei 50 und 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Die fettgedruckten Zahlen geben die Mittelwerte, die Zahlen in Klammern die Minima und Maxima an. Alle Zellgrößenangaben in μm . LI = Lichtintensität in $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. PA = Pervalvarachse. AA = Apikalachse. TA = Transapikalachse. Vol. = absolutes Zellvolumen, errechnet nach der Formel: $\text{Vol.} [\mu\text{m}^3] = \text{PA} \times (\text{AA}/2) \times (\text{TA}/2) \times \pi$ (Edler, 1979). stationär = Zellen der beginnenden stationären Phase der Kultur, abnehmende Zellzahl.

	Meßgröße	LI	17 PSU	34 PSU	51 PSU
<i>Chaetoceros</i> sp.	PA		7,8 (4,2-11,8)	8,4 (4,2-12,4)	7,2 (3,7-11,1)
	AA	50	4,2 (1,9-5,5)	3,9 (2,0-4,6)	3,7 (2,1-5,0)
	TA		3,1 (1,7-4,3)	2,9 (1,8-3,7)	2,7 (1,7-3,6)
	Vol.		78	73	58
<i>Chaetoceros</i> sp.	PA		7,3 (4,5-14,2)	7,4 (4,9-12,4)	7,2 (4,6-12,7)
	AA	5	3,3 (2,2-4,5)	3,4 (2,4-5,1)	3,4 (1,7-5,1)
	TA		2,4 (2,1-3,0)	2,3 (1,9-3,3)	2,5 (2,1-3,5)
	Vol.		45	47	48
<i>Chaetoceros</i> sp. stationär	PA		8,9 (4,5-18,3)	8,0 (4,6-13,4)	8,0 (4,1-13,0)
	AA	5	3,5 (2,6-5,1)	3,5 (2,6-5,7)	3,5 (2,1-4,9)
	TA		2,4 (2,0-3,2)	2,3 (1,8-3,0)	2,5 (1,6-3,1)
	Vol.		59	50	53
<i>Navicula</i> sp.	PA		5,9 (4,0-7,7)	6,4 (4,5-7,7)	6,4 (4,5-8,0)
	AA	50	9,6 (8,2-10,9)	9,2 (7,7-10,2)	10,4 (9,2-11,6)
	TA		6,4 (5,4-7,1)	6,4 (5,9-7,3)	6,7 (5,8-7,2)
	Vol.		286	296	349

Logarithmische Kulturen:

Die mittleren Werte für die Apikalachse und Transapikalachse sanken bei *Chaetoceros* sp. und 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ mit ansteigender Salinität, während für die Pervalvarachse keine Tendenz auszumachen ist. Im Schwachlicht sind für diese Art keine nennenswerten Unterschiede in den Meßgrößen zu erkennen. Alle Meßwerte für die drei Meßgrößen waren im Starklicht größer oder gleich groß wie die im Schwachlicht. Die größten Differenzen zwischen Minimum und Maximum traten unter beiden Lichtregimen in der Pervalvarachse auf: bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ und 34 PSU (8,2 μm) bzw. 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ und 17 PSU (9,7 μm).

Von 17 auf 34 PSU stieg bei *Navicula* sp. die Pervalvarachse von 5,9 auf 6,4 μm an, während die Apikalachse nahezu konstant blieb. Die Apikal- und Transapikal-

achsen stiegen von 34 auf 51 PSU an, was zu der deutlichen Volumenerhöhung bei *Navicula* sp. unter der höchsten Salinität führte. Die größte Differenz zwischen Minimum und Maximum lag auch bei dieser Art in der Pervalvarachse (3,7 μm bei 17 PSU).

Stationäre *Chaetoceros* sp.-Kulturen:

Die zu Beginn der stationären Phase mit leicht abnehmender Zellzahl gemessenen Zellvolumina stiegen gegenüber den Werten der logarithmischen Phase leicht an. Die Salinität zeigte auch hier keine einheitliche Tendenz.

Die absoluten Zellvolumina von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp.:

Im Starklicht nahm das Volumen bei *Navicula* sp. mit steigender Salinität zu, während es bei *Chaetoceros* sp. sank. Die Zellvolumina von *Chaetoceros* sp. im Schwachlicht waren bei allen drei Salinitäten deutlich kleiner als im Starklicht. Sie unterschieden sich im Schwachlicht nur noch geringfügig voneinander. Zu Beginn der stationären Wachstumsrate, also bei Verringerung der Zelldichte, nahm das Volumen für alle *Chaetoceros* sp.- Kulturen im Schwachlicht wieder zu.

3.1.3. Osmotische Zellvolumina und Vakuolenanteile

Zur Bestimmung der Vakuolenanteile wurden für *Chaetoceros* sp. transmissions-elektronenmikroskopische und für *Navicula* sp. lichtmikroskopische Aufnahmen herangezogen (Abb. 7 und 8). Während *Chaetoceros* sp. mehrere kleine Vakuolen oder eine verzweigte Vakuole besitzt, weist *Navicula* sp. eine größere Vakuole auf. Tab. 4 zeigt die relativen Anteile der Valvae und der Zellkompartimente am osmotischen Volumen der Zelle. Der Schalenanteil lag für beide Arten zwischen 7 und 10 % des Gesamtzellvolumens. Die Cytoplasma- und Vakuolenvolumina von *Chaetoceros* sp. schwankten bei unterschiedlicher Salinität, ohne daß eine eindeutige Tendenz festzustellen war. Bei Meerwassersalinität war die Vakuole am kleinsten, während sie bei erhöhter bzw. erniedrigter Salinität an Größe zunahm. Der Vakuolenanteil von *Navicula* sp. war im Durchschnitt 11 % größer als der von *Chaetoceros* sp. und unter allen Salinitäten konstant. Der mit der Salinität geringfügig schwankende Schalenanteil beider Arten war unbedeutend.

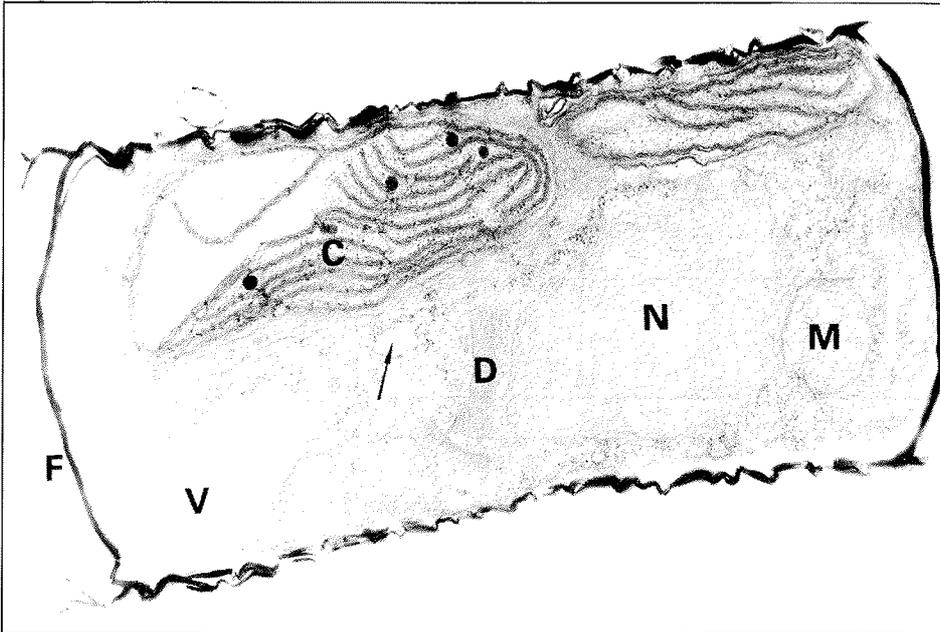


Abb. 7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Chaetoceros* sp. (32000 x). N = Nucleus, V = Vakuole, D = Dictyosom, C = Chloroplast, F = Frustulum (Schale), M = Mitochondrium. Der Pfeil deutet auf eine weitere Vakuole bzw. einen verzweigten Vakuolenanteil.

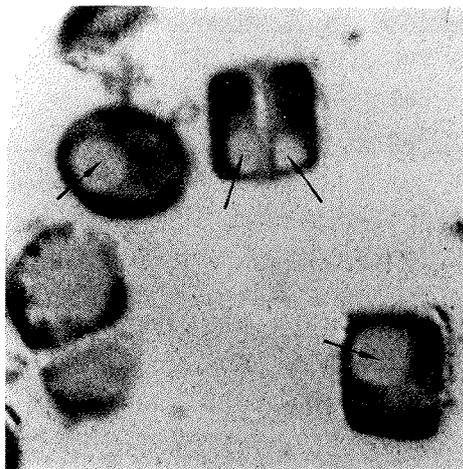


Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit Methylenblauangefärbten Semidünnschnitts von *Navicula* sp. (1700 x). Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Vakuole der Zellen.

Tab. 4: Relative Anteile der Zellkompartimente am osmotischen Zellvolumen für *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Salinität bei einer Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Cytoplasma (CP) und Vakuole (Vak.) sind als prozentuale Anteile vom osmotischen Zellvolumen (Zellvolumen abzüglich Schalenanteil) angegeben. Zur Ermittlung der Werte wurden für *Chaetoceros* sp. TEM-Aufnahmen (17 PSU: n = 15; 34 PSU: n = 7; 51 PSU: n = 16) und für *Navicula* sp. mit Methylenblau angefärbte Semidünnschnitte eingesetzt (n = 80). Alle Angaben in [%], wenn nicht anders angegeben.

Salinität [PSU]	<i>Chaetoceros</i> sp.			<i>Navicula</i> sp.		
	Valve	CP	Vak.	Valve	CP	Vak.
17	9	83	17	10	75	25
34	8	92	8	9	73	27
51	10	79	21	7	75	25
Mittelwert	9	85	15	9	74	26

Aus den absoluten Zellvolumina und dem relativen Schalenanteil am Gesamtzellvolumen ergeben sich die osmotischen Volumina, die für die Konzentrationsangaben der Osmolyte zugrunde gelegt wurden (Tab. 5).

Tab. 5: Osmotische Zellvolumina von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in der logarithmischen Wachstumsphase, errechnet aus dem absoluten Zellvolumen abzüglich Schalenanteil. Alle Angaben in μm^3 , sofern nicht anders angegeben.

Salinität [PSU]	<i>Navicula</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp.	
	50 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$	50 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$	5 $\mu\text{mol Phot.}/\text{m}^2\text{s}$
17	260	72	41
34	269	66	43
51	318	54	44

3.2. Diskussion

3.2.1. Wachstum und Populationsdichte

Die Kultivierungstemperatur von 4 °C wurde aufgrund von Literaturdaten gewählt. Generell gilt der Temperaturbereich von 3 bis 8 °C (Bunt, 1968) bzw. 3 bis 5 °C (Fiala und Oriol, 1990) in Bezug auf das Wachstum antarktischer Diatomeen als optimal. Dabei bewirken unterschiedliche Lichtintensitäten keine Verschiebung des Optimums. Sie haben nur einen quantitativen Einfluß auf das Wachstum (Fiala und Oriol, 1990). Dieser quantitative Einfluß schlägt sich auch bei *Chaetoceros* sp. nieder. Im Schwachlicht nahmen die Wachstumsraten um die Hälfte (17 und 34 PSU) bzw. 2/3 (bei 51 PSU) gegenüber dem Starklicht ab. Diese Tendenz wird durch die Untersuchung einer kleinzelligen *Chaetoceros*-Art bestätigt (Thomas et al., 1992). Die absoluten Werte für die Verdopplungszeit dieser Art liegen unter vergleichbaren Lichtintensitäten bei 49 h (5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) und 19 h (55 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) deutlich niedriger als die Werte dieser Arbeit (Tab. 2). Der Unterschied ist möglicherweise auf unterschiedliche Lichtzyklen zurückzuführen. Die Algen der zitierten Arbeit wurden Dauerlicht ausgesetzt, während die Stammkulturen für die hier beschriebenen Versuche in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 h beleuchtet wurden. In der Publikation über die Kultivierung unter Feldbedingungen von marinem Phytoplankton wird die Verdopplungszeit einer kleinzelligen *Chaetoceros*-Art (Valvendurchmesser < 10 μm) bei -1 °C und 45 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ im Dauerlicht mit 20,2 h angegeben (Spies, 1987). Auch dieser Wert liegt deutlich unter dem hier gemessenen (34 h). Multipliziert man die Daten der Tab. 2 mit dem Faktor 2, um sie mit den Dauerlichtergebnissen zu vergleichen, werden ähnliche Wachstumsraten erreicht wie in den zitierten Arbeiten. Der Vergleich von Wachstumsraten unter unterschiedlichem Licht-Dunkel-Wechsel ist jedoch gerade bei Planktonorganismen fragwürdig. So ist bekannt, daß planktische Diatomeen bei kurzem Licht-Dunkel-Rhythmus eine höhere Produktivität als im Dauerlicht zeigen (Mortain-Bertrand, 1989).

Die Wachstumsraten bei Meerwassersalinität (34 PSU) einer Reihe anderer Diatomeenarten schwanken je nach Art und Kulturbedingungen (Lichtintensität, Lichtzyklus und Temperatur) zwischen 0,4 und 0,5 (Bartsch, 1989), 0,6 und 0,8 (Vargo et al., 1986) und 0,38 bis 1,33 (Spies, 1987). Die Wachstumsraten von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. stimmen mit 0,49 bzw. 0,87 Teilungen / Tag gut mit dem oben angegebenen Bereich überein. *Chaetoceros* sp. ist als langsam wachsende, *Navicula* sp. als schnell wachsende Art zu charakterisieren. Die Literatur ist in der Frage der Wachstumsgeschwindigkeit in Bezug auf die

Zellgröße widersprüchlich. Das vorliegende Ergebnis steht im Gegensatz zu denen einer Untersuchung von insgesamt 19 marinen und Brackwasserdiatomeen (Mizuno, 1991). Danach nimmt die maximale Wachstumsrate mit steigendem Zellvolumen ab, während in dieser Arbeit die größere Art schneller als die kleinere Art wächst. Allerdings wurden zu der zitierten Untersuchung nur Arten mit einem Zellvolumen von $600 \mu\text{m}^3$ bis $75400 \mu\text{m}^3$ herangezogen, was einem Vielfachen der beiden hier untersuchten Arten entspricht (Tab. 3). Es liegt aber auch eine Arbeit über pennate Diatomeen vor, die das schnellere Wachstum großzelliger gegenüber kleinzelligen Arten belegt (Williams, 1964).

Im hypoosmotischen Bereich (17 PSU), der den Salzgehalt bei der Eisschmelze im antarktischen Frühjahr und Sommer simulieren sollte, sind für beide Eisdiatomeen keine verringerten Wachstumsraten festzustellen. Dies wird bestätigt durch eine Untersuchung der arktischen Diatomeen *Coscinodiscus lacustris*, *Melosira juergensii*, *Porosira glacialis* und *Navicula transitans*, die ein gleichmäßiges Wachstum in einem weiten Salinitätsbereich von 10 PSU (*N. transitans*: 15 PSU) bis 50 PSU aufwiesen (Grant und Horner, 1976). Die Untersuchung von 8 antarktischen, nicht langfristig-adaptierten Eisdiatomeen, ergab ein klar vermindertes Wachstum im unteren Salinitätsbereich. 6 *Nitzschia*- und 2 *Amphiprora*-Arten zeigten ab 19,5 PSU ein ansteigendes Wachstum und hatten zwischen 25,5 PSU und der Endsalinität des Versuchs von 31,5 PSU ihre Optima (Vargo et al., 1986). Dieselben Autoren fassen den Salinitätsbereich des Oberflächenwassers während der Eisschmelze aus Literaturdaten mit 3 bis 20 PSU zusammen. Als Extremwert, bei dem noch Wachstum im hypoosmotischen Bereich zu messen ist, werden 5 PSU angegeben (Grant und Horner, 1976). Bunt (1964) stellte bei Eisplättchen-algen eine hohe Photosyntheseaktivität zwischen 7,5 und 10 PSU fest. Ob die Algen unter diesen Bedingungen noch wachsen bzw. Photosyntheseaktivität zeigen, ist wahrscheinlich eine Frage der Adaptationsdauer der Algen an die veränderte Salinität (Palmisano et al., 1987). In Vorversuchen zum Wachstumsbereich in Abhängigkeit von der Salinität konnte für *Chaetoceros* sp. eine Wachstumsgrenze von 10 PSU ermittelt werden. Beide untersuchten Arten können sich mit unveränderter Wachstumsrate bei halber Meerwassersalinität teilen und sind somit zumindest an schwach hypoosmotische Bedingungen angepaßt.

Bei 51 PSU nimmt die Wachstumsrate von *Chaetoceros* sp. gegenüber der von 34 PSU um ca. $\frac{1}{3}$ ab, während die von *Navicula* sp. konstant bleibt. Somit ist *Navicula* sp. besser an hohe Salinitäten adaptiert als *Chaetoceros* sp.. Dies steht

im Gegensatz zu den Untersuchungen an 4 arktischen Diatomeen (Grant und Horner, 1976) und 8 antarktischen Diatomeen (Vargo et al., 1986), in denen bei 50 PSU noch keine deutliche Verminderung der Wachstumsraten auftrat. In Versuchen mit gekoppelter Salinitätserhöhung und Temperaturerniedrigung konnte nachgewiesen werden, daß die Abnahme der Wachstumsraten der Eisdiatomeen *Entomoneis (Amphiprora) kufferathii*, *Nitzschia cylindrus* und *Thalassiosira antarctica* im Bereich von 34 bis 100 PSU linear und in erster Linie auf die Salinitätserhöhung zurückzuführen ist (Bartsch, 1989). Das obere Limit für die Salinität, unter der bisher noch Wachstum gemessen werden konnte, wird für die psychrophile Art *Nitzschia frigida* mit 145 PSU bei einer Temperatur von -8 °C angegeben (Aletsee und Jahnke, 1992). Die Autoren gehen von einer erhöhten Salztoleranz bei sinkender Temperatur aus. Möglicherweise kann die Salztoleranz von *Chaetoceros* sp. durch die Anpassung an niedrige Temperaturen gesteigert werden. Daß kleinzellige *Chaetoceros*-Arten wie *Chaetoceros neogracile* unter tiefsten Temperaturen und höchster Salinität überleben können, zeigt das Vorkommen dieser Art im oberen Eissäulenbereich (Bartsch, 1989). Ob diese Art nicht nur überlebt, sondern auch unter diesen Bedingungen wächst, ist zumindest aufgrund der vorliegenden Wachstumsergebnisse unwahrscheinlich. Diese Frage wird aber im Kapitel zur Dunkelinkubation eingehend diskutiert (Kap. 5.2.).

Die Verringerung des Wachstums von *Chaetoceros* sp. ist wahrscheinlich auf die Erhöhung der K⁺-Konzentration und die Synthese bzw. Regulation von organischen Osmolyten zurückzuführen, die bei erhöhter Salinität vermehrt synthetisiert werden (Munns et al., 1983). Der nochmalige Abfall der Wachstumsraten auf ein nahezu einheitliches Niveau bei einer Lichtintensität von 5 µmol Photonen / m² s zeigt, daß die Salinität unter Schwachlicht keinen Einfluß mehr auf die Wachstumsrate hat. Auffallend ist, daß die maximale Zelldichte bei *Chaetoceros* sp. sowohl im Starklicht als auch im Schwachlicht bei 51 PSU zu messen war. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Grant und Horner (1976), die ebenfalls in diesem Salinitätsbereich (50 PSU) das Maximum fanden. Die Erläuterung dieses Befundes wird in der Diskussion zu den Volumenbestimmungen weiter ausgeführt.

3.2.2. Absolute Zellvolumina

Hinsichtlich der Untersuchungen von *Chaetoceros* sp. kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Einfluß der jeweils unterschiedlichen durchschnittlichen Zellgrößen auf die physiologischen Eigenschaften der Art eine Rolle gespielt hat, wie er in Synchronkulturen von *Coscinodiscus asteromphalus* nachgewiesen wurde

(Werner, 1971b). Eine Differenzierung hätte Synchronkulturen dieser kleinzelligen und schwer zu isolierenden Art vorausgesetzt. Während der dreijährigen Kultivierung der Arten *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. konnte außerdem keine sexuelle Fortpflanzung beobachtet werden. Dies ist für Laborkulturen nicht ungewöhnlich, weil sich in der Regel immer nur ein kleiner Teil der Population in der Gametogenese befindet und die Zellen leicht übersehen werden können (Furnas, 1985). Außerdem hat das Studium von Laborkulturen den Nachteil, daß dort Anomalitäten in der Schalenbildung - gerade im unteren Größenbereich - auftreten, die in der Natur selten beobachtet worden sind (Round et al., 1990). Da sich während der drei Monate dauernden Vermessung der Art keine meßbaren Schwankungen in der Zelldurchschnittsgröße ergaben, muß entweder von einer sehr geringen Reduktionsrate der Zellen oder von einer asexuellen Zellvergrößerung ausgegangen werden. Untersuchungen an wahrscheinlich derselben Art zur Effektivität der Kohlenstoffassimilation zeigen auch keine Zellverkleinerung bei vorheriger Adaptation von 5 Tagen (Thomas et al., 1992). Für Salz- und Brackwasserdiatomeen ist eine sich mit abnehmender Zellgröße ebenfalls verringernde Reduktionsrate nachgewiesen worden (Stosch und Drebes, 1964; Mizuno, 1991). Für die asexuelle Zellvergrößerung werden in der Literatur drei Mechanismen beschrieben:

- 1) Ausbildung von kurzen Valven bei großen Zellen und von langen Valven bei kleinen Zellen wie dies bei *Stephanopyxis turris* (Centrales) beobachtet wurde (van den Hoek, 1993).
- 2) Ausgleich der Zellverkleinerung durch elastische Gürtelbänder (Geitler, 1932; Round et al., 1990).
- 3) Ausscheidung von Cytoplasma ins umgebende Medium bei Nährstoffmangel, bevor eine neue große Schale aufgebaut wird (Drebes, 1966; Gallagher, 1983). Diese Form der Zellvergrößerung tritt bei *Leptocylindrus danicus* und bei Arten auf, die die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung verloren haben (French und Hargraves, 1986).

Falls tatsächlich eine vegetative Zellvergrößerung vorgelegen haben sollte, kann Punkt 2 aufgrund der TEM-Aufnahmen nicht eindeutig beurteilt werden. Möglicherweise stellen die "gewellten" Schalenstrukturen elastische Gürtelbänder dar (Abb. 7). Zur genaueren Beurteilung wären rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen hilfreich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht angefertigt wurden. Eine Cytoplasmaausscheidung (Punkt 3) wurde nicht in den Kulturen beobachtet. Als wahrscheinlichste Erklärung für eine mögliche Kompensation der Zellgrößenverkleinerung stellt für beide Arten die Ausbildung einer größeren Pervalvarachse

(längere Valvenmäntel) mit kleiner werdenden Apikal- und Transapikalachsen dar, die durch die große Variabilität in der Pervalvarachse zum Ausdruck kommt (Tab. 3).

Unter Starklicht verringert *Chaetoceros* sp. die Apikal- und Transapikalachsen. Die Zellen werden kleiner. Der Salzgehalt kontrolliert also die Zellgröße bzw. das Zellvolumen. Im Schwachlicht hat die erhöhte Salinität keinen zusätzlichen Effekt. Die durchschnittliche Zellgröße hat unter dieser Lichtintensität anscheinend ein Minimum erreicht. Der Hauptunterschied für die deutlich geringeren Schwachlichtvolumina liegt in den größeren Werten der Pervalvarachse im Starklicht. Erhöhte Salinität hat auf *Navicula* sp. den gegenteiligen Effekt wie auf *Chaetoceros* sp.: Die Zellgröße bzw. das Zellvolumen steigt an. Untersuchungen unter Schwachlicht wurden bei dieser Art nicht durchgeführt.

Die *Chaetoceros*-Ergebnisse stimmen gut mit Literaturdaten überein. Bei 6 Phytoplankton-Diatomeen nahm mit sinkender Lichtintensität das Volumen zwischen 23 und 72 % ab (Thompson et al., 1991). Die Autoren führen die Volumenunterschiede ebenfalls auf Änderungen in der Pervalvarachse zurück. Der Vergleichswert dieser Untersuchung (34 PSU) liegt mit 36 % in der unteren Region des angegebenen Bereichs. Allerdings wurde in der zitierten Arbeit ein Lichtintensitätsbereich von 4,5 bis 225 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ abgedeckt, während die eigene Untersuchung nur den Bereich von 5 bis 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ wiedergibt. Der Lichtsättigungspunkt ist erst bei ca. 70 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ erreicht (Nothnagel und Wanzek, 1989). Bei Erhöhung der Lichtintensität wäre dieser Effekt möglicherweise noch deutlicher hervorgetreten. Aus den Ergebnissen kann auf eine überwiegende Kontrolle des Zellvolumens durch den Kohlenstoffmetabolismus geschlossen werden, da dieser mit sinkender Lichtintensität abnimmt (Thompson et al., 1991; Joint et al., 1987).

3.2.3. Osmotische Zellvolumina und Vakuolenanteile

Chaetoceros sp. bildet, wie viele zentrische und rapheöse pennate Diatomeen, mehrere kleine Vakuolen ohne charakteristische Form aus (Round et al., 1990). Während die große Zentralvakuole von *Navicula* sp. lichtmikroskopisch gut zu erkennen ist, ist man bei *Chaetoceros* sp. auf TEM-Aufnahmen angewiesen. Die Vakuolenanteile der untersuchten Diatomeen von 15 % für *Chaetoceros* sp. und 26 % für *Navicula* sp. liegen deutlich unter denen von *Stephanodiscus binderanus* (62 %) und *Fragilaria capucina* (36 %) (Sicko-Goad et al., 1977). Dem Ionengehalt des Vakuolensaftes der zumeist extensiven Vakuolen planktischer, mariner Diatomeenarten wird eine wichtige Funktion zur Regulation der Schwebefähigkeit zugesprochen (Round et al., 1990). Diese Frage wird bei der Diskussion der Ionengehalte der Eisalgen nochmals aufgegriffen. Für die gemessenen Osmolyte bedeuten die geringen Vakuolenanteile bzw. großen Cytoplasmaanteile am osmotischen Volumen der Zelle, daß sie sehr hohe Gehalte aufweisen müssen, um als kompatible Substanzen wirksam zu sein. Sie können ihre verträgliche Wirkung nur im Cytoplasma entfalten, wo sie wahrscheinlich überwiegend kompartimentiert sind (Kirst, 1990).

Die planktische Art *Chaetoceros* sp. paßt sich an erhöhte Salinität und verringerte Lichtintensität mit der Verringerung der Zelldurchschnittsgröße und der spezifischen Wachstumsrate an. Die Art verringert damit die Konzentration des für den Schalenaufbau erforderlichen Silikats, das als begrenzender Wachstumsfaktor in den Salzlaugenkanälen- und -lakunen auftreten kann (Dieckmann et al., 1991). Es wird ebenfalls die zur Reproduktion erforderliche C-Assimilationsrate erniedrigt. Durch die Erhöhung des Verhältnisses Oberfläche / Volumen ist eine effektivere Nährstoffaufnahme gewährleistet. Außerdem steigert eine geringe Zellgröße die Überlebenschancen im oberen Teil der Eissäule, da hier nicht nur eine hohe Salinität durch Ausfrieren der Sole vorherrscht, sondern damit zusätzlich der Raum zu klein für großzellige Arten wird (Gleitz und Thomas, 1993). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Vermessung der Solenkanäle im Packeis. Es konnte ein mittlerer Durchmesser des antarktischen Weddellmeer-Packeises von ca. 200 µm und ein minimaler von 5 µm bestimmt werden (Weissenberger et al., 1992).

Der mit der abnehmenden Zellgröße zunehmende geringere Bedarf an Nährsalzen (besonders des Silikats) pro Zelle könnte zur mit der Salinität ansteigenden Populationsdichte beigetragen haben. Diese Annahme spiegelt sich in den gemessenen erhöhten Populationsdichten mit steigender Salinität unter Starklicht

wider. Im Schwachlicht gilt die Annahme nicht, denn die Populationsdichte stieg trotz konstanter Zellgröße an. Da kleinzellige *Chaetoceros*-Arten als Frühjahrsblüher im Weddellmeer auftreten (Scharek, 1991), hätten sie bei der Neubesiedlung der Wassersäule nach der Eisschmelze einen Vorsprung vor Arten, die ihre Zelldurchschnittsgröße nicht verringern können. Außerdem haben nur Arten eine Chance, sich in der freien Wassersäule gegenüber konkurrierenden Arten durchzusetzen, wenn sie schon zahlreich in der Eissäule vorhanden sind. Umgekehrt werden sich nur Arten in großen Abundanzen in der Eissäule niederschlagen, wenn sie vorher dominant in der Wassersäule waren (Nöthig, 1988). In beiden Fällen ist die Quantität entscheidend. Der Beitrag, den die Eisalgen zur Wiederbesiedlung der Wassersäule leisten, sollte aber nicht überschätzt werden. Riebesell et al. (1991) gehen von einer schnellen Sedimentation durch Aggregatbildung der aus dem schmelzenden Eis freiwerdenden Algen aus, die zudem einem hohen Fraßdruck ausgesetzt sind. Die Autoren fanden aufgrund von Experimenten zur Aggregation in Rotationstanks artspezifische Aggregationshäufigkeiten. Die Art *Nitzschia cylindrus* und einige Flagellaten aggregierten in geringerem Maße als *Phaeocystis* sp. und *Nitzschia prolongatoides*. Die Aggregatbildung ist hauptsächlich von der "Klebrigkeit" (stickiness) der Zelloberfläche abhängig. So ist zu erwarten, daß die Schleim produzierenden Zellen der in dieser Arbeit untersuchten Art *Navicula* sp., die wahrscheinlich schon im Eis koagulieren, beim Entlassen in die Wassersäule schnell Aggregate bilden und absinken. In den *Chaetoceros* sp.-Kulturen wurde, auch bei großer Zelldichte, keine Schleimbildung oder Koagulation der Zellen beobachtet. Das Potential von *Chaetoceros* sp. zur Wiederbesiedlung der Wassersäule im Frühjahr kann aber nicht abschließend beurteilt werden.

Navicula sp. erhöht im Gegensatz zu *Chaetoceros* sp. das Volumen mit ansteigender Salinität. Die Wachstumsrate bleibt konstant. Allerdings erreicht diese Art - auch bei Berücksichtigung des größeren Zellvolumens (Tab. 3) - nicht eine entsprechend hohe Zelldichte wie *Chaetoceros* sp., wodurch der Selbstbeschattungseffekt minimiert wird, auch wenn man berücksichtigt, daß das Volumen von *Navicula* sp. ein 3-4-faches von dem der planktischen Art beträgt. Durch die hohe Wachstumsrate ist *Navicula* sp. zumindest im Starklicht in Konkurrenz mit z.B. *Chaetoceros* sp. im Vorteil, weil eine größere Anzahl Zellen pro Zeiteinheit produziert und damit das Nährstoffangebot optimal zur Reproduktion der eigenen Art genutzt werden kann. Es liegen leider keine Vergleichsdaten anderer Diatomeenarten hinsichtlich der Variabilität der Zelldurchschnittsgröße mit unterschiedlicher Salinität und Lichtintensität vor. Bei der Vermeidung der Zell-

verkleinerung liegt möglicherweise derselbe Mechanismus wie bei *Chaetoceros* sp. zugrunde.

4. Osmolyte der Stammkulturen

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Ionen

Als maßgebliche Kat- und Anionen konnten K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , Cl^- und SO_4^{2-} bestimmt werden. Ca^{2+} und NO_3^- , die in geringen Konzentrationen zu erwarten gewesen wären, lagen unterhalb der Nachweisgrenzen der eingesetzten Methoden. K^+ war in beiden Diatomeenarten und allen Salinitäten das dominierende Kation (Abb. 9A - 9D).

In *Chaetoceros* sp. stieg die Konzentration dieses Ions nahezu linear mit der Salinität an (Abb. 9A und 9B). Der Korrelationskoeffizient (r) war 0,98 im Starklicht und 0,99 im Schwachlicht. Die Schwachlichtwerte lagen deutlich höher als die im Starklicht. K^+ erreichte ein Vielfaches der beiden anderen Kationen Na^+ und Mg^{2+} ($403 : 53 : 45 \text{ mol / m}^3$), was einem Verhältnis von ca. $8 : 1 : 1$ ($K^+ : Na^+ : Mg^{2+}$) entsprach (Abb.: 9B, bei 51 PSU). Für Na^+ und Mg^{2+} war keine klare Tendenz in Abhängigkeit von der Salinität zu verzeichnen.

Für *Navicula* sp. ergab sich ein anderes Bild (Abb. 9C und 9D). Im Starklicht lag die K^+ -Konzentration bei 34 PSU am höchsten, während sie bei 51 PSU wieder absank ($r = 0,23$). Im Schwachlicht hingegen war ein deutlicher Anstieg der Konzentration dieses Ions mit der Salinität zu messen ($r = 0,91$). Im Schwachlicht und unter hyperosmotischen Bedingungen (51 PSU) wurden deutlich höhere Kationenkonzentrationen erreicht als im Starklicht. In diesem Ansatz und unter 34 PSU im Starklicht lagen die Na^+ -Konzentrationen mit 300 bzw. 147 mol / m^3 am höchsten. Sie überstiegen damit die Na^+ -Konzentrationen von *Chaetoceros* sp. bei weitem. Die Dominanz von K^+ war bei *Navicula* sp. nicht so ausgeprägt wie bei *Chaetoceros* sp. Das maximale Vielfache von $K^+ : Na^+ : Mg^{2+}$ betrug bei 34 PSU im Schwachlicht $232 : 41 : 29 \text{ mol / m}^3$. Das entsprach einem Verhältnis von ca. $6 : 1 : 0,8$ ($K^+ : Na^+ : Mg^{2+}$).

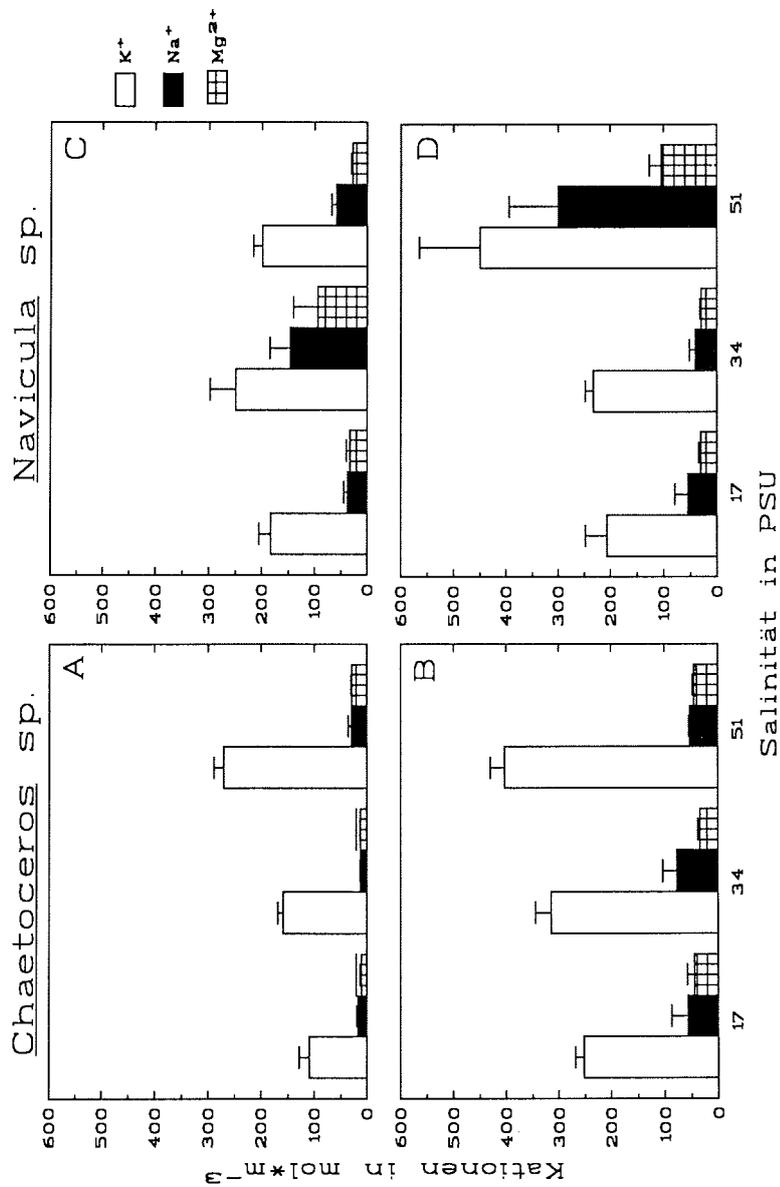


Abb. 9: Kationenkonzentrationen von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Salinität und Lichtintensität. A = *Chaetoceros* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{s}$, B = *Chaetoceros* sp. bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{s}$, C = *Navicula* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{s}$ und D = *Navicula* sp. bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{s}$. Alle Angaben in mol / m^3 . Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

Als Hauptanionen konnten HPO_4^{2-} und Cl^- bestimmt werden. Das SO_4^{2-} spielte eine untergeordnete Rolle (Abb. 10A - 10D). Zur besseren Darstellbarkeit mußten unterschiedliche Skalierungen für die Grafiken der beiden Arten gewählt werden. Bei den Anionen war dieselbe Tendenz zu beobachten wie bei den Kationen: Die Anionenkonzentrationen stiegen bei *Chaetoceros* sp. im Schwachlicht deutlich gegenüber den Konzentrationen im Starklicht an (Abb. 10A und 10B). Bei *Navicula* sp. wurden die höchsten Konzentrationen bei 34 PSU im Starklicht und bei 51 PSU im Schwachlicht erreicht (Abb. 10C und 10D).

Unter hyperosmotischen Bedingungen reicherte *Chaetoceros* sp. überwiegend HPO_4^{2-} an, während *Navicula* sp. höhere Cl^- -Konzentrationen aufwies.

In beiden Arten wurden deutlich geringere Anionen- als Kationenkonzentrationen gemessen. Unter Schwachlicht und 51 PSU ergab sich in Bezug auf die Hauptanionen und K^+ folgendes Bild: Betrug die höchste K^+ -Konzentration von *Chaetoceros* sp. $403 \text{ mol} / \text{m}^3$, so erreichte HPO_4^{2-} nur $76 \text{ mol} / \text{m}^3$. Ähnlich gravierend war der Unterschied bei *Navicula* sp.: Die höchste K^+ -Konzentration lag bei $450 \text{ mol} / \text{m}^3$, während das Cl^- nur einen Wert von $178 \text{ mol} / \text{m}^3$ erreichte.

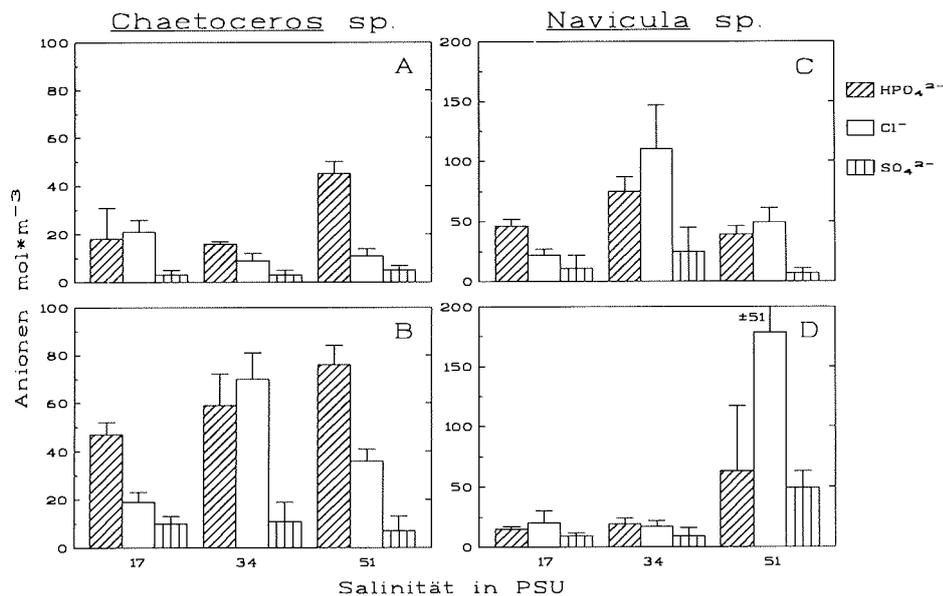


Abb. 10: Anionenkonzentrationen von *Chaetoceros sp.* und *Navicula sp.* in Abhängigkeit von Salinität und Lichtintensität. A = *Chaetoceros sp.* bei 50 μmol Photonen / m² s, B = *Chaetoceros sp.* bei 5 μmol Photonen / m² s, C = *Navicula sp.* bei 50 μmol Photonen / m² s und D = *Navicula sp.* bei 5 μmol Photonen / m² s. Alle Angaben in mol / m³. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

4.1.2. Organische Osmolyte

Folgende organische Verbindungen konnten nachgewiesen werden:

- 16 verschiedene Aminosäuren, darunter Prolin in hohen Konzentrationen
- Homarin als quartäre Ammoniumverbindung
- Die organischen Säuren Citrat, Lactat und eine "Acetat-ähnliche Säure"
- DMSP als tertiäre Schwefelverbindung (nur bei *Navicula sp.*)

Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit und Selektivität der Aminosäure-Bestimmungsmethode konnten 16 verschiedene Aminosäuren bestimmt werden (Abb. 11). Die Iminosäure Prolin trat bei 34 und 51 PSU in einer bis zu 15-fachen Konzentration der übrigen Aminosäuren auf, so daß sie photometrisch bestimmt wurde, um eine starke Verdünnung des Extraktes zu vermeiden. Aus Darstellungsgründen sind die Prolinergebnisse in einer gesonderten Grafik abgebildet (Abb. 12).

Die Prolinkonzentration stieg in beiden Eisalgen nahezu linear mit der Salinität an. Im Starklicht betragen die Korrelationskoeffizienten für den Prolinanstieg in *Chaetoceros sp.* und *Navicula sp.* 0,97 bzw. 0,94, im Schwachlicht 0,98 bzw.

0,94. Bei *Chaetoceros* sp. hielten sich die Stark- und Schwachlichtkonzentrationen die Waage. Die Prolinkonzentrationen von *Navicula* sp. fielen im Schwachlicht bei 34 und 51 PSU auf ca. die halben Starklichtkonzentrationen ab. Die Werte beider Arten lagen bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ in der gleichen Größenordnung. Im hypoosmotischen Bereich (17 PSU) waren die Prolinkonzentrationen (1 bis 15 mol / m^3) beider Diatomeen im Konzentrationsbereich der anderen Aminosäuren (Abb. 11).

Keine der bestimmten Aminosäuren (außer Prolin) erreichte eine höhere Konzentration als 36 mol / m^3 . Die Konzentrationen waren bei *Navicula* sp. in der Regel geringer als bei *Chaetoceros* sp.. Glutamat konnte als dominierende Aminosäure (außer Prolin) für beide Arten bestimmt werden (Abb. 11).

Konzentrationen über 4 mol / m^3 erreichten in *Chaetoceros* sp. noch die Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Glycin, Lysin, Serin und Threonin. Von denen stiegen nur Alanin im Starklicht sowie Arginin, Glutamat und Serin im Schwachlicht mit der Salinität an.

Bei *Navicula* sp. erreichten außer Glutamat nur noch Alanin, Asparagin, Glycin und Threonin die 4 mol / m^3 -Konzentrationsmarke. Alanin stieg im Stark- und Schwachlicht, Glutamat nur im Schwachlicht mit der Salinität an.

Prolin und mit Abstand Glutamat, beides Aminosäuren der Glutamatfamilie, waren die Hauptaminosäuren. Die Alaninkonzentration wurde ebenfalls von der Salinität kontrolliert.

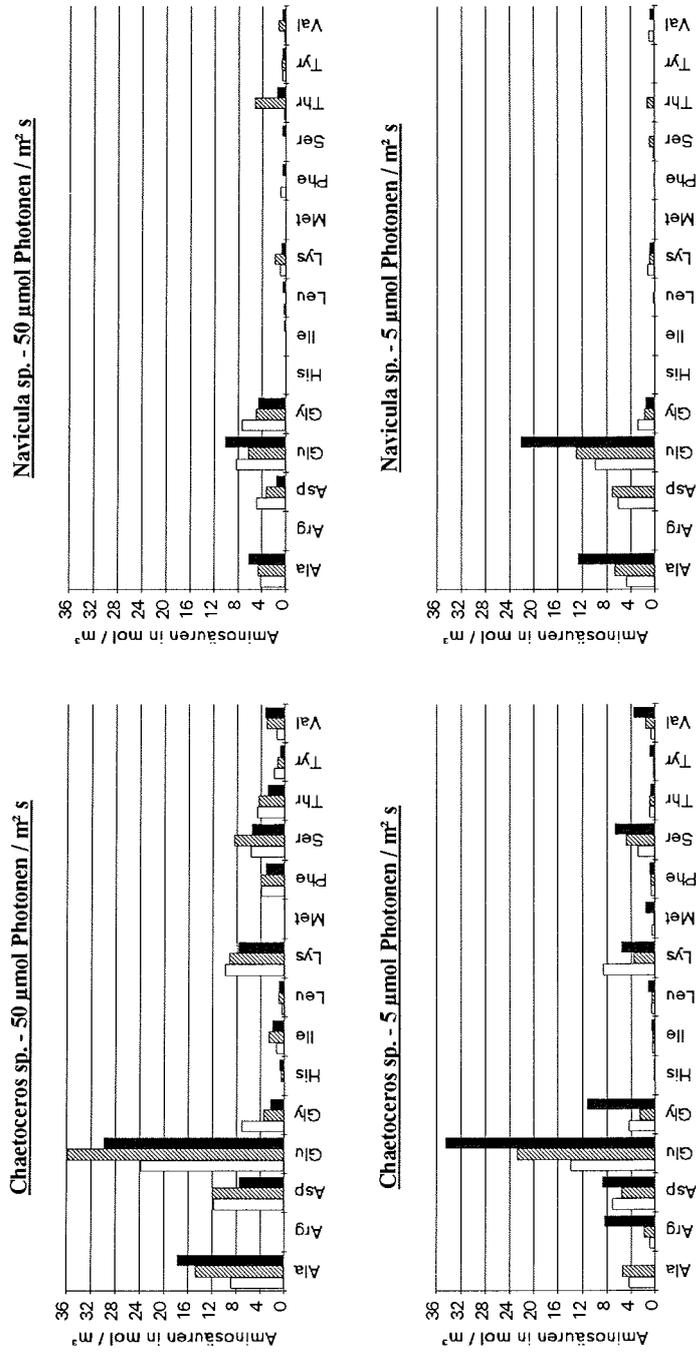


Abb. 11: Aminosäurekonzentrationen von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von Salinität und Lichtintensität. Alle Angaben in mol / m³. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4). Weiße Balken = 17 PSU, schraffierte Balken = 34 PSU und schwarze Balken = 51 PSU.

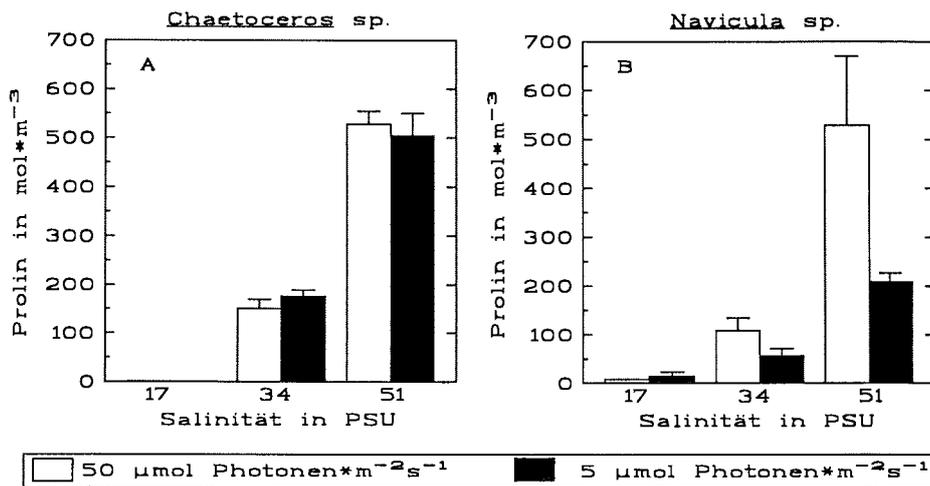


Abb. 12: Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von Salinität und Lichtintensität. Alle Angaben in mol / m³. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

Eine "Acetat-ähnliche" organische Säure trat in hohen Konzentrationen auf. Sie besaß dieselbe Retentionszeit wie die Eichsubstanz Acetat, konnte aber nicht mit einem Enzymtest (Boehringer Acetat-Test: UV-Test bei 340 nm) verifiziert werden. Citrat und Lactat traten als schwach konzentrierte Säuren ebenfalls auf (Abb. 13). Im Starklicht waren deutlich höhere Konzentrationen der unbekanntenen Säure zu messen als im Schwachlicht (unterschiedliche Skalierung in der Abb. 13). Unter einer Lichtintensität von 50 μmol Photonen / m² s und 34 PSU waren sie mit 568 mol / m³ bei *Chaetoceros* sp. (Abb. 13A) und 498 mol / m³ bei *Navicula* sp. (Abb. 13C) am höchsten, während sie im hypo- und hyperosmotischen Bereich deutlich abfielen. Die Konzentration der unbekanntenen organischen Säure stieg in *Navicula* sp. im Schwachlicht nahezu linear mit der Salinität an (r = 0,97) (Abb. 13D), im Gegensatz zur Art *Chaetoceros* sp., in der die Konzentration von 34 auf 51 PSU abfiel (Abb. 13B). Dabei lagen die Werte von *Navicula* sp. für 17 und 34 PSU deutlich unter denen von *Chaetoceros* sp..

Citrat und Lactat nahmen im Verhältnis zur unbekanntenen Säure im Schwachlicht zu. Citrat trat mit dem Maximalwert von 36 mol / m³ sowohl bei *Chaetoceros* sp. als auch bei *Navicula* sp. im Schwachlicht auf, während die höchste Lactatkonzentration von 41 mol / m³ in *Navicula* sp. im Starklicht gemessen wurde.

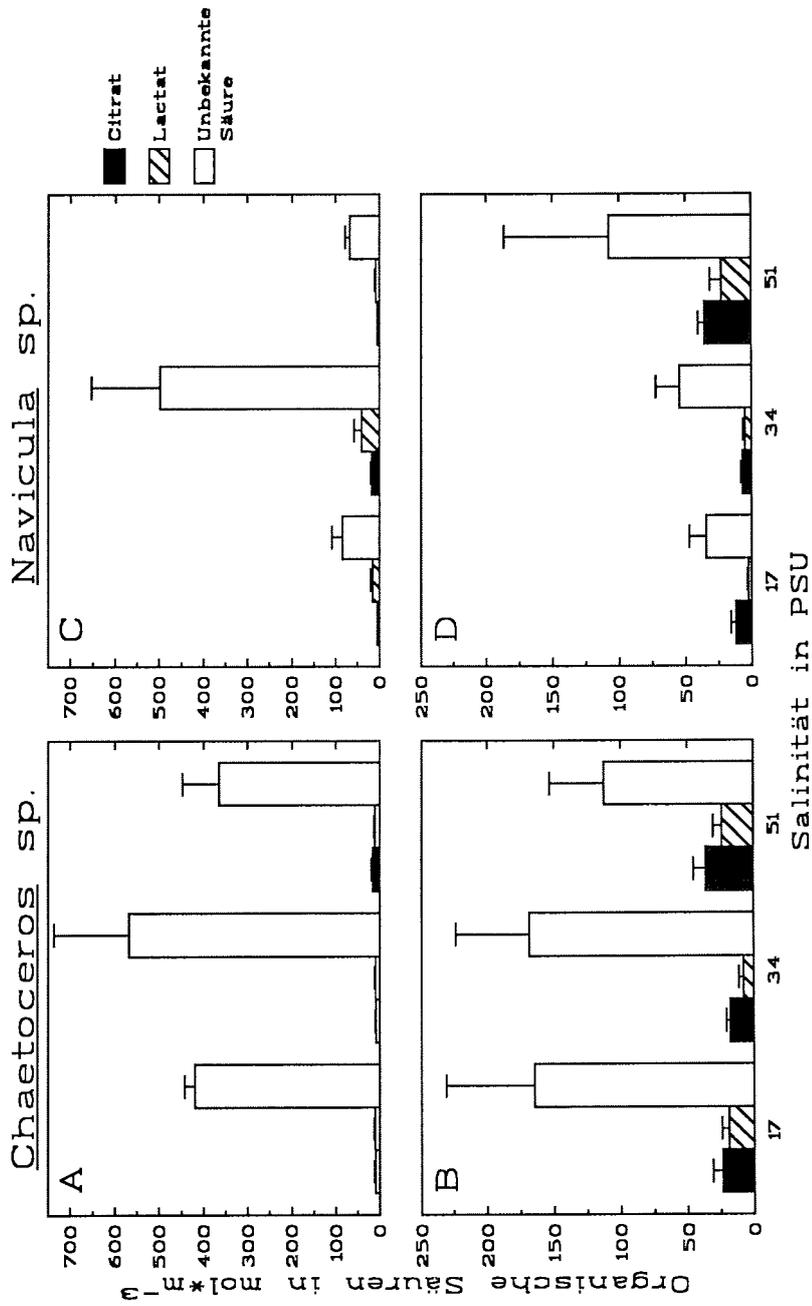


Abb. 13: Konzentrationen der organischen Säuren von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von der Salinität und Lichtintensität. A = *Chaetoceros* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$, B = *Chaetoceros* sp. bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$, C = *Navicula* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ und D = *Navicula* sp. bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$, alle Angaben in mol / m^3 . Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

Die Homarinkonzentration beider Diatomeenarten stieg linear mit der Salinität im Stark- und Schwachlicht an (Abb. 14A und 14B). Der Korrelationskoeffizient zwischen der Salinitätszunahme und der Homarinkonzentration bei *Navicula* sp. betrug im Starklicht 0,93, im Schwachlicht 0,97. Für *Chaetoceros* sp. lag er bei 0,97 bzw. 0,93. Dabei waren die Konzentrationen für 51 PSU bei *Chaetoceros* sp. deutlich höher als die von *Navicula* sp.. Beide Eisalgen wiesen unter hyperosmotischen Bedingungen im Schwachlicht höhere Homarinkonzentrationen auf als im Starklicht. Homarin war im Vergleich z.B. zum Prolin in beiden Arten gering konzentriert. Die Konzentration betrug 23 mol / m³ bei *Chaetoceros* sp. und 8 mol / m³ bei *Navicula* sp. im Schwachlicht und 51 PSU.

Die tertiäre Schwefelverbindung DMSP (Dimethylsulfoniumpropionat) war nur in der Art *Navicula* sp. nachzuweisen (Abb. 14C). Auch diese Verbindung stieg linear mit der Salinität an. Der Korrelationskoeffizient, der den Zusammenhang zwischen Salinität und Konzentration angibt, lag bei 0,96 für beide Lichtintensitäten. Die DMSP-Konzentrationen bei 17 und 34 PSU waren im Schwachlicht geringer als im Starklicht. Unter hyperosmotischen Bedingungen war der Schwachlichtwert größer. Die DMSP-Konzentration betrug ein Vielfaches der Homarinkonzentration (86 mol / m³ bei 51 PSU im Schwachlicht).

Tab. 6 faßt die osmolalen Konzentrationen der Osmolyte zusammen.

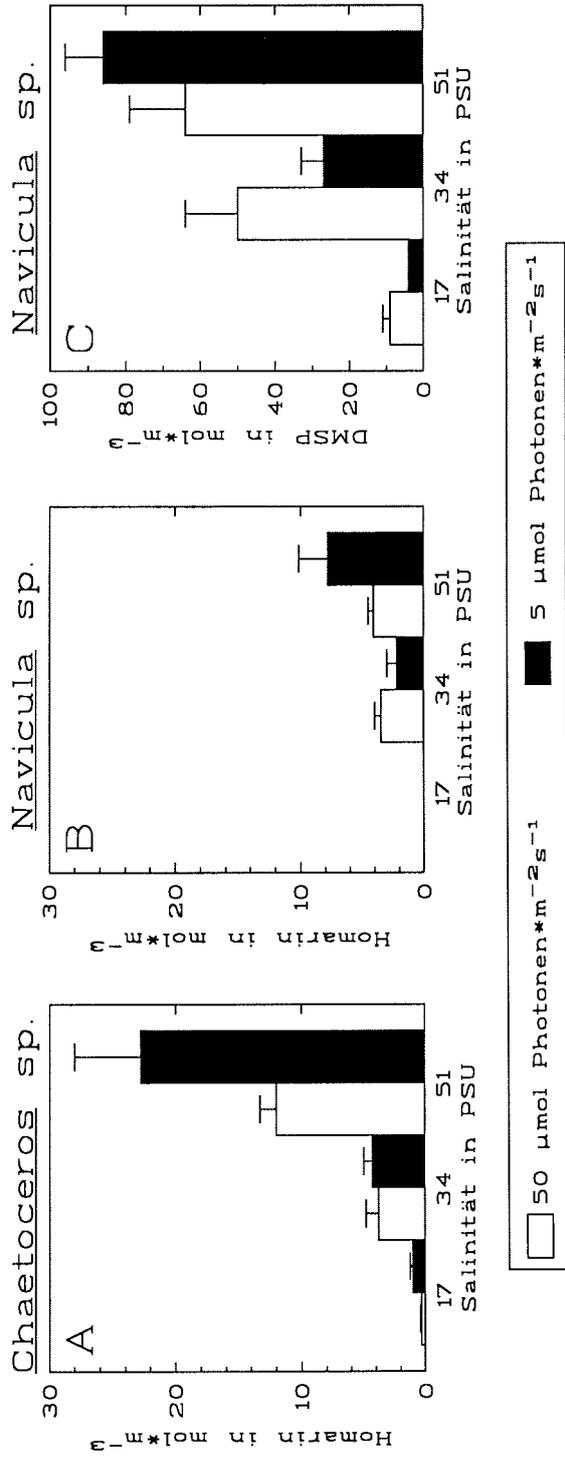


Abb. 14: Hominanzkonzentration von *Chaetoceros* sp. (A) und *Navicula* sp. (B) und DMSP-Konzentration von *Navicula* sp. (C) in Abhängigkeit von der Salinität und Lichtintensität. Alle Angaben in mol / m³. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

Tab. 6: Osmotische Potentiale der gemessenen anorganischen und organischen Osmolyte in Abhängigkeit von Salinität und Lichtintensität. Sal.: Salinität in PSU. PAR: Lichtintensität in $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. AS: Summe der Aminosäuren außer Prolin. Pro: Prolin. Hom: Homarin. u. S.: unbekannte Säure, berechnet nach Acetateichung. Die zugrundeliegenden osmotischen Koeffizienten der Ionen wurden aus CRC Handbook of Chemistry and Physics (1971) und der von Prolin aus Schobert (1977) berechnet: $\text{K}^+ = 0,92$, $\text{Na}^+ = 0,93$, $\text{Mg}^{2+} = 0,85$, $\text{Cl}^- = 0,92$, $\text{SO}_4^{2-} = 0,78$, $\text{HPO}_4^{2-} = 0,90$, Prolin = 1,10, übrige Substanzen = 1 (angenommen).

Art	Sal.	PAR	K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	Pro	AS	Citrat	Lactat	u.S.	Hom	DMSP
	17	50	100	16	9	20	16	2	2	81	10	10	419	0	0
	34	50	146	11	11	9	15	2	165	100	8	9	568	4	0
<i>Chaetoceros</i>	51	50	249	27	24	10	41	4	581	85	15	11	365	12	0
sp.	17	6	232	53	38	17	9	17	2	46	24	20	163	1	0
	34	6	289	72	28	64	53	9	194	51	19	7	167	4	0
	51	6	371	49	38	33	68	5	556	85	36	25	112	23	0
	17	50	168	35	28	20	42	9	8	28	5	15	84	0	9
	34	50	230	137	80	101	67	19	119	28	18	41	498	4	50
<i>Navicula</i>	51	50	183	54	23	45	35	5	581	28	4	8	68	4	64
sp.	17	6	189	51	25	19	14	7	17	26	12	2	35	0	4
	34	6	214	38	25	16	17	7	61	32	7	5	55	2	27
	51	6	414	279	89	164	56	38	228	38	36	23	108	8	86

4.1.3. Vitalität

Der FRI (Fluorescence response index) von *Chaetoceros* sp. nahm mit verringerter Lichtintensität und erhöhter Salinität ab (Tab. 7). Während der FRI von *Navicula* sp. im Starklicht bei 17 und 34 PSU konstant bei ca. 0,79 blieb, nahm er im hyperosmotischen Bereich deutlich ab (0,49). Im Schwachlicht war der FRI dieser Art bei 17 und 51 PSU gleich groß (ca. 0,60) und zeigte unter Meerwassersalinität nur einen geringfügigen Unterschied zum Starklichtwert bei derselben Salinität.

Tab. 7: FRI (Fluorescence response index) als Maß für die Photosynthesekapazität von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in Abhängigkeit von Lichtintensität und Salinität. $FRI = (F_D - F_N) / F_D$. Wobei F_D = Fluoreszenz nach Zugabe von DCMU und F_N = Fluoreszenz vor Zugabe von DCMU. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

Salinität [PSU]	<i>Navicula</i> sp.		<i>Chaetoceros</i> sp.	
	50 $\mu\text{mol Phot./m}^2\text{s}$	5 $\mu\text{mol Phot./m}^2\text{s}$	50 $\mu\text{mol Phot./m}^2\text{s}$	5 $\mu\text{mol Phot./m}^2\text{s}$
17	0,79 \pm 0,02	0,59 \pm 0,10	0,86 \pm 0,03	0,78 \pm 0,03
34	0,79 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03	0,84 \pm 0,02	0,71 \pm 0,04
51	0,49 \pm 0,06	0,60 \pm 0,08	0,71 \pm 0,03	0,59 \pm 0,06

4.2. Diskussion

4.2.1. Ionen

Die hohen K^+ -Konzentrationen weisen beide Eisalgen als K^+ -Typen aus (Bisson und Kirst, 1979), d.h. ein Großteil des osmotischen Potentials wird durch die Aufnahme von K^+ über Poren oder Ionen-selektive Kanäle reguliert. Die treibende Kraft ist eine Kombination aus dem Konzentrationsgradienten zwischen Medium und Zellsaft und dem elektrischen Membranpotential, das innerhalb der Zelle negativ ist (Kirst, 1994). Das Membranpotential vieler mariner Algen ist ein K^+ -Diffusionspotential (Gleichgewicht zwischen Medium und Zelle). Es liegt bei den meisten Arten zwischen -40 und -100 mV (Kirst, 1990). Tab. 8 gibt einen Überblick über die Ruhepotentiale (Nernstpotentiale), die sich aus den Ionenkonzentrationen für jedes Ion nach der Nernstgleichung errechnen lassen:

$$E = \frac{R \times T}{n \times F} \times \ln \frac{\text{Ionenkonzentration im Medium}}{\text{Ionenkonzentration in der Zelle}}$$

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur (277 °K)

n = Wertigkeit

F = Faradaykonstante

In Bezug auf die organischen Anionen kann davon ausgegangen werden, daß sie die Membran nicht permeieren können. Sie wurden deshalb nicht in der Tab. 8 aufgeführt. Geht man von einem mittleren Membranpotential von -70 mV (des oben angegebenen Bereichs von -40 bis -100 mV) aus, so können K^+ und HPO_4^{2-} als nahezu passiv verteilt angesehen werden, da sich die jeweiligen Ruhepotentiale (Nernstpotentiale) und das angenommene Membranpotential nicht wesentlich unterscheiden. Na^+ und Cl^- liegen somit nicht im elektrochemischen Gleichgewicht vor, so daß diese Ionenkonzentrationen reguliert werden müssen. Die Na^+ -Abgabe von der Zelle an das Medium (oder auch Vakuole) kann über eine Na^+ -ATPase oder den H^+/Na^+ -Antiport aktiv bewirkt werden, während der Cl^- -Transport wahrscheinlich vom Turgor gesteuert wird (Kirst, 1990).

Na⁺ hat erwartungsgemäß in dem untersuchten Salinitätsbereich für beide Arten eine geringere Bedeutung als K⁺. Nur bei 34 PSU im Starklicht und 51 PSU im Schwachlicht erreicht Na⁺ in *Navicula* sp. über 50 % des osmotischen Wertes

Tab. 8: Berechnete Nernstpotentiale der beiden Diatomeenarten *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. für die verschiedenen Kulturansätze. Die Salinität ist in PSU, die Potentiale sind in mV angegeben. Sal. = Salinität.

Art	Sal.	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
<i>Navicula</i> sp.	17	43	-86	-3	60	-93	3
	34	28	-77	-7	38	-91	1
	51	59	-62	13	67	-78	21
	17	34	-89	-1	62	-80	5
	34	58	-75	7	83	-75	14
	51	20	-81	-3	36	-84	-2
<i>Chaetoceros</i> sp.	17	62	-73	12	61	-82	18
	34	87	-66	18	98	-73	27
	51	76	-69	12	103	-80	25
	17	34	-93	-6	63	-75	-5
	34	43	-82	6	49	-88	11
	51	62	-78	7	74	-86	21

von K⁺. *Chaetoceros* sp. reichert erst bei doppelter Meerwassersalinität (68 PSU) äqui-osmolale Konzentrationen der beiden Kationen an (Nothnagel und Wanzek, 1989). Ansonsten liegen die Na⁺-Werte mit den Mg²⁺-Konzentrationen in derselben Größenordnung. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen für *Phaeodactylum tricornutum*, *Cyclotella cryptica* und *C. meneghiniana*, die ebenfalls als K⁺-Typen gelten (Dickson und Kirst, 1987; Liu und Hellebust, 1976b).

Cl⁻ und HPO₄²⁻ stellen die Hauptanionen beider Diatomeen dar. Die Anionen erreichen nie die Kationenkonzentrationen. Das Verhältnis Kationen /Anionen schwankt zwischen ca. 2 und 5 bei beiden Arten (Tab. 9). Es muß daher ein deutliches Anionendefizit konstatiert werden. Dies ist für cytoplasmareiche Mikroalgen schon oft beobachtet worden und stellt somit keine Besonderheit dar (Kirst, 1977a; Kirst, 1977b; Dickson und Kirst, 1986; Dickson und Kirst, 1987). Für Abweichungen vom ausgeglichenen Kat- und Anionenverhältnis können negative Gruppen von Proteinen, sauren Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat und organische Säuren verantwortlich gemacht werden (Dickson und Kirst, 1987). Berücksichtigt man demgemäß die gemessenen organischen Säuren mit ihren bei physiologischem pH vorliegenden negativen Ladungen, so ergeben

sich Verhältnisse von positiven Ladungen / negativen Ladungen zwischen 0,3 und 2,2 (Tab. 9). Die Kat- und Anionenverhältnisse sind somit bei *Chaetoceros* sp. im Schwachlicht und bei *Navicula* sp. im Starklicht nahezu ausbalanciert. Auch die übrigen Ansätze weisen unter Einbeziehung der Ladung organischer Osmolyte nicht so drastische Differenzen in der Ladungsbilanz auf als wenn nur die Ionen zur Berechnung herangezogen werden.

In der Reihe der die Konformation von Makromolekülen stabilisierenden und destabilisierenden Ionen (Hofmeistersche Reihe) zählt Cl^- zu den destabilisierenden, während PO_4^{3-} , SO_4^{2-} und die organische Säure Acetat zu den eher stabilisierenden Anionen gezählt werden (Yancey et al., 1982; Clark, 1985). Außerdem haben Na^+ (als NaCl), die Anionen Cl^- (in DMSP-Cl) und in noch stärkerem Maße Br^- (in DMSP-Br) eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der Malatdehydrogenase von *Tetraselmis subcordiformis*, während dies nur in vermindertem Maß für das Kation K^+ (als KCl bzw. KBr) gilt (Gröne und Kirst, 1991). Diese Empfindlichkeit der MDH läßt sich aber nicht auf die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase oder die Glutamatdehydrogenase dieser Art übertragen. Die genannten Autoren gehen daher nicht von einer generellen, sondern einer partiellen Salzinhibition von Enzymen aus. Demgemäß hat möglicherweise die Akkumulation von organischen Säuren, die unter physiologischem pH negativ geladen sind, statt Cl^- und von K^+ statt Na^+ einen vorteilhaften Einfluß auf einige Enzyme der untersuchten Arten *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp.. Diese Vermutung trifft auf die gemessenen organischen Säuren (Malat, Lactat, Citrat und die unbekannte Säure) nur dann zu, wenn sie ähnliche Eigenschaften wie Acetat besitzen sollten.

Tab. 9: Übersicht über die prozentualen Anteile der Ionen, der organischen Osmolyte insgesamt (Osm) und von Prolin am internen osmotischen Potential (π_Z). π_M : externes Potential (Medium). Kat/An: Verhältnis Kationen / Anionen. Pos / Neg: Verhältnis positive / negative Ladungen. Potentiale in mOsm / kg. Turgor in MPa. Salinität (Sal.) in PSU. PAR in $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Den Berechnungen liegt die Beziehung $34 \text{ PSU} = 1000 \text{ mOsm} / \text{kg} = 2,54 \text{ MPa}$ zugrunde.

Art	Sal.	PAR	Zelle	Medium	$\pi_Z - \pi_M$	Turgor	Kat/An	Pos/Neg Ionen [%]	Osm [%]	Prolin[%]	
<i>Chaetoceros</i>	17	50	684	500	184	0,5	2,4	0,3	24	76	0
	34	50	1047	1000	47	0,1	4,3	0,3	18	82	16
	51	50	1424	1500	-76	-0,2	3,3	0,6	25	75	41
sp.	17	6	623	500	123	0,3	5,3	1,1	59	41	0
	34	6	956	1000	-44	-0,1	2,2	1,0	54	46	20
	51	6	1402	1500	-98	-0,2	2,8	1,2	40	60	40
<i>Navicula</i>	17	50	451	500	-49	-0,1	2,1	1,1	67	33	2
	34	50	1391	1000	391	1,0	1,9	0,6	46	54	9
	51	50	1104	1500	-396	-1,0	2,3	1,3	31	69	53
sp.	17	6	401	500	-99	-0,2	4,9	2,2	76	24	4
	34	6	505	1000	-495	-1,2	4,7	2,1	63	37	12
	51	6	1565	1500	65	0,2	2,5	1,5	64	34	15

Der prozentuale Ionenanteil ist bei beiden Eisalgen im Schwachlicht deutlich größer als im Starklicht unabhängig von der Salinität. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Algen bei geringerer Lichtintensität und damit einhergehender reduzierter Energieversorgung auf die energiesparende Akkumulation von Ionen angewiesen sind, um das interne osmotische Potential aufrechtzuerhalten (Kirst, 1994). Die Anreicherung organischer Osmolyte ist energieaufwendiger. Hohe Ionenkonzentrationen haben jedoch einen negativen Effekt auf den Metabolismus der Zellen. Zum Schutz der Enzyme im Cytoplasma sind zwei Anpassungsmechanismen denkbar: Entweder werden die Ionen überwiegend in der Vakuole kompartimentiert und / oder kompatible Substanzen (Brown und Simpson, 1972; Yancey et al., 1982) im Cytoplasma kompensieren bzw. vermindern die Enzyminhibition. Die vergleichsweise kleinen Vakuolenvolumina am Gesamtvolumen von durchschnittlich 15 % (21 % bei 51 PSU) bei *Chaetoceros* sp. und 26 % bei *Navicula* sp. lassen keinen großen Spielraum für die zusätzliche Aufnahme hoher Ionenkonzentrationen zu, da kein osmotischer Gradient zwischen Vakuole und Cytoplasma angenommen werden kann. Außerdem verändert sich die Vakuolengröße der beiden Algen mit der Salinität nicht. Dies wäre ein Indiz für eine Funktion der Vakuole als Speicherkompartiment für Ionen (Kirst, 1990). Daher ist die Wirkung kompatibler Substanzen wahrscheinlicher. Ein direkter Vergleich beider Arten ist aber nicht ohne Einschränkung möglich. Aus der Differenz des internen und externen osmotischen Potentials ($\pi_z - \pi_M$) bzw. dem daraus errechneten (theoretischen) Turgor ergibt sich eine deutliche Unterbestimmung der Summe der Osmolyte von 396 mOsm/kg bei 51 PSU im Starklicht und von 495 mOsm/kg bei 34 PSU im Schwachlicht für die Art *Navicula* sp. (Tab. 9). Die übrigen Ansätze beider Arten weisen entweder einen positiven Turgor oder nur eine geringe Unterbestimmung auf. In der Literatur werden Turgorwerte von 0,02 - 0,31 MPa (Dickson und Kirst, 1987) bis 0,5 MPa (Guillard, 1962) angegeben.

4.2.2. Organische Osmolyte

Prolin und eine "Acetat-ähnliche" organische Säure stellen die Hauptosmolyte beider Arten dar. Von untergeordneter Rolle sind die freien Aminosäuren, die übrigen organischen Säuren, Homarin und DMSP (nur *Navicula* sp.).

4.2.2.1. Aminosäuren

Im Gegensatz zu den meisten Algen akkumulieren Diatomeen in der Regel nicht ihr Haupt-Photosyntheseprodukt (Zucker) unter osmotischem Streß, sondern die Iminosäure Prolin (Hellebust, 1976). Dies wurde für einige Brack- und Meerwas-

serdiatomeen nachgewiesen (Schobert, 1974, 1977a,b; Liu und Hellebust, 1976a,b,c). Auch von den Eisdiatomeen *Entomoneis (Amphiprora) kufferathii*, *Fragilariopsis (Nitzschia) cylindrus*, *Thalassiosira antarctica* (Bartsch, 1989) und *Chaetoceros neogracile* (Nothnagel und Wanzek, 1989) ist bekannt, daß sie unter Salzstreß Prolin akkumulieren. Eine Ausnahme von dieser Regel bildet die Brackwasserart *Cylindrotheca fusiformis*, die Mannitol anreichert (Paul, 1979). Zur Übersicht sind in der Tab. 10 die verschiedenen bisher in Diatomeen gefundenen kompatiblen Substanzen zusammengestellt.

Tab. 10: Übersicht über die bisher für Diatomeen nachgewiesenen kompatiblen Substanzen. Die unterschiedlich hohen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Salinität wurden nicht berücksichtigt. V = Vorkommen, B = Brackwasserart, M = marine Art, S = Salzsee und E = Eisalgen.

Art	V kompatibleSubstanzen	Literatur
<i>Chaetoceros</i> sp.	E Prolin, Homarin, Glutamat	diese Arbeit
<i>Cyclotella cryptica</i>	B Prolin, Glutamat, Homarin, Glycinbetain	Liu und Hellebust (1976c), Dickson und Kirst (1987)
<i>C. meneghiniana</i>	B Prolin	Schobert (1974)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	M Mannose	Paul (1979)
<i>Entomoneis (Amphiprora)</i> <i>kufferathii</i>	E Prolin	Bartsch (1989)
<i>Navicula</i> sp.	S Prolin	Borowitzka (1981)
<i>Navicula</i> sp.	E Prolin, Homarin, DMSP, Glutamat	diese Arbeit
<i>Nitzschia cylindrus</i>	E Prolin	Bartsch (1989)
<i>Nitzschia pungens</i> f. <i>multiseries</i>	M Taurin	Jackson et al. (1992)
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	B Prolin, DMSP, Homarin, Glycinbetain, freie Aminosäuren, Glycerin	Besnier et al. (1969), Dickson und Kirst (1987)
<i>Thalassiosira antarctica</i>	E Prolin	Bartsch (1989)

Es ist bisher nur die Aminosäure Taurin bekannt, die unter Salzstreß die Prolinkonzentration in der marinen Diatomee *Nitzschia* f. *multiseries* übersteigt (Jackson et al., 1992). Bei 48 PSU lagen 61 % der freien Aminosäuren als Taurin, 17 % als Glutamat und nur ca. 1 % als Prolin vor. In der Brackwasserart *P. tricornutum* übersteigt die Prolinkonzentration (ca. 490 mol / m³) erst bei

1000 mol / m³ NaCl (ca. 63 PSU) deutlich die Summe der freien Aminosäuren (ca. 330 mol / m³) (Dickson und Kirst, 1987). Ein tendenziell ähnliches Ergebnis liegt für die Brackwasserart *Cyclotella cryptica* vor, die erst nach einem Transfer von 33 % künstlichem Meerwasser (ca. 11 PSU) in 80 % künstliches Meerwasser (ca. 27 PSU) eine leicht erhöhte Prolinkonzentration (20 mol / m³) gegenüber Glutamat (18 mol / m³) aufwies (Liu und Hellebust, 1976a). Somit können die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen der Aminosäuren bei Diatomeen dahingehend interpretiert werden, daß die Prolinkonzentration nur bei Salzstreß, aber nicht unter normaler Umgebungssalinität, größer ist als die Summe der anderen freien Aminosäuren. Demzufolge sind die vergleichsweise hohen Prolinkonzentrationen unter Meerwassersalinität von *Chaetoceros* sp. (150 mol / m³) und *Navicula* sp. (108 mol / m³) zur Summe der anderen freien Aminosäuren (100 mol / m³ bzw. 28 mol / m³) als hoch einzustufen. Da es sich bei den Eisalgen um marine Arten handelt, die nur während der Eisschmelze hypoosmotischen Bedingungen ausgesetzt sind, müssen 34 PSU als normale Umgebungssalinität angesehen werden. Diese relativ hohen Prolin-Basis-konzentrationen sind möglicherweise spezifisch für Eisalgen. Es liegen aber zu wenige Untersuchungen mariner Arten zum Vergleich vor, um eine gesicherte Typisierung vornehmen zu können.

Die in der Literatur vorliegenden Untersuchungen zielen vielmehr auf die Funktion freier Aminosäuren als Indikator für die N- und C-Assimilation in der Biomasseentwicklung. Dabei kommt den Aminosäuren Gln und Glu eine zentrale Rolle zu, da sie an der Synthese anderer Aminosäuren beteiligt sind. Aufgrund der Untersuchung von 15 verschiedenen Mikroalgen, darunter *P. tricornutum* als Vertreter der Diatomeen (unter natürlicher Umgebungssalinität), kommt Flynn (1990) zu dem Schluß, daß die Aminosäure-Zusammensetzung keine Grundlage für einen "metabolischen Fingerabdruck" liefert. Die Zusammensetzung der Aminosäuren ist während der unterschiedlichen Wachstumsphasen einer Art, aber auch zwischen den Arten zu unterschiedlich, um klare Aussagen über den Kohlenstoff-Stickstoff-Status (C-N-Status) machen zu können. Der Autor stellt das Verhältnis von Gln / Glu als einzigen aussagekräftigen Wert zur Kennzeichnung des C-N-Status heraus: Ist er kleiner als 0,1, handelt es sich um N-verarmte Kulturen. Liegt der Wert über 0,5, kann von einer ausreichenden N-Versorgung ausgegangen werden. His und Glu werden als Hauptaminosäuren für *P. tricornutum* angegeben.

Im Verlauf einer Blüte der Art *Rhizosolenia delicatula* bei Roscoff (Frankreich) nahm die Konzentration der freien Aminosäuren von 200 auf 10 mol / m³ Zellvo-

lumen ab (Martin-Jézéquel et al., 1992). Dabei stellte Glu die Hauptaminosäure dieser Art dar, die nur langsam - wie die übrigen freien Aminosäuren außer Gln - mit zunehmender Biomasse abnahm. Im Gegensatz dazu war Gln, als einzige Aminosäure, mit der lebenden Biomasse (Chl a und Zellzahl) der Blüte korreliert. Gln, als Aminogruppendonor, erschöpft sich erst, aber dann abrupt, mit dem Zusammenbruch der Algenblüte. Da die generelle Abnahme der freien Aminosäuren mit der Nitrat-Erschöpfung einhergeht, sprechen die Autoren diesen, besonders dem quantitativ bedeutenden Glu, die Funktion eines primären N-Speichers zu.

Neben Glu sind auch noch Gln und Asn als Hauptaminosäuren für *P. tricornutum* in Dialyskulturen nachgewiesen worden (Marsot et al., 1991). Für *Chaetoceros gracilis* konnten Tyr, Glu und Lys, für *Thalassiosira pseudonana* Ser und Tyr und für *Skeletonema costatum* Tyr und Glu als Hauptaminosäuren identifiziert werden (De Roeck-Holtzhauer et al., 1993).

Die Ergebnisse der hinsichtlich der Aminosäure-Zusammensetzung zitierten Arbeiten haben eines gemeinsam: Sie weisen neben anderen Aminosäuren Glu als Hauptaminosäure in verschiedenen Diatomeenarten aus. Dies stimmt mit den eigenen Ergebnissen überein. Sowohl im Stark- als auch im Schwachlicht und bei jeder Salinität dominiert Glu über die anderen Aminosäuren (außer Prolin). Die absoluten Werte der Gesamt-Aminosäurekonzentration nehmen in *Chaetoceros* sp. bei 17 und 34 PSU im Schwachlicht um ca. 50 % gegenüber dem Starklicht ab, steigen aber mit der Salinität an. Bei *Navicula* sp. sind die Starklichtwerte konstant, während die Schwachlichtkonzentrationen ebenfalls leicht mit der Salinität ansteigen. Dieser Anstieg ist in beiden Arten hauptsächlich auf Glu zurückzuführen, das damit bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ eine ähnliche Tendenz wie Prolin zeigt, aber quantitativ von geringerer Bedeutung ist.

Bei der Einschätzung der Aminosäurekonzentrationen in verschiedenen Arten spielt die Bestimmungsmethode eine wesentliche Rolle. Für diese Arbeit wurde die Methode der Vorsäulenderivatisierung mit DABSYL-Cl gewählt (s. Methodenteil). Diese Methode hat den Vorteil, daß Prolin erfaßt wird. Der Nachteil besteht darin, daß Asn und Gln nicht quantifiziert werden können. Anders verhält es sich mit der OPA-Methode: Das Derivatisierungsmittel o-Phthaldialdehyd, das mit einem Fluoreszenzdetektor quantifiziert wird, reagiert auch mit Asn und Gln, aber nicht mit Prolin. Somit konnte die Iminosäure in den oben zitierten Arbeiten, zu deren Durchführung die OPA-Methode eingesetzt wurde, nicht quantifiziert werden. Dadurch kann es besonders bei Diatomeen zu Fehleinschätzungen kommen wie z.B. bei der Art *P. tricornutum*, für die bereits in früheren Untersuchungen Prolin nachgewiesen werden konnte (Tab. 10). Für

die vorliegende Arbeit hat das zur Konsequenz, daß Gln nicht bestimmt werden konnte. Quantitativ dürfte dies jedoch von untergeordneter Rolle sein, weil das Verhältnis Gln/Glu in den oben zitierten Untersuchungen meistens kleiner als 0,5 war. Somit wären maximal Gln-Konzentrationen von 3 bis 18 mol / m³ zu erwarten.

Auch wenn die Konzentrationen der freien Aminosäuren (außer Prolin) in allen Ansätzen nicht größer als 100 mol / m³ war, ist ihnen die Fähigkeit zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen nicht abzusprechen. So konnte eine Kombination von Threonin, Glycin, Serin, Alanin und Prolin die Fällung eines Hormon / Antikörper-Komplexes durch PEG stärker vermindern als eine äquimolare Konzentration von Prolin (Paleg et al., 1985). Yancey et al. (1982) fassen in einem Übersichtsartikel die Ergebnisse der Wirkung von Aminosäuren auf die Pyruvatkinase des Krebses *Pachygrapsus crassipes* zusammen. Der Km-Wert der Pyruvatkinase wurde nicht wesentlich von den Aminosäuren Glycin, Alanin, Prolin, Taurin und β -Alanin beeinflusst, während dies bei den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin der Fall war. Somit können nicht alle, aber ein Großteil der freien Aminosäuren als kompatible Substanzen angesehen werden.

Die Prolin-Konzentrationsangaben einiger Eisalgen aus der Literatur liegen als relative Werte vor (Bartsch, 1989), d.h. der Prolingehalt wurde als ein Vielfaches der Ausgangskonzentration bei 34 PSU angegeben. Die Prolinkonzentrationen von drei Arten stieg im Salinitätsbereich von 34 bis 95 PSU linear an, um dann konstant zu bleiben. *E. kufferathii* erreichte das 50-fache der Ausgangskonzentration. Für den Bereich zwischen 34 und 51 PSU ergaben sich Steigerungen von 10-facher (*E. kufferathii*) und 2-3-facher (*T. antarctica* und *F. cylindrus*) Prolinkonzentration. Für die in dieser Arbeit untersuchten Arten *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. nahmen die molaren Konzentrationen unter Starklicht um die Faktoren 3,5 bzw. 5 zu (Abb. 12). Diese Steigerungsraten scheinen eine in der Größenordnung vergleichbare Prolinkonzentration zwischen den Literaturdaten für *T. antarctica*, *F. cylindrus* und den eigenen Ergebnissen zu belegen. Doch diese Art des Konzentrationsvergleichs ist aus drei Gründen für eine vergleichende Einschätzung der Prolinergebnisse unzureichend:

1) Da die absoluten Ausgangskonzentrationen nicht bekannt sind, läßt eine relative Konzentrationserhöhung zwar die qualitative Aussage zu, daß Prolin an der osmotischen Akklimatisation beteiligt ist. Über die quantitative Bedeutung lassen sich allerdings keine Rückschlüsse ziehen.

2) Der Vergleich relativer Konzentrationsveränderungen zwischen Arten, deren osmotische Volumina (Zelle abzüglich der Zellwand) und deren Cytoplasma-Anteil am (osmotischen) Volumen nicht bekannt sind, kann irreführend sein. So müßte zumindest zwischen Cytoplasma-reichen (*Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. in der vorliegenden Arbeit) und Cytoplasma-armen Arten (Sicko-Goad, 1977; Edler, 1979) unterschieden werden, da von einer überwiegenden Kompartimentierung des Osmolyten im Cytoplasma ausgegangen werden kann (Kirst, 1990).

3) Die Volumina der Diatomeen können mit dem Lichtangebot und dem Salzgehalt variieren (Kap. 3.1.2., Sicko-Goad, 1977; Thompson et al., 1991).

Neuere Untersuchungen an der Art *E. kufferathii* bei 0°C, 34 PSU und 30 μmol Photonen / $\text{m}^2 \text{ s}$ ergaben einen Prolingehalt von ca. 10 mol / m^3 (Michael Wanzek, unveröffentlicht). Die Art besitzt damit eine im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Eisalgen geringe Prolinkonzentration (Abb. 12). Diese beträgt auch bei 51 PSU - wenn man die oben angegebene 10-fache Steigerung der Konzentration bei *E. kufferathii* zugrunde legt - nur ca. 1/5 (100 mol / m^3) der Prolinkonzentrationen von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. (528 mol / m^3 bei 50 μmol Photonen / $\text{m}^2 \text{ s}$). Unter der Annahme, daß Prolin nur im Cytoplasma vorliegt, müßte *E. kufferathii* somit eine Cytoplasma-arme Art mit einem Anteil von nur ca. 16 % am osmotischen Volumen sein, um vergleichbare Konzentrationen der Iminosäure zu besitzen (errechnet aus Tab. 4). Über die Größe der Kompartimente von *E. kufferathii* liegen keine Daten vor. Die Bezeichnung "Prolinalge" für *E. kufferathii* (Bartsch, 1989) könnte daher irreführend sein: Sie mag in Bezug auf die mit der Salinität ansteigende absolute Konzentration der Iminosäure pro Zelle der großzelligen Art zutreffen, in Bezug auf die volumenbezogene Konzentration aber nicht.

Hinsichtlich der Prolinkonzentration kann grundsätzlich zwischen Kurz- und Langzeit-Typen unterschieden werden: Während die Brackwasserart *Cyclotella meneghiniana* nach einem Salzstreß nur kurzzeitig Prolin akkumuliert (Schobert, 1974), ist die Prolinanreicherung in *Phaeodactylum tricorutum* erst nach ca. 40-50 h abgeschlossen und konstant (Schobert, 1979, 1980). Vergleicht man die Konzentration vom Langzeit-Typ (Dickson und Kirst, 1987) mit denen von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp., so liegen letztere unter Starklicht und 51 PSU um ca. 17 % höher. Im Schwachlicht hingegen ist die Prolinkonzentration von *Navicula* sp. mit 208 mol / m^3 nur halb so groß. Trotz der nicht angegebenen Kultur-Lichtintensität für *Phaeodactylum tricorutum* und des Salzstresses mit NaCl - nicht wie in den eigenen Stammkulturen, für die künstliches Meersalz verwendet wurde - liegen die Prolinergebnisse im gleichen Größenordnungs-

bereich. Die Eisalgen weisen somit hinsichtlich des Prolingehaltes keine Besonderheiten im Vergleich zur Brackwasserart auf. Unter 51 PSU und $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ entfallen auf Prolin 41 % (*Chaetoceros* sp.) und 53 % (*Navicula* sp.) des gesamten osmotischen Potentials der Zelle (Tab. 9). Für Cytoplasma-reiche Mikroalgen wird ein prozentualer Anteil des Hauptosmolyten von 25 bis 60 % angegeben (Hellebust, 1985; Kirst, 1990). Die Eisalgen sind daher im mittleren bzw. oberen Bereich einzustufen. Allerdings muß hier berücksichtigt werden, daß die Salztoleranz-Grenze der Algen mit 51 PSU noch lange nicht erreicht ist. Da einerseits *Chaetoceros* sp. im oberen Eissäulenbereich Salinitäten von über 100 PSU überleben kann und andererseits bekannt ist, daß einige Eisalgen einen linearen Prolinanstieg bis 95 PSU aufweisen (Bartsch, 1989), ist unter extremen hypersalinen Bedingungen von höheren Prolinanteilen auszugehen. Setzt man voraus, daß die Ionen überwiegend in der Vakuole und die organischen Osmolyte nahezu vollständig im Cytoplasma kompartimentiert sind, erreichen die beiden Diatomeen Maximalwerte von 703 mOsm/kg (entsprechend 50 % bei *Chaetoceros* sp.) und 732 mOsm/kg (entsprechend 67 % bei *Navicula* sp.) Prolin am osmotischen Potential des Cytoplasmas. Zieht man die ungewöhnlichen Lösungseigenschaften von Prolin in wäßriger Lösung in Betracht, dann besteht ein nicht-idealer Zusammenhang zwischen der molaren Konzentration ($> 40 \text{ mol} / \text{m}^3$) und der Aktivität (Schobert, 1977c), d.h. die Aktivität ist höher als die Molarität. Dieser Effekt verstärkt sich noch beträchtlich mit zunehmender Konzentration. Daher müßte die Osmolalität des Cytoplasmas noch nach oben korrigiert werden. Da es aber zum einen keinen experimentellen Beweis für die Kompartimentierung der Iminosäure im Cytoplasma gibt und zum anderen das Cytoplasma keine ideale (wäßrige) Lösung darstellt, sind diese Annahmen spekulativ. Anhand von Versuchen mit *Nicotiana tabacum* (Tabak)-Suspensionskulturen und daraus entwickelten Modellen zu ^{15}N -Markierungskinetiken könnte auch eine gleichmäßige Verteilung des Prolins in der Zelle angenommen werden (Rhodes und Handa, 1989).

Die Verträglichkeit der Iminosäure kann mit einer Reihe von Arbeiten zu deren Einfluß auf die Aktivität verschiedener Enzyme in unterschiedlichen Organismen belegt werden. Die Fällung der Glutaminsynthetase aus *Hordeum distichon* (Gerste) konnte durch die Zugabe von Prolin vermindert bzw. kompensiert werden (Paleg et al., 1985). Der Einfluß von Prolin ist dabei pH- und konzentrationsabhängig. Die Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) von *Rhizophora mangle* (Myrtales) wurde durch die Zugabe von $600 \text{ mol} / \text{m}^3$ Prolin gesteigert (Sommer et al., 1990). Die Aktivitätssteigerung der MDH, der Nitratreduktase (NR) und der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) in

Sasola soda (Chenopodiaceae) durch Prolin unter Hitzeeinwirkung betrug 10 % (NR) bis 60 % (MDH) (Nikolopoulos und Manetas, 1991). Dabei nahm die Aktivitätssteigerung bei Konzentrationen über 1000 mol / m³ nicht mehr zu.

Wenn auch die Funktion von Prolin als stoffwechselverträgliche Substanz in vielen Organismen nachgewiesen wurde, so gilt dies nicht generell. Die Autoren der zuletzt zitierten Arbeit weisen daraufhin, daß Prolin in *S. soda* keinen Schutz gegen die Inhibition der Enzyme durch NaCl bietet, während dieser Schutz für *Cynodon dactylon* (Hundszahngas) gegeben ist. Sie gehen daher von einer Co-Evolution zwischen Osmolytensystem und Enzymstruktur aus. Damit könnte die Präferenz bestimmter Osmolyte in einigen Bakterien- (Galinski, 1993), Algen- (Wegmann, 1986), Pflanzen- und Tierklassen (Yancey et al., 1982) erklärt werden.

Während die Schutzfunktion von Prolin bei Diatomeen unter Salzstreß allgemein akzeptiert ist, verneint Schobert (1977b) die Funktionen als N-Speicher und Osmolyt. Die experimentellen Befunde, daß die Prolinkonzentration sowohl von der Art (Nitrat, Ammonium, Aminosäuren) als auch von der Konzentration der externen N-Quelle abhängig ist, interpretiert die Autorin als unvereinbar mit der Funktion als N-Speicher. Diese Aussage steht im Gegensatz zur Auffassung von Martin-Jézéquel et al. (1992), die - wie oben beschrieben - die freien Aminosäuren als primären Stickstoffspeicher ansehen, dessen Konzentration mit der Abnahme des externen Nitrats korreliert ist. Außerdem geht Schobert (1977b) davon aus, daß die Konzentration eines Osmolyten nur von der Schockgröße und nicht noch von anderen Faktoren abhängig sein darf. Diese Anforderungen an einen kompatiblen Osmolyten sind dem Verfasser dieser Arbeit zu eng ausgelegt: Letztendlich ist jede Akkumulation eines Osmolyten Energie- und Ressourcen-abhängig. Sollte z.B. die Akkumulation von Prolin bei Salzstreß unter Nährstoffmangel oder niedriger Lichtintensität geringer sein als unter optimalen Bedingungen möglich, muß dies nicht gleich zum Zelltod führen. Selbst unter Standardbedingungen weist die Art *Chaetoceros* sp. bei 51 PSU schon eine Verringerung der Wachstumsrate, aber keine Plasmolyse auf. Sowohl die Inhibition der Enzyme durch Ionen als auch die Schutzfunktion durch Prolin sollten als relative Wirkungen aufgefaßt werden. Entscheidend ist, daß die Art den Salzstreß überlebt und sich fortpflanzt. Von sekundärer Bedeutung ist dabei das Erreichen einer maximalen, durch günstige Bedingungen induzierbaren Osmolytkonzentration, die unter natürlichen Bedingungen wahrscheinlich nicht anzutreffen ist.

Nichtsdestoweniger stellt sich die Frage: Wie regulieren die Algen auf enzymatischer Ebene eine konstante Prolinkonzentration? Dazu wurden in *Morus alba*

(weißer Maulbeerbaum) die Aktivitäten der Prolinoxidase und Prolindehydrogenase unter Wasserstreß bestimmt (Veeranjaneyulu und Kumari, 1989). Der Prolinumsatz wird durch beide Enzyme verursacht (Abb. 15).

Sie sind jedoch unterschiedlich kompartimentiert: Die Prolinoxidase befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, während die Prolindehydrogenase im Cytoplasma lokalisiert ist, wo sie als aktiver Teil der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase fungiert. Somit katalysieren die beiden Enzyme dieselbe Reaktion mit denselben Ausgangssubstraten und Coenzymen, aber in unterschiedliche Richtungen. Die Prolindehydrogenase arbeitet in Richtung Abbau zu Pyrrolin-5-Carboxylat. Dieser wird unter Wasserstreß stärker inhibiert als die Synthese von Prolin durch die Prolinoxidase (P5C-Reduktase). Somit überwiegt die Prolinsynthese und es kommt unter Wasserstreß (Salzstreß) zur Prolinakkumulation.

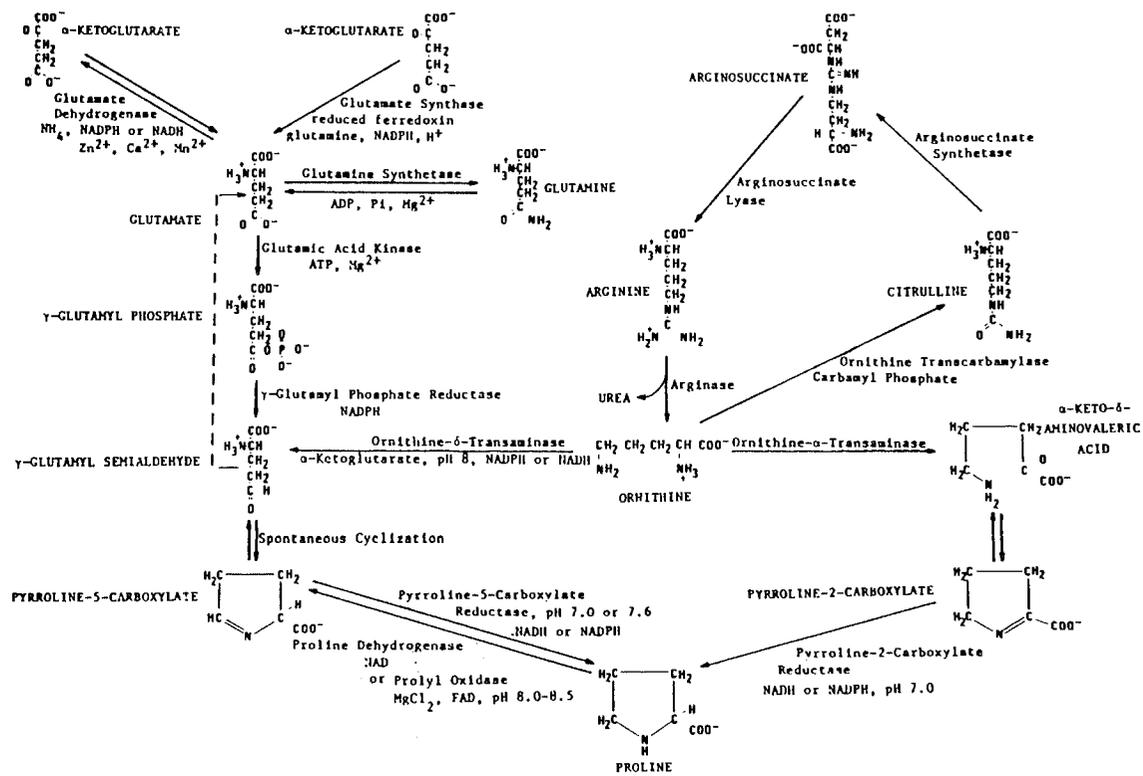


Abb. 15: Biosynthese und katabole Stoffwechselwege von L-Prolin in Pflanzen (aus Dashek und Erickson, 1981).

4.2.2.2. Organische Säuren

Eine "Acetat-ähnliche" Säure ist unter den gemessenen organischen Säuren dominant in beiden Diatomeenarten. Malat, Citrat und Lactat sind schwache Säuren mit pK' -Werten > 3 . Unter physiologischem pH von ca. 7 liegen sie als organische Anionen vor.

Auch wenn damit zu rechnen war, daß organische Säuren in dissoziierter Form beim Ladungsausgleich des Kationenüberschusses (s. Ionendiskussion) beteiligt sein könnten, so sind doch die Konzentrationen überraschend hoch. Allerdings deuten die hohen Standardfehler auf eine große Variabilität, besonders der unbekannt organischen Säure, hin. Teilweise wurde in einer Probe ein Vielfaches der Konzentration einer Parallelprobe gefunden. Möglicherweise ist dies auch methodisch bedingt. Das Basislinien-Grundrauschen bei der Leitfähigkeitsbestimmung im sauren Eluenten war groß, so daß eine korrekte Peak-Auswertung erschwert war.

Die organischen Säuren können in den Citrat-Zyklus eingeschleust und umgesetzt werden. Der Citrat-Zyklus, als amphiboler Stoffwechselweg, vermittelt zwischen katabolen und anabolen Sequenzen. Die organischen Säuren können sowohl vollständig im Citrat-Zyklus und der anschließenden Elektronentransportkette oxidiert werden als auch z.B. als Vorstufe für α -Ketoglutarat (2-Oxo-Glutarat) bzw. Oxalacetat zur Verfügung stehen. α -Ketoglutarat ist die Vorstufe zum Glutamat, aus dem die Aminosäuren der Glutamatfamilie wie Glutamin, Prolin, Ornithin und Arginin synthetisiert werden. Oxalacetat ist der Ausgangspunkt zur Synthese von Aspartat, Asparagin, Methionin, Threonin, Isoleucin und Lysin. Somit ist die direkt mit dem Citrat-Zyklus verzahnte Aminosäuresynthese möglicherweise auch mit den organischen Säuren verbunden. Anaplerotische Reaktionen müssen die entnommenen Zwischenprodukte des Citrat-Zyklus ständig auffüllen, um dessen Funktionstüchtigkeit zu gewährleisten. Hohe Konzentrationen an freien organischen Säuren können somit das C-Skelett für Folgereaktionen liefern, insbesondere für die Prolinsynthese unter Salzstreß.

Aufgrund von Wasserstreß-Versuchen mit der höheren Pflanze *Vicia faba* (Pferde- oder Saubohne) sollten die Quellen der Prolinsynthese ermittelt werden (Venekamp und Koot, 1988). Während des ersten Tages des Salzstresses stammen die Aminosäuren Prolin und Asparagin dieser Art aus freien Aminosäuren und aus sogenannten Aminotransfer-Komponenten aus dem Proteinabbau. Darunter sind die Aminosäuren zu verstehen, die in den Glutamat-Aminogruppen-Transfer einmünden können: Glutamat, Aspartat, Alanin, Serin,

Glycin und Glutamin. Während des zweiten Tages gelangten nur noch 15 % der aus Proteinen freiwerdenden Aminotransfer-Komponenten in die Prolinsynthese, während 85 % neu synthetisiert werden mußten. Unter dauerhaftem Salzstreß synthetisierte die Pflanze Prolin vermehrt aus anderen Quellen als den Aminotransfer-Komponenten. Die Autoren gehen von Nitrat als N-Quelle und möglicherweise organischen Säuren als C-Quelle aus. Die Hypothese konnte in einem weiteren Wasserstreß-Experiment mit *V. faber* im Licht und im Dunkeln bestätigt werden (Venekamp et al., 1989). Dabei trägt die Synthese organischer Säuren wie Citrat, Malat und Lactat zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität bei: Der Ladungsverlust des intrazellulären Nitrats, das in die Prolinsynthese einfließt, kann über die Synthese organischer Säuren kompensiert werden. Diese Betrachtung ist jedoch nur dann zulässig, wenn - wie in diesem Experiment - die Nitrataufnahme aus dem externen Milieu unmöglich ist. Es existiert unter diesen Bedingungen ein Korrelationskoeffizient von 0,8 zwischen der Summe der organischen Säuren der Respiration und Prolin. Der Korrelationskoeffizient zwischen den organischen Säuren der Photorespiration (Glycolat und Glycerin) und Prolin ist nur 0,5. Die verschiedenen Stoffwechsel-Schritte zur Prolinsynthese, angefangen bei der Glutamatdehydrogenase, stellen einen wirksamen metabolischen Mechanismus zum Entfernen überschüssiger H⁺-Ionen (aus der Synthese organischer Säuren) und damit zur Kontrolle des zellulären pH dar. In dieser Pflanze existiert also anscheinend eine enge Verknüpfung von organischen Säuren, Prolinsynthese und Regulation des pH unter Wasserstreß. Außerdem vermindert Lichtabschluß die Prolinsynthese, verhindert sie aber nicht. In *Chlorella autotrophica* konnten die Enzyme des Glyoxylat-Zyklus durch eine vorherige Dunkelinkubation induziert werden (Laliberté und Hellebust, 1989). Unter Salzstreß nahm die Art Acetat aus dem Medium auf und war dadurch in der Lage, hohe Prolinkonzentrationen zu synthetisieren.

Die Konzentrationen der unbekannt organischen Säure beider Eisalgen waren im Schwachlicht deutlich geringer als im Starklicht im Gegensatz zu den Ionenkonzentrationen, die sowohl absolut als auch prozentual zunahmen. Die Funktion zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität kann diese Konzentrationsunterschiede nicht erklären. Bis auf den Schwachlichtansatz von *Navicula* sp. zeigen alle Ansätze ihr Maximum bei 34 PSU. Wenn man die organischen Säuren als leicht verfügbare C-Quelle zum Anabolismus oder als Atmungssubstrat zur Energiegewinnung betrachtet, so spiegeln die hohen Werte unter Meerwassersalinität möglicherweise einen energetisch günstigen Zustand wider. Die Konzentrationen der organischen Säuren von *Chaetoceros* sp. sind im

Schwachlicht bei 17 und 34 PSU deutlich größer als die von *Navicula* sp.. Der Einfluß der Salinität ist aber konträr:

Während die Konzentration der "Acetat-ähnlichen" organischen Säure bei *Navicula* sp. mit der Salinität nahezu linear anstieg ($r = 0,97$), sank sie bei *Chaetoceros* sp. von 34 auf 51 PSU. Bei *Navicula* sp. unter $5 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ deutet sich ein Zusammenhang zwischen Salzstreß, Prolinsynthese, möglicherweise verminderter Nitratverfügbarkeit und Aufrechterhaltung der Elektroneutralität an.

Desweiteren tragen die organischen Säuren zu einem großen Teil zum osmotischen Potential der Algen bei. Man kann daher zumindest von einem Osmolytensystem mit zwei Hauptosmolyten ausgehen, in dem allerdings das Prolin als echte kompatible Substanz gilt, was für die unbekannte organische Säure aufgrund der Ladung und des zumeist fehlenden Anstiegs mit der Salinität nicht wahrscheinlich ist. Über die Kompartimentierung organischer Säuren ist bisher bei Algen nichts publiziert. Im Blatt von *Chenopodium* liegen die organischen Säuren zu ca. 63 % in der Vakuole vor (McCue und Hanson, 1990). Über die Kompatibilität hoher Konzentrationen organischer Säuren mit den Enzymen ist bisher nur wie o.b. ein eher stabilisierender Effekt auf die makromolekulare Konformation bekannt.

4.2.2.3. Homarin und DMSP

Die tertiäre Schwefelverbindung DMSP (Dimethylsulfoniumpropionat) ist wegen ihrer klimatologischen Bedeutung im letzten Jahrzehnt in den Blickpunkt der Forschung gerückt (zur Übersicht: Charlson et al., 1987). Dabei wird davon ausgegangen, daß das DMSP bzw. das Spaltprodukt DMS hauptsächlich vom Phytoplankton (Keller et al., 1989), aber auch von Makroalgen (White, 1982; Reed, 1983; Karsten, 1991) produziert und an das umgebende Wasser abgegeben wird. Aufgrund des großen Konzentrationsgradienten gelangt das DMS vom Wasser in die Atmosphäre, wo es dann durch Radikale (OH , NO_3) zu Schwefeldioxid und MSA (Methansulfonsäure) oxidiert wird. Das Schwefeldioxid - das zu Sulfat umgewandelt wird - und Methansulfonat dienen als Wolkenkondensationskerne, die die Wolkenbildung über den Ozeanen erhöhen. Dies ist besonders bedeutend für Regionen geringer Partikel- und Staubdichte (südliche Hemisphäre), da diese auch als Kondensationskerne fungieren. Die erhöhte Wolkenbildung steigert wiederum die Reflektion der Sonneneinstrahlung mit dem Effekt, daß die Phytoplanktonproduktion und damit auch die DMS-Freisetzung abnimmt. Die daraus resultierende verminderte Wolkenbildung verursacht die Erwärmung der Erde und eine erhöhte Produktion der Algen. Somit schließt sich der Regel-

kreis, dem die Gaia-Hypothese zugrundeliegt, wonach Organismen ihre Umwelt beeinflussen können und nicht nur durch sie beeinflusst werden (Lovelock et al., 1972; Lovelock, 1990). Dieser Regelmechanismus könnte dem Treibhauseffekt (der Erwärmung der Erde) entgegenwirken (Charlson et al., 1992).

Im Phytoplankton stellen die Dinophyceae und die Prymnesiophyceae (einschließlich Coccolithophoriden) die Hauptproduzenten dar (Keller et al., 1989). Die Autoren geben nur einzelne Vertreter der Bacillariophyceae an, die größere Mengen an DMSP enthalten, wie *Melosira nummuloides*.

In antarktischen Küstengewässern wurden hohe Konzentrationen an DMS im Wasser gemessen, die eng mit *Phaeocystis pouchetii*-Blüten korreliert waren, so daß diese Art als DMSP-Hauptproduzent gilt (Gibson et al., 1990; Fogelqvist, 1991; Kirst et al., 1991). Eisalgengemeinschaften, die hauptsächlich aus Diatomeen bestehen, besitzen (pro Liter) eine bis zu 245-fache DMSP-Konzentration der Algen in der Wassersäule unter dem Eis bzw. eine 20 bis 56-fache Konzentration der Algen im offenen Wasser (Kirst et al., 1991). Dabei gehören die Gemeinschaften aus der Salzlauge zu den geringeren Produzenten (kleines DMSP / Chl a-Verhältnis).

Für Makroalgen ist die Abhängigkeit der DMSP-Konzentration von Licht, Salinität, Temperatur und Saisonalität (Tageslänge) nachgewiesen (Karsten et al., 1990; Karsten, 1991). Die Konzentration der tertiären Schwefelverbindung nahm mit steigender Lichtintensität, Salinität und Tageslänge und mit sinkender Temperatur zu. In den Mikroalgen *Hymenomonas carterae* (Prymnesiophyceae), *Tetraselmis subcordiformis* (Prasinophyceae) und *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae, Diatomee) stieg die DMSP-Konzentration ebenfalls mit der Salinität an (Vairavamurthy et al., 1985; Dickson und Kirst, 1986, 1987). Für Eisalgen liegen bisher noch keine Daten vor.

Chaetoceros sp. ist wie viele Diatomeen kein DMSP-Produzent. Auch unter Stickstoffmangel-Bedingungen konnte keine DMSP-Akkumulation induziert werden. *Navicula* sp. ist mit 50 mol / m³ bei 50 µmol Photonen / m² s und 34 PSU ein mittlerer DMSP-Produzent. Diese Einstufung erfolgt aufgrund der Klassifikation von Kirst und Wiencke (1994), nach der die Algen mit einer Konzentration unter 50 mol / m³ als schwache und die mit einer größeren Konzentration (50-800 mol / m³) als starke DMSP-Produzenten eingeteilt werden. Die Konzentration nahm sowohl im Stark- als auch im Schwachlicht mit der Salinität zu, was die Osmolytfunction der Substanz bestätigt. Der Einfluß der Lichtintensität zeigt keine klare Tendenz auf. Während die Schwachlichtwerte für 17 und 34 PSU ca. doppelt so groß sind wie die im Starklicht, ist die DMSP-Konzentration bei 51 PSU im Schwachlicht deutlich größer als die bei 50 µmol

Photonen / m² s. Im Zusammenhang mit der sinkenden Prolinkonzentration im Schwachlicht gewinnt somit das DMSP an Bedeutung. Zudem haben Untersuchungen zur Funktion der tertiären Schwefelverbindung als kompatible Substanz bei *T. subcordiformis* ergeben, daß die optimale Schutzwirkung der Malatdehydrogenase bei einer Konzentration von bis zu 100 mol / m³ DMSP liegt (Gröne und Kirst, 1991). Bei 200 mol / m³ war eine deutliche Inhibition zu verzeichnen. In Anwesenheit von 100 mol / m³ DMSP war die Aktivität der MDH höher als bei äquimolarer Glycinbetain- und Mannitol-Konzentration. Die Ergebnisse der zitierten Autoren deuten auf einen engen Konzentrationsbereich hin, in dem das DMSP als kompatible Substanz bezeichnet werden kann. Sollten die *in vitro*-Versuche auf die Cytoplasma-Verhältnisse von *Navicula* sp. übertragbar sein, so befänden sich die gemessenen DMSP-Konzentrationen (< 100 mol / m³) im optimalen "Schutzbereich".

Quartäre Ammoniumverbindungen (QACs) und tertiäre Sulphoniumverbindungen (TSCs) besitzen ein Methylgruppen-substituierendes N- oder S-Atom, das eine positive Ladung trägt. Diese Substanzen sind in Bakterien, Cyanobakterien, Algen, höheren Pflanzen und Tieren nachgewiesen worden (Yancey et al., 1982). Fast alle bisher untersuchten Algenarten enthalten Betaine oder deren analoge Sulphoniumverbindungen (Blunden und Gordon, 1986). Die weitverbreitetsten sind Glycinbetain, γ -Aminobuttersäure-Betain, Prolinbetain und das oben bereits diskutierte DMSP. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse für verschiedene Arten einer Gattung, kann von einer "taxonomischen Signifikanz" der Komponenten ausgegangen werden (Blunden et al., 1992). Für Diatomeen sind bisher die Verbindungen Glycinbetain (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Cyclotella cryptica* und *C. meneghiniana*) und Homarin (*C. cryptica* und *C. meneghiniana*) nachgewiesen worden (Roch et al., 1985; Blunden und Gordon, 1986; Dickson und Kirst, 1987). Die zuletzt zitierten Autoren fanden eine Akkumulation von Glycinbetain und Homarin mit ansteigender Salinität. In der Prasinophyceae *Tetraselmis* (*Platimonas*) *subcordiformis* werden die QACs allerdings erst nach einer ca. 3-stündigen lag-Phase synthetisiert, was auf eine *de novo*-Synthese der beteiligten Enzyme hindeutet (Dickson und Kirst, 1986). Hinsichtlich der Verträglichkeit der QACs mit den Enzymen des Cytoplasmas ist bei Algen nichts bekannt. Die Wirkung der Verbindungen wurden hauptsächlich in höheren Pflanzen untersucht (zur Übersicht: Rhodes und Hanson, 1993). Danach gelten die meisten QACs als kompatible Substanzen, aber nicht alle: Für Trigonellin, Acetylcholin, S-Methyl-L-Methionin und S-Adenosyl-L-Methionin konnten keine verträglichen

Eigenschaften bestätigt werden. Am meisten ist über das Glycinbetain bekannt, das gut wasserlöslich ist, keine Nettoladung unter physiologischem pH trägt (Wyn Jones und Storey, 1981) und wahrscheinlich nahezu zu 100 % im Cytoplasma (in *Chenopodium*) vorliegt (McCue und Hanson, 1990).

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die "taxonomische Signifikanz" der QACs: In beiden Diatomeenarten wurde Homarin gefunden. Für *Navicula* sp. kann eine weitere Substanz nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund methodischer Schwierigkeiten konnten ein Systempeak und möglicherweise ein Komponentenpeak nicht getrennt und quantifiziert werden. Dieser vermeintliche Komponentenpeak trat aber nicht reproduzierbar auf, so daß es sich dabei um einen Probenaufbereitungseffekt handeln könnte. Einerseits weisen die sehr niedrigen Konzentrationen auf die Funktion als Membran-modifizierende Substanz hin (Blunden und Gordon, 1986), andererseits stiegen die Homarinkonzentrationen mit der Salinität an, was auf die Funktion als kompatible Substanz hindeutet. Die hohen Homarinkonzentrationen, die bei *T. subcordiformis* gefunden wurden, unterstützen die Hypothese, daß es sich um eine kompatible Substanz handeln könnte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Homarin und Trigonellin (dieselbe Summenformel, aber unterschiedliche Strukturformeln), das nicht als kompatible Substanz gilt, lassen sich keine eindeutigen Aussagen zur Funktion der Substanz machen. Ein direkter Konzentrationsvergleich der beiden Eisalgen mit den *Cyclotella*-Arten (Dickson und Kirst, 1987) ist leider nicht möglich, da Glycinbetain und Homarin aufgrund der verwendeten Bestimmungsmethode in den Brackwasserarten nicht getrennt quantifiziert werden konnten. Die Gesamtkonzentration lag mit 120 mol / m³ QACs (bei 400 mol / m³ NaCl = ca. 26 PSU) in den *Cyclotella*-Arten deutlich höher als in den Eisalgen, in denen die maximale Homarinkonzentration nur 23 mol / m³ (bei *Chaetoceros* sp. bei 51 PSU im Schwachlicht) betrug. Quantitativ ist die Verbindung damit im Bereich der Aminosäurekonzentrationen.

4.2.2.4. Vitalität

Die Fluoreszenzmessung kann nicht nur zur Bestimmung des Chl a-Gehaltes, sondern auch zur Ermittlung der Photosynthesekapazität eingesetzt werden. Darunter ist die durchschnittliche maximale Rate der Nettophotosynthese von Pflanzen bei natürlicher CO₂-Versorgung sowie optimalen Licht-, Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen zu verstehen (Borriss und Libbert, 1984). Zur Messung werden die verzögerte Fluoreszenz nach einer Dunkelinkubation (F_N) und die maximale Fluoreszenz zueinander in Beziehung gesetzt. Die maximale Fluoreszenz wird durch die Zugabe eines Inhibitors (DCMU) erzeugt, der den

nicht-zyklischen Elektronentransport (PS II) blockiert und damit die Löschung ("quenching") der Elektronen verhindert. In Versuchen mit einzelligen Grünalgen in Batch-Kulturen konnte eine gute Korrelation zwischen der Photosyntheserate und dem relativen Anstieg der Fluoreszenz nach der Inhibition des Elektronentransports mit DCMU festgestellt werden (Samuelsson und Öquist, 1977). Während der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Algen ihr Photosynthesemaximum erreichten, waren die durch DCMU induzierten Fluoreszenzwerte (F_D) am größten. In der stationären Phase, in der die Photosyntheserate abnahm, sanken sie ab. In Felduntersuchungen und Laborexperimenten von Phytoplanktern stellte sich das Verhältnis F_D / F_N als Index für die Effizienz der Photosynthese (Energieausnutzung) und als Indikator für die spezifische Photosyntheserate unter sich verändernden Umweltfaktoren bei gleichbleibender Lichtintensität heraus (Roy und Legendre, 1979). Eine Verminderung der Lichtintensität führte zur Erhöhung von F_D / F_N , obwohl die Photosyntheserate abnahm. Nährstoffmangel resultierte in der Verminderung von F_D / F_N . Cullen und Renger (1979) führten den FRI (Fluorescence response index: $(F_D - F_N) / F_D$) ein. Sie gingen von der Annahme aus, daß die Fluoreszenz pro Chlorophylleinheit umgekehrt proportional zur Photosynthesekapazität ist. Je geringer der Anteil an photochemisch genutzten Elektronen ist, desto größer ist die Fluoreszenz und umgekehrt. Somit zeigt ein FRI von 0 keine Photosynthesekapazität. Die Algen sind in diesem Fall Stoffwechsel-inaktiv oder tot. Ansteigende FRI-Werte kennzeichnen eine zunehmende Photosynthesekapazität. Für die Diatomeen gemäßigter Regionen, *Phaeodactylum tricornerutum* und *Thalassiosira weissflogii*, liegen FRI-Werte von 0,55 und 0,6 bei 10 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ bzw. von 0,33 und 0,42 bei 100 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vor (Furuya und Li, 1992). Obwohl die FRI-Werte im Schwachlicht deutlich höher als im Starklicht lagen, war die C-Assimilationsrate bei 100 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ größer. Der Schwachlichteffekt wird damit erklärt, daß viele Phytoplankter unter verringerter Lichtintensität die Menge an Lichtsammelpigmenten erhöhen, wodurch sich wahrscheinlich die Effizienz des Transfers der Anregungsenergie von akzessorischen Pigmenten auf das Chl a erhöht.

Der FRI gibt somit Auskunft über den physiologischen Zustand der Alge unter verschiedenen Umweltbedingungen. Ein direkter Schluß vom FRI auf die absolute C-Assimilationsrate bei unterschiedlicher Lichtintensität ist allerdings nicht möglich.

Aus kurzzeitigen Salzstreß-Untersuchungen zur Fluoreszenzinduktion und aus Photosynthese-Licht-Kurven arktischer pennater Eisalgen aus der Untereis-

schicht ist bekannt, daß sie ihr Salinitätsoptimum bei Umgebungssalinität (ca. 30 PSU) haben (Bates und Cota, 1986). FRI-Werte sind nicht angegeben.

Die FRI-Werte von *Chaetoceros* sp. zeigen sowohl im Stark- als auch im Schwachlicht einen deutlichen Salinitätseffekt. Dabei ist die Effizienz der Lichtnutzung im hypoosmotischen Bereich (17 PSU) am größten. Dies ist bemerkenswert, da die Salinität von 17 PSU die untere Grenze des Wachstumsbereichs der Art im Schwachlicht markiert. Die Abnahme des FRI bei 51 PSU im Starklicht läßt sich mit der deutlichen Abnahme der Wachstumsrate erklären. Im Schwachlicht ist bei ähnlich starker Abnahme des FRI keine nennenswerte Verminderung der Wachstumsrate festzustellen. Die verminderte photochemische Nutzung der Lichtenergie (geringere Fluoreszenzlöschung) reicht offenbar aus, dem erhöhten Energiebedarf für den Ionentransport und die Synthese bzw. Regulation einer hohen Konzentration organischer Osmolyte unter Salzstreß und Schwachlicht zu genügen. Die verringerte Photosynthesekapazität genügt anscheinend, die ständig für das Wachstum erforderlichen Zellmetabolite bereitzustellen.

Insgesamt liegen die FRI-Werte für alle Ansätze von *Chaetoceros* sp. (außer 51 PSU) deutlich höher als die der gemäßigten Diatomeen (Furuya und Li, 1992).

Auch bei *Navicula* sp. führt erhöhte Salinität im Starklicht zu einer drastischen Abnahme des FRI. Allerdings spiegelt sich diese Tendenz nicht in einer verminderten Wachstumsrate wider. Im Schwachlicht liegt das Optimum des FRI bei Meerwassersalinität (34 PSU), was im Einklang mit der Literatur steht (Bates und Cota, 1986). Aufgrund der fehlenden Wachstumsdaten unter dieser Lichtintensität kann keine Diskussion mit den Fluoreszenzdaten erfolgen. Auch die FRI-Werte von *Navicula* sp. liegen im oberen Bereich oder über den FRI-Werten für Diatomeen gemäßiger Regionen.

Ob eine Korrelation des FRI und der C-Assimilationsrate vorliegt, könnte nur durch Photosynthese-Experimente unter entsprechenden Bedingungen geklärt werden. Bestünde eine solche Korrelation, so wäre mit Verminderung des FRI eine Reduktion des Wachstums zu erwarten. Die Wachstumsdaten der Stammkulturen zeigen aber keine klare Tendenz. Der FRI der untersuchten Eisalgen ist primär eine Funktion der Salinität. Er ist zum Teil deutlich höher als bei Diatomeen gemäßiger Regionen. Der Einfluß der Lichtintensität ist von geringerer Bedeutung. Der FRI eignet sich in Bezug auf die untersuchten Arten wohl als Vitalitätstest (Stoffwechselaktivität), aber nicht als Mittel zur Quantifizierung der C-Assimilation. Da dieser Index vornehmlich zur Beurteilung

der Vitalität während der Langzeit-Dunkelinkubation (s. Kap. 5.) bestimmt wurde, spielt die quantitative Einschätzung der Fluoreszenzergebnisse eine untergeordnete Rolle.

5. Langzeit-Dunkelinkubation

5.1. Ergebnisse

Als Vitalitätstest wurde der FRI als Maß für die Photosynthesekapazität bestimmt. Desweiteren diente die mikroskopische Zellzahlbestimmung nicht nur der Erfassung der Bezugsgröße, sondern auch als Kontrolle für den Zustand der Algenkulturen. Als kompatible Substanzen sollten Prolin, Homarin und DMSP (nur bei *Navicula* sp.) erfaßt werden. In Bezug auf *Chaetoceros* sp. konnte nur Prolin gemessen werden, da sich die Zellen der Langzeit-Inkubation als zu labil für die Standardaufbereitung erwiesen (s. Material und Methoden). Auch *Navicula* sp. erwies sich als zu empfindlich gegenüber dem mehrmaligen Zentrifugieren, so daß die Pellets nur einfach mit Sorbitol gewaschen werden konnten. Es mußte daher auf die Bestimmung der Ionen verzichtet werden.

5.1.1. Prolinkonzentration und Populationsdichte nach Vorinkubation im Schwachlicht

Die Prolinkonzentrationen aller Ansätze nahmen während der 84-tägigen Dunkelinkubation deutlich ab (Abb. 16). Am deutlichsten war dies im Ansatz von *Chaetoceros* sp. bei 51 PSU zu beobachten, in dem die absolute Prolinkonzentration um ca. 300 mol / m³ sank. Die Zellzahl zeigte im Gegensatz zur Prolinkonzentration während des Versuchs eine schwach steigende Tendenz, die in den *Chaetoceros* sp.-Ansätzen stärker ausgeprägt war als in denen von *Navicula* sp.. Die wesentlichen Veränderungen sowohl der Prolinkonzentration als auch der Zellzahl waren im Zeitraum von 0 bis 56 d zu verzeichnen, während zwischen den Probennahmen von 56 und 84 d nur noch geringfügige Unterschiede auftraten. Eine Ausnahme davon bildete die 34 PSU-Probe von *Chaetoceros* sp., bei der zwar die Prolinkonzentration konstant blieb, aber die Zellzahl weiter schwach anstieg. Aufgrund der stark überlappenden Standardabweichung der Zellzahl für den Erntezeitpunkt nach 56 d mit dem Mittelwert nach 84 d sollte dieser Unterschied jedoch nicht überbewertet werden.

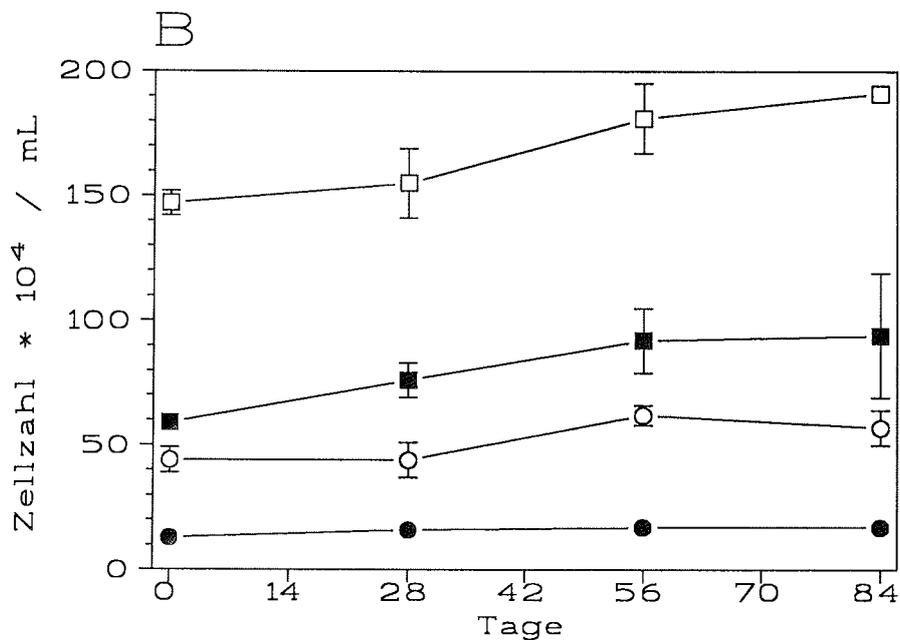
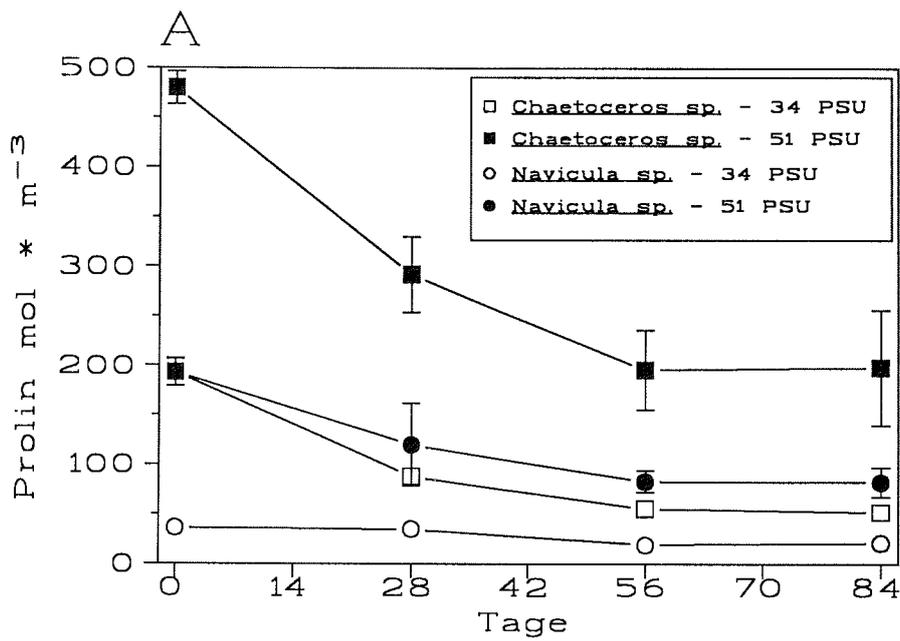


Abb. 16: Prolinkonzentration und Zellzahl während einer 84-tägigen Dunkelinkubation bei 4 °C. Die Kulturen wurden bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. A = Prolinkonzentration in mol / m^3 . B = Zellzahl * $10^4 / \text{mL}$.

5.1.2. Vitalität

Der FRI (Fluorescence response index) blieb während des gesamten Versuchszeitraums auf einem hohen Niveau. Er sank bei *Chaetoceros* sp. nie unter den Anfangswert (Abb. 17). Die beiden Arten zeigten eine unterschiedliche Entwicklung der Fluoreszenzwerte auf: Während der FRI von *Navicula* sp. kontinuierlich mit der Versuchsdauer abnahm, wurden die FRI-Werte der beiden *Chaetoceros* sp.-Ansätze nach 14 d deutlich stimuliert, um dann auf ein letztendlich gleiches Niveau wieder abzufallen. Ab dem Probenzeitraum von 14 d lagen die *Chaetoceros* sp.-Werte deutlich über denen von *Navicula* sp.. Aufgrund von Kultivierungsschwierigkeiten konnten für *Navicula* sp. und *Chaetoceros* sp. nicht dieselben Probenzeitpunkte und die Gesamtdauer des Versuchs eingehalten werden.

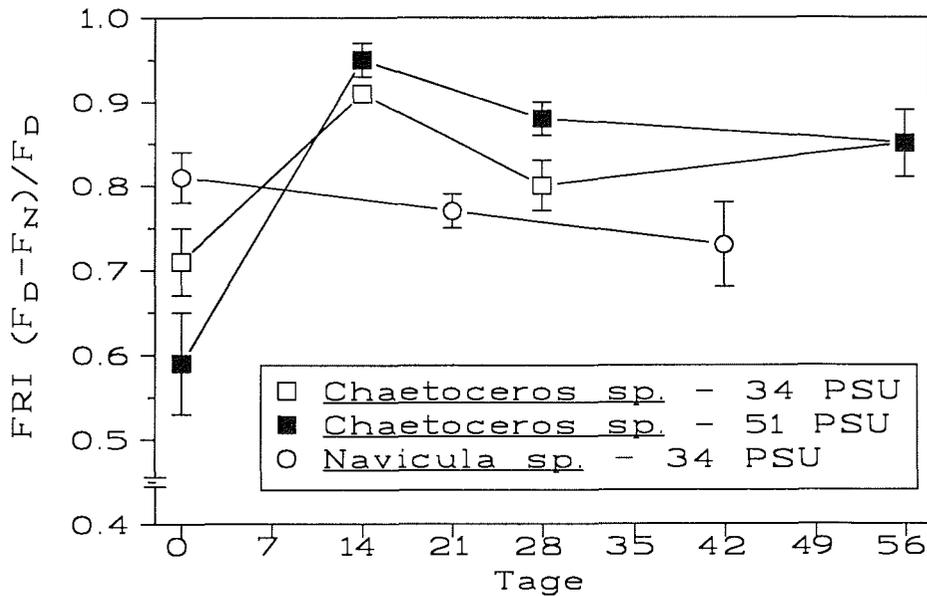


Abb. 17: FRI (Fluorescence response index) als Maß für die Photosynthesekapazität im Verlauf einer 56 (42)-tägigen Dunkelinkubation bei 4 °C von *Chaetoceros* sp. (34 und 51 PSU) und *Navicula* sp. (34 PSU). $FRI = (F_D - F_N) / F_D$. Wobei F_D = Fluoreszenz nach Zugabe von DCMU und F_N = Fluoreszenz vor Zugabe von DCMU bedeutet. *Chaetoceros* sp. wurde bei 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$, *Navicula* sp. bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

5.1.3. Prolin, DMSP, Homarin und Populationsdichte in *Navicula* sp. nach Vorinkubation im Starklicht

Die Prolinkonzentration des bei $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubierten *Navicula*-Ansatzes (Abb. 18) nahm, wie die Zellzahl (Abb. 19), deutlich bis zur ersten Probennahme nach 21 d ab, um dann konstant zu bleiben. Die DMSP- und Homarinwerte von *Navicula* sp. zeigten im Vergleich zum Prolin eine andere Tendenz (Abb. 20). Die Konzentrationen lagen bei Versuchsende höher als zu Beginn. Dabei waren die Konzentrationsunterschiede allerdings sehr gering. Sieht man von dem DMSP-Wert für 21 d ab, so zeigen beide Kurven einen parallelen Verlauf.

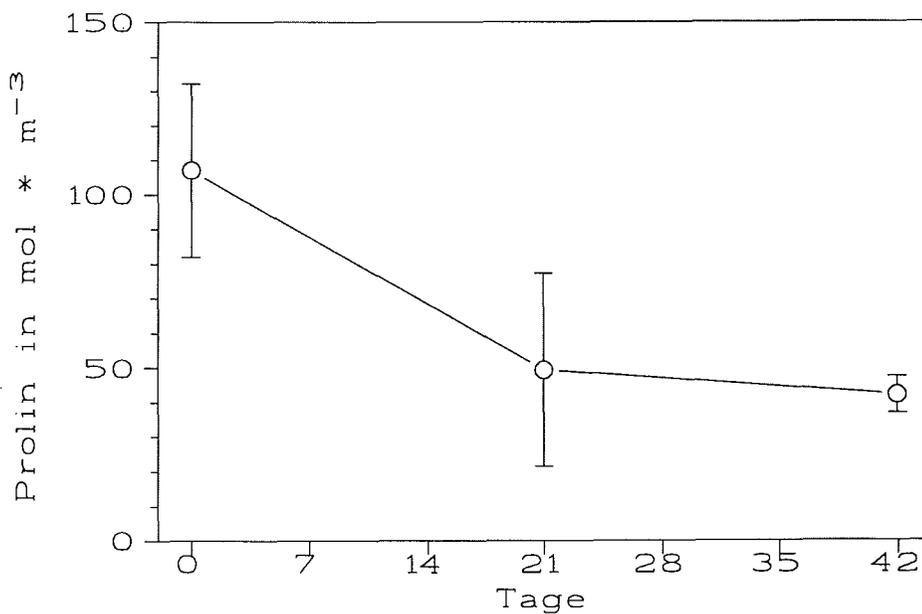


Abb. 18: Prolinkonzentration von *Navicula* sp. während einer 42-tägigen Langzeitinkubation im Dunkeln nach einer Vorinkubation bei $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

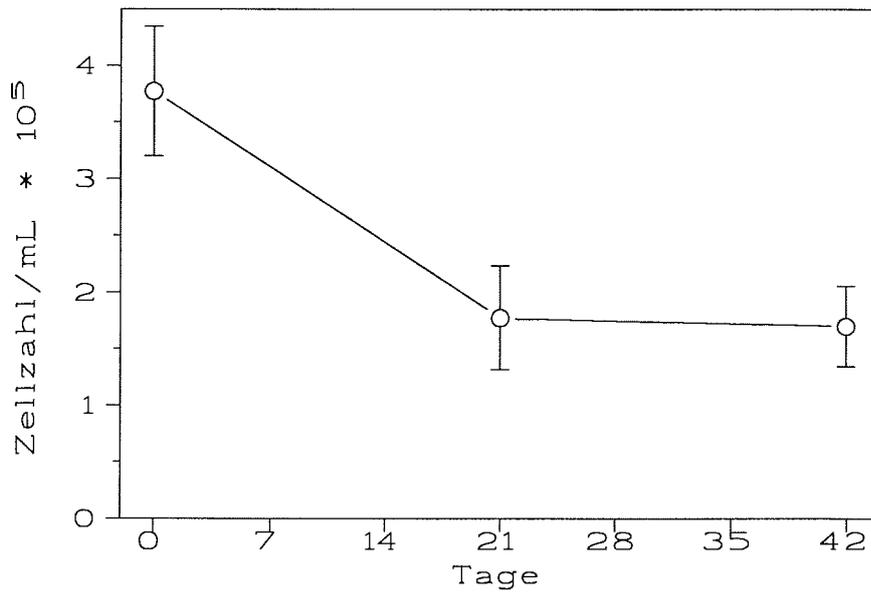


Abb. 19: Zellzahl von *Navicula* sp. (34 PSU) während einer 42-tägigen Dunkelinkubation. Die Zellen wurden bei $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

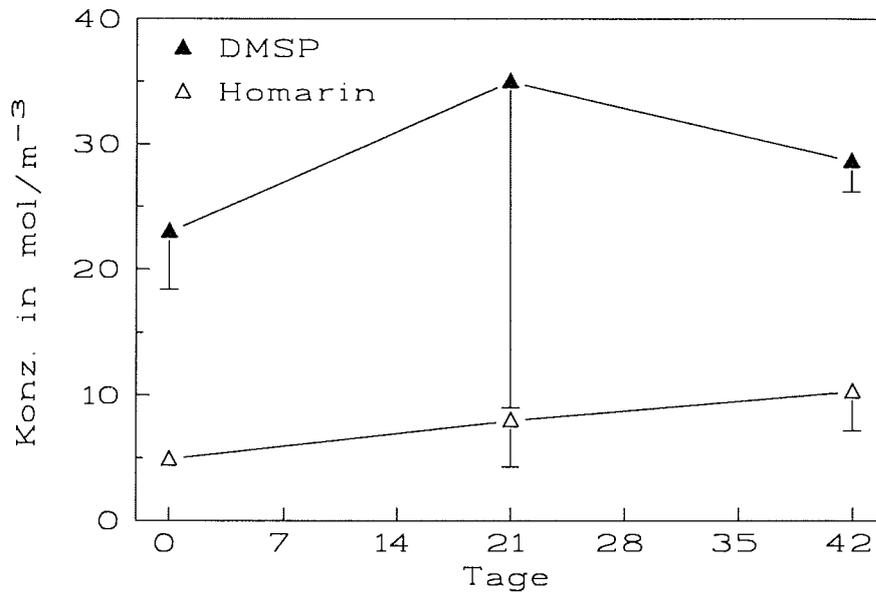


Abb. 20: DMSP- und Homarinkonzentration von *Navicula* sp. (34 PSU) im Verlauf einer 42-tägigen Dunkelinkubation. Die Kultur wurde bei $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

5.2. Diskussion

Aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber mechanischer Belastung bei der Aufbereitung mußte auf die Erfassung der Ionen verzichtet werden (s. Kap. 5.1.). Von besonderem Interesse sind die Konzentrationsveränderungen des Hauptosmolyten Prolin und die Überlebensrate der beiden Eisalgen in Abhängigkeit von der Dauer der Dunkelinkubation. Die DMSP- und Homarinkonzentrationen, als quantitativ nicht so bedeutende Osmolyte, wurden zusätzlich in *Navicula* sp. nach einer Vorinkubation bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ ermittelt.

In den im Schwachlicht (5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) vorinkubierten Kulturen der beiden Eisalgen ist eine leichte Zellzahlzunahme mit zunehmender Inkubationsdauer zu verzeichnen. Diese Ergebnisse dokumentieren nicht nur eine hohe Überlebensrate, sondern sogar eine Zunahme der Populationsdichte nach 56 bzw. 84 d der Dunkelinkubation. Ob es sich bei den überlebenden Zellen um vegetative oder Dauerstadien handelt, kann nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Im Gegensatz zu Dauersporen, die sich durch eine stark verdickte Zellwand auszeichnen, weisen die Dauerstadien von Diatomeen oft keine markanten morphologischen Unterschiede zur vegetativen Zelle auf (Du Preez und Bate, 1992). Die Art *Chaetoceros pseudocurvisetus* bildet unter Nährstoffmangel sowohl Dauersporen als auch Dauerstadien aus (Kuwata et al., 1993). Dabei zeichnen sich die Dauerstadien durch schwach pigmentierte Zellen mit geschrumpften und fragmentierten Chloroplasten aus. Dies stimmt gut mit der mikroskopischen Beobachtung ab 28 d der Dunkelinkubation der *Chaetoceros* sp.-Ansätze überein. Die *Navicula* sp.-Zellen zeigten ein verdichtetes Cytoplasma wie die Dauerstadien der Brandungsdiatomee *Anaulus australis* auf (Du Preez und Bate, 1992).

Aufgrund der geringfügigen Unterschiede zwischen den vegetativen und dunkelinkubierten Zellen ist von einer Dauerstadienbildung (ab 28 d) auszugehen. Demgemäß wären mit zunehmender Dauer der Dunkelinkubation stoffwechsellinaktivere Zellen mit abnehmendem FRI-Werten zu erwarten gewesen. Diese Erwartung wird von beiden Arten ab 28 d mit den abfallenden FRI-Werten (geringere Photosynthesekapazität) bestätigt (Abb. 17).

Über die Zunahme des FRI von *Chaetoceros* sp. nach 14 d kann nur spekuliert werden. Die Photosynthesekapazität von *Anaulus australis* blieb trotz Dunkelinkubation 3-4 d konstant (Du Preez und Bate, 1992). Die Autoren erklären die Aufrechterhaltung der Photosynthesekapazität mit der Erhöhung der Pigmentkonzentrationen von Chl a und Fucoxanthin während dieser Inkubationszeit. Der Abfall der Photosynthesekapazität kann mit der Abnahme der Konzentration der

Ribulosebisphosphatcarboxylase, des photosynthetischen Elektronentransport-systems und den niedrigen Konzentrationen der Calvin-Zyklus-Intermediate erklärt werden, wie dies bei *Scenedesmus obliquus* gefunden wurde (Kulandaivelu und Senger, 1976). Möglicherweise erhöht die Art *Chaetoceros* sp. während der ersten 14 d der Dunkelinkubation die Pigmentkonzentrationen und die der Ribulosebisphosphatcarboxylase. Mit der Konzentrationserhöhung des Enzyms würde sich das photochemische "Quenching" und damit der FRI (Photosynthesekapazität) erhöhen.

Die Halbierung der Zellzahl der unter 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ vorinkubierten *Navicula*-Ansätze nach 21 d der Dunkelinkubation, die aufgrund der leeren Schalen im mikroskopischen Bild nachzuvollziehen ist, deutet auf einen starken Einfluß der Vorinkubation hin. Der Unterschied der 34 PSU-Ansätze von *Navicula* sp. im Vergleich zu den 34 PSU-Ansätzen von *Chaetoceros* sp. bestand ausschließlich in der unterschiedlichen Lichtintensität der Vorinkubation. Die im Starklicht vorinkubierten Algen zeigen somit eine deutlich geringere Überlebensrate. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Versuchsergebnissen zum Sommer-Winter-Übergang mit zwei Klons der Art *Fragilariopsis (Nitzschia) cylindrus* und einer pennaten arktischen Diatomee (Palmisano und Sullivan, 1983). Die Erniedrigung der Lichtintensität von 46 auf 0 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ und der Temperatur von 0 auf $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie die Erhöhung der Salinität von 20 auf 39 PSU führten zur Erhöhung der Überlebensrate der genannten Arten. Die alleinige Erniedrigung der Lichtintensität von 46 auf 0 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ hatte dabei ebenfalls einen positiven Effekt auf die Überlebensrate. Der Effekt der Lichtintensität besteht während dieses jahreszeitlichen Übergangs wahrscheinlich in der Erniedrigung der Wachstumsrate und der Erhöhung des Heterotrophiepotentials (Palmisano und Sullivan, 1982). Dem Licht wird die Funktion als Steuerungsfaktor zur Einleitung von Anpassungsmechanismen zum Überwintern beigemessen. Bunt und Lee (1972) kommen aufgrund einer 3 monatigen Dunkelinkubation bei $-1,8 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einer ebenfalls 3 monatigen Vorinkubation bei 861-1076 Lux und $-1,8 \text{ }^\circ\text{C}$ zu dem Schluß, daß die Heterotrophie keine Rolle beim Überleben im Dunkeln spielt. Acetat, Pyruvat, Glycolat, Succinat, Citrat, Lactat und Glycin hatten keinen Einfluß auf das Wachstum von *Fragilaria sublinearis* und *Chaetoceros fragile*. Dem gegenüber stehen hohe Aufnahme-raten von Aminosäuren durch Eisalgen im Licht und im Dunkeln (Rivkin und Putt, 1987). Möglicherweise sind die angebotenen Substrate entscheidend.

Die Ergebnisse aus der Literatur sind kontrovers in Bezug auf die Funktion des Lichts, den Einfluß des Lichts auf die Heterotrophie und auf die Bedeutung der Heterotrophie zum Überleben im Dunkeln. Den in dieser Arbeit untersuchten Kulturen wurden keine organischen Substrate zugesetzt. Die Heterotrophiefähigkeit kann also nicht entscheidend zum Überleben beigetragen haben, auch wenn Bakterien zum Recycling von Nährstoffen aus abgestorbenen Zellen (bei *Navicula* sp.) beigetragen haben sollten, und die Arten in der Lage gewesen wären, diese im Dunkeln aufzunehmen. Letzteres ist zumindest für *Chaetoceros* sp. unwahrscheinlich. Die Ergebnisse zur Erhöhung der Prolinkonzentration durch verschiedene N-Quellen im Dunkeln, nach einem hyperosmotischen Schock, sind negativ (Kap. 6.1.2.1.). Kein Widerspruch besteht zwischen den Ergebnissen der zitierten Arbeiten und den eigenen Resultaten in deren Einschätzung hinsichtlich der ökologischen Bedeutung: Wenn auch Licht, Temperatur, Salinität und Heterotrophiepotential einen Einfluß auf die Überlebensrate haben mögen, überlebensnotwendig sind sie nicht. Auch ein kleiner Teil der Population von ca. 1 %, wie er in Laborexperimenten ohne simulierten Sommer-Winter-Übergang gemessen wurde (Palmisano und Sullivan, 1983), würde zur Wiederbesiedelung der Wassersäule im Frühjahr / Sommer ausreichen.

Von einer Zellzahlzunahme während einer mehrmonatigen Dunkelinkubation - wie bei *Chaetoceros* sp. - ist bisher noch nicht berichtet worden. Dieses Ergebnis verlangt nach einer Erklärung. Möglicherweise steht die Prolinkonzentration im Zusammenhang mit der Populationsentwicklung. Aus den Indizes für die Zellzahlzunahme bzw. -abnahme und der Prolinabnahme läßt sich folgern, daß die Prolinkonzentration stärker sinkt als die Zellzahl ansteigt (Tab. 11). Die Prolinkonzentration vermindert sich also nicht nur aufgrund von Zellteilung und der damit einhergehenden Verteilung auf Tochterzellen. Vermutlich wird die Iminosäure mit zunehmender Inkubationsdauer in andere Zellmetabolite umgewandelt, in Proteine eingebaut oder veratmet. Somit dient dieser Osmolyt nicht nur als kompatible Substanz zum Schutz gegen erhöhte interne Salzkonzentrationen, sondern möglicherweise auch als Stickstoffquelle und Atmungssubstrat. Bemerkenswert ist dabei das Erreichen einer Minimalkonzentration, die klar von der Salinität abhängt. Die Kurven der beiden 51 PSU-Ansätze von *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. liegen deutlich über denen bei 34 PSU. Das Wachstum ist anscheinend direkt mit der Prolinabnahme gekoppelt: Nachdem die Prolinabnahme nach 56 d stagniert, kommt es auch zu keinem nennenswerten Wachstum mehr. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß

der Hauptosmolyt als Energiespeicher fungieren könnte, dessen Reserven aber nur bis zu einer salinitätsabhängigen Konzentration aufgebraucht werden können. Die Prolinkonzentration der Stammkulturen ist daher nicht zwingend notwendig, um die Zellfunktionen aufrechtzuerhalten. Die Mindestkonzentrationen bei einer Salinität von ≥ 34 PSU sind artspezifisch und liegen für *Navicula* sp. deutlich niedriger als für *Chaetoceros* sp.. Die Arten leisten sich unter günstigen Lichtbedingungen einen "Überschuß" (P_{0-34}) an Prolin, der unter ungünstigen abiotischen Faktoren (Lichtabschluß) aufgezehrt werden kann (Tab. 11). Vielleicht trägt der größere "Prolinüberschuß" von *Chaetoceros* sp. zur Dominanz in Wintergemeinschaften im Packeis bei, wie sie für *Chaetoceros neogracile* und verschiedene *Nitzschia*-Arten festgestellt worden ist (Garrison und Close, 1993).

Neben den Reservestoffen Chrysolaminarin und Lipiden könnte Prolin eine zusätzliche C-Quelle darstellen. Andererseits deutet der in Laborversuchen ermittelte hohe Einbau von photoassimiliertem Kohlenstoff (bei 130-150 μmol Photonen / $\text{m}^2 \text{s}$) zu 14-23 % in Lipide auf deren Bedeutung als hauptsächliche C-Quelle (Reservestoff) hin (Thomas und Gleitz, 1993). Vergleichsweise lagen in der in den Wintergemeinschaften nicht aufgeführten Art *Nitzschia curta* nur 7-8 % des assimilierten Kohlenstoffs in Lipiden vor.

Die untersuchten Eisalgen sind beim Überwintern anscheinend unabhängig von einem ausgeprägten Heterotrophiepotential und organischen Substraten, weil sie wahrscheinlich ihre Energiereserve in Form von Lipiden während der langen Dunkelperiode aufzehren. Inwieweit Prolin, neben der vermuteten Funktion als N-Quelle, auch als zusätzliche C-Quelle in Betracht kommt, kann nicht abschließend beurteilt werden. Hierzu hätten die Reservestoffe (Lipide und Chrysolaminarin) und deren Abnahme bzw. Umbau während der Dunkelinkubation bestimmt werden müssen.

Das mit der Inkubationsdauer schwindende osmotische Potential des Osmolyten Prolin wird vermutlich durch Akkumulation von Ionen kompensiert.

Tab. 11: Zusammenhang der Prolinkonzentration und der Zellzahlveränderung während der Dunkelinkubation bei 4 °C. Verhältnis $Z_{84/0}$ der Endzellzahl (d = 84) / Anfangszellzahl (d = 0) und Verhältnis $P_{0/84}$ der Prolinkonzentration (d = 0) / Prolinkonzentration (d = 84). $Z_{84/0}$ gibt die Zunahme bzw. Abnahme der Zellzahl und $P_{0/84}$ die Abnahme der Prolinkonzentration während der 84-tägigen Dunkelinkubation wieder. P_{0-84} gibt die Differenz der Prolinkonzentration zu Beginn und zum Ende der Dunkelinkubation an. * *Navicula* sp. nach einer Vorinkubation bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Die Inkubationsdauer betrug 42 d. Es gelten entsprechend $Z_{42/0}$, $P_{0/42}$ und P_{0-42} .

Art	Salinität [PSU]	$Z_{84/0}$	$P_{0/84}$	P_{0-84} [mol / m ³]
<i>Chaetoceros</i> sp.	34	1,3	3,7	141
<i>Chaetoceros</i> sp.	51	1,6	2,4	282
<i>Navicula</i> sp.	34	1,3	1,7	15
* <i>Navicula</i> sp.	34	*0,4	*2,5	*65
<i>Navicula</i> sp.	51	1,3	2,3	111

Die sich nur geringfügig ändernden Konzentrationen von DMSP und Homarin in *Navicula* sp. deuten nicht auf die Funktion dieser Osmolyte als sekundäre Energiespeicher hin, wie dies von Karsten (1991) für DMSP bei Makroalgen vorgeschlagen wird. Wahrscheinlicher erscheint hier die synergistische Wirkung (Paleg et al., 1985) der verschiedenen Osmolyte (DMSP, Homarin, Aminosäuren) als kompatible Substanzen, deren Bedeutung möglicherweise mit der Prolinabnahme steigt. Eine Ersatzfunktion für Prolin ist aber nicht zu postulieren, denn dann wären steigende Osmolytkonzentrationen mit zunehmender Inkubationsdauer zu erwarten gewesen. Die auch nach langer Dunkelinkubation konstante DMSP-Konzentration erklärt vermutlich auch die hohen Konzentrationen, die in Freilanduntersuchungen in den verschiedenen Eisalngemeinschaften unterschiedlich alten Packeises gemessen worden sind (Kirst et al., 1991). Wenn auch die Untersuchungen zum DMSP- und Homaringehalt in den Stammkulturen ergeben haben, daß Licht und Salinität einen deutlichen Einfluß auf die Konzentrationen dieser Osmolyte haben, so muß dies für die 42-tägige Dunkelinkubation unter konstanten Bedingungen (Temperatur und Salinität) verneint werden.

6. Prolinstoffwechsel

6.1. Ergebnisse

Das folgende Kapitel spiegelt die Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. unter verschiedenen hypo- und hyperosmotischen Versuchsbedingungen wider.

6.1.1. Hypoosmotische Bedingungen

6.1.1.1. Prolinkonzentration in Zelle und Medium im zeitlichen Verlauf nach einem abrupten hypoosmotischen Schock

Nach einer hypoosmotischen Belastung von 51 auf 17 PSU wurde die Prolinabgabe an das Medium bzw. die Prolinkonzentration in den Zellen verfolgt (Abb. 21). Sofort nach dem hypoosmotischen Schock nahm die Konzentration in den Zellen abrupt ab, während sie im Medium entsprechend zunahm. Das Maximum der Prolinkonzentration im Medium war nach 30 min erreicht. Fortan sank die Konzentration der Iminosäure im Medium im zeitlichen Verlauf beständig weiter. In den Zellen hingegen nahm die Prolinkonzentration nach 4 h

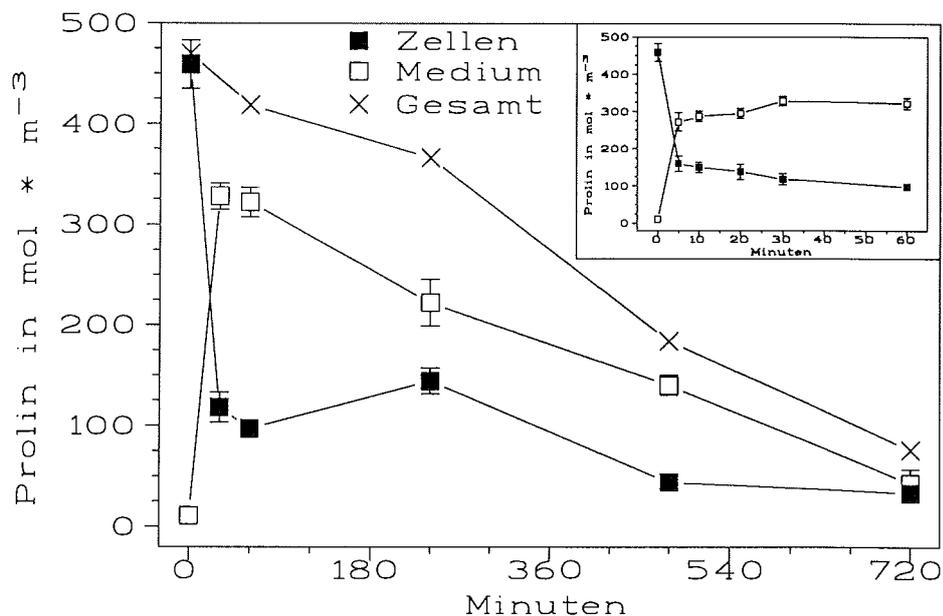


Abb. 21: Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. nach einer hypoosmotischen Belastung von 51 auf 17 PSU bei $50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Konzentrationen in den Zellen und im Medium. Die Medium- und die Zellkonzentrationen sind auf die eingesetzte Zellzahl mit dem entsprechenden Volumen bezogen. Die Werte sind dadurch direkt vergleichbar. Die eingefügte Abbildung (rechts oben) gibt die Konzentrationen aller Probenahmen während der ersten 60 min wieder. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

wieder deutlich zu, um dann - ebenfalls wie im Medium - auf ein niedriges Niveau abzufallen. Die Abnahme der gesamten Prolinkonzentration (Zelle und Medium) verlief linear mit der Zeit ($r = -0,9929$).

6.1.1.1. Schockgröße (Schwellenwert) zur Prolinfreisetzung

Abb. 22 gibt die Ergebnisse eines Experiments mit abgestuften hypoosmotischen Schocks wieder. Es wurde die Prolinkonzentration im Medium in Abhängigkeit von der Schockgröße gemessen. Als Ausgangsansatz diente ein 51 PSU-*Chaetoceros* sp.-Ansatz, der mit entsprechend hyposalinen Medien behandelt wurde, um die jeweilige Schockstufe zu bewerkstelligen. Nach den geringen Schocks bis zu 8,5 PSU war kein nennenswerter Ausfluß von Prolin in das Medium zu messen. Erst bei 12,7 PSU nahm die Prolinkonzentration deutlich zu, um dann nahezu linear mit der Größe der hypoosmotischen Belastung anzusteigen.

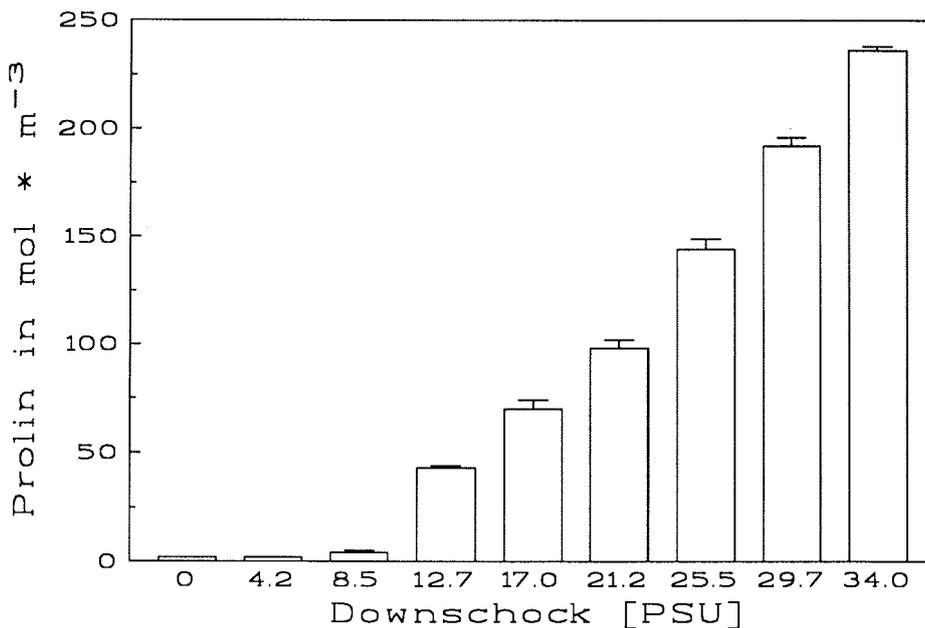


Abb. 22: Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. im Medium in Abhängigkeit von der Höhe der hypoosmotischen Belastung. Der Prolingehalt des Mediums wurde 30 min nach der Belastung gemessen und auf das Volumen der eingesetzten Zellzahl bezogen. Die Kultursalinität betrug 51 PSU. Die Schockmedien variierten zwischen 51 und 17 PSU. Dadurch ergaben sich hypoosmotische Schocks zwischen 0 und 34 PSU. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$).

6.1.2. Hyperosmotische Bedingungen

6.1.2.1. Prolinkonzentration in Abhängigkeit von verschiedenen N-Quellen und Glucose im Licht und im Dunkeln

Nach einer hyperosmotischen Belastung von 34 auf 51 PSU verdoppelte sich die Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. im Licht schon nach 4 h, um nach 8 h das Maximum zu erreichen (Abb. 23). Nach 48 h war eine deutliche Prolinabnahme zu verzeichnen. Im Dunkeln hingegen war nur ein geringfügiger Anstieg von ca. 25 mol / m³ der Iminosäure zu messen. Dieser war nach 4 h erreicht und blieb während der 48-stündigen Versuchsdauer konstant.

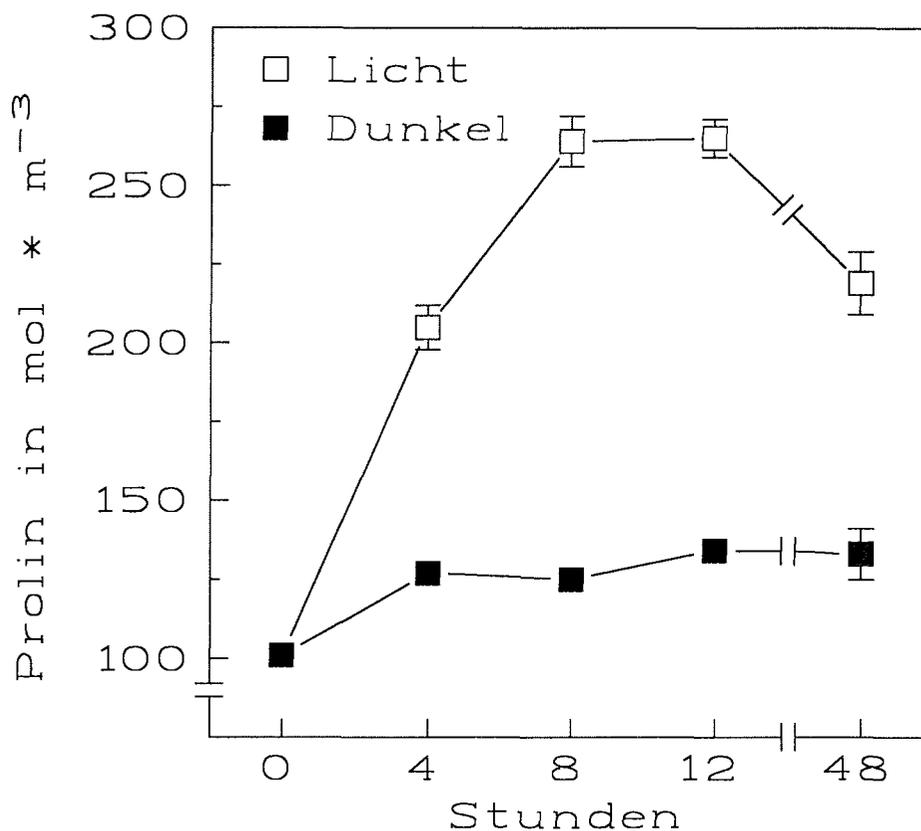


Abb. 23: Prolinakkumulation von *Chaetoceros* sp. nach einer hyperosmotischen Belastung von 34 auf 51 PSU bei 50 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$ (12 : 12 LD-Rhythmus) und im Dunkeln. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

Nach einem hyperosmotischen Schock von 34 auf 51 PSU stieg die Prolinkonzentration im Dunkeln unabhängig von der N- bzw. C-Quelle nur sehr geringfügig ($\leq 60 \text{ mol} / \text{m}^3$) an (Abb. 24). Der Glutamatwert lag dabei unter dem der

Kontrolle (N-frei) und war mit dem Ausgangswert identisch. Im Licht stiegen alle Ansätze deutlich über die der Parallelen im Dunkeln an. Für die induzierte Prolinkonzentration in Abhängigkeit von der jeweiligen N- bzw. C-Quelle ergab sich folgende Reihenfolge:

Prolin > NH_4^+ > Glutamat > NO_3^- > Glucose > Kontrolle

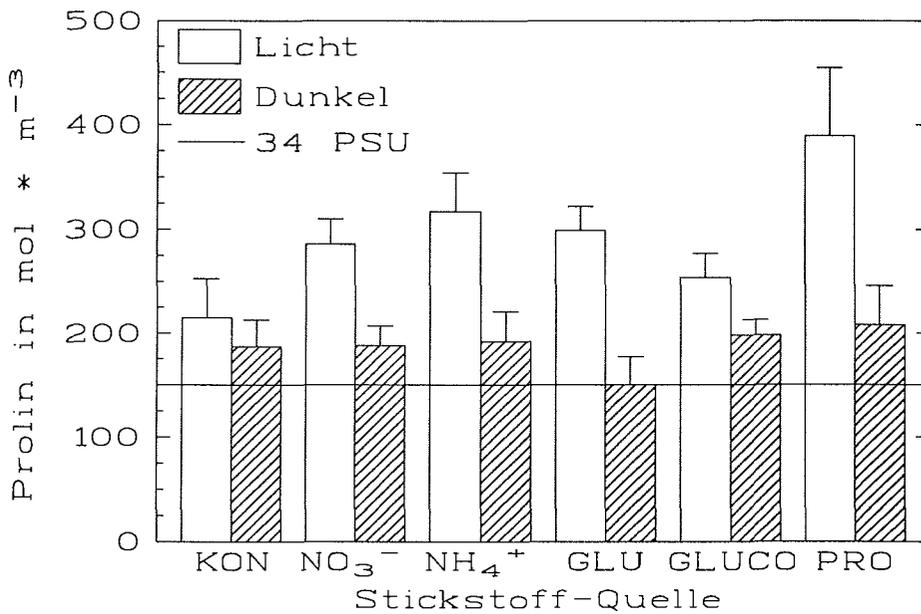


Abb. 24: Prolinkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock von 34 auf 51 PSU nach Zugabe unterschiedlicher N- bzw. C-Quellen (2 mol / m³) zum Medium und einer Inkubationsdauer von 24 h. Der Lichtzyklus für die Lichtproben betrug 12 : 12 h (Licht : Dunkel). Die 34 PSU-Linie stellt den Mittelwert der Ausgangs-Prolinkonzentration dar. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (n = 4).

Für den Versuch mit einem hyperosmotischen Schock von 17 auf 51 PSU ergaben sich für NH_4^+ , NO_3^- und die Kontrolle ähnliche Werte wie für den Salzbelastungsversuch von 34 auf 51 PSU (Abb. 25). Auffällig war der Abfall der Prolinkonzentration bei Glutamatzugabe im Licht und im Dunkeln, sowie der geringe NH_4^+ -Wert im Dunkeln. Die Reihenfolge in Bezug auf die hervorgerufene Prolinkonzentration (im Licht):

NH_4^+ > NO_3^- > Kontrolle > Glutamat

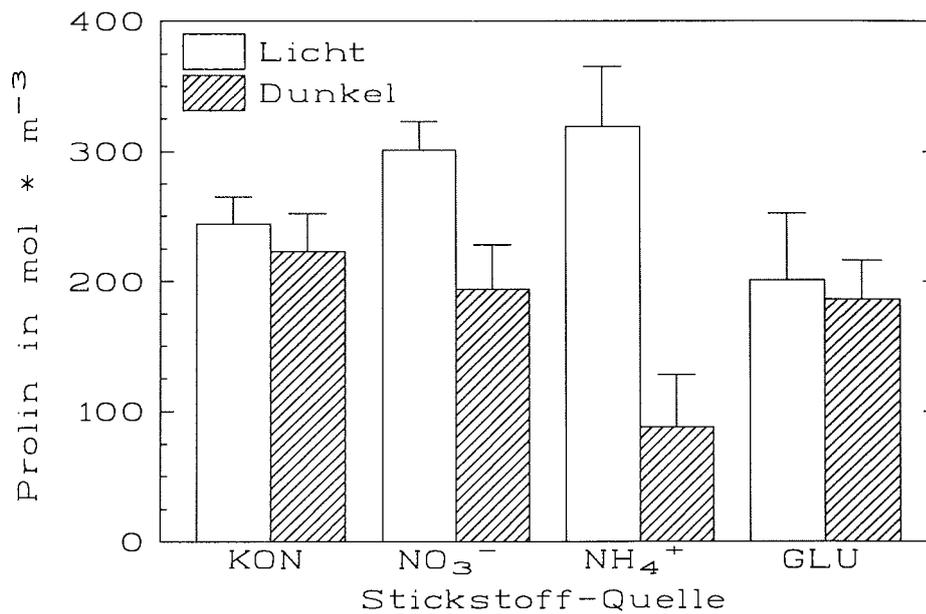


Abb. 25: Prolinkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock von 17 auf 51 PSU in Abhängigkeit von der angebotenen 2 mol / m³ N-Quelle im Medium und einer Inkubationsdauer von 24 h. Der Lichtzyklus für die Lichtproben betrug 12 : 12 h (Licht : Dunkel). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4). Die Ausgangskonzentration von Prolin bei 17 PSU war 1 mol / m³.

Die N-frei inkubierten Ansätze zeigten nach einer hyperosmotischen Belastung von 17 auf 51 PSU deutlich geringere Prolinkonzentrationen als die vergleichbaren mit 0,883 mol / m³ NO₃⁻ (f / 2-Konzentration des Mediums) vorinkubierten Kulturen (Abb. 26). Bis auf den Prolinansatz, der zu einer Konzentration von ca. 225 mol / m³ Prolin führte, blieben alle anderen Proben unter 100 mol / m³. Außer Prolin erhöhten nur NH₄⁺ und Glycin geringfügig die intrazelluläre Konzentration der Iminosäure gegenüber der Kontrolle.

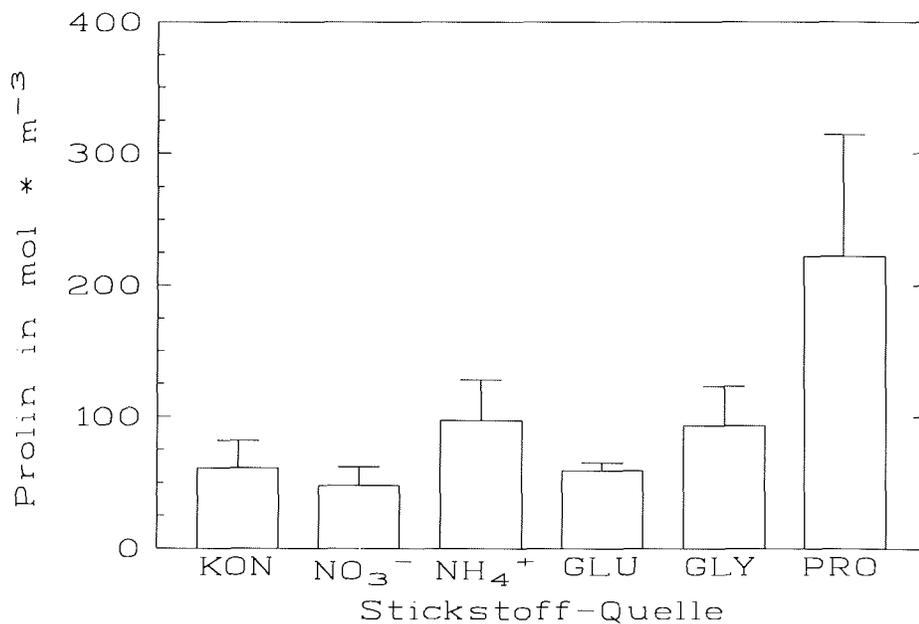


Abb. 26: Prolinkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock von 17 auf 51 PSU, dem eine 7-tägige N-freie Vorinkubation der Kulturen vorausging. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Prolinkonzentrationen in Abhängigkeit von der angebotenen N-Quelle (2 mol / m³) dargestellt (n = 4).

6.1.2.2. Hyperosmotischer Sorbitolschock

Zur Kontrolle, ob die Prolinakkumulation auch mit einer anderen osmotisch aktiven Lösung zu induzieren ist, wurde eine Polyol-Lösung eingesetzt. Nach einem hyperosmotischen Schock einer 17 PSU-Kultur mit 1,5 Osm/kg (= 51 PSU) Sorbitol akkumulierte die Art nach 8 h nur eine sehr geringe Prolinkonzentration, die nach 24 h noch abnahm (Tab. 12).

Tab. 12: Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. nach einer hyperosmotischen Belastung mit einer 1500 mOs/kg (= 51 PSU) Sorbitollösung. Die Ausgangskulturen hatten eine Salinität von 17 PSU. Die Ansätze wurden 8 bzw. 24 h bei 4 °C und 50 μmol Photonen / m² s inkubiert. Die mikroskopische Kontrolle bestätigte den Erhalt der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4).

Inkubationsdauer	Prolin in mol / m ³
0	1 ± 0
8	51 ± 4
24	17 ± 7

6.1.3. Temperatureinfluß

Zur Temperaturabhängigkeit wurden die *Chaetoceros* sp.-Kulturen bei Meerwassersalinität und 51 PSU an -1,8 °C angepaßt. Wegen der starken Überlappungen der Standardabweichungen ließen sich keine eindeutigen Tendenzen mit sinkender Temperatur messen (Tab. 13).

Tab. 13: Vergleich der Prolinkonzentrationen der 34 PSU- und 51 PSU-Stammkulturen von *Chaetoceros* sp. bei 4 °C und -1,8 °C. Prolinkonzentration in mol / m³. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) (n = 4).

Salinität [PSU]	4 °C		-1,8 °C	
	MW	SD	MW	SD
34	150	20	176	13
51	528	27	453	74

6.2. Diskussion

6.2.1. Hypoosmotische Bedingungen

Der starke hypoosmotische Schock von 51 PSU auf 17 PSU sollte Aufschluß über Konzentration und Verteilung des Hauptosmolyten Prolin in Zelle und Medium im zeitlichen Verlauf geben. Nach 30 min liegt das von den Zellen abgegebene Prolin fast vollständig im Medium vor (ca. 325 mol / m³). Diese starke Abnahme der Prolinkonzentration in den Zellen ist wahrscheinlich auf die veränderte Permeabilität der Plasmamembran aufgrund des osmotischen Schocks zurückzuführen (Schobert, 1980). Der Ausfluß organischer Osmolyte wie Mannitol und DMSP ins hypoosmotische Medium wurde auch in der Prasinophyceae *Tetraselmis (Platimonas) subcordiformis* (Kirst, 1977b; Dickson und Kirst, 1986), *Chlorella autotrophica* (Laliberté und Hellebust, 1989) und der Diatomee *Phaeodactylum tricorutum* (Schobert, 1980) beobachtet und stellt somit keine Besonderheit der Eisalgen dar. Die abnehmende Gesamtkonzentration deutet aber schon zu diesem Zeitpunkt auf eine geringe Metabolisierung des Prolins in den Zellen hin (Abb. 21). Der deutliche Prolinanstieg in *Chaetoceros* sp. nach 240 min kann als Aufnahme der Iminosäure durch die Zellen angesehen werden. Spätestens zu diesem Zeitpunkt kann man daher von einer Erholungsphase der Kulturen ausgehen. Die folgende kontinuierliche Prolinabnahme im Medium, in den Zellen und in der Gesamt-Prolinkonzentration können als ausbalancierte Aufnahme rate aus dem Medium und Einbaur rate wahrscheinlich in Proteine bzw. andere Zellmetabolite interpretiert werden. Der Einbau von Prolin nach einem Downschock in die genannten Fraktionen wurde für die Art *Cyclotella cryptica* nachgewiesen (Liu und Hellebust, 1976a). Die Schockkulturen von *Chaetoceros* sp. wuchsen anschließend weiter (Daten nicht gezeigt). *Chaetoceros* sp. hat den hypoosmotischen Schock von 34 PSU also nicht nur überlebt; die Art nimmt sogar schon nach spätestens 4 h ihren Hauptosmolyten wieder auf und setzt ihn um.

Der Versuch zur Auslotung der Schockgröße, ab der Prolin freigesetzt wird, ergab einen Schwellenwert zwischen über 8,5 PSU und unter 12,7 PSU (Abb. 22). Der Meßzeitpunkt zur Bestimmung der Prolinkonzentration im Medium wurde mit 30 min nach dem Schock gemäß den Ergebnissen des vorher diskutierten Versuchs gewählt.

P. tricorutum und *C. autotrophica* zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster wie *Chaetoceros* sp.: Nach 30 min eines abrupten hypoosmotischen Schocks von 1900 mOsm/kg (ca. 65 PSU) auf 770 mOsm/kg (ca. 26 PSU) gaben *P. tricor-*

nutum ca. 70 % des intrazellulären Prolins (Schobert, 1980) und *C. autotrophica* ca. 45 % nach einer hypoosmotischen Belastung von 51 PSU auf 17 PSU ans Medium ab (Laliberté und Hellebust, 1989). Der Prolinverlust von *Chaetoceros* sp. betrug ca. 80 %.

Im Freiland ist jedoch nicht von einem abrupten hypoosmotischen Schock, sondern eher von einer allmählichen Aussüßung während der Eisschmelze auszugehen. Insofern stellt das oben geschilderte Laborexperiment eine Extremsituation dar, die die Veränderungen im Prolinpool während der hypoosmotischen Belastung verdeutlichen sollte. Eine sukzessive, über 20 Schritte in 10 h herbeigeführte, hypoosmotische Belastung von 51 auf 17 PSU führte bei *C. autotrophica* allerdings zu keiner Prolinfreisetzung (Laliberté und Hellebust, 1989). Die Rate der Salinitätserniedrigung betrug 3,4 PSU / h.

Aus der Antarktis sind Lufttemperaturschwankungen von 10 - 20 °C in 1 bis 2 d bekannt, die Temperaturschwankungen von 3 - 5 °C in den oberen Eisschichten verursachen (Eicken, 1992). Nimmt man 24 h als Zeitspanne der Temperaturerhöhung an, so ergibt sich folgende Rechnung: Eine angenommene Eistemperatur von z.B. -8 °C ergibt eine Solensalinität von 129 PSU (berechnet nach Assur, 1958). Die Salinität sinkt nach einer Temperaturerhöhung von 5 °C auf 53 PSU ab. Es käme somit, eine gleichmäßige Erwärmung vorausgesetzt, zu einer Salinitätserniedrigung von 3,2 PSU / h. Dieser Wert liegt unter den Schwellenwerten zur Prolinfreisetzung von *C. autotrophica* ($\geq 3,4$ PSU) und *Chaetoceros* sp. (zwischen 8,5 und 12,7 PSU). Unter natürlichen hypoosmotischen Belastungen ist aufgrund des ermittelten Schwellenwertes für *Chaetoceros* sp. deshalb nicht von einem Prolinverlust der Zellen auszugehen.

6.2.2. Hyperosmotische Bedingungen

Die Prolinsynthese nach einer hyperosmotischen Behandlung ist klar lichtabhängig (Abb. 23). Im Dunkeln kommt es nur zu einem minimalen Prolinanstieg. Ohne Zusatz organischer Substanzen zum Schockmedium kamen mehrere Autoren für Arten verschiedener Familien zum selben Ergebnis (Liu und Hellebust, 1976c; Schobert, 1977a; Setter und Greenway, 1983; Laliberté und Hellebust, 1989). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Prolinakkumulation NAD(P)H- und ATP-abhängig ist. Sind diese Reserven erschöpft, stagniert die Synthese. Die organischen Säuren, die in *Chaetoceros* sp. in beträchtlichen Mengen vorliegen, sind anscheinend nicht via Citratzyklus und α -Ketoglutarat an der Prolinsynthese im Dunkeln beteiligt. Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen konnte diese Beteiligung für *Chlorella autotrophica* (Laliberté und Hellebust, 1989) und höhere Pflanzen (Venekamp et al., 1989) nachgewiesen werden (Kap. 4.2.2.2.).

Bei marinen Arten liegt keine *lag*-Phase hinsichtlich der Prolinsynthese vor, das Maximum wird nach ca. 2-6 h erreicht (Liu und Hellebust, 1976b; Ahmad und Hellebust, 1988; Laliberté und Hellebust, 1989; Kirst, 1994). Das Fehlen einer *lag*-Phase bei *Chaetoceros* sp. kann aus dem nahezu linearen Anstieg der Prolinkonzentration zwischen 0 und 8 h abgeleitet werden. Die oben zitierten Autoren schließen aus dem sofortigen Einsetzen der Synthese auf eine Aktivierung vorhandener Enzyme. Eine *de novo*-Synthese von Enzymen würde an einer *lag*-Phase zu erkennen sein. Nach Abb. 23 wird das Prolinmaximum aber erst nach 8 h erreicht, was möglicherweise zu einer Fehleinschätzung aufgrund fehlender Zwischenwerte führt. Andererseits könnte die vergleichsweise geringe Versuchstemperatur von 4°C zu einer Verringerung der Syntheserate geführt haben. Da das Prolinmaximum von der Quantität der N-Quelle abhängt (Schobert, 1977b), kann die geringe maximale Konzentration in den Versuchsansätzen wahrscheinlich auf zu hohe eingesetzte Zellzahlen ohne zusätzliche Nitratzugabe zurückgeführt werden. Es lag somit keine Substratsättigung vor. Nitratmangel hat dann wahrscheinlich während der weiteren Inkubation der Lichtansätze nach 48 h zur Prolinabnahme aufgrund von Zellteilungen geführt. Die Zellzahl stieg um 74 % im Vergleich zur Ausgangszellzahl an (Daten nicht gezeigt). Im Dunkeln blieben Zellzahl und Prolinkonzentration nahezu konstant.

Die Prolinakkumulation ist nicht generell das Ergebnis eines hyperosmotischen Schocks, sondern die Folge eines Salzstress. Sorbitol verursachte nur eine geringfügige Erhöhung der Prolinkonzentration. Für *Cyclotella cryptica* konnte nachgewiesen werden, daß die organischen Osmolyte Mannitol, Saccharose und Glycerin in hyperosmotischer Konzentration nicht zur Stimulation der Prolinsynthese führen (Liu und Hellebust, 1976b). *Chaetoceros* sp. zeigt auch hier Übereinstimmung mit Diatomeen gemäßigter Regionen. Einen ähnlichen Effekt wie NaCl, das Hauptbestandteil des Meerwassers ist, haben die Salze MgCl₂ und Na₂SO₄ bei *P. tricorutum* (Schobert, 1977a): Sie erhöhen mit zunehmender Konzentration ebenfalls die Prolinkonzentration.

Niedrige Temperaturen (-1,8 °C) erhöhen anscheinend nicht die Prolinkonzentration (Tab. 12). Dies wäre aufgrund der kryoprotektiven Wirkung der Iminosäure zu erwarten gewesen. Mehrere Arbeiten weisen Prolin die Fähigkeit zur Erhöhung der Frostresistenz (Withers und King, 1979), zur Aktivitätssteigerung der Enzyme beim Wiederauftauen (Carpenter und Crowe, 1988; Galinski, 1992) und zur Membranstabilisierung zu (Schlee, 1986). Die Eigenschaften gelten auch für einige Zucker, Polyole, Aminosäuren und quartäre Ammoniumverbindungen.

Möglicherweise war der Temperaturunterschied von +4 °C zu -1,8 °C nicht groß genug, um einen quantitativen Effekt im Laborversuch hervorzurufen. Andererseits könnte die Prolinkonzentration somit als reine Funktion der Salinität betrachtet werden. Denn verringerte man die Temperatur unter -1,8 °C, gefröre das Salzwasser (34 PSU) und die Salinität stiege an. Unter natürlichen Bedingungen ist somit der Temperaturstreß untrennbar mit dem Salzstreß gekoppelt. Wachstumsversuche mit Eisdiatomeen deuten darauf hin, daß die Salinitätstoleranz mit sinkender Temperatur zunimmt (Aletsee und Jahnke, 1992). Zukünftige kombinierte Salz-Temperaturexperimente müssen zeigen, ob organischen Osmolyten dabei eine Funktion zukommt.

Sämtliche N-Quellen und auch Glucose führen zu einer Erhöhung der Prolinkonzentration gegenüber der N-freien Kontrolle nach einer hyperosmotischen Belastung von 34 auf 51 PSU im Licht (Abb. 24). Daraus ist zu folgern, daß alle Substanzen z.T. aufgenommen und umgesetzt worden sind. Im Dunkeln können die angebotenen Quellen nicht zur Konzentrationserhöhung von Prolin verwertet werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß Diatomeen im Licht nur geringe Mengen an Aminosäuren ans Medium abgeben, aber ein großes Spektrum an Aminosäuren nutzen können (Flynn, 1990). Der Autor gibt die Reihenfolge der Nutzung folgendermaßen an:

basische (Arg, Lys, Orn) > amidische (Asn, Gln) > saure (Asp, Glu) Aminosäuren.

Möglicherweise ist eine geringe Aufnahmerate von Glu dafür verantwortlich, daß Ammonium zur effektiveren Steigerung des Prolingehalts führt. Da Nitrat erst in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen zu Ammonium reduziert werden muß, führt letzteres wahrscheinlich schneller zu einer höheren Prolinkonzentration. Sollte in *Chaetoceros* sp. der GS-GOGAT-Weg aktiv sein, führt dies zu einer höheren Affinität zu Ammonium und damit zur besseren Ausnutzung der N-Quelle. In der Reaktionsfolge wird zunächst Glu zu Gln umgewandelt. Diese Reaktion wird durch die Glutaminsynthetase (GS) katalysiert. Im zweiten Schritt wird das Gln und α -Ketoglutarat zu Glu von der Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) umgesetzt. Dieser Stoffwechselweg ist bei den meisten Diatomeen aktiv (Marsot et al., 1991).

Das C-Skelett der Glucose fließt im Licht wahrscheinlich mit in die Prolinsynthese ein (Liu und Hellebust, 1976c). Der Zucker erhöht außerdem den Energiestatus der Zelle. Anhand von Freilandproben aus den Infiltrations- und Bändergemeinschaften des Weddellmeerpackeises, in denen Diatomeen dominierten,

konnte - neben dem Einbau von Serin und Glycin - ebenfalls die Aufnahme von Glucose nachgewiesen werden (Gleitz, 1990). Der aufgenommene Zucker floß vollständig in die Synthese von Polysacchariden, Aminosäuren und Lipiden. Im Starklicht wurde Glucose überwiegend in Polysaccharide, im Schwachlicht ($< 20 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) in Aminosäuren eingebaut. Die Steigerung der Prolinkonzentration bei Zugabe von Glucose in *Chaetoceros* sp. steht somit im Einklang mit den Ergebnissen von Eisalgen und Diatomeen gemäßiger Regionen.

Wie zu erwarten war, stellt Prolin die effektivste Quelle zur Steigerung der intrazellulären Konzentration der Iminosäure dar. Prolin muß nach der Aufnahme nicht erst umgebaut werden und kann im Cytoplasma verbleiben.

Möglicherweise hätte eine 30 h Vorinkubation im Dunkeln mit anschließender Acetatzugabe zu einer Prolinerhöhung geführt, wie dies für *Chlorella autotrophica* nachgewiesen wurde (Laliberté und Hellebust, 1989). Die Autoren begründen diesen Effekt mit der Induktion der Enzyme des Glyoxylatzyklus, besonders der Isocitratlyase, die Isocitrat in Glyoxylat und Succinat überführt. Succinat geht dann in den Citratzyklus und damit in die Aminosäuresynthese ein. Außerdem könnte eine lange Dunkelinkubation die Heterotrophiekapazität der Alge steigern (Palmisano und Sullivan, 1982). Die Daten der Dunkelinkubation suggerieren eine fehlende Fähigkeit zur Heterotrophie im Dunkeln. Die im Gegensatz zum Licht ausbleibende Erhöhung der Prolinkonzentration im Dunkeln ist aber nicht unbedingt gleichbedeutend mit einem nicht vorhandenen Heterotrophiepotential. So konnten Rivkin und Putt (1987) für verschiedene antarktische Diatomeen hohe Aufnahmeraten von Aminosäuren im Licht und im Dunkeln nachweisen. Die Summe der in Proteine, Polysaccharide und Lipide eingebauten Aminosäuren war dabei deutlich größer als die Einbauraten in niedermolekulare Substanzen. Da diesen Versuchen keine hyperosmotische Belastung vorausging, können die Ergebnisse nicht direkt mit denen von *Chaetoceros* sp. verglichen werden. Es wäre jedoch denkbar, daß die angebotenen organischen Substrate zwar aufgenommen, aber in andere niedermolekulare Substanzen oder Reservestoffe als Prolin eingebaut werden.

Chaetoceros sp. kann auch einen hyperosmotischen Schock von 17 auf 51 PSU mit der anschließenden Prolinakkumulation bewältigen. Vergleichbare N-Quellen führen zu Prolinkonzentrationen derselben Größenordnung wie bei der geringeren hyperosmotischen Belastung von 34 auf 51 PSU (Abb. 25). Aufgrund der minimalen Ausgangskonzentration von $1 \text{ mol} / \text{m}^3$ Prolin (bei 17 PSU) ist dazu eine wesentlich größere Syntheserate erforderlich. Daß die Kontrolle

(Mediumnitrat-Konzentration von $0,882 \text{ mol / m}^3$) zu höheren Prolinwerten führt als das angebotene Glutamat, kann mit der oben beschriebenen geringfügigen Aufnahme der Aminosäure erklärt werden. Für den Abfall der Prolinkonzentration nach Zugabe von Ammonium im Dunkeln liegt keine hinlängliche Erklärung vor.

Die Ergebnisse nach einer 7 d N-freien Inkubation deuten auf eine verringerte Aufnahmefähigkeit und / oder Verwertung der N-Quellen zur Prolinsynthese der Algen hin (Abb. 26). Nitrat und Glutamat verursachten keinen höheren, Ammonium und Glycin nur einen geringfügig größeren Prolinanstieg als die N-freie Kontrolle. Es werden in keinem Fall die absoluten Prolinkonzentrationen nach dem hyperosmotischen Schock bei Vorinkubation unter Standardbedingungen (17 PSU) erreicht. Der Kontrollwert von ca. 65 mol / m^3 läßt auf die Mobilisierung von Prolin aus Reserveproteinen oder die Umwandlung freier Aminosäuren zu Prolin schließen. Nur die Zugabe von 2 mol / m^3 Prolin führt zum Erreichen des für die Langzeitinkubation im Dunkeln konstatierten "Prolinminimums" von 200 mol / m^3 (Kap. 5.). Nach langem Stickstoffmangel ist die Eisalge daher nicht in der Lage, eine adäquate Prolinsynthese als Streßreaktion zu gewährleisten. Sie ist dann vermutlich auf die Aufnahme von Ionen zur Aufrechterhaltung des osmotischen Potentials angewiesen. Die würden wiederum unweigerlich zur Inhibition des Wachstums führen (Munns et al., 1983).

Die ökophysiologische Bedeutung organischer Substrate und die Steigerung der Heterotrophiekapazität im Dunkeln für Eisalgen mag bezweifelt werden. Die fehlende Dunkelheterotrophie und die lichtabhängige Prolinsynthese von *Chaetoceros* sp. lassen den Schluß zu, daß die Art auf eine Salinitätszunahme der Sole im Dunkeln, verursacht durch die tiefen Temperaturen im antarktischen Winter und die Schneeaufgabe des Packeises, nicht mit der Akkumulation von Prolin reagieren kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit, der von Bunt und Lee (1972) und Palmisano und Sullivan (1983) zur Langzeit-Inkubation im Dunkeln zeigen, daß die Eisdiatomeen nicht von organischen Substraten zum Überleben im Winter abhängig sind. Der Aufnahme von Aminosäuren mag eine unterstützende Funktion für das heterotrophe Wachstum während des langen antarktischen Winters zukommen (Rivkin und Putt, 1987). Diese unterstützende Funktion gewinnt an Bedeutung, wenn der Bakterienbiomasseanteil der Eisgemeinschaft sehr klein ist. Die Bakterien besitzen ein günstigeres Oberfläche / Volumen-Verhältnis als Diatomeen und wären den Algen, im Fall der Konkurrenz um Substrate, überlegen. Die Bakterienbiomasse wird mit nur ca.

1 % der Eisgemeinschaften angegeben (Kottmeier et al., 1987). Die Bakterienkonkurrenz der Eisalgen ist somit gering und ein vorhandenes Dunkel-Heterotrophiepotential wäre von Vorteil.

Besonders bedeutend könnte die Fähigkeit zur Aufnahme organischer Substrate während des Einschlusses der Algen ins Eis sein. Dort liegen möglicherweise durch mechanische Zerstörung großer Diatomeen (Gleitz und Thomas, 1993) wie z.B. *Entomoneis (Amphiprora) kufferathii* größere Mengen an Substrat vor. Im Licht (ohne Schneeauflage) könnten kleinzellige Arten wie *Chaetoceros* sp. von den dann vorliegenden Substraten profitieren. Dabei käme der Iminosäure Prolin, als Hauptosmolyt der Diatomeen, eine besondere Rolle zu, weil die Bacillariophyceae im Eis dominieren. Das Heterotrophiepotential könnte somit gerade im Herbst bei beginnender Packeisbildung von Bedeutung sein.

7. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Mit den Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. wurden Laborexperimente zur Salztoleranz, zur Veränderung der Osmolytkonzentrationen während Langzeit-Dunkelinkubationen und zum Prolinstoffwechsel durchgeführt.

Hinsichtlich der Wachstumsraten weist die pennate Art *Navicula* sp. im untersuchten Salinitätsbereich von 17 bis 51 PSU keine Beeinträchtigung durch die Änderung der Salinität auf (Tab. 14). Sie ist daher im Starklicht als salztolerant zu bezeichnen, wie dies für mehrere Eisalgen bereits nachgewiesen wurde. Die Wachstumsraten der zentrischen Art *Chaetoceros* sp. sinken nur bei 50 μmol Photonen / m^2 s mit ansteigender Salinität, während sie im Schwachlicht (5 μmol Photonen / m^2 s) nahezu konstant bleiben. Der Salzeffekt ist also nicht im Schwachlicht zu messen. In Bezug auf das Wachstum kann daher nicht von unabhängigen Einflüssen von Licht und Salinität ausgegangen werden.

Tab. 14: Veränderungen der Meßgrößen mit ansteigender Salinität in Abhängigkeit von der Lichtintensität. + = Zunahme, o = keine Tendenz (gleichbleibend), - = Abnahme, k.D. = keine Daten, n.v. = nicht vorhanden, Lichtintensität in μmol Photonen / m^2 s. Die Osmolyte in Klammern geben die Hauptvertreter der Substanzgruppe an, auf die sich auch die Angaben in der Tabelle beziehen.

Lichtintensität:	<i>Chaetoceros</i> sp.		<i>Navicula</i> sp.	
	50	5	50	5
Wachstumsrate	-	o	o	k.D.
Populationsdichte	+	+	o	k.D.
Zellvolumen	-	o	+	k.D.
Vakuole	o	k.D.	o	k.D.
Schale	o	k.D.	o	k.D.
Ionen (K^+)	+	+	o	+
Prolin	+	+	+	+
restliche Aminosäuren (Glutamat)	o	+	o	+
organische Säuren	o	-	o	+
Homarin	+	+	+	+
DMSP	n.v.	n.v.	+	+
Photosynthesekapazität	-	-	-	-

Für die Veränderungen des Zellvolumens ergibt sich ein ähnliches Bild: Während es bei *Navicula* sp. im Starklicht mit zunehmender Salinität leicht ansteigt, sinkt

es bei *Chaetoceros* sp., um im Schwachlicht keinen nennenswerten Effekt mehr zu zeigen. Der Salzeffekt besteht auch bezüglich des Zellvolumens nur im Starklicht.

Im Gegensatz dazu steht die Zunahme der Populationsdichte von *Chaetoceros* sp. mit ansteigender Salinität unter beiden Lichtintensitäten. Somit sind die Schlußfolgerungen von Arrigo und Sullivan (1992), die von unabhängigen und multiplikativen Wirkungen von Licht, Temperatur und Salinität auf Photosynthese und Wachstum ausgehen, weder gänzlich abzulehnen, noch zu bestätigen. Der aufgrund von Photosyntheseeffizienz und maximaler Photosyntheseraten postulierte multiplikative Effekt von Salinität, Temperatur und Licht mag möglicherweise generell für die Photosynthesecharakteristika der Eisalgen gelten. Hinsichtlich der Effekte von Licht und Salinität auf Wachstum und Zellvolumen von *Chaetoceros* sp. trifft er nicht zu. Unter ökologischen Gesichtspunkten könnte dieses Ergebnis und die nahezu unveränderte Wachstumsrate bei 17 PSU als Erklärung für den "Erfolg" der planktischen Form bei der Wiederbesiedlung der Wassersäule im Frühjahr angesehen werden.

Den geringfügigen Veränderungen der Schalen-, Vakuolen- und Cytoplasmaanteile am Gesamtzellvolumen kommt keine Funktion bei der Anpassung der Arten an unterschiedliche Salinitäten zu. Aufgrund der Kompartimentuntersuchungen können beide Arten als cytoplasmareich charakterisiert werden.

Als Hauptosmolyte konnten K^+ , Prolin und eine nicht identifizierte organische Säure, mit ähnlicher Leitfähigkeit und Retentionszeit wie Acetat, bestimmt werden. Während hohe Konzentrationen organischer Säuren bisher für Diatomeen nicht publiziert wurden, stimmen die Ergebnisse der anderen beiden Osmolyte gut mit Befunden von Diatomeen gemäßigter Breiten überein. Den organischen Säuren kommen wahrscheinlich die Funktionen als organische Anionen (statt hoher Cl^- -Konzentrationen) und als leicht verfügbare C-Quelle (unter ausreichender Lichtintensität) zu. In erheblich geringerer Konzentration konnte die quartäre Ammoniumverbindung Homarin erstmals in Eisalgen nachgewiesen werden. Da die Konzentration dieser Verbindung ebenso mit der Salinität anstieg wie die der Hauptosmolyte K^+ und Prolin, kann möglicherweise von einer Funktion als kompatible Substanz ausgegangen werden. DMSP, das bei Eisalgen bisher nur für *Nitzschia lecointei* nachgewiesen wurde (Sasse, 1993), konnte in der vorliegenden Arbeit nur in *Navicula* sp. bestimmt werden. DMSP gilt nicht nur als verträgliche Substanz, sondern besitzt als biogene Vorstufe zur Bildung von Kondensationskernen in der Atmosphäre klimarelevante Bedeutung.

Neben dem schon oben beschriebenen Prolin konnte ein ganzes Spektrum von Aminosäuren gemessen werden, die jedoch in geringen Konzentrationen in den Zellen vorlagen. Glutamat stach dabei als Hauptaminosäure heraus, ohne daß damit für Eisalgen eine spezifische Eigenschaft hergeleitet werden kann.

Die zunehmende Zellzahl, die mikroskopische Kontrolle der Zellen und die Werte der Photosynthesekapazität während der Dauer der Dunkelversuche dokumentieren nicht nur das Überleben, sondern sogar ein geringes Wachstum der Algen unter Lichtabschluß (Tab. 15). In den im Schwachlicht vorinkubierten Ansätzen zur Langzeitinkubation im Dunkeln nahm die Prolinkonzentration stärker ab als die Populationsdichte zunahm. Prolin kommen daher möglicherweise auch die Funktionen als N-Quelle und Atmungssubstrat im Dunkeln zu. Da die Prolinkonzentrationen nur bis zu einem salinitätsabhängigen Minimum abnahmen, kann während der Dunkelinkubation von einem Aufzehren eines schon unter Umgebungssalinität akkumulierten "Prolinüberschusses" ausgegangen werden. In dem im Starklicht vorinkubierten *Navicula* sp.-Ansatz hingegen blieben Homarin und DMSP konstant, während die Populationsdichte, die Prolinkonzentration und die Photosynthesekapazität kontinuierlich abnahmen. Dem Licht kann somit eine metabolische Steuerungsfunktion beigegeben werden.

Tab.15: Übersicht über die Veränderungen der verschiedenen Meßgrößen nach einer bis zu 84-tägigen Langzeitinkubation im Dunkeln. Die Lichtintensität während der Vorinkubation betrug 50 bzw. 5 $\mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$. Die Kennzeichnungen in den Spalten gelten für 34 und 51 PSU. k.D. = keine Daten. n.v. = nicht vorhanden. +/- = bis 14 d Anstieg, dann Abfall bis zum Ende der Versuchsdauer. * = nur 34 PSU-Ansätze.

	<i>Chaetoceros</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.	
Lichtintensität:	5	50*	5
Populationsdichte	+	-	+
Photosynthesekapazität	+/-	-	k.D.
Prolin	-	-	-
Homarin	k.D.	o	k.D.
DMSP	n.v.	o	k.D.

Unter hypoosmotischen Bedingungen konnte ein Schwellenwert (S) von 8,5 PSU $< S < 12,7$ PSU, ab dessen Überschreiten Prolin aus den Zellen ins Medium abgegeben wird, konstatiert werden. Unter Freilandbedingungen sind beim allmählichen Schmelzen des Packeises keine größeren abrupten hypoosmotischen Schocks zu erwarten, so daß sich *Chaetoceros* sp. beim Winter-Frühling-Übergang wahrscheinlich den Hauptosmolyten zunächst "erhält", um ihn dann in an-

dere Zellsubstanzen umzuwandeln. Wird die Art abrupten hypoosmotischen Bedingungen ausgesetzt, gibt sie zunächst große Mengen von Prolin ans Medium ab, um es dann nach spätestens 4 h wieder aufzunehmen (Abb. 27). Der Umbau des intrazellulären Prolins in andere Metabolite bzw. Proteine beginnt wahrscheinlich schon nach ca. 1 h. Die Art ist daher tolerant gegenüber starken hypoosmotischen Schocks, die in der Intensität vermutlich unter natürlichen Bedingungen nicht anzutreffen sind.

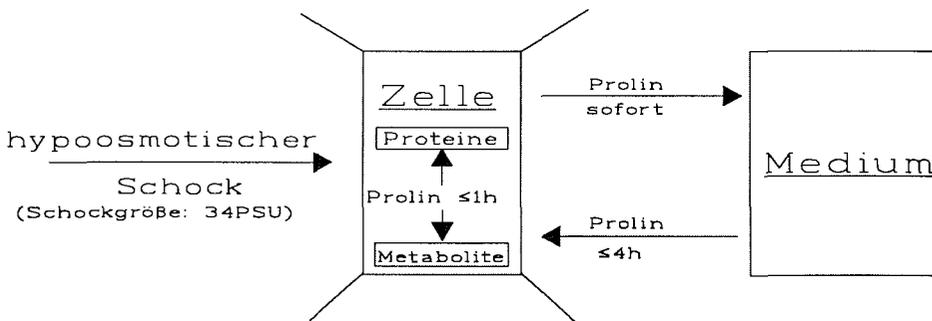


Abb. 27: Modell zur Verteilung von Prolin in Zelle und Medium nach einer hypoosmotischen Belastung von 51 auf 17 PSU (Schockgröße: 34 PSU) im zeitlichen Verlauf.

Die Experimente zur Prolinakkumulation nach einer hyperosmotischen Belastung zeigen, daß die Prolinsynthese in *Chaetoceros* sp. lichtabhängig ist (Abb. 28). Im Dunkeln werden sehr wahrscheinlich die noch vorliegenden intrazellulären Reserven an ATP und Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) aufgebraucht, bevor die Prolinsynthese stagniert. Auch die Zugabe von verschiedenen N-Quellen bzw. Glucose bewirkt keine Steigerung der Prolinkonzentration im Dunkeln gegenüber der Kontrolle. Im Licht hingegen führen alle angebotenen organischen Substrate zur erhöhten Prolinsynthese im Vergleich zur Kontrolle. Unter N-Mangelbedingungen verursacht nur Prolin eine deutliche Steigerung der intrazellulären Konzentration der Iminosäure. Es kann bei dieser Art also von einer Photoheterotrophie und nicht von einer Dunkelheterotrophie ausgegangen werden. *Chaetoceros* sp. kann einer Salinitätserhöhung im Dunkeln, wie sie unter natürlichen Bedingungen in den Solenkanälen und -kavernen auftreten kann, nicht mit einer Steigerung der Prolinkonzentration begegnen.

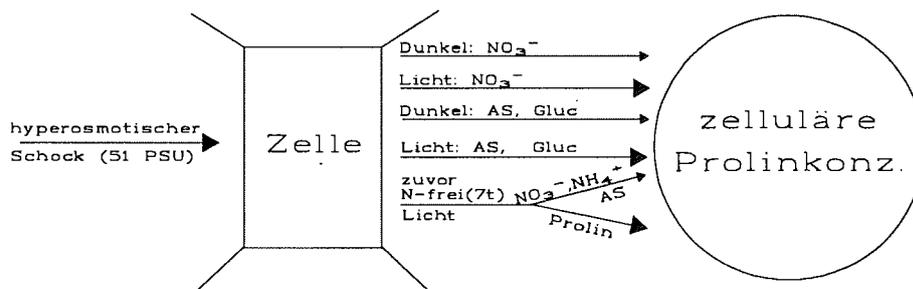


Abb. 28: Prolinkonzentration von *Chaetoceros* sp. nach einer hyperosmotischen Belastung in Abhängigkeit von der N-Quelle bzw. Glucose im Dunkeln und im Licht. Die Dicke der Pfeilspitze symbolisiert die Intensität der Prolinakkumulation. Die 7-tägige N-freie Inkubation fand im Licht ($50 \mu\text{mol Photonen} / \text{m}^2 \text{ s}$) vor dem Salzschock statt. AS = Aminosäuren, Gluc = Glucose, Prolinkonz. = Prolinkonzentration.

Abschließend läßt sich folgern, daß die zentrische Eisdiatomee *Chaetoceros* sp. auf ungünstige abiotische Bedingungen wie erhöhte Salinität und verringerte Lichtintensität mit Reduktion des Stoffwechsels reagiert. Die eigenen Untersuchungen zeigen, daß sie sowohl Wachstum als auch Zellvolumen verringert. Aus der Literatur ist bekannt, daß *Chaetoceros* sp. die Photosyntheserate unter niedrigen Temperaturen konstant hält, die Respiration einschränkt und insgesamt durch eine effizientere C-Assimilation charakterisiert ist (Thomas et al., 1992). Die Art kann lange Dunkelheit, wie sie im antarktischen Winter vorherrscht, ohne Dunkelheterotrophie überleben. Die einzelnen Anpassungsmechanismen von *Chaetoceros* sp. wurden auch in Algen temperierter Regionen gefunden. Der "Erfolg" dieser Art sowohl in der Wassersäule als auch im Eis ist wahrscheinlich aus der Summe bzw. Kombination der Anpassungsmöglichkeiten abzuleiten.

Navicula sp. hingegen schränkt unter Starklicht und erhöhter Salinität weder Wachstum noch Zellvolumen ein. Sie zeigt ein ähnliches Überlebensmuster im Dunkeln wie *Chaetoceros* sp.. Unter Schwachlicht neigt die Art jedoch zur Gallertbildung und macht sich damit für quantitative Untersuchungen unzugänglich. Außerdem setzt die Gallertbildung schon bei geringer Zelldichte ein, so daß die Ermittlung von Wachstum und Populationsdichte aufgrund der Zellzahlbestimmung unmöglich wird. Über die Funktion des Polymers ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise stellt es einen Fraßschutz oder einen Schutz gegen Verdriftung durch Strömungen dar (Hoagland et al., 1993).

Ausblick: Zukünftige Untersuchungen sollten den experimentellen Nachweis der Lokalisation von Prolin im Cytoplasma zum Ziel haben. Möglicherweise bietet die intrazelluläre Markierung der Iminosäure mit Fluoreszenzfarbstoffen einen

methodischen Ansatz. Auch wenn die "Indizien" zur cytoplasmatischen Lokalisation von Prolin groß sind, wäre ein eindeutiger Nachweis *in vivo* an einem geeigneten Objekt (großzellige Diatomee) wünschenswert. Die vorliegende Arbeit ist als Einstieg in die Aufklärung der Salztoleranz unter verschiedenen Lichtbedingungen bei Eisdiatomeen zu verstehen. Zum umfassenderen Verständnis der Anpassungsmechanismen von Eisalgen an ihren extremen Standort muß die Temperatur als weitere Variable berücksichtigt werden. In kombinierten Salz- und Temperaturexperimenten könnte die Frage geklärt werden, ob eine multiplikative Wirkung besteht oder nicht.

8. Literaturverzeichnis

- Ackley, S.F.; Dieckmann, G.S.; Shen, H. (1987). Algal and foram incorporation into new sea ice. *EOS* 68: 1736.
- Ahmad, I.; Hellebust, J.A. (1988). The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae. *Plant Physiol.* 88: 348-354.
- Aletsee, L.; Jahnke, J. (1992). Growth and productivity of the psychrophilic marine diatoms *Thalassiosira antarctica* COMBER and *Nitzschia frigida* GRUNOW in batch cultures at temperatures below the freezing point of sea water. *Polar Biol.* 11: 643-647.
- Armbrust, E.V.; Chisholm, S.W. (1990). Role of light and the cell cycle on the induction of spermatogenesis in a centric diatom. *J. Phycol.* 26: 470-478.
- Armbrust, E.V.; Chisholm, C.W. (1992). Patterns of cell size change in marine centric diatom: variability evolving from clonal isolates. *J. Phycol.* 28: 146-156.
- Arrigo, K.R.; Sullivan, C.W. (1992). The influence of salinity and temperature covariation on the photophysiological characteristics of Antarctic sea ice microalgae. *J. Phycol.* 28: 746-756.
- Assur, A. (1958). Composition of sea ice and its tensile strength. In: National Academy of Science: Arctic Sea Ice. National Research Council Publ. 598, Washington, D.C.: 106-138.
- Bartsch, A. (1989). Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten. *Ber. Polarforsch.* 63.
- Bates, S.S.; Cota, G.F. (1986). Fluorescence induction and photosynthetic responses of Arctic ice algae to sample treatment and salinity. *J. Phycol.* 22: 421-429.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. (1973). Short communication. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Besnier, V.; Bazin, M.; Marchelidon, J.; Genevet, M. (1969). Etude de la variation du pool intracellulaire des acides aminés libres d'une diatomée marine en fonction de la salinité. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51: 1255-1261.
- Bidwell, J.P. (1985). *Artificial seawaters*. Jones and Barlett Publishers, Inc., Boston.
- Bisson, M.A.; Kirst, G.O. (1979). Regulation of turgor pressure in marine algae: ions and low molecular-weight organic compounds. *Aust. J. Plant Physiol.* 6: 539-556.
- Blunden, G.; Gordon, S.M. (1986). Betaines and their sulphonio analogues in marine algae. *Progress in Phycological Research* 4: 39-80.
- Blunden, G.; Smith, B.E.; Irons, M.W.; Ming-He Yang; Roch, O.G.; Patel, A.V. (1992). Betaines and tertiary sulphonium compounds from 62 species of marine algae. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 4: 373-388.
- Borowitzka, L.J. (1981). The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia* 81: 33-46.
- Borriss, H.; Libbert, E. (Eds.) (1984). *Wörterbücher der Biologie. Pflanzenphysiologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Brown, A.D.; Simpson, J.R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72: 589-591.

- Bunt, J.S. (1964). Primary productivity under sea ice in Antarctic waters. Influence of light and other factors on photosynthetic activities of Antarctic marine microalgae. *Antarct. Res. Ser.* 1: 27-31.
- Bunt, J.S. (1968). Some characteristics of microalgae isolated from Antarctic sea ice. In: Llano, G.A.; Schmitt, G.L. (Eds.): *Biology of Antarctic Seas III*. *Antarct. Res. Ser.* 11: 1-14.
- Bunt, J.S.; Lee, C.C. (1972). Data on the composition and dark survival of four sea-ice microalgae. *Limnol. Oceanogr.* 17: 452-461.
- Carpenter, J.F.; Crowe, J.H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244-255.
- Charlson, R.J.; Lovelock, J.E.; Andreae, M.O.; Warren, S.G. (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326: 655-661.
- Charlson, R.J.; Schwartz, S.E.; Hales, J.M.; Cess, R.D.; Coakley, J.A., Jr.; Hansen, J.E.; Hofmann, D.J. (1992). Climate forcing by anthropogenic aerosols. *Science* 255: 423-430.
- Clark, M.E. (1985). The osmotic role of amino acids: Discovery and function. In: *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation* (eds.: Gilles, R.; Gilles-Baillien, M.), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- CRC Handbook of chemistry and physics (1971). West, R.C. (Ed.): 52nd edition. The chemical Rubber Co., Cleveland Ohio, USA.
- Cullen, J.J.; Renger, E.H. (1979). Continuous measurement of the DCMU-induced fluorescence response of natural phytoplankton populations. *Mar. Biol.* 53: 13-20.
- Dashek, W.V.; Erickson, S.S. (1981). The botanical review. Isolation, assay, biosynthesis, metabolism, uptake and translocation, and function of proline in plant cells and tissues. *The Botanical Review* 47: 349-385.
- Davis, C.O.; Harrison, P.J.; Dugdale, R.C. (1973). Continuous culture of marine diatoms under silicate limitation. I. Synchronized life cycle of *Skeletonema costatum*. *J. Phycol.* 9: 175-180.
- De Roeck-Holtzhauer, Y.; Claire, C.; Bresdin, F.; Amicel, L.; Derrien, A. (1993). Vitamin, free amino acid and fatty acid compositions of marine planktonic microalgae used in aquaculture. *Bot. Mar.* 36: 321-325.
- Dickson, D.M.J.; Kirst, G.O. (1986). The role of β -dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine and homarine in the osmoacclimation of *Platimonas subcordiformis*. *Planta* 167: 536-543.
- Dickson, D.M.J.; Kirst, G.O. (1987). Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae: the role of inorganic ions, quarternary ammonium, tertiary sulphonium and carbohydrate solutes. I. Diatoms and a Rhodophyte. *New Phytol.* 106: 645-655.
- Dieckmann, G.S.; Lange, M.A.; Ackley, S.F.; Jennings, Jr., J.C. (1991). The nutrient status in sea ice of the Weddell Sea during winter: effects of sea ice texture and algae. *Polar Biol.* 11: 449-456.
- Drebes, G. (1966). On the life history of the marine plankton diatom *Stephanodiscus palmeriana*. *Helgo. Wiss. Meeresunters.* 13: 101-114.
- Du Preez, D.R.; Bate, G.C. (1992). Dark survival of the surf diatom *Anaulus australis* Drebes et Schulz. *Bot. Mar.* 35: 315-319.
- Edler, L. (1979). Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. *Phytoplankton and chlorophyll*. BMB 5.
- Eicken, H. (1992). The role of sea ice in structuring Antarctic ecosystems. *Polar Biol.* 12: 3-13.

- Fiala, M.; Oriol, L. (1990). Light-temperature interactions on the growth of Antarctic diatoms. *Polar Biol.* 10: 629-636.
- Flynn, K.J. (1990). Composition of intracellular and extracellular pools of amino acids, and amino acid utilization of microalgae of different sizes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 139: 151-166.
- Fogelqvist, E. (1991). Dimethylsulphide (DMS) in the Weddell Sea surface and bottom water. *Mar. Chem.* 35: 169-177.
- French, F.W.; Hargraves, P.E. (1985). Spore formation in the life cycles of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *J. Phycol.* 21: 477-483.
- French, F.W.; Hargraves, P.E. (1986). Population dynamics of the spore-forming diatom *Leptocylindrus danicus* in Narragansett Bay, Rhode Island. *J. Phycol.* 22: 411-420.
- Furnas, M.J. (1985). Diel synchronization of sperm formation in the diatom *Chaetoceros curvisetum* CLEVE. *J. Phycol.* 21: 667-671.
- Furuya, K.; Li, W.K.W. (1992). Evaluation of photosynthetic capacity in phytoplankton by flow cytometric analysis of DCMU-enhanced chlorophyll fluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88: 279-287.
- Galinski, E.A. (1992). Kompatible Solute aus Bakterien - Gewinnung, Anwendung, Struktur und Funktion. Habilitationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- Galinski, E.A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.
- Gallagher, J.C. (1983). Cell enlargement in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 19: 539-542.
- Garrison, D.L.; Ackley, S.F.; Buck, K.R. (1983). A physical mechanism for establishing algal populations in frazil ice. *Nature* 306, 5941: 363-365.
- Garrison, D.L.; Close, A.R. (1993). Winter ecology of the sea ice biota in Weddell Sea pack ice. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96: 17-31.
- Garrison, D.L.; Close, A.R.; Reimnitz, E. (1989). Algae concentrated by frazil ice: evidence from laboratory experiments and field measurements. *Antarct. Science* 1, 4: 313-316.
- Garrison, D.L.; Sullivan, C.W.; Ackley, S.F. (1986). Sea ice microbial communities in Antarctica. *BioScience* 36, 4: 243-250.
- Geitler, L. (1932). Der Formenwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen) *Arch. Protistenkd.* 78: 1-226.
- Gerlach, E.; Deuticke, B. (1963). Eine einfache Methode zur Mikrobestimmung von Phosphat in der Papierchromatographie. *Biochemische Zeitschrift* 337: 477-479.
- Gibson, J.A.E.; Garrick, R.C.; Burton, H.R.; McTaggart, A.R. (1990). Dimethylsulfide and the alga *Phaeocystis pouchetii* in Antarctic coastal waters. *Mar. Biol.* 104: 339-346.
- Gleitz, M. (1990). Vergleichende ökophysiologische Untersuchungen über den Kohlenstoff-Metabolismus an Freilandpopulationen antarktischer Eisalgen. (Photosynthese und Heterotrophie). Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Gleitz, M.; Thomas, D.N. (1993). Variation in phytoplankton standing stock, chemical composition and physiology during sea-ice formation in the southeastern Weddell Sea, Antarctica. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173: 211-230.

- Gorham, J. (1984). Separation of plant betaines and their sulphur analogues by cation-exchange high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 287: 345-351.
- Grant, W.S.; Horner, R.A. (1976). Growth responses to salinity variation in four arctic ice diatoms. *J. Phycol.* 12: 180-185.
- Gröne, T.; Kirst, G.O. (1991). Aspects of dimethylsulfonylpropionate effects on enzymes isolated from the marine phytoplankter *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). *J. Plant Physiol.* 138: 85-91.
- Guillard, R.R. (1962). 32. Salt and osmotic balance. In: *Physiology and biochemistry of algae* (ed. R.A. Lewin): 529-540.
- Hellebust, J.A. (1976). Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 485-505.
- Hellebust, J.A. (1985). Mechanism of response to salinity in halotolerant microalgae. *Plant and Soil* 89: 69-81.
- Hoagland, K.D.; Rosowski, J.R.; Gretz, M.R.; Roemer, S.C. (1993). Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* 29: 537-566.
- Hoek, C. van den; Jahns, H.M.; Mann, D.G. (1993). *Algen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Horner, R.A. (1985). Ecology of sea ice microalgae. In: Horner, R.A. (Ed.). *Sea ice biota*: 83-104. CRC Press, Boca Raton.
- Horner, R.; Ackley, S.F.; Dieckmann, G.S.; Gulliksen, B.; Hoshiai, T.; Legendre, L.; Melnikov, I.A.; Reeburgh, S.; Spindler, M.; Sullivan, C.W. (1992). Ecology of sea ice biota. 1. Habitat, terminology, and methodology. *Polar Biol.* 12: 417-427.
- Jackson, A.E.; Ayer, S.W.; Laycock, M.V. (1992). The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens*. *Can. J. Bot.* 70: 2198-2201.
- Joint, I.R.; Pomroy, A.J.; Robinson, G.A. (1987). Morphological changes in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) during a spring bloom in a marine ecosystem enclosure. *Br. Phycol. J.* 22: 119-134.
- Karsten, U. (1991). Ökophysiologische Untersuchungen zur Salinitätstoleranz antarktischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung des β -Dimethylsulphoniumpropionat (DMSP)-Stoffwechsels. *Ber. Polarforsch.* 79.
- Karsten, U.; Wiencke, C.; Kirst, G.O. (1990). The effect of light intensity and daylength on the β -dimethylsulphonylpropionate (DMSP) content of marine green macroalgae from Antarctica. *Plant, Cell and Environ.* 13: 989-993.
- Keller, M.D.; Bellows, W.K.; Guillard, R.R.L. (1989). Dimethyl sulfide production in marine phytoplankton. In: Saltzman, E.S.; Cooper, W.J. (Eds.). *Biogenic sulfur in the environment*. A.C.S. Symposium Series 393: 167-182.
- Kirst, G.O. (1977a). Ion composition of unicellular marine and freshwater algae with special reference to *Platimonas subcordiformis* cultivated in media with different osmotic strength. *Oecologia* 28: 177-189.
- Kirst, G.O. (1977b). Coordination of ionic relations and mannitol concentrations in the euryhaline unicellular alga, *Platimonas subcordiformis* after osmotic shocks. *Planta* 135: 69-75.
- Kirst, G.O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 21-53.
- Kirst, G.O. (1994). Influence of salinity on algal ecosystems. In: *Current Phycology*. Chapman and Hall. Im Druck.

- Kirst, G.O.; Thiel, C.; Wolff, H.; Nothnagel, J.; Wanzek, M.; Ulmke, R. (1991). Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) in ice-algae and its possible biological role. *Mar. Chem.* 35: 381-388.
- Kirst, G.O.; Wiencke, C. (1994). *Ecophysiology of polar algae*. Eingereicht.
- Kosower, E.M.; Patton, J.W. (1961). A convenient preparation of the 1-methyl betaines of pyridine carboxylic acids. *J. Org. Chem.* 26: 1318-1319.
- Kosower, E.M.; Skorcz, J.A.; Schwarz Jr., W.M.; Patton, J.W. (1960). Pyridinium complexes. I. The significance of the second charge-transfer band of pyridinium iodides. *J. Org. Chem.* 25: 2188-2191.
- Kottmeier, S.T.; McGrath Grossi, S.; Sullivan, C.W. (1987). Sea ice microbial communities. VIII. Bacterial production in annual sea ice of McMurdo Sound, Antarctica. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35: 175-186.
- Kulandaivelu, G.; Senger, H. (1976). Changes in the reactivity of the photosynthetic apparatus in heterotrophic ageing cultures of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol. Plant.* 36: 157-173.
- Kuwata, A.; Hama, T.; Takahashi, M. (1993). Ecophysiological characterisation of two life forms, resting spores. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102: 245-255.
- Laliberté, G.; Hellebust, J.A. (1989). Regulation of proline content of *Chlorella autotrophica* in response to changes in salinity. *Can. J. Bot.* 67: 1959-1965.
- Lange, M.A.; Ackley, S.F.; Wadhams, P.; Dieckmann, G.S.; Eicken, H. (1989). Development of sea ice in the Weddell Sea. *Ann. Glaciol.* 12: 92-96.
- Liu, M.S.; Hellebust, J.A. (1976a). Effects of salinity changes on growth and metabolism of the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.* 54: 930-937.
- Liu, M.S.; Hellebust, J.A. (1976b). Effects of salinity and osmolarity of the medium on amino acid metabolism in *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.* 54: 938-948.
- Liu, M.S.; Hellebust, J.A. (1976c). Regulation of proline metabolism in the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.* 54: 949-959.
- Lovelock, J.E. (1990). Hands up for the Gaia hypothesis. *Nature* 344: 100-102.
- Lovelock, J.E.; Maggs, R.J.; Rasmussen, R.A. (1972). Atmospheric dimethyl sulphide and the natural sulphur cycle. *Nature* 237: 452-453.
- Marsot, P.; Cembella, A.D.; Colombo, J.C. (1991). Intracellular and extracellular amino acid pools of marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) grown on unenriched seawater in high-cell-density dialysis culture. *J. Phycol.* 27: 478-491.
- Martin-Jézéquel, V.; Sournia, A.; Birrien, J.-L. (1992). A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. III. Free amino acids composition studied by HPLC analysis. *J. Plankton Res.* 14, 3: 409-421.
- Maykut, G.A. (1985). The ice environment. In: Horner, R.A. (Ed.). *Sea ice biota*: 21-82. CRC Press, Boca Raton.
- McCue, K.F.; Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Tibtech.* 8: 358-362.
- Mizuno, M. (1991). Influence of cell volume on the growth and size reduction of marine and estuarine diatoms. *J. Phycol.* 27: 473-478.
- Mortain-Bertrand, A. (1989). Effects of light fluctuations on the growth and productivity of Antarctic diatoms in culture. *Polar Biol.* 9: 245-252.
- Munns, R.; Greenway, H.; Kirst, G.O. (1983). Halotolerant eukaryotes. *Encyclopedia of plant physiology*, N.S., 12C: Physiological plant ecology III: 59-135. Springer (Eds.: Lange, O.L.; Nobel, P.S.; Osmond, C.B.; Ziegler, H.).

- Nikolopoulos, D.; Manetas, Y. (1991). Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzymes: Proline incompatibility. *Phytochemistry* 30, 2: 411-413.
- Nöthig, E.-M. (1988). Untersuchungen zur Ökologie des Phytoplanktons im südöstlichen Weddellmeer (Antarktis) im Januar / Februar 1985. *Ber. Polarforsch.* 53.
- Nothnagel, J.; Wanzek, M. (1989). Zur Ökophysiologie der antarktischen Eisalge *Chaetoceros neogracile* VAN LANDINGHAM. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Paleg, L.G.; Stewart, G.R.; Starr, R. (1985). The effect of compatible solutes on proteins. *Plant and Soil* 89: 83-94.
- Palmisano, A.C.; SooHoo, J.B.; Sullivan, C.W. (1987). Effects of four environmental variables on photosynthesis-irradiance relationships in Antarctic sea-ice microalgae. *Mar. Biol.* 94: 299-306.
- Palmisano, A.C.; Sullivan, C.W. (1982). Physiology of sea ice diatoms. I. Response of three polar diatoms to a simulated summer-winter transition. *J. Phycol.* 18: 489-498.
- Palmisano, A.C.; Sullivan, C.W. (1983). Physiology of sea ice diatoms. II. Dark survival of three polar diatoms. *Can. J. Microbiol.* 29: 157-160.
- Paul, J.S. (1979). Osmoregulation in the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *J. Phycol.* 15: 280-284.
- Reed, R.H. (1983). Measurement and osmotic significance of β -dimethylsulphonioacetate in marine macroalgae. *Mar. Biol. Lett.* 4: 173-181.
- Reed, R.H. (1984). Use and abuse of osmo-terminology. *Plant, Cell and Environ.* 7: 165-170.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- Rhodes, D.; Handa, S. (1989). Amino acid metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cells. In: Cherry, H. (Ed.), *Environmental stress in plants. Biochemical and physiological mechanism.* NATO ASI Series. Series G: Ecological sciences 19: 41-62, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rhodes, D.; Hanson, A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Riebesell, U.; Schloss, I.; Smetacek, V. (1991). Aggregation of algae released from melting sea ice: implications for seeding and sedimentation. *Polar Biol.* 11: 239-248.
- Rivkin, R.B.; Putt, M. (1987). Heterotrophy and photoheterotrophy by Antarctic microalgae: Light-dependent incorporation of amino acids and glucose. *J. Phycol.* 23: 442-452.
- Roch, O.; Crabb, T.A.; Blunden, G.; Gordon, S.M. (1985). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in phytoplankton. *Br. Phycol. J.* 20: 190.
- Round, F.E.; Crawford, R.M.; Mann, D.G. (1990). *The diatoms. Biology & morphology of the genera.* Cambridge University Press.
- Roy, S.; Legendre, L. (1979). DCMU-enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton. *Mar. Biol.* 55: 93-101.
- Samuelsson, G.; Öquist, G. (1977). A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.* 40: 315-319.

- Sasse, S. (1993). Ökophysiologische Untersuchungen an der antarktischen Diatomee *Nitzschia lecointei* (VAN HEUCK). Photosynthese und DMSP-Gehalt in Abhängigkeit von Temperatur und Salinität. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Scharek, R. (1991). Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddellmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr. Ber. Polarforsch. 94.
- Schlee, D. (1986). Ökologische Biochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.
- Schobert, B. (1974). The influence of water stress on the metabolism of diatoms. I. Osmotic resistance and proline accumulation. Z. Pflanzenphysiol. 74: 106-120.
- Schobert, B. (1977a). The influence of water stress on the metabolism of diatoms. II. Proline accumulation under different conditions of stress and light. Z. Pflanzenphysiol. 85: 451-461.
- Schobert, B. (1977b). The influence of water stress on the metabolism of diatoms. III. The effect of different nitrogen sources on proline accumulation. Z. Pflanzenphysiol. 85: 463-470.
- Schobert, B. (1977c). The anomalous colligative properties of proline. Naturwissenschaften 64: 386.
- Schobert, B. (1979). Die Akkumulierung von Prolin in *Phaeodactylum tricorutum* und die Funktion der "compatible solutes" in Pflanzenzellen unter Wasserstress. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 92: 23-30.
- Schobert, B. (1980). Proline catabolism, relaxation of osmotic strain and membrane permeability in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Physiol. Plant. 50: 37-42.
- Schultz, M.E.; Trainor, F.R. (1968). Production of male gametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptica*. J. Phycol. 4: 85-88.
- Setter, T.L.; Greenway, H. (1983). Changes in the production of endogenous osmotic solutes accumulated by *Chlorella emersonii* in the light and dark. Plant, Cell and Environ. 6: 227-234.
- Sicko-Goad, L.; Stoermer, E.F.; Ladewski, B.G. (1977). A morphometric method for correcting phytoplankton cell volume estimates. Protoplasma 93: 147-163.
- Smith, W. (1966). Short-term temperature and light conditions associated with auxospore formation in the marine centric diatom *Coscinodiscus concinnus*. Nature 209: 217-218.
- Sommer, C.; Thonke, B.; Popp, M. (1990). The compatibility of D-pinitol and 1D-1-O-methyl-muco-inositol with malate dehydrogenase activity. Bot. Acta. 103: 270-273.
- Spies, A. (1987). Growth rates of Antarctic marine phytoplankton in the Weddell Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 41: 267-274.
- Stosch, H.A. von; Drebes, G. (1964). Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris* - ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. Helgol. Wiss. Meeresunters. 11: 209-257.
- Thomas, D.N.; Baumann, M.E.M.; Gleitz, M. (1992). Efficiency of carbon assimilation and photoacclimation in a small unicellular *Chaetoceros* species from the Weddell Sea (Antarctica): influence of temperature and irradiance. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 157: 195-209.

- Thomas, D.N.; Gleitz, M. (1993). Allocation of photoassimilated carbon into major algal metabolite fractions: Variation between two diatom species isolated from the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 13: 281-286.
- Thompson, P.A.; Harrison, P.J.; Parslow, J.S. (1991). Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 27: 351-360.
- Tippit, D.H.; Pickett-Heaps, J.D. (1977). Mitosis in the pennate diatom *Surirella ovalis*. *J. Cell Biol.* 73: 705-727.
- Vairavamurthy, A.; Andreae, M.O.; Iverson, R.L. (1985). Biosynthesis of dimethylsulfide and dimethylpropiothetin by *Hymenomonas carterae* in relation to sulfur source and salinity variations. *Limnol. Oceanogr.* 30(1): 59-70.
- Vargo, G.A.; Fanning, K.; Heil, C.; Bell, L. (1986). Growth rates and the salinity response of an Antarctic ice microflora community. *Polar Biol.* 5: 241-247.
- Vaulot, D.; Chisholm, S.W. (1987). Flow cytometric analysis of spermatogenesis in the diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 23: 132-137.
- Veeranjaneyulu, K.; Kumari, B.D.R. (1989). Proline metabolism during water stress in mulberry. *J. Exp. Bot.* 40 (214): 581-583.
- Venekamp, J.H.; Koot, J.T.M. (1988). The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *J. Plant Physiol.* 132: 102-109.
- Venekamp, J.H.; Lampe, J.E.M.; Koot, J.T.M. (1989). Organic acids as sources in field bean plants, *Vicia faba* L.. *J. Plant Physiol.* 133: 654-659.
- Wegmann, K. (1986). Osmoregulation in eukaryotic algae. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 37-43.
- Weissenberger, J. (1992). Die Lebensbedingungen in den Solekanälchen des antarktischen Meereises. *Ber. Polarforsch.* 111.
- Weissenberger, J.; Dieckmann, G.; Gradinger, R.; Spindler, M. (1992). Sea ice: A cast technique to examine and analyze brine pockets and channel structure. *Limnol. Oceanogr.* 37(1): 179-183.
- Werner, D. (1971a). Der Entwicklungszyklus mit Sexualphase bei der marinen Diatomee *Coscinodiscus asteromphalus*. I. Kultur und Synchronisation von Entwicklungsstadien. *Arch. Mikrobiol.* 80: 43-49.
- Werner, D. (1971b). Der Entwicklungszyklus mit Sexualphase bei der marinen Diatomee *Coscinodiscus asteromphalus*. II. Oberflächenabhängige Differenzierung während der vegetativen Zellverkleinerung. *Arch. Mikrobiol.* 80: 115-133.
- White, R.H. (1982). Analysis of dimethyl sulfonium compounds in marine algae. *J. Mar. Res.* 40: 529-536.
- Williams, R.B. (1964). Division rates of salt marsh diatoms in relation to salinity and cell size. *Ecology* 45: 877-880.
- Withers, L.A.; King, P.J. (1979). Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L.. *Plant Physiol.* 64: 675-678.
- Wyn Jones, R.G.; Storey, R. (1981). Betaines. In: Paleg, G.; Aspinall, D. (Eds.). *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*: 171-204. Academic Press, Sydney.
- Yancey, P.H.; Clark, M.E.; Hand, S.C.; Bowlus, R.D.; Somero, G.N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.

Zwally, H.J.; Comiso, J.C.; Parkinson, C.L.; Campbell, W.J.; Carsey, F.D.; Gloersen, P. (1983). Antarctic sea ice, 1973-1979: Satellite passive-microwave observations. NASA SP-459, Nation. Aeronaut. Space Admin., Washington.

9. Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Kirst, der mir volle Freiheit bei der Gestaltung meiner Arbeit ließ, für die Überlassung des Themas, die wissenschaftlichen Anregungen und seine - auch spontane - Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Ursula Winter, Frau Claudia Daniel, Frau Ruth Jakobi, Frau Doris Meyerdierks und Herrn Holger Eichhorn danke ich für ihre methodische Unterstützung.

Vielen Dank schulde ich Herrn Dr. Andreas Jacob für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten. Herrn Michael Wanzek bin ich für den ständigen Gedankenaustausch in Bezug auf die Eisalgenproblematik dankbar.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Roswitha Ulmke für ihre vielfältige organisatorische und methodische Unterstützung, insbesondere bei den HPLC-Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Freunden, Bekannten und Familienmitgliedern, die meine Stimmungstiefs, besonders während des Zusammenschreibens dieser Arbeit, ertragen und nicht verübelt haben.

Ferner danke ich allen, die mich unterstützt haben, oben aber nicht namentlich genannt wurden.

Abschließend danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung der Mittel für das Forschungsvorhaben "Organische Osmolyte in Eisalgen" (SPP "Antarktisforschung"), die diese Arbeit ermöglicht haben.

Folgende Hefte der Reihe „Berichte zur Polarforschung“ sind bisher erschienen:

- * **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR
- Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge
zusammengestellt von Norbert Klages
- Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungsschiffes ‚Meteor‘“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern
- Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- * **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982“
by G. Hempel and R. B. Heywood
- * **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen ‚Eiswarte‘)“
zusammengestellt von Gode Gravenhorst
- Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS ‚Polar-sirkele‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei
zusammengestellt von R. Schneppenheim
- Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“
by D. L. Cram and J.-C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmidt, M. Mall, R. Kresse, T. Schwinghammer
- Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass
- Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982
zusammengestellt von Dieter Adelung
- Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski
- Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundschleppnetzfüge und Liste der Probennahme an Robben und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- * **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS ‚Polarbjörn‘ 1982/83“ (Sommerkampagne zur Atka-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS ‚Polarstern‘ (Kapstadt, 20. Januar 1983 – Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrtleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS ‚Polarstern‘ 1982/83“
herausgegeben von Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12.–16. May 1983, edited by S. B. Schnack
- Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV ‚Walther Herwig‘ and RV ‚Meteor‘“ –
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages
- Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein
- Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski
- Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede
- Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht von den Fahrtabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer
- Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht vom Fahrtabschnitt 4, Punta Arenas–Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Kohnen
- Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS ‚Polarstern‘ 1984, mit Beiträgen des FS ‚Valdivia‘
und des Forschungsflugzeuges ‚Falcon 20‘ zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel