

**Optisches Pumpen als noninvasives Verfahren zur
Untersuchung von Zustandsänderungen in
photosynthetischen Systemen**

Vom Fachbereich Physik der Universität Oldenburg zur Erlangung
des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

Daniel Berg
geb. am 20. August 1967
in Oldenburg/Holst.

Erstreferent : Prof. Dr. Karlheinz Maier
Korreferent : Prof. Dr. Dr. Birger Kollmeier

Tag der Disputation : 13/03/2001

**Optisches Pumpen als noninvasives Verfahren zur
Untersuchung von Zustandsänderungen in
photosynthetischen Systemen**

Vom Fachbereich Physik der Universität Oldenburg zur Erlangung
des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

Daniel Berg
geb. am 20. August 1967
in Oldenburg/Holst.

Erstreferent : Prof. Dr. Karlheinz Maier
Korreferent : Prof. Dr. Dr. Birger Kollmeier

Tag der Disputation : 13/03/2001

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Molekülphysikalische Grundlagen	3
2.1 Energetische Zustände, Anregung und Relaxation eines Moleküls	3
2.2 Fluoreszenzparameter und Übergangsraten	5
2.2.1 Stationäre Systeme	5
2.2.2 Nichtstationäre Systeme	6
3 Zweistufige Photosynthese	8
3.1 Aufbau von Chloroplasten	8
3.2 Der Photosyntheseapparat	9
3.2.1 Das Photosystem I	9
3.2.2 Das Photosystem II	11
3.2.3 Elektronentransport	12
4 Fluoreszenz photosynthetischer Organismen	15
4.1 Spektrale Verteilung — PSI-Fluoreszenz	16
4.2 PSII-Fluoreszenz	17
4.2.1 Fluoreszenzabklingen stationärer Systeme	17
4.3 Fluoreszenzinduktion nicht-stationärer Systeme: Der Kautsky-Effekt	20
4.3.1 Modellierung ohne Elektronenakzeptor	22
4.3.2 Modellierung mit Elektronenakzeptor	26
5 Algenaufzucht und Pigmentextraktion	30
6 Meßmethoden und Meßaufbauten	31
6.1 Absorptionsspektrometer	31
6.2 Meßaufbau zur transienten Erfassung von Induktionskurven	31
6.3 Meßaufbau zur Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven und Fluoreszenzspektren	33

6.3.1	Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven	33
6.3.2	Aufnahme von cw-Fluoreszenzspektren	36
6.4	Optisches Pumpen	36
6.4.1	Optisches Pumpen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen	37
6.4.2	Variables Vorbeleuchtungssystem	39
7	Messungen und Ergebnisse	51
7.1	Grundlegende Messungen	51
7.1.1	Absorption und cw-Fluoreszenz von Grünalgen	51
7.1.2	Fluoreszenzabklingkurven von Algen	52
7.2	Optisches Pumpen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen	54
7.2.1	Anwendung des optischen Pumpens: Wasserstreß	55
7.3	Charakterisierung des Fließsystems	57
7.3.1	Einfluß der Algendichte	57
7.3.2	Messungen zur Anregungsintensität im Vorbeleuchtungsrohr	57
7.3.3	Einfluß von Streulicht aus der Vorbeleuchtungsstrecke	57
7.3.4	Einfluß der Laserintensität	58
7.3.5	Eichung und Genauigkeit der Vorbeleuchtungsstrecke	60
7.4	Messungen zur Fluoreszenzinduktion	63
7.4.1	Fluoreszenzabklingkurven	64
7.4.2	cw-Fluoreszenzspektren	71
8	Diskussion	73
8.1	Analyse der Möglichkeiten des optischen Pumpens	73
8.1.1	Methode der zusätzlichen sättigenden Pulsen	73
8.1.2	Variables Vorbeleuchtungssystem	74
8.2	Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat	75
8.3	Analyse der Fluoreszenzinduktion	76
8.3.1	Fluoreszenzabklingkurven	76
8.3.2	cw-Fluoreszenzspektren	84
9	Zusammenfassung und Ausblick	89

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm	4
3.1	Aufbau von Chloroplasten	9
3.2	Organisation des Photosyntheseapparates	10
3.3	Räumliche Organisation des Photosystems I	10
3.4	Paarweise räumliche Organisation des Photosystems II	11
3.5	Z-Schema der zweistufigen Photosynthese	13
3.6	Wasserspaltung photosynthetischer Organismen	14
4.1	Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von <i>Chorella vulgaris</i>	16
4.2	Das Exzitonen-Radikalpaar-Modell Teil I	18
4.3	Das Exzitonen-Radikalpaar-Modell Teil II	19
4.4	OJIP-Transiente	21
4.5	Verschiedene Modelle der Antennenorganisation	23
4.6	<i>Connected Units Model</i>	24
4.7	Quantenausbeuten und Fluoreszenz am PS II	27
4.8	Drei-Zustands-Modell des PS II	29
6.1	Meßaufbau zur transienten Erfassung von Kautskykurven	32
6.2	Pikosekunden-Lasersystem. S1, S2: Spiegel; S3: Strahlteiler	33
6.3	Fluoreszenzmeßplatz	34
6.4	Optisches Pumpen	37
6.5	Puls-Pausen-Verhältnis beim optischen Pumpen	38
6.6	Die Vorbeleuchtungsstrecke	39
6.7	Das Vorbeleuchtungsrohr	40
6.8	Schnitt durch das Vorbeleuchtungsrohr	41
6.9	Spektrum der Vorbeleuchtungs-LED's	42
6.10	Eichung des Durchflußmessers	44
6.11	Strömungsarten	45
6.12	Geschwindigkeits-Potenzprofile für turbulente Rohrströmungen	46
6.13	Anteile am relativen Fehler für die Vorbeleuchtungszeit	50
7.1	Fluoreszenzspektren von <i>Chorella vulgaris</i> in Nährlösung mit und ohne DCMU	52

7.2	Fluoreszenzabklingkurven von <i>Chlorella vulgaris</i> in F_0 und F_m	53
7.3	Optisches Pumpen: Fluoreszenzabklingkurven von <i>Pisum sativum</i> . . .	54
7.4	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer als Funktion der Trockenzeit	56
7.5	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer als Funktion des relativen Massenverlustes	56
7.6	Spektrale Korrektur mit und ohne Pump-LED	58
7.7	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von <i>Chlorella vulgaris</i> in F_0 und F'_0 .	59
7.8	Vergleichsmessungen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten, Teil I	60
7.9	Vergleichsmessungen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten, Teil II	61
7.10	Vergleich transienter Messungen mit Messungen im Fließsystem	62
7.11	Fluoreszenzabklingkurven von <i>Chlorella vulgaris</i> nach verschiedenen Vorbeleuchtungsauern	64
7.12	Fluoreszenzamplitude und Verhältnis von Intensität zu mittlerer Fluoreszenzlebensdauer	66
7.13	Fitparameter von Fluoreszenzabklingkurven während der Fluoreszenzinduktion	67
7.14	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer und Übergangsraten während der Fluoreszenzinduktion	68
7.15	Vergleich transienter Messungen mit Messungen im Fließsystem unter DCMU-Einfluß	69
7.16	Fitparameter von Fluoreszenzabklingkurven während der Fluoreszenzinduktion unter DCMU-Einfluß	70
7.17	cw-Fluoreszenzspektren von <i>Chlorella vulgaris</i> nach verschiedenen Vorbeleuchtungsauern.	71
7.18	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm während der Fluoreszenzinduktion	72
8.1	Übergangsraten in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 . .	78
8.2	Übergangsraten in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 während der Fluoreszenzinduktion	80
8.3	Rekombinationsrate k_{-1} in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 unter DCMU- und NH_2OH -Einwirkung	81
8.4	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer beim Übergang von F_{sc} zu F_m	82
8.5	Rate k_1 für die Ladungstrennung beim Übergang von F_{sc} zu F_m	83
8.6	Berechnetes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm	86
8.7	Berechnetes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm bei nichtverschwindender PSI-Induktion	87

Abkürzungen

Chl <i>a</i> , Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>a</i> bzw. Chlorophyll <i>b</i>
cw	Continuous Wave
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea
ERPM	Exzitonen-Radikalpaar-Gleichgewichtsmodell
FWHM	Full width at half maximum: Halbwertsbreite
LHC	Light Harvesting Complex
NH ₂ OH	Hydroxylamin
P680	Photoaktives Zentralpigment des PS II
P700	Photoaktives Zentralpigment des PS I
Pheo	Pheophytin: Primärer Elektronenakzeptor des PS II
PSI, PS II	Photosystem I bzw. Photosystem II
PSE	Photosynthetische Einheit
Q _A	Primäres Chinon: sekundärer Elektronenakzeptor des PS II
Q _B	Sekundäres Chinon
RZI, RZII	Reaktionszentrum des PSI bzw. des PS II

Kapitel 1

Einleitung

Photoautotrophe Organismen, wie beispielsweise Grünalgen und grüne Pflanzen, sind in der Lage, aus anorganischen Nährstoffen alle Substanzen, die für den normalen Ablauf der Stoffwechselprozesse nötig sind, selbständig zu produzieren. Die dazu notwendige Energie gewinnen sie durch Absorption von Photonen in speziellen Pigment-Protein-Komplexen, den sogenannten Antennen, und der Wandlung in chemische Energie in der *Photosynthese*. Ein Teil der absorbierten Energie wird von diesen Antennenpigmenten jedoch wieder als Fluoreszenz abgestrahlt. Dabei hängt die Fluoreszenzquantenausbeute von der Gesamtbilanz aller konkurrierender Folgeprozesse ab, also auch von der Effizienz der Photochemie. Zustandsänderungen des Photosyntheseapparates haben also auch Einfluß auf dessen photophysikalische Eigenschaften. Daher kann die Messung der Fluoreszenz Informationen über den Zustand und die Funktionsweise des Photosyntheseapparates liefern.

Neben der Auswertung von Fluoreszenzuntersuchungen ungestörter Organismen können weitere Erkenntnisse zur Entwicklung und Überprüfung von Modellen für die Photosynthese gewonnen werden, indem gezielte Eingriffe am System vorgenommen werden und deren Wirkung auf Fluoreszenzparameter beobachtet wird. Solche Veränderungen werden in der Regel entweder durch chemische Präparation oder durch die Züchtung von Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften erreicht. Der Nachteil dieser Methoden liegt in der Irreversibilität der Eingriffe und damit der dauerhaften Veränderung oder Zerstörung der Proben. Das kann unerwünschte und kaum abschätzbare Nebenwirkungen zur Folge haben.

Durch geeignete additive Beleuchtung eines photosynthetischen Systems vor oder während der Messung ist es jedoch möglich, solche gezielten Zustandsänderungen des Photosyntheseapparates auch noninvasiv zu präparieren. So kann mit der neu entwickelten Methode des *optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen* der Elektronentransport in photosynthetischen Organismen reversibel blockiert werden. Aus Messungen an derart präparierten Proben können Rückschlüsse auf Wirkungsweise und -ort verschiedener Störungen gewonnen werden, ohne die Organismen durch den sonst notwendigen biochemischen Eingriff zu zerstören.

Neben solchen Zustandsänderungen, die durch äußere Parameter induziert wer-

den, zeigen photosynthetische Organismen nach Dunkeladaptation ein besonderes dynamisches Verhalten: mit Beginn der Beleuchtung setzt ein über mehrere Minuten dauernder Einschwingvorgang des Photosyntheseapparates ein. Dieser sogenannte Kautsky-Effekt spiegelt sich in Variationen der Fluoreszenzintensität vom Mikrosekunden- bis in den Minutenbereich wider und wird daher auch Fluoreszenzinduktion genannt. Möchte man neben der transienten Messung dieser Intensitätsänderungen detailliertere Untersuchungen während des nichtstationären Übergangs vornehmen, steht man vor dem Problem, daß sich der Zustand des Organismus in viel kleineren Zeitintervallen ändert, als sie für die Durchführung einzelner Messungen notwendig sind. So benötigt zum Beispiel die Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven nach dem Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens typischerweise mehrere Minuten, innerhalb derer sich das zu untersuchende System in einem stationären Zustand befinden muß. Daher werden solche Messungen während nichtstationärer Übergänge möglich, wenn es gelingt, stationäre Zwischenzustände zu erzeugen und für eine ausreichend lange Zeit zu erhalten.

Zur Untersuchung der Fluoreszenzinduktion wurde daher ein Fließsystem zum variablen optischen Pumpen von Grünalgen entwickelt, mit dem diese für eine definierte Zeit vorbeleuchtet und für die notwendige Meßdauer von Fluoreszenzabklingkurven und Fluoreszenzspektren in einem dieser Zwischenzustände festgehalten werden können.

In der vorliegenden Arbeit werden die Entwicklung und Anwendung des optischen Pumpens mit zusätzlichen Pulsen und im variablen Fließsystem beschrieben. Dazu wird nach dieser Einleitung ein kurzer Überblick über die molekülphysikalischen Grundlagen zur Interpretation von Fluoreszenzparametern gegeben (Kapitel 2). Die beiden folgenden Kapitel 3 und 4 befassen sich mit dem physiologischen Aufbau des Photosyntheseapparates sowie den Ursachen und Erklärungsmodellen der Fluoreszenz photosynthetischer Antennen. Danach folgt die Beschreibung der Aufzuchtbedingungen der verwendeten Algen (Kapitel 5).

In Kapitel 6 werden die neu entwickelten Meßmethoden und -aufbauten ausführlich vorgestellt. Im folgenden Kapitel 7 werden zunächst die Messungen zur Spezifikation der neuen Meßaufbauten gezeigt. Unter Anwendung der Methode der zusätzlichen sättigenden Pulse werden Messungen und Ergebnisse zu den Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat vorgestellt. Den Abschluß bilden detaillierte Untersuchungen der Fluoreszenzinduktion im Fließsystem zur variablen Vorbeleuchtung an Grünalgen. Die Messungen werden in Kapitel 8 diskutiert und bewertet.

Abschließend werden die Ergebnisse zusammengefaßt und ein Ausblick auf mögliche weiterführende Arbeiten gegeben (Kapitel 9).

Kapitel 2

Molekülphysikalische Grundlagen

2.1 Energetische Zustände, Anregung und Relaxation eines Moleküls

Ein Molekül kann verschiedene stationäre energetische Zustände einnehmen. Dabei hat es grundsätzlich drei verschiedene Anregungszustände (Haken und Wolf, 1992; Weidlein *et al.*, 1982):

1. Elektronische Anregungszustände: Man unterscheidet Singulett-Zustände mit antiparalleler Spinausrichtung (S_i , Gesamtspin $s_{\text{ges}} = 0$) und Triplett-Zustände mit paralleler Spinausrichtung (T_i , $s_{\text{ges}} = 1$). Der Grundzustand ist meistens ein Singulett-Zustand und wird mit S_0 bezeichnet. Elektronische Anregungsenergien liegen typischerweise in einem Bereich zwischen 1 und 20 eV.
2. Vibronische Anregungszustände: Innerhalb der elektronischen Zustände kann ein Molekül verschiedene Schwingungszustände ν_i einnehmen, die energetische Abstände zwischen 0.01 eV und 0.1 eV haben.
3. Rotatorische Anregungszustände: Innerhalb der vibronischen Zustände wiederum existiert eine Rotationsfeinstruktur, die Energiedifferenzen um 10^{-3} eV aufweist.

Das Verhältnis der Anzahl N_i, N_j von Molekülen in zwei Zuständen i und j mit den Energien E_i und E_j ist durch die Boltzmannverteilung gegeben

$$\frac{N_i}{N_j} = \exp\left(-\frac{E_i - E_j}{kT}\right), \quad (2.1)$$

wobei k die Boltzmannkonstante und T die Temperatur ist. Bei Zimmertemperatur ist praktisch nur der elektronische Grundzustand besetzt, nur etwa jedes einhundertste Molekül besetzt einen Schwingungszustand über dem Schwingungsgrundzustand.

Die Anregung eines Moleküls in einen höheren Singulett-Zustand S_i kann durch Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung erfolgen. Dabei wird die Energie eines Photons absorbiert. Danach erfolgt eine sehr schnelle Energiedissipation in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 . Die verschiedenen Relaxationsmechanismen von dort aus sind im Jablonski-Diagramm (Abb. 2.1) dargestellt.

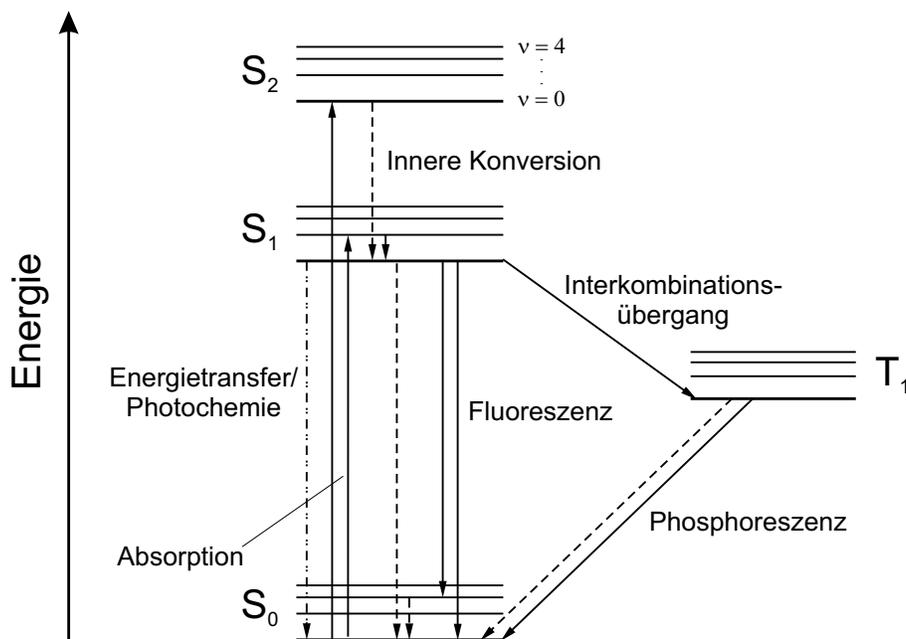


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm

1. Fluoreszenz: Mit einer Rate k_f relaxiert das Molekül unter Emission eines Fluoreszenzphotons in den S_0 -Zustand. Die Relaxation kann in verschiedene Rotations- und Schwingungsniveaus des S_0 erfolgen (Fluoreszenzspektrum).
2. Interkombinationsübergang (*Intersystem Crossing*): Durch die nichtverschwindende Spin-Bahn-Kopplung ist ein spinverbotener Übergang in den Triplett-Zustand möglich. Von dort aus ist wieder die Relaxation unter Abgabe eines Photons möglich (Rate k_{isc}). Aufgrund oft geringerer Übergangswahrscheinlichkeiten ist dieser Weg jedoch meistens mit einer geringen Quantenausbeute behaftet.
3. Innere Konversion (*Internal Conversion*): Strahlungslose Energiedissipation durch Energieübertrag durch Stöße an Nachbarmoleküle (Rate k_{ic}).
4. Energietransfer an Nachbarmoleküle: Relaxation durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung oder Elektronentransfer (Rate k_{et}).

5. Photochemie: Die Anregungsenergie wird für chemische Reaktionen verwendet (Rate k_p).

2.2 Fluoreszenzparameter und Übergangsraten

Die zeitliche Entwicklung der Anzahl angeregter Moleküle $N(t)$ eines solchen Systems läßt sich beschreiben durch

$$\frac{dN(t)}{dt} = - \sum_i k_i(t)N(t), \quad (2.2)$$

wobei die $k_i(t)$ die im vorherigen Abschnitt angegebenen, in der Regel zeitabhängigen Raten sind (k_f , k_{isc} , k_{ic} , k_p und k_{et}).

Die Lösung dieser Differentialgleichung liefert Informationen über energetische Zustände bzw. Relaxationsmechanismen. Im Folgenden werden der stationäre (zeitunabhängige Raten) und der nichtstationäre Fall (zeitabhängige Raten) untersucht.

2.2.1 Stationäre Systeme

Befindet sich das zu untersuchende System im energetischen Gleichgewicht, so sind die Übergangsraten konstant, d.h. es gilt

$$k_i(t) = k_i = const. \quad (2.3)$$

Damit läßt sich Gl. 2.2 integrieren zu

$$N(t) = N(0) \exp\left(- \sum_i k_i t\right), \quad (2.4)$$

wobei $N(0)$ die Anzahl angeregter Moleküle zum Zeitpunkt $t = 0$ sei. Die Anzahl emittierter Fluoreszenzphotonen $F(t)$ ist zur Anzahl angeregter Moleküle $N(t)$ proportional, also gilt auch

$$F(t) = F(0) \exp\left(- \sum_i k_i t\right) \quad (2.5)$$

oder mit $\tau_f = 1/\sum_i k_i$

$$F(t) = F(0) \exp\left(- \frac{t}{\tau_f}\right) \quad (2.6)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_f beschreibt die Zeit, nach der die Anzahl der emittierten Fluoreszenzphotonen $F(t)$ auf $\frac{1}{e}$ gesunken ist, $F(0)$ ist die Fluoreszenzintensität zur Zeit $t = 0$ nach einer Anregung. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist definiert als

Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen, was auch dem entsprechenden Verhältnis der Raten entspricht:

$$\Phi_f = \frac{k_f}{\sum_i k_i} = k_f \cdot \tau \quad (2.7)$$

Komplexere Systeme mit verschiedenen Molekülsorten und demzufolge zusätzlichen Relaxationkanälen erfordern ein komplizierteres Modell. Die Lösung der Ratengleichungen, die ein solches System beschreiben, kann zu einem Multiexponential-Ansatz für das Fluoreszenzabklingen führen (vgl. Kapitel 4) :

$$F(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (2.8)$$

Man kann nun den Schwerpunkt der Abklingkurve angeben, die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m , nach der im Mittel ein Photon emittiert wird. Diese mittlere Fluoreszenzlebensdauer kann als intensitätsgemittelte Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet werden:

$$\begin{aligned} \tau_m &= \langle t \rangle \\ &= \frac{\int_0^{\infty} t_i F_i(t) dt}{\int_0^{\infty} F_i(t) dt} \\ &= \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \end{aligned} \quad (2.9)$$

Die Anzahl der emittierten Fluoreszenzphotonen erhält man durch Integration von Gl. 2.8 zu

$$F = \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (2.10)$$

Daraus lassen sich die relativen Anteile der einzelnen Exponentialkomponenten an der Gesamtfluoreszenz bestimmen:

$$\Phi_j = \frac{\alpha_j \tau_j}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (2.11)$$

Durch Messung von Fluoreszenzabklingkurven in Verbindung mit einem entsprechenden physikalischen Modell können so Informationen über molekulare Vorgänge gesammelt werden.

2.2.2 Nichtstationäre Systeme

Werden Systeme untersucht, deren energetische Übergangsraten $k_i(t)$ zeitabhängig sind, ist die Lösung von Gl. 2.2 je nach zugrundeliegendem Modell entsprechend

kompliziert oder sogar nicht exakt möglich. So kann sich beispielsweise die Gesamtrate der Fluoreszenz k_f und somit die Fluoreszenzquantenausbeute während eines Einpendelns in ein Gleichgewicht ändern.

Wie bereits einleitend erwähnt, kann man jedoch über solche Einschwingvorgänge weitere Informationen erhalten, indem man Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Zeitachse des Einschwingens durchführt. Der variable Zustand wird sozusagen in viele stationäre Einzelzustände zerlegt. Dazu muß entweder die Meßdauer kurz im Vergleich zu den beobachteten Veränderungen am untersuchten System sein, oder das zu untersuchende System muß für die Dauer der Messung im jeweiligen Übergangszustand festgehalten werden. Die entsprechenden Zustandsgleichungen und die Fluoreszenzkinetik werden für jeden Zeitpunkt einzeln bestimmt und es kann so die zeitliche Entwicklung des Systems untersucht werden.

Photosynthetische Organismen, die nach einer Dunkeladaptation beleuchtet werden, zeigen in ihrer Chl *a*-Fluoreszenz ein solches Einschwingverhalten, das als Fluoreszenzinduktion oder Kautsky-Effekt bezeichnet wird. In Kapitel 4 werden die notwendigen Begriffe und Modelle zu seiner Beschreibung erläutert, Kapitel 6 beschreibt die experimentellen Techniken, die solche Messungen ermöglichen.

Kapitel 3

Zweistufige Photosynthese

Photosynthetische Organismen können mit Hilfe spezieller Pigment-Protein-Komplexe, den sogenannten Antennen, Umgebungslicht absorbieren und die so aufgenommene Energie verwenden, um die zum Wachstum notwendigen Kohlenhydrate aus anorganischen Nährstoffen herzustellen. Grüne Pflanzen und Grünalgen führen dazu eine zweistufige Photosynthese aus, bei der die Energie der Photonen über viele Zwischenschritte in chemische Energie umgewandelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente an Erbsenblättern und einzelligen Grünalgen vorgenommen, die sich im Aufbau des photosynthetischen Apparates sehr ähnlich sind. Daher wird im Folgenden ein Überblick über den allgemeinen Aufbau des Photosyntheseapparates grüner Pflanzen und Algen gegeben.

3.1 Aufbau von Chloroplasten

Bei der zweistufigen Photosynthese von grünen Pflanzen und Algen wird aus Licht gewonnene Energie in mehreren Stufen umgeformt und zum Wachstum verwendet. Sie wird in die Lichtreaktionen, bei denen die Energie absorbierter Photonen in chemische Energie umgewandelt wird und die Dunkelreaktionen, bei denen diese Energie zum Aufbau von Kohlenhydraten verwendet wird, unterteilt. Die Photosynthese spielt sich innerhalb von kleinen Organellen, den sogenannten Chloroplasten (Abb. 3.1) ab. Sie sind von einer äußeren Doppelmembran umgeben, die innere Membran ist ebenfalls ein lamellenartiges Membransystem, das aus geschichteten sogenannten Grana-Thylakoiden und aus einzelnen Stroma-Thylakoiden besteht. Der Photosyntheseapparat ist innerhalb dieser Membranen lokalisiert, während die Dunkelreaktionen im Stroma stattfinden.

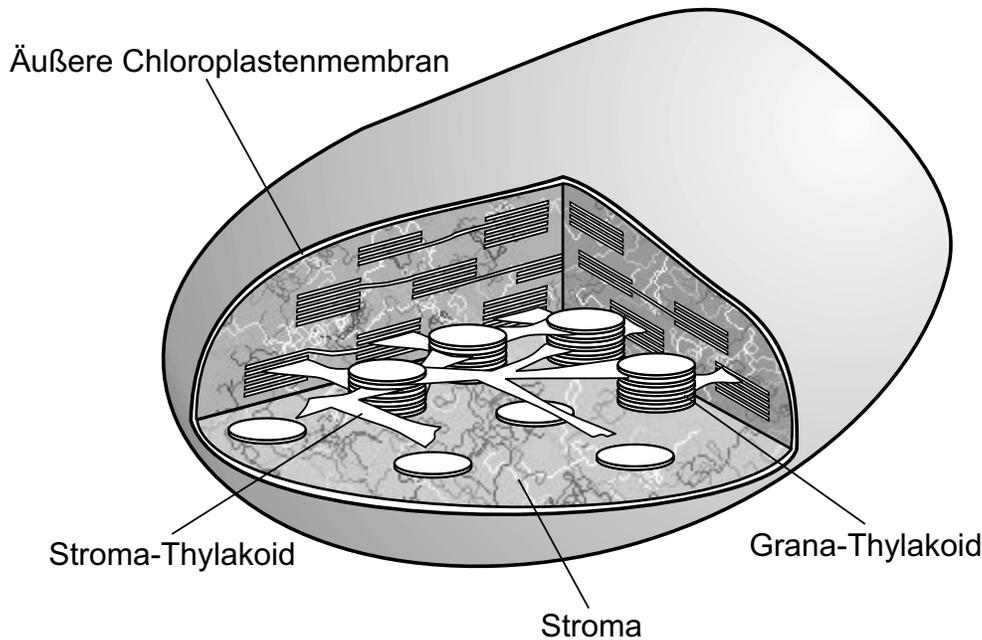


Abbildung 3.1: Aufbau von Chloroplasten, nach Ort (Ort, 1986)

3.2 Der Photosyntheseapparat

Der Photosyntheseapparat von Grünalgen und anderen Organismen, die eine zwei-stufige Photosynthese durchführen, läßt sich zunächst in drei funktionelle Bestandteile untergliedern: die Photosysteme I und II und die Elektronentransportkette, die die beiden Systeme koppelt. In Abb. 3.2 ist die räumliche Organisation dieser drei Bestandteile innerhalb der Thylakoidmembran schematisch dargestellt (die peripheren Antennenkomplexe sind hier nicht eingezeichnet, die einzelnen Bausteine und deren Abkürzungen werden in Kap. 3.2.3 erläutert).

Im Folgenden wird nun ein Überblick über die Physiologie und Funktionalität dieser drei Bausteine gegeben.

3.2.1 Das Photosystem I

Das Photosystem I besteht aus zwei unterschiedlichen Pigment-Protein-Komplexen, dem äußeren Antennenkomplex LHCI (LHC = *light harvesting complex*) und dem inneren Kern-Komplex CPI. Dabei sind jeweils acht LHCI-Komplexe ringförmig um einen CPI-Komplex angeordnet (Abb. 3.3). Die innere Antenne CPI ist aus zwei Polypeptiden aufgebaut, die das Reaktionszentrum des Photosystems I, die Elektronenakzeptoren A_0 und A_1 sowie mehrere Eisen-Schwefel-Komplexe binden (vgl. Abb. 3.2). Das Zentrum bilden zwei als Heterodimer organisierte Proteine der Massen 82 und 83 kDa. Dieser Dimer ist nach seinem Absorptionsmaximum bei

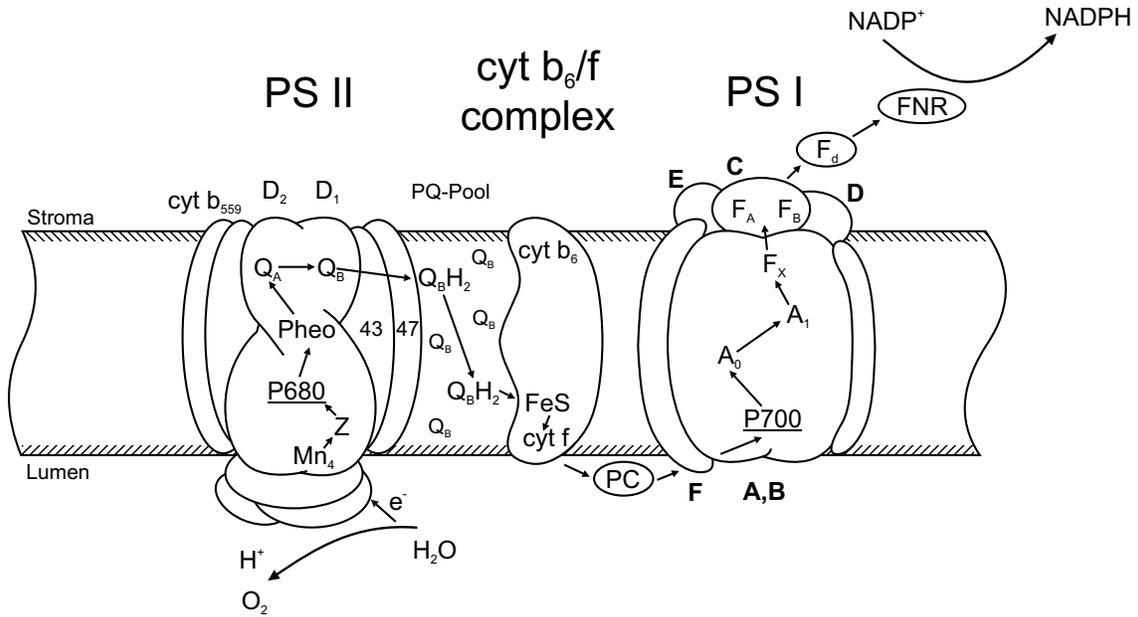


Abbildung 3.2: Organisation des Photosyntheseapparates innerhalb der Thylakoidmembran, nach Witt (Witt, 1996)

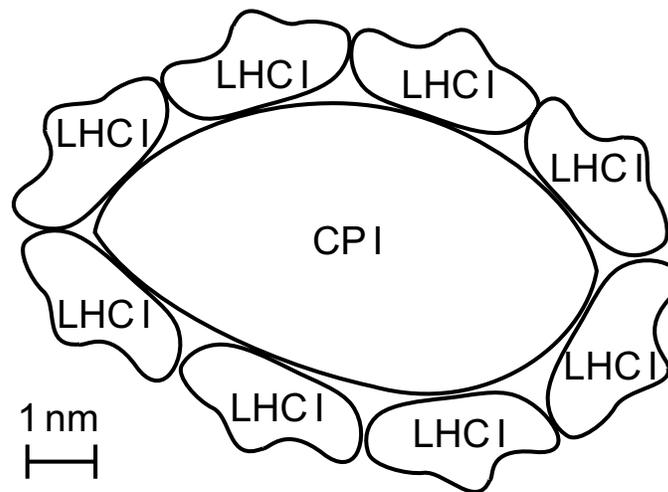


Abbildung 3.3: Räumliche Organisation des Photosystems I, nach Boekma (Boekma *et al.*, 1990; Boekma *et al.*, 1994)

$\lambda = 700\text{ nm}$ mit P 700 benannt. Weiterhin sind in der inneren Antenne etwa 100 Chl a - und 15 β -Carotin-Moleküle gebunden, die ebenfalls wie die äußere Antenne der Absorption von Licht dienen und die Energie schnell an das P 700 weiterleiten.

3.2.2 Das Photosystem II

Das Photosystem II besteht aus mehreren Protein-Komplexen, ähnlich wie beim PSI läßt sich jedoch eine grobe funktionelle Unterteilung in das Antennen-System und einen zentralen Kern-Komplex vornehmen.

Dieser zentrale D1/D2-Komplex bindet das Reaktionszentrum RZ II mit dem photoaktiven Zentralpigment P 680 in der Thylakoidmembran (Abb. 3.2). Das Reaktionszentrum besteht aus dem photoaktiven Zentrum, das ebenfalls nach seinem Absorptionsmaximum mit P 680 bezeichnet wird, zwei Pheophytin-Molekülen, wovon das eine den primären Elektronenakzeptor (im Weiteren mit *Pheo* bezeichnet) bildet, sowie dem primären Chinon Q_A . Als Elektronendonator für das PS II dient das Tyrosin 161 (oder Tyrosin Z), das seinerseits Elektronen über Mangan²⁺-Speichergruppen aus der Wasserspaltung erhält. Weiterhin befindet sich die Bindungsnische für das sekundäre Chinon Q_B am D1-Protein (vgl. auch Abb. 3.5).

Die Antenne des PS II ist weiter in innere (CP43/CP47) und äußere Pigment-Protein-Komplexe (LHC II) unterteilt. In den äußeren Antennen befinden sich neben einigen Carotenoiden hauptsächlich Chl a und Chl b , während in den inneren Antennen kein Chl b vorhanden ist (Yamamoto und Bassi, 1996).

In Abb. 3.4 ist die räumliche Anordnung des PS II schematisch gezeigt, wie sie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt wurde. Besonders auffällig ist dabei die dimer-artige Organisation von jeweils zwei Photosystemen II.

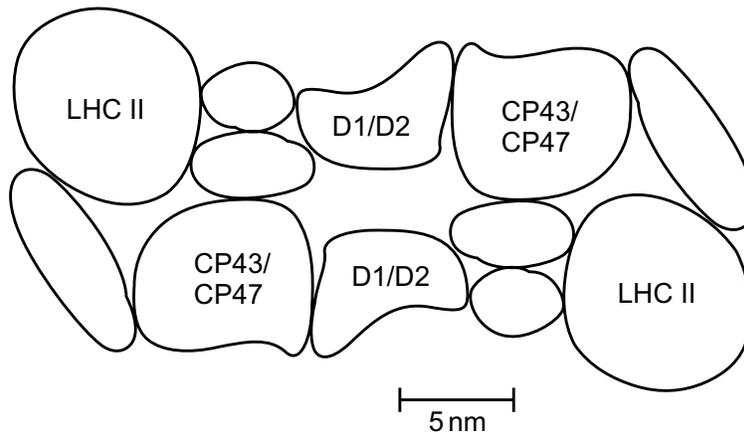


Abbildung 3.4: Paarweise räumliche Organisation des Photosystems II, nach Hankamer (Hankamer et al., 1997)

Neben den oben beschriebenen sogenannten PS II $_{\alpha}$ -Zentren kommt das PS II in einer weiteren Modifikation (PS II $_{\beta}$), sowie in einer weiteren *inaktiven* Form vor.

Die α -Zentren befinden sich in den stapelförmigen Grana-Thylakoiden, während die β -Zentren in den Stroma-Thylakoiden lokalisiert sind. Die oben beschriebene paarweise Organstation findet sich nur bei den α -Zentren. Die β -Zentren haben eine etwa zweieinhalbmals kleinere Antenne, denen das Chl *b* komplett fehlt (Percival *et al.*, 1984; Thielen *et al.*, 1981), während inaktiven Zentren die Andocknische für das sekundäre Chinon Q_B fehlt (s.u.).

Sowohl der Anteil als auch die Funktion der PS II $_{\beta}$ -Zentren ist bis heute unklar: je nach Präparation wurden Anteile an β -Zentren zwischen 25% und 50% festgestellt (Roelofs *et al.*, 1992; Melis, 1985). Die wahrscheinlichste Deutung der PS II $_{\beta}$ - und der inaktiven Zentren wurde bisher von Melis vorgeschlagen, der beide Modifikationen als Zwischenstufen während des Aufbaus neuer PS II ansieht (Melis, 1985; Melis, 1991).

3.2.3 Elektronentransport

Die beiden Photosysteme sind durch die sogenannte Elektronentransportkette gekoppelt. Diese gesamten Lichtreaktionen dieser nun vollständigen zweistufigen Photosynthese sind im sogenannten Z-Schema (Abb. 3.5) dargestellt. Die Antenne des PS II absorbiert ein Photon, dessen Energie sehr schnell an das P 680 weitergeleitet wird und dieses anregt. Es kommt dort zu einer Ladungstrennung, bei der es ein Elektron an den primären Elektronenakzeptor, das Pheophytin (Pheo), abgibt. Das Pheophytin gibt das Elektron an das primäre Chinon Q_A ab (Ladungsstabilisierung), das seinerseits das sekundäre Chinon Q_B zum Semichinon Q_B^- reduziert. Das oxidierte P 680 wird durch ein Elektron aus der Wasserspaltung (M) über das Tyrosin Z wieder reduziert. Im wasserspaltenden Komplex (M) werden jeweils 2 Wassermoleküle in vier Schritten unter Abgabe jeweils eines Elektrons in Sauerstoff und H^+ -Ionen gespalten (Joliot *et al.*, 1971; Joliot und Kok, 1975, siehe Abb. 3.6). Anregung, Ladungstrennung und -stabilisierung wiederholen sich, das Semichinon wird durch Aufnahme eines weiteren Elektrons weiter reduziert. Das Q_B^{2-} wird doppelt protoniert, koppelt so als Plastochinon vom PS II ab und wandert in den Plastochinon-Pool (PQ).

Von dort gelangen die Elektronen über den Cytochrom b_6/f -Komplex zum Photosystem I. Die Funktionsweise dieses Komplexes ist im Einzelnen noch nicht geklärt. Er dient unter anderem der Verlagerung von Protonen, die für die ATP-Synthese benötigt werden (s.u.). Die Absorption in der Antenne des P 700 führt zu dessen Anregung und zum Elektronenübertrag an einen weiteren Chlorophyll *a*-Monomer A_0 , den primären Akzeptor des PSI. Von dort gelangt das Elektron zum Phyllochinon A_1 und über verschiedene Eisen-Schwefel-Komplexe (FeS_A , FeS_B und FeS_X) und Ferredoxin (F_d) zum Ferredoxin-NADP $^+$ -Oxidoreductase-Enzym (FNR). Dieses reduziert das NADP $^+$, das dann als NADH für die weiteren Dunkelreaktionen zur Verfügung steht. Das P 700 wird durch ein Elektron vom Plastocyanin (PC) reduziert, das Elektronen über den Cyt b_6/f -Komplex vom Plastochinon-Pool erhält.

Neben diesem Weg der Elektronen durch den Photoyntheseapparat findet zusätz-

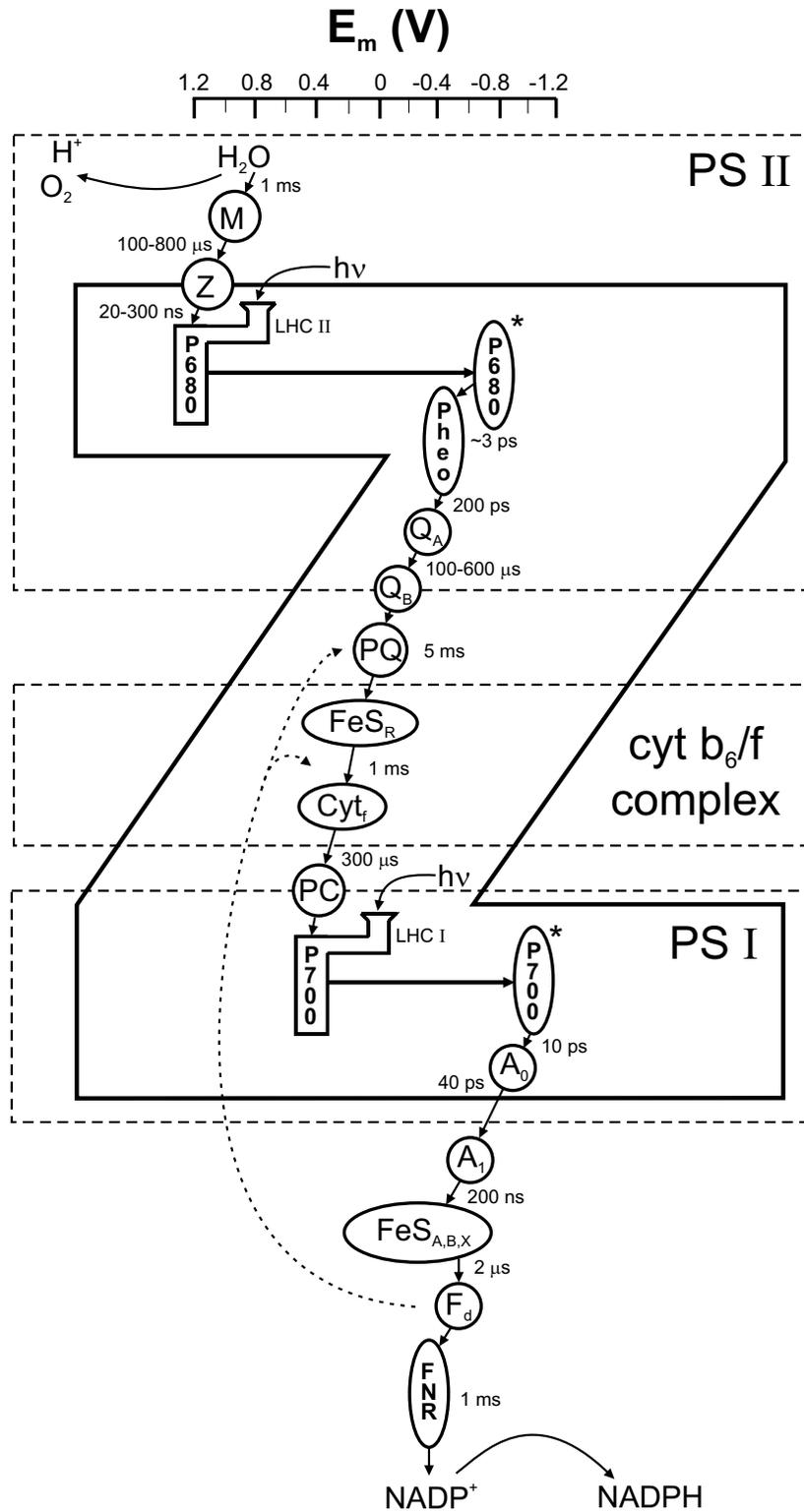


Abbildung 3.5: Z-Schema der zweistufigen Photosynthese, nach Govindjee (Govindjee und Coleman, 1992)

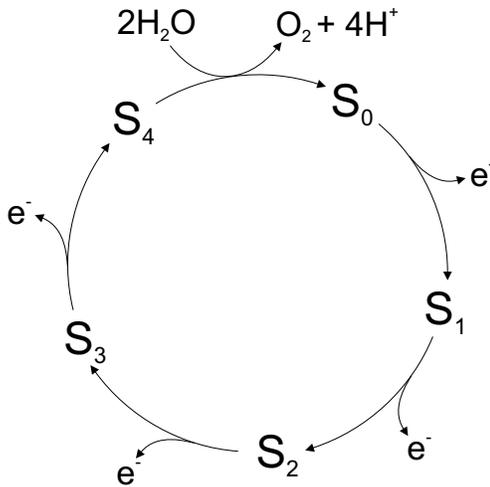


Abbildung 3.6: Wasserspaltung photosynthetischer Organismen, nach (Joliot *et al.*, 1971): Die Elektronen werden jeweils an das Tyrosin Z (Z) abgegeben. Zwei Wassermoleküle werden in vier Schritten gespalten, dazu müssen vier Photonen im Reaktionszentrum absorbiert werden.

lich der sogenannte zyklische Elektronentransport am PSI statt. Er ist in Abb. 3.5 durch den gestrichelten Pfeil angedeutet. Dabei werden Elektronen vom Ferredoxin (F_d) wieder zurück an den Plastochinon-Pool oder den Cytochrom b₆/f-Komplex abgegeben, wobei ADP zu ATP phosphoryliert wird. ATP wird ebenfalls für die Dunkelreaktionen der Photosynthese benötigt.

Diese zweistufige Photosynthese kann auf verschiedene Arten gestört d.h. reversibel oder irreversibel geschädigt werden. So können verschiedene Umweltparameter wie Temperatur, Lichtintensität oder auch Luft- und Wasserqualität z.B. direkt die Elektronentransportkette beeinflussen und so die Effektivität der Photosynthese verändern. Verschiedene Herbizide greifen ebenfalls direkt in diese Mechanismen ein. Eine wichtige Rolle spielen dabei die beiden Chinone Q_A und Q_B. Wird die Bindungsnische des Q_B durch einen Antagonisten belegt, kann der Elektronenfluss aus dem PSII blockiert werden, das Q_A bleibt im reduzierten Zustand zurück, erhöhte Fluoreszenz des PSII bzw. von dessen Antennenpigmenten wird beobachtet.

Im folgenden Kapitel wird nun gezeigt, inwieweit die Fluoreszenz photosynthetischer Systeme als indirekte, noninvasive Methode der Bestimmung der photosynthetischen Aktivität dienen kann.

Kapitel 4

Fluoreszenz photosynthetischer Organismen

Photosynthetische Organismen absorbieren Licht mit Hilfe von verschiedenen Pigmenten, die in ihren Antennen in Protein-Komplexe eingebettet sind (s. Kap. 3.2). Entsprechend zeigen sie die für die Pigmente charakteristische Fluoreszenz, die aber zum einen durch die Proteinumgebung und zum anderen durch die Anwesenheit verschiedener Fluoreszenzlöcher (im Folgenden *Quencher*) im Vergleich zu freien Pigmenten in Lösung verändert ist.

Wie in Kapitel 3 beschrieben, ist das im Photosystem II und dessen Antennenkomplex mit Abstand am häufigsten vertretene Pigment das Chlorophyll. Die Fluoreszenz von Chl *a* aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 in Lösung zeigt unter geeigneten Bedingungen (Abwesenheit von externen Quenchern, geringe Konzentration, rotationsdepolarisationsfreie Messung) ein monoexponentielles Fluoreszenzabklingen mit einer Fluoreszenzlebensdauer zwischen 5 ns und 7 ns (Hoff und Amesz, 1991; Keller, 1986; Connolly *et al.*, 1982). Dabei ist die Fluoreszenz normalerweise, d.h. bei nicht zu hohen Intensitäten, unabhängig davon, ob das Pigment vor der Messung beleuchtet wurde oder dunkeladaptiert war.

Die Fluoreszenz photosynthetischer Organismen unterscheidet sich davon grundlegend: Zum Einen verändert sich das Fluoreszenzabklingverhalten im Gleichgewichtszustand durch die komplexe Proteinumgebung, verschiedene neue Relaxationskanäle entstehen, die Abklingkurven lassen sich nicht mehr durch einen simplen monoexponentiellen Ansatz beschreiben. Zum Anderen wird die sogenannte *Fluoreszenzinduktion* beobachtet: nach Dunkeladaptation des Organismus über mehrere Minuten zeigt die Fluoreszenz vom Beginn der Beleuchtung an ein charakteristisches Schaltverhalten, die Intensität variiert nach dem Beleuchtungsbeginn vom Nanosekunden- bis in den Minutenbereich, bis nach etwa zwanzig Minuten ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Dieser Effekt wurde zuerst von Kautsky und Hirsch genauer untersucht und wird nach einem der Autoren auch *Kautsky-Effekt* genannt (Kautsky und Hirsch, 1931).

Im Folgenden wird ein Überblick über Art und Herkunft der Fluoreszenz photo-

synthetischer Organismen gegeben und aufgezeigt, inwiefern Messungen der Änderung dieser Fluoreszenz als noninvasive Sonde für Untersuchungen am Photosyntheseapparat dienen können.

4.1 Spektrale Verteilung — PSI–Fluoreszenz

Abbildung 4.1 zeigt ein Fluoreszenzspektrum von *Chlorella vulgaris* in Nährlösung im langwelligen Spektralbereich (für Spektren im gesamten sichtbaren Bereich siehe z.B. (Forster *et al.*, 1997)) und ein Absorptionsspektrum von Pigmentextrakt in Methanol (vgl. Kapitel 5: Algenaufzucht und Pigmentextraktion). Diese spektrale Verteilung ist typisch für viele Chl *a/b*–haltige photosynthetische Organismen bei Zimmertemperatur. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fluoreszenzinduktion von photosynthetischen Organismen wird lediglich in der langwelligen Fluoreszenzbande oberhalb von 650 nm beobachtet. Daher wird im Folgenden ausschließlich dieser Spektralbereich betrachtet.

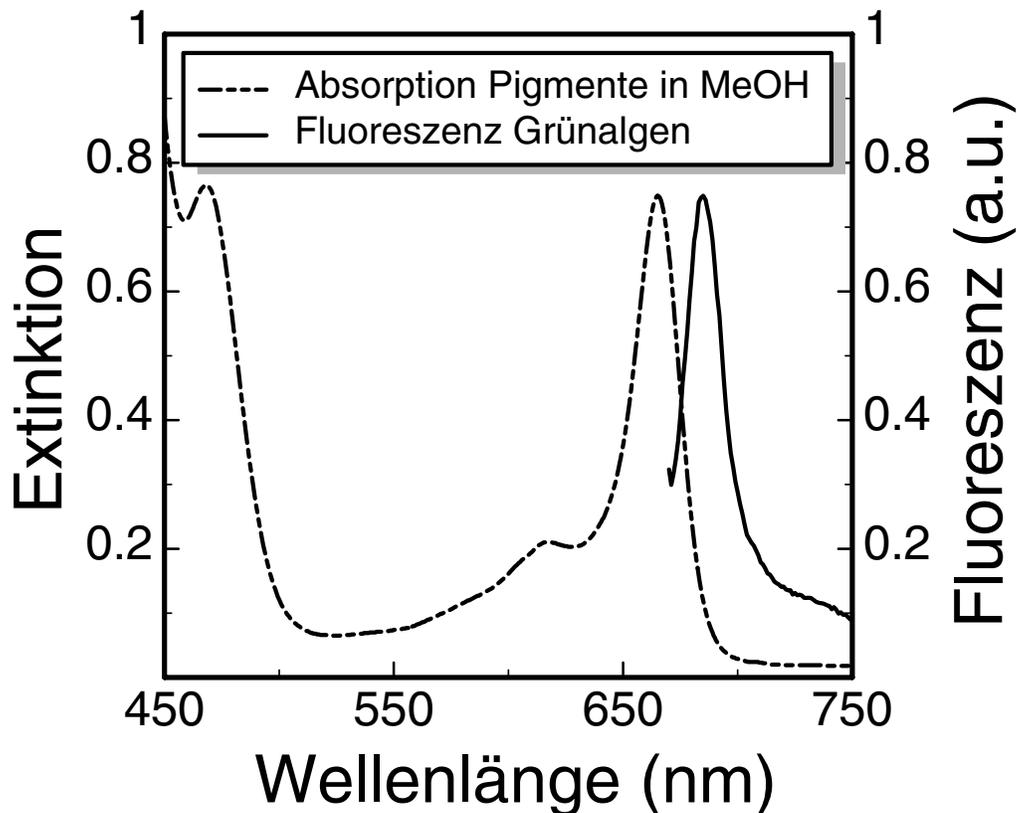


Abbildung 4.1: Spektren von *Chlorella vulgaris*: Absorptionsspektrum von Pigmentextrakt in Methanol und Fluoreszenzspektrum der Algen in Nährlösung.

Die variable Fluoreszenz hat ihren Ursprung nahezu komplett im Chl *a*-haltigen PSII. Bei Zimmertemperatur hat die Chl *a*-Fluoreszenz im roten Spektralbereich ein Maximum bei 683 nm bei einer Halbwertsbreite von 20 nm und eine breite Schulter zwischen 700 nm und 750 nm (Dau, 1994). Der Anteil der Fluoreszenz des PSII im Maximum ist sehr gering, selbst bei minimaler variabler Fluoreszenz des PSII (Zustand F_0 , s.u.) hat sie lediglich einen Anteil von 5 %. Bei maximaler variabler Fluoreszenz (Zustand F_m , s.u.) liegt der Anteil an der Gesamtfluoreszenz sogar nur bei 1 % (Dau, 1994; Roelofs *et al.*, 1992).

Die Gründe für die Abwesenheit von variabler Fluoreszenz im PSI sind bis heute nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, daß die Erniedrigung der Fluoreszenz des PSI durch eine höhere Konzentration an oxidiertem P700⁺ einen ähnlichen Wirkungsgrad hat wie die primäre Ladungstrennung und somit die Photochemie (Dau, 1994; Butler und Kitajima, 1975). Oxidierte Reaktionszentren stehen nicht für eine Anregung zur Verfügung und können so nicht strahlen. Dies hätte ähnliche Fluoreszenzquantenausbeuten für offene und geschlossene Reaktionszentren zur Folge. Weiterhin wird von einem nahezu irreversiblen Energietransfer von den Antennen des PSI an das P 700 ausgegangen, so daß bei der Messung von Fluoreszenzabklingkurven ein monoexponentielles Abklingen für das PSI erwartet wird (Valkunas *et al.*, 1995). Experimentell wird für das PSI eine Fluoreszenzlebensdauer von $\tau \approx 80$ ps beobachtet (Trissl *et al.*, 1993c; Holzwarth, 1991).

4.2 PS II–Fluoreszenz

4.2.1 Fluoreszenzabklingen stationärer Systeme

Die Relaxation des Photosystems II nach einer Anregung und die damit verbundene zeitliche Entwicklung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz kann Aussagen über Energietransferraten liefern (siehe Kapitel 2). Das heute anerkannte Modell für stationäre Systeme wurde von Schatz *et al.* entwickelt (Schatz *et al.*, 1988; Roelofs *et al.*, 1991; Krieger *et al.*, 1992). Dieses sogenannte Exzitonen–Radikalpaar–Gleichgewichtsmodell (im Folgenden ERPM) ist in Abb. 4.2 dargestellt. Die Energie eines in der Antenne absorbierten Photons ist nach diesem Modell nicht an einem Antennenpigment lokalisiert, sondern ist in Form eines Exzitons über das gesamte Antennensystem des PSII verteilt. Die Energie kann sehr schnell ($t < 10$ ps) an das Reaktionszentrum und auch vom Reaktionszentrum zurück an die Antenne übertragen werden. Mit der Rate k_1 findet im angeregten Reaktionszentrum eine Ladungstrennung statt, das Radikalpaar P 680⁺Pheo⁻ wird gebildet. Durch eine Rekombination mit der Rate k_{-1} kann so der angeregte, strahlende Zustand wiederbesetzt werden.

In Abb. 4.3 sind die Einzelschritte für einen einmaligen Umlauf abgebildet. Dabei ist P 680 das Reaktionszentrum, Pheo der primäre Elektronenakzeptor Pheophytin, Q_A und Q_B das primäre bzw. sekundäre Chinon und Chl_{*n*} die Antenne des PSII. Angeregte Zustände sind mit * gekennzeichnet. Der Zustand **A** zeigt den Grundzustand

des PS II.

Nach Absorption eines Photons der Energie $W_{ph} = h \cdot \nu$ befindet sich die Antenne in einem angeregten Zustand Chl_n^* . Das Gleichgewicht zwischen den zusammengefassten angeregten Antennenmolekülen Chl_n und dem angeregten Reaktionszentrum ist mit Zustand **B** bezeichnet. Von hier aus kann eine Relaxation in den Grundzustand mit der Rate k_A entweder strahlungslos (k_{nr}) oder unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons (k_f) stattfinden. Mit der Rate k_1 findet im angeregten Reaktionszentrum die Bildung des Radikalpaares $\text{P 680}^+\text{Pheo}^-$ statt (Zustand **C**). Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit kommt es zur Ladungsrekombination, die Anregungsenergie wird zurück auf die Antenne übertragen (Rate k_{-1}). Neben weiteren strahlungslosen Relaxationsprozessen (k_D) erfolgt die Ladungsstabilisierung durch Elektronentransfer vom Pheo^- zum primären Chinon Q_A (Rate k_2 , Zustand **D**). Hier sollte unter normalen Umständen eine Rückreaktion nicht möglich sein, da die Energiebarriere extrem hoch ist (*trap limited kinetics*). Das Q_A gibt das Elektron an das sekundäre Chinon Q_B und damit in die Elektronentransportkette ab (k_{pc}).

Die zeitliche Entwicklung dieses Systems gegeben durch die folgenden Ratengleichungen:

$$\frac{dB}{dt} = -(k_1 + k_A)B + k_{-1}C \quad (4.1)$$

$$\frac{dC}{dt} = -(k_{-1} + k_D + k_2)C + k_1B \quad (4.2)$$

wobei B und C die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände **B** und **C** sind. Dieses Gleichungssystem läßt sich durch Laplace-Transformation lösen ((Schatz *et al.*, 1988; Berg, 1995)). Faßt man dazu die den Zustand **B** bzw. den Zustand **C** entvölkern den Raten als

$$k_B = k_1 + k_A \quad (4.3)$$

$$k_C = k_{-1} + k_2 + k_D \quad (4.4)$$

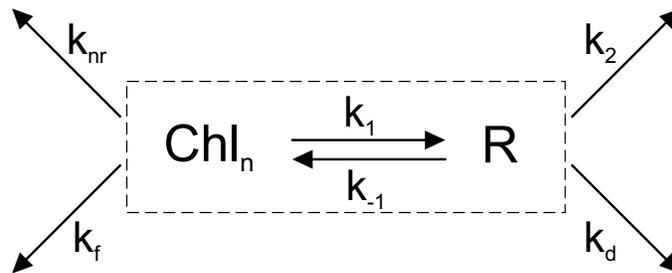


Abbildung 4.2: Das Exitonen-Radikalpaar-Gleichgewichtsmodell nach Schatz *et al.* Teil I: R: Radikalpaar $\text{P 680}^+\text{Pheo}^-$; Chl_n : Antenne + P680; k_f : Fluoreszenz; k_{nr} : nichtstrahlende Relaxation (Antenne); k_2 : Photochemie; k_D nichtstrahlende Relaxation (Reaktionszentrum)

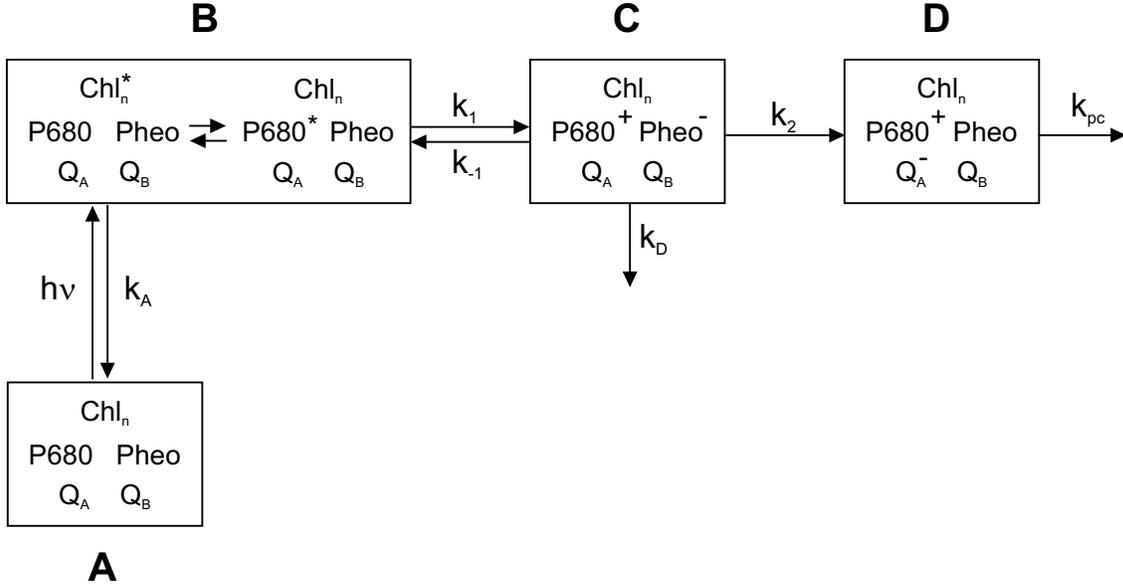


Abbildung 4.3: Das Exzitonen-Radikalpaar-Gleichgewichtsmodell nach Schatz *et al.* Teil II: P680: Reaktionszentrum; Pheo: Pheophytin; Q_A bzw. Q_B : primäres bzw. sekundäres Chinon; Chl_n : Antenne; * angeregte Zustände

zusammen, so erhält man für die Entvölkerung des Zustands unmittelbar nach einer Anregung ($B(0) = 1$ und $C(0) = 0$):

$$B(t) = \alpha_1 \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (4.5)$$

mit

$$\tau_1 = 2 \cdot \left(k_B + k_C + \sqrt{(k_B + k_C)^2 + 4(k_1 k_{-1} - k_B k_C)} \right)^{-1} \quad (4.6)$$

$$\tau_2 = 2 \cdot \left(k_B + k_C - \sqrt{(k_B + k_C)^2 + 4(k_1 k_{-1} - k_B k_C)} \right)^{-1} \quad (4.7)$$

$$\alpha_1 = \frac{k_C \tau_1 \tau_2 - \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \quad (4.8)$$

$$\alpha_2 = \frac{k_C \tau_1 \tau_2 - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \quad (4.9)$$

Nach diesem Modell wird also ein biexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten mit den Abklingdauern τ_i ($i = 1, 2$) für das PS II erwartet. Durch Umformung kann der Zusammenhang zwischen den Übergangsraten im Modell, die direkt physikalischen

Prozessen zugeordnet sind, und den experimentell bestimmbaren Parametern α_i und τ_i angegeben werden:

$$k_1 = \alpha_1\tau_1^{-1} + \alpha_2\tau_2^{-1} - k_A \quad (4.10)$$

$$k_{-1} = \frac{\alpha_1\alpha_2(\tau_2^{-1} - \tau_1^{-1})^2}{k_1} \quad (4.11)$$

$$k_2 + k_D = \alpha_1\tau_2^{-1} + \alpha_2\tau_1^{-1} - k_{-1} \quad (4.12)$$

Da experimentell lediglich drei unabhängige Größen zugänglich sind – die Lebensdauern τ_1 , τ_2 und das Amplitudenverhältnis (α_1/α_2) – muß ein Parameter aus anderen Experimenten ermittelt werden. Aufgrund von Messungen anderer Gruppen wird der strahlungslose Anteil k_{nr} der Rate k_A mit $k_{nr} = 0.3 \text{ ns}^{-1}$ angesetzt (Roelofs *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1996). Diese Rate kann als konstant angesehen werden, solange es nicht zu einer zusätzlichen strahlungslosen Relaxation innerhalb der Antenne kommt (Terjung, 1998). Weiterhin werden die Raten k_2 und k_D zusammengefaßt.

Wird nun der Elektronenfluß aus dem PS II gestört, indem z.B. das Andocken des Q_B verhindert wird, so wird zunächst die Rate k_{pc} zu Null, das Chinon Q_A bleibt nach einer Anregung, Ladungstrennung und –stabilisierung im reduzierten Zustand. Wird in diesem Zustand erneut ein Photon absorbiert und findet Ladungstrennung statt, so führt die starke elektromagnetische Wechselwirkung zwischen Q_A^- und Pheo⁻ zur Ladungsrekombination des Radikalpaars $P 680^+ \text{ Pheo}^-$, die Rate k_2 verschwindet, die Rate k_{-1} wächst, der Zustand **B** wird erneut besetzt und es wird erhöhte Fluoreszenz beobachtet (Kap. 7.1.2).

Die Heterogenität des PS II (vgl. Kap. 3.2.2: PS II _{α} - und PS II _{β} -Zentren) erfordert formal die Berücksichtigung weiterer Raten und damit weiterer Fluoreszenzparameter. Inwieweit dies notwendig ist und in eigene Messungen eingeht, wird in Kapitel 8 untersucht.

4.3 Fluoreszenzinduktion nicht–stationärer Systeme: Der Kautsky–Effekt

Neben dem oben beschriebenen Fluoreszenzabklingen im Gleichgewichtszustand nach kurzzeitiger Anregung werden, wie bereits erwähnt, auch Variationen in der Intensität und spektralen Verteilung der Fluoreszenz von Pflanzen und Algen über mehrere Minuten beobachtet. So zeigen dunkeladaptierte photosynthetische Organismen charakteristische Änderungen in der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz, wenn man sie mit kontinuierlichem Licht beleuchtet. Diese Änderungen werden als Fluoreszenzinduktion, Fluoreszenztransiente oder auch Kautsky–Effekt bezeichnet. Die Intensitätstransiente wird in die schnelle (bis zu 1 s) und die langsame Phase (bis zu mehreren Minuten) unterteilt. Abbildung 4.4 zeigt eine exemplarische Messung der

schnellen Phase, der sogenannten OJIP-Transiente, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist.

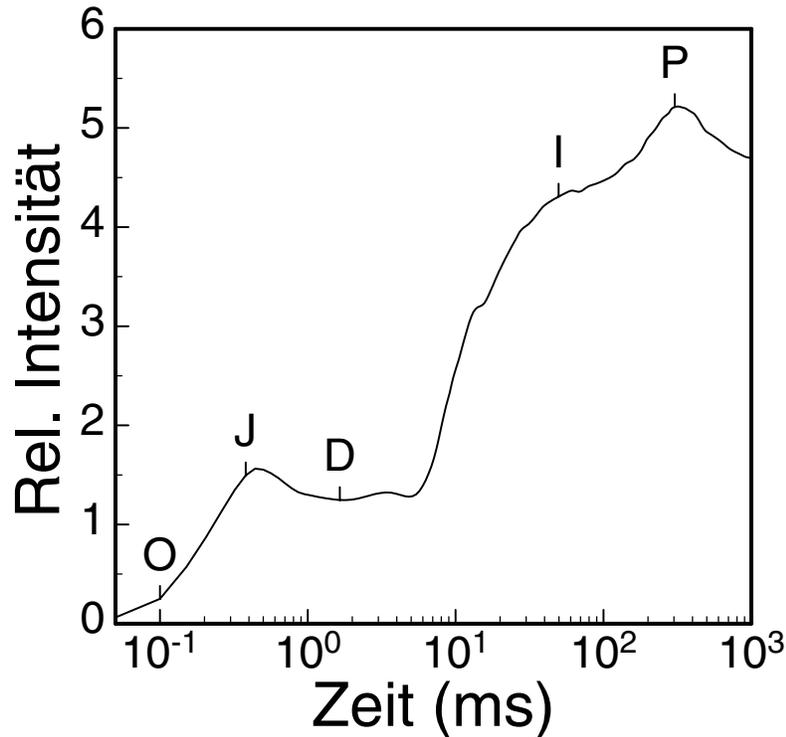
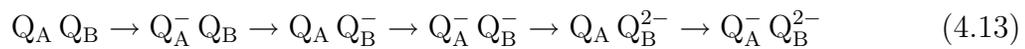


Abbildung 4.4: Die OJIP-Transiente. Diese Kurve wurde an Chlorella bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 650\text{nm}$ und einer Intensität von $I = 25\text{W/m}^2$ aufgenommen. Vom Zustand minimaler Fluoreszenz unmittelbar nach dem Zuschalten des Lichts (O) steigt die Intensität über die beiden Flexionen I und J bis zu einem Maximum P an. Unter geeigneten Umständen ist ein Zwischenminimum (Dip D) zu beobachten.

In erster Näherung spiegelt dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität die kontinuierliche Reduktion des Elektronenakzeptor-Pools des PSII (Q_A , Q_B und PQ) wieder. Dabei kann das Paar aus primärem und sekundärem Chinon die verschiedenen Zustände schrittweise durch Aufnahme jeweils eines weiteren Elektrons aus dem PSII einnehmen



Eine Untersuchung der Art des Anstiegs und der verschiedenen Flexionen kann so weitere Informationen über Funktionsweise und Organisation des Photosyntheseparates liefern.

Da sich während der Induktion das Gesamtsystem nicht in einem stationären Zustand befindet, sich also verschiedene Photosysteme in verschiedenen Zuständen

befinden können, muß die Gesamtheit vieler solcher Systeme betrachtet werden. Bilden viele photosynthetische Einheiten (PSE) zusammen einen Verbund, so wird die Ratenbilanz und damit auch die Gesamtfluoreszenz dieses Systems davon abhängen, ob die einzelnen Subsysteme untereinander Energie austauschen können.

Über viele Jahre wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen und anhand von Messungen überprüft. Dabei beschreiben viele Modelle zunächst nur die oxidierende Seite des PS II in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors, einige vor allem neuere Ansätze schließen die reduzierende Seite ebenfalls ein.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Modelle gegeben werden (Dau, 1994; Govindjee, 1995a; Govindjee, 1995b).

4.3.1 Modellierung ohne Elektronenakzeptor

Neben sehr einfachen Gittermodellen (z.B. Pearlstein (Pearlstein, 1982)) oder Trichtermodellen (z.B. Seely (Seely, 1973)) wurden auch komplexere Ansätze wie z.B. das bipartite bzw. tripartite Modell von Butler (Butler *et al.*, 1983; Butler und Strasser, 1977; Butler, 1978) oder das *Sequential Hit*-Modell von Valkunas (Valkunas *et al.*, 1992) entwickelt, konnten aber jeweils nur Einzelmessungen erklären oder lieferten unphysiologische Ergebnisse (siehe z.B. Review von H. Dau (Dau, 1994)). Trissl *et al.* (Trissl *et al.*, 1993a) und Lazár *et al.* (Lazár *et al.*, 1997; Lazár *et al.*, 1998; Lazár und Pospíšil, 1999) berücksichtigten erstmals konsequent das ERPm und erweiterten es entsprechend.

In Abb. 4.5 sind verschiedene denkbare Organisationsformen der Antennen mehrerer PSE skizziert. Neben den beiden Extremzuständen nichtverbundener Einzelsysteme (*Separated Units*, Abb. 4.5 (a)) und einem gemeinsamen Pigment-Pool (*Lake*, Abb. 4.5 (b)) sind dort zwei Zustände mit begrenztem Exzitonenaustausch zwischen verschiedenen PSE gezeigt: das zuerst von Joliot und Joliot eingeführte *Connected Units Model* (Joliot und Joliot, 1964) und das *Domain Model* (Paillotin, 1976a; Paillotin, 1976b; Den Hollander *et al.*, 1983, Abb. 4.5 (c) bzw. (d)).

Die umfassendste Behandlung wurde in den letzten Jahren von Trissl *et al.* mit einem *Connected Units Model* vorgenommen und soll hier kurz umrissen werden (Abb. 4.6). In diesem Zwei-Zustands-Modell kann jede PSE genau zwei Zustände einnehmen:

- Das Reaktionszentrum (RZ) der PSE ist geschlossen und kann in diesem Zustand keine weitere Energie strahlungslos dissipieren, die Fluoreszenz ist maximal (F_m). Im ERPm entspricht dies dem Zustand mit verschwindender Rate für die Photochemie $k_2 = 0$.
- Das Reaktionszentrum der PSE ist offen, Energie kann aufgenommen werden und sowohl strahlend als auch strahlungslos dissipiert werden, die Fluoreszenz ist minimal (F_0).

Das Modell wurde in seiner allgemeinen Form in (Trissl *et al.*, 1993a; Trissl *et al.*, 1993b; Trissl, 1994) dargestellt, in späteren Veröffentlichungen wurden weitere Modifikationen wie z.B. die Einführung heterogener Antennen vorgenommen (Trissl und Lavergne, 1995a; Trissl und Lavergne, 1995b; Lavergne und Trissl, 1995; Bernhardt und Trissl, 1999). Für die hier vorgestellten grundlegenden Eigenschaften eines solchen Zwei-Zustands-Modells ist dies jedoch ohne Bedeutung.

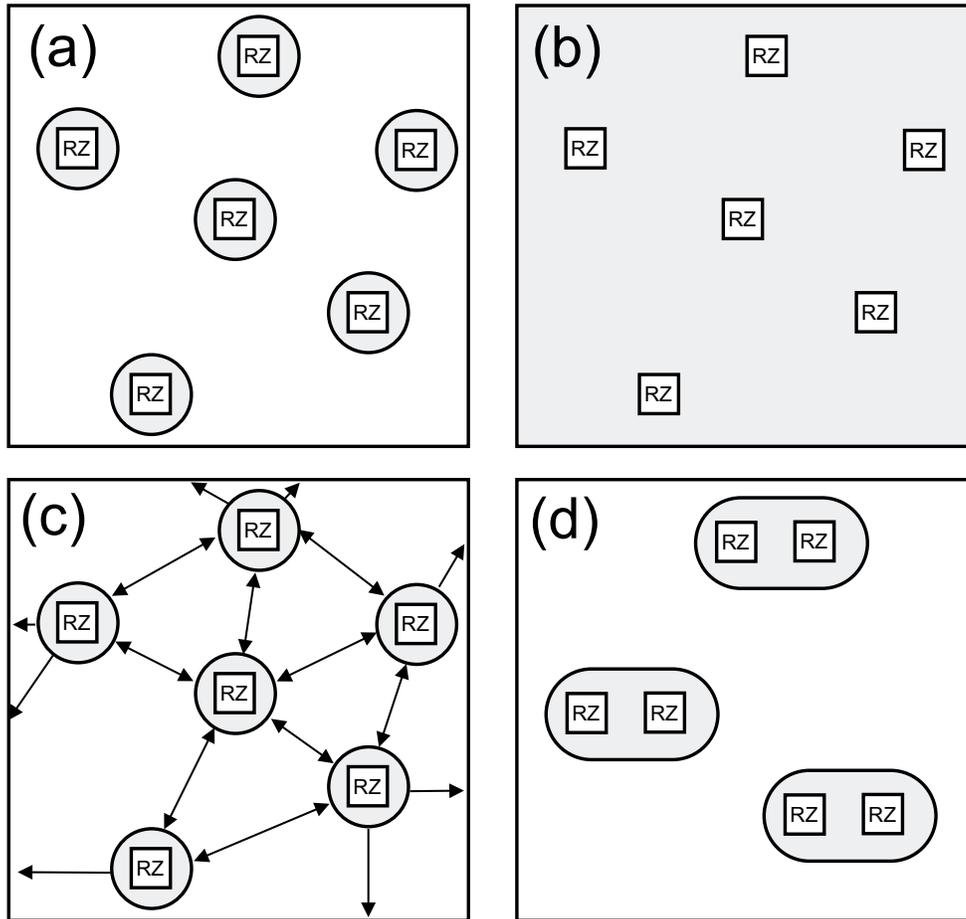


Abbildung 4.5: Verschiedene Modelle der Antennenorganisation nach Bernhardt (Bernhardt und Trissl, 1999). (a) *Separate Units Model*: kein Exzitonenaustausch zwischen separaten Antennen, (b) *Lake Model*: alle Reaktionszentren teilen sich einen gemeinsamen Antennenpool, in dem Exzitonen frei wandern können, (c) *Connected Units Model*: begrenzte Rate für Exzitonenaustausch, (d) *Domain Model*: innerhalb begrenzter Domänen (hier Domänengröße $\lambda = 2$) ist freier Exzitonenaustausch möglich.

Das Modell berücksichtigt das ERPM und führt eine zusätzliche Rate k_{UV} für den Exzitonenaustausch zwischen verschiedenen PSE ein. Diese Erweiterung beinhaltet die beiden oben beim stationären ERPM beschriebenen Fälle (F_0 : alle PSII offen und F_m : alle PSII geschlossen), da in diesen Fällen die treibende Kraft für einen

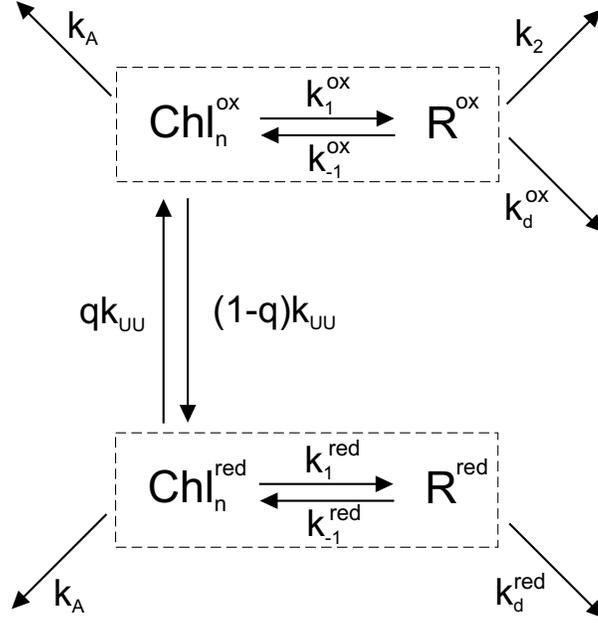


Abbildung 4.6: *Connected Units Model* für das PSII nach (Trissl und Lavergne, 1995a). Chl_n : Antennensysteme; R : Radikalpaar; *ox* bzw. *red*: offene bzw. geschlossene PSE; q Anteil offener RZ; k_{UU} : Rate für Exzitonenaustausch; k_A : strahlungslose Antennenverluste (k_{nr}) + Fluoreszenz (k_f)

Exzitonenaustausch fehlt und somit $k_{UU} = 0$ ist. Hier wird noch keine Aussage über die Art des Energietransfers in Hinsicht auf physiologische Abstandsparameter gemacht.

Das Reaktionsschema läßt sich wiederum als System von Ratengleichungen darstellen (Trissl und Lavergne, 1995a, S. 185, Gl. (1a) - (1d), die Nomenklatur wurde an die in dieser Arbeit verwendete angepaßt):

$$\frac{dz^{\text{ox}}}{dt} = - (k_A + k_1^{\text{ox}} + (1 - q)k_{UU}) z^{\text{ox}} + k_{-1}^{\text{ox}} R^{\text{ox}} + qk_{UU} z^{\text{red}} \quad (4.14)$$

$$\frac{dz^{\text{red}}}{dt} = - (k_A + k_1^{\text{red}} + qk_{UU}) z^{\text{red}} + k_{-1}^{\text{red}} R^{\text{red}} + (1 - q)k_{UU} z^{\text{ox}} \quad (4.15)$$

$$\frac{dR^{\text{ox}}}{dt} = - (k_{-1}^{\text{ox}} + k_2 + k_D^{\text{ox}}) R^{\text{ox}} + k_1^{\text{ox}} z^{\text{ox}} \quad (4.16)$$

$$\frac{dR^{\text{red}}}{dt} = - (k_{-1}^{\text{red}} + k_D^{\text{red}}) R^{\text{red}} + k_1^{\text{red}} z^{\text{red}} \quad (4.17)$$

Dabei stehen z^{ox} , z^{red} , R^{ox} und R^{red} für die Konzentration von Exzitonen und Radikalpaaren in offenen bzw. geschlossenen PSE. Ist nun z_0 die Anfangskonzentration an Exzitonen, dann ergeben sich die Quantenausbeuten für die Fluoreszenz ϕ_f und die Photochemie ϕ_p zu

$$\phi_f = \frac{k_f}{z_0} \int_0^{\infty} z dt \quad (4.18)$$

$$\phi_p = \frac{k_f}{z_0} \int_0^{\infty} R^{\text{ox}} dt \quad (4.19)$$

Die analytische Lösung des Gleichungssystems führt zu folgendem Ausdruck für die Fluoreszenzinduktionskinetik:

$$-\frac{dq}{dt} = I\phi_p(q), \quad (4.20)$$

wobei I die Exzitonenerzeugungsrate ist (absorbierte Photonen pro PSE und s^{-1}) (Lavergne und Leci, 1993). Daraus läßt sich dann die Fluoreszenz als Funktion des Anteils offener PSE $\phi_f(q)$ herleiten:

$$\phi_f(q) = \frac{F_m - q[F_m - F_0(1 + J)]}{1 + Jq} \quad (4.21)$$

Dabei ist J der sogenannte *Konnektivitäts-Parameter*, der die Sigmoidität der $F(t)$ -Kurve bestimmt. Definiert man den effektiven Wirkungsquerschnitt $\sigma(q)$ eines offenen Zentrums als

$$\sigma(q) = \frac{\phi_p(q)}{q}, \quad (4.22)$$

dann gilt

$$\frac{\sigma(0)}{\sigma(1)} = J + 1 \quad (4.23)$$

Somit kann $J+1$ als Anstieg im Wirkungsgrad beim Schließen benachbarter Zentren angesehen werden.

Als Grenzfälle des *Connected Units* Modell ergeben sich :

- $k_{UV} = 0$: es findet kein Energieaustausch statt. Die Fluoreszenzinduktionskurve hat die Form einer simplen exponentiellen Sättigung mit der konstanten Rate $I\phi_p(1)$.
- $k_{UV} \rightarrow \infty$: Exzitonen können ungestört durch einen Antennenpool wandern (*lake model*). Die Fluoreszenz steigt sigmoidal bis zu einem Maximum an.

Diese beiden Extremfälle gelten nicht nur für das *Connected Units* Modell, sondern für alle Zwei-Zustands-Modelle in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors.

Weiterhin konnten Trissl *et al.* zeigen, daß das *Connected Units Model* und das *Domain Model* sehr ähnliche Voraussagen für Fluoreszenzinduktionskurven liefern

und daher die tatsächliche Organisationsform aus Fluoreszenzdaten wahrscheinlich kaum ermittelt werden kann (Bernhardt und Trissl, 1999).

Durch Anpassung der Modellparameter an Messungen von Fluoreszenzinduktionskurven an Organismen mit blockiertem Elektronentransport aus dem PS II wurde für die Rate des Exzitonenaustauschs $k_{UV} = 0.5 \text{ ns}^{-1}$ gefunden, was im Domänen-Modell einer Domänengröße von 4–5 PSE pro Domäne entspricht (Trissl und Lavergne, 1995a). Nach heutigen Kenntnissen über die Struktur des PS II (Hankamer *et al.*, 1997, vgl. Abb. 3.4, S. 11) wäre eine Domänengröße von $\lambda = 2$ zu erwarten gewesen; die Ergebnisse deuten also auf PSE-Dimere hin, die durch begrenzte Konnektivität verbunden sind (Jahns und Trissl, 1997).

Der Ansatz von Lazár *et al.* (Lazár *et al.*, 1997; Lazár *et al.*, 1998; Lazár und Pospíšil, 1999) geht im Prinzip einen ähnlichen Weg (Zwei-Zustands-Modell), fordert aber keine heterogenen Antennen, sondern modelliert die Wasserspaltung und berücksichtigt so Fluoreszenzquenching durch oxidierte Reaktionszentren P680⁺. Bei geringen Anregungsintensitäten, d.h. bei absorbierten Photonen unterhalb von etwa $1 \text{ Photon} \cdot (\mu\text{s} \cdot \text{Zentrum})^{-1}$, sollte die Konzentration von P680⁺ jedoch verschwindend gering sein (Lavergne und Trissl, 1995). Da die in dieser Arbeit verwendeten Anregungsintensitäten um drei Größenordnungen unter diesem Wert liegen, wird der erste Ansatz berücksichtigt.

4.3.2 Modellierung mit Elektronenakzeptor

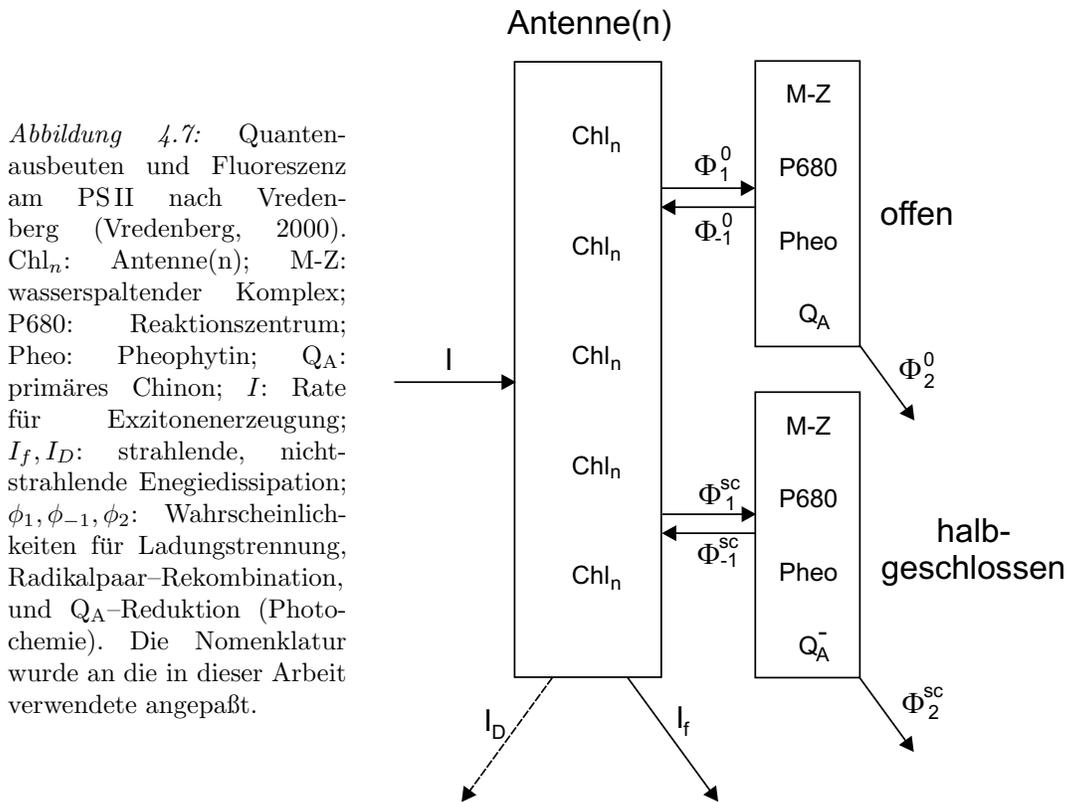
Modelle zur Beschreibung der Fluoreszenzinduktion *in vivo* erfordern die Berücksichtigung der reduzierenden Seite des PS II. So wird meist neben der zweistufigen Reduktion des Q_B (*two-electron-gate*) ein Einfluß des Zustandes des wasserspaltenden Komplexes S_i, vgl. Abb. 3.6, S. 14) auf die Rate der Reduktion des Q_A bzw. Q_B berücksichtigt.

Erste differenzierte Versuche, die Fluoreszenzinduktion in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors zu modellieren, wurden von Hsu vorgenommen (Hsu, 1992), der bei begrenzter Konnektivität der Antennen die Auswirkungen von Variationen verschiedener Parameter auf der reduzierenden Seite des PS II auf die Fluoreszenztransiente numerisch simulierte. In seinem Modell wird für die Reduktion des primären Chinons Q_A unabhängig vom Redoxzustand des sekundären Chinons Q_B (Gl. 4.13) jeweils dieselbe Rate angesetzt, im Ergebnis wird so eine heterogene Größe des PQ-Pools (Plastochinons) postuliert.

Die bislang komplexesten Modelle wurden von Strasser *et al.* (Strasser *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1995; Strasser *et al.*, 1998; Stirbet und Strasser, 1996; Stirbet *et al.*, 1998) sowie Lebedeva *et al.* (Riznichenko *et al.*, 1999; Lebedeva *et al.*, 2000) entwickelt. Dabei berücksichtigt Strasser zusätzliches Fluoreszenz-Quenching durch oxidiertes PQ, Lebedeva setzt insgesamt sogar 26 verschiedene Übergangsraten für mögliche Übergänge zwischen allen denkbaren Konfigurationen an. Mit beiden Modellen lassen sich simulierte Kurven erzeugen, die qualitativ sehr gut mit Messungen über den gesamten Verlauf der schnellen Phase der Fluoreszenzinduktion überein-

stimmen. Allerdings reagieren diese Modelle aufgrund der hohen Anzahl an Parametern sehr empfindlich auf Variationen einzelner Kenngrößen, die in der Umkehr eine Gewinnung von Modellparametern aus Meßdaten sehr schwierig macht.

Weitere Ansätze von Goltsev *et al.* (Goltsev und Yordanov, 1997) und Vredenberg (Vredenberg, 2000) gehen ebenfalls von fester, aber begrenzter Konnektivität der Antennen aus, modellieren die reduzierende Seite aber mit verschiedenen Raten für die Reduktion der sekundären Elektronenakzeptoren des PS II, ohne heterogene PQ-Pools anzunehmen. Dabei führt Goltsev eine weitere Rate zur doppelten Reduktion des Q_B durch das Q_A^- ein, wohingegen Vredenberg lediglich bis zum primären Chinon Q_A modelliert und stattdessen einen neuen *halbgeschlossenen* Zustand des PS II im Gegensatz zum *geschlossenen* Zustand einführt. Dieses Modell von Vredenberg kann bisher als einziges elektrophysiologische Messungen während der Induktion mit Fluoreszenzdaten in Einklang bringen.



Im Folgenden soll daher dieses Drei-Zustands-Modell (Abb. 4.7) weiter erläutert werden (Vredenberg, 2000). Die Antennenmoleküle sind hier zusammengefaßt, eine globale Rate für begrenzte Konnektivität wird angenommen. Weiterhin wird zur Vereinfachung angenommen, daß ein Exziton im RZ entweder zur Ladungstrennung und -stabilisierung führt oder durch Rekombination zur Antenne zurücktransferiert wird ($\phi_2 + \phi_{-1} = 1$). Strahlungslose Verluste werden hier nicht im RZ sondern neben

der Fluoreszenz (I_f) in der Antenne (I_D) angesiedelt. Der geschlossene Zustand ist hier nicht dargestellt, da dort $\phi_2^m = 0$ gilt.

Nun sei im dunkeladaptierten Zustand $\phi_2^0 \sim 1$ (jede Ladungstrennung k_1 führt zur Ladungsstabilisierung k_2), dann lassen sich Energiezustrom in die Antenne J_i und Energieabfluß J_e für die Anfangsphase der Induktion (Übergang vom offenen in den halbgeschlossenen Zustand) beschreiben durch

$$J_e = I_f + I_D + \phi_1 \cdot I \quad (4.24)$$

$$J_i = I + (\phi_{-1}^0 + \phi_{-1}^{sc}) \cdot \phi_1 \cdot I \cdot 0.5 \quad (4.25)$$

Im Gleichgewicht $J_e = J_i$ erhält man mit $\phi_{-1} = \phi_{-1}^0 + \phi_{-1}^{sc}$ und $\phi_D = I_D/I$ die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f zu

$$\phi_f = \frac{I_f}{I} = 1 - \phi_1 \cdot \left(1 - \frac{\phi_{-1}}{2}\right) - \phi_D \quad (4.26)$$

In Abb. 4.8 ist der gesamte zweistufige Prozeß, der zum Schließen einer PSE nötig ist, im Ratenmodell dargestellt. Zunächst befinden sich alle PSE im offenen Zustand (F_0), der wasserspaltende Komplex befindet sich im S_1 -Zustand, sämtliches Q_A liegt oxidiert vor (a). Nach Absorption eines ersten Photons und Energieübertrag an das P680 findet die Ladungstrennung statt (b). Nach der Ladungsstabilisierung (c) wird das $P680^+$ durch ein Elektron aus der Wasserspaltung reduziert (d), der wasserspaltende Komplex geht in den Zustand S_2 über. Dieser Zustand (d) wird als *halbgeschlossen* bezeichnet. Er zeichnet sich dadurch aus, daß Ladungstrennung bei reduziertem Q_A weiterhin möglich ist, jedoch bei einer niedrigen Rate für *Exzitoneneinfang* aus der Antenne. Nach Absorption eines weiteren Photons, erneuter Ladungstrennung (e) und Reduktion des $P680^+$ befindet sich die PSE im geschlossenen Zustand (f).

Bei Beleuchtung eines dunkeladaptierten photosynthetischen System steigt nun die Fluoreszenz von F_0 bis zur maximalen Fluoreszenz F_m an. Seien nun $[\phi_f]_0$, $[\phi_f]_{sc}$ und $[\phi_f]_m$ die Fluoreszenzquantenausbeuten im offenen, halbgeschlossenen und geschlossenen Zustand und α , β und γ die jeweiligen Konzentrationen ($\alpha + \beta + \gamma = 1$), so läßt sich die Gesamtfluoreszenzquantenausbeute ϕ_f darstellen als

$$\phi_f = \alpha[\phi_f]_0 + \beta[\phi_f]_{sc} + \gamma[\phi_f]_m \quad (4.27)$$

Daraus ergeben sich direkt die zwei Extremzustände F_0 und F_m ($\alpha = 1$ bzw. $\gamma = 1$) und ein weiterer, quasistationärer Zustand wenn sich alle PSE im halbgeschlossenen Zustand befinden ($\beta = 1$). Dieser Zustand ist erreicht, wenn die Elektronentransferraten auf der Donorseite k_{S1} und der Akzeptorseite k_2 klein im Vergleich zur Rekombinationsrate des Radikalpaares k_{-1} sind. Somit würde die Wahrscheinlichkeit für die Radikalpaar-Rekombination zu

$$\phi_{-1}^{sc} = \frac{k_{-1}}{k_{-1} + k_2 + k_s + k_D} \sim 1 \quad (4.28)$$

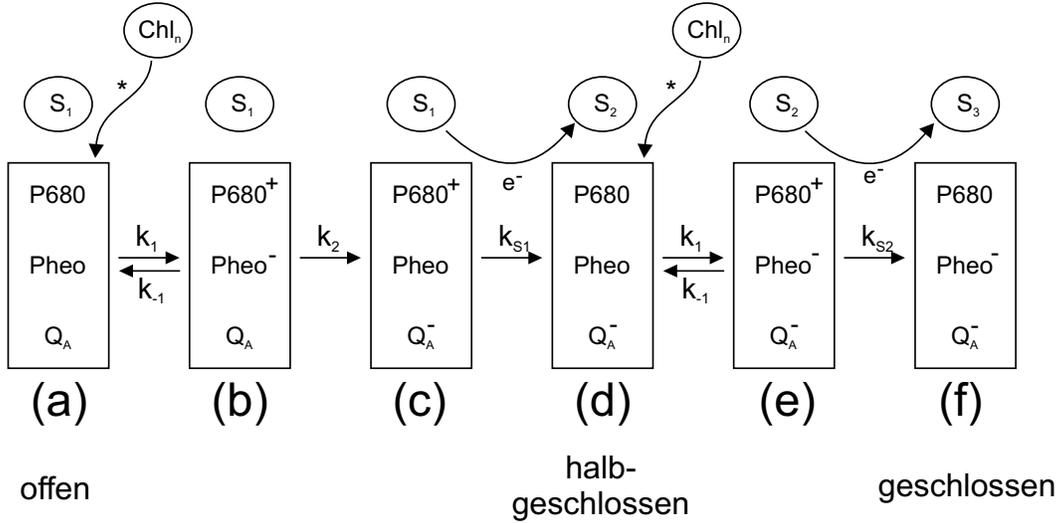


Abbildung 4.8: Drei-Zustands-Modell des PSII nach Vredenberg (Vredenberg, 2000). P680: Reaktionszentrum; Pheo: Pheophytin; Q_A : primäres Chinon; Chl_n : Antenne; S_i : S-Zustand des wasser-spaltenden Komplexes; e^- : Elektron; * Exziton. Die Nomenklatur wurde an die in dieser Arbeit verwendete angepaßt.

und die Fluoreszenzquantenausbeute (Gl. 4.26) wird zu

$$\phi_f = \frac{I_f}{I} = 1 - \phi_1 \cdot \left(1 - \frac{\phi_{-1}}{2}\right) - \phi_D \sim 1 - \frac{\phi_{-1}}{2} \quad (4.29)$$

Das Modell (Vredenberg, 2000, S. 35f) liefert dann für ϕ_f bei $\beta = 1$

$$[\phi_f]_{sc} = 0.5 \cdot ([\phi_f]_m - [\phi_f]_0), \quad (4.30)$$

also eine Fluoreszenzquantenausbeute, die 50% der maximalen Ausbeute bei geschlossenen PSE ($\gamma = 1$) beträgt. Dies gilt allerdings nur für hohe Anregungsintensitäten, d.h. wenn die Exzitonenerzeugungsrate deutlich höher ist als die Rate k_2 , oder bei einer Blockade des Elektronentransports aus dem PSII ($k_2 = 0$). Anderenfalls wird sich während der Induktion ein Zustand mit $\beta < 1$ einstellen.

Weiterhin zeigt dieses Modell, daß der Zustand F_0 sehr empfindlich auf Licht reagiert, d.h. schon sehr geringe Anregungsintensitäten verschieben die gemessene minimale Fluoreszenz F_0 durch Erhöhung der Rate k_{-1} nach oben (F'_0 , vgl. Kap. 7.3.4).

Kapitel 5

Algenaufzucht und Pigmentextraktion

Alle Messungen wurden an *Chlorella vulgaris* durchgeführt. Sie wurden aus der Algensammlung der Universität Göttingen bezogen (Stamm SAG 211-11b, (Schlösser, 1994)). Die Algen wurden in einem Medium nach Kuhl und Lorenzen (Kuhl und Lorenzen, 1964) aufgezogen. Sie wurden mit gefilterter Luft geblubbert, der 3% CO₂ zugesetzt wurde. Die Beleuchtung erfolgte durch Leuchtstoffröhren Osram 15W/77 Fluora 12 Stunden täglich mit 10 W/m². Die Temperatur wurde konstant auf 20 °C gehalten.

Die Grünalge *Chlorella vulgaris* wurde gewählt, da sie relativ einfach kultivierbar ist und viele Vergleichsmessungen zur Chlorophyll-Fluoreszenz in der Literatur vorhanden sind. Weiterhin hat sie sich als relativ unempfindlich gegen ein schwankendes Algen-Medium-Verhältnis erwiesen, was aufgrund der hier realisierbaren Aufzuchtbedingungen für große Mengen bei ständiger Verfügbarkeit unabdingbar war (vgl. Kap. 7.3).

Für die Messungen im Fließsystem wurden jeweils 25l Algen benötigt. Da es schwierig die somit benötigte Gesamtmenge von ca. 50l Algen ständig in einem definierten Zustand maximalen Wachstums zu halten, wurden die Algen zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:1 mit Medium aufgefüllt, jeweils einen Tag danach wurden die Messungen durchgeführt.

Als Maß für die Algendichte wurde die Chlorophyllkonzentration nach Pigmentextraktion herangezogen. Zunächst wurden 10 ml Algen in Medium fünf Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert und das Algenpellet mit 10 ml Methanol p.A. + 0.5% v/v Triton-X-100 gelöst (Winkler, 1996). Nach Inkubation im Wasserbad (60 °C) wurde die Zellmasse abzentrifugiert und das Pigmentextrakt im Absorptionsspektrometer vermessen. Die Chlorophyllkonzentration erhält man durch Messung der Absorptionskoeffizienten $A_{665.2}$ und $A_{652.4}$ bei 665.2 nm bzw. 652.4 nm nach (Lichtenthaler, 1987) zu

$$C_{a+b} = (1.44 \cdot A_{665.2} + 24.93 \cdot A_{652.4}) \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

Kapitel 6

Meßmethoden und Meßaufbauten

6.1 Absorptionsspektrometer

Die Absorptionmessungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Zweistrahlabsorptionsspektrometer Uvikon 820 der Fa. Kontron durchgeführt. Die spektrale Bandbreite betrug 2 nm. Die Windows-Software zur Steuerung des Spektrometers sowie zur Datenaufnahme und -visualisierung wurde im Rahmen der Arbeit entwickelt.

6.2 Meßaufbau zur transienten Erfassung von Induktionskurven

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Aufbau zur transienten Messung von Fluoreszenzinduktionskurven entwickelt. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abb. 6.1 dargestellt.

Das Licht einer Laserdiode (Philips CQL-820D, 5 mW, 650 nm) wird mit der Linse L1 auf die Probe gelenkt. Mit einem Neutralglas-Keil (Schott) kann die Intensität variiert werden. Die Fluoreszenz wird unter einem Winkel von etwa 60° detektiert, um eine direkte Reflexion des Lasers in die Detektionsoptik zu vermeiden. Die Fluoreszenz wird durch den Einsatz von zwei Kantenfiltern (Schott RG 695) oberhalb von 695 nm detektiert und mit der Linse L2 auf eine schnelle Photodiode (OSI 5k) abgebildet. Das Signal wird verstärkt und mit einem digitalen Sampling Oszilloskop (DSO, LeCroy 9350 AM) im Einzelschußverfahren aufgezeichnet.

Die variable Fluoreszenz soll hier über einen Zeitraum von bis zu mehreren Sekunden bei einer maximalen Auflösung von $1 \mu\text{s}$ aufgezeichnet werden, wobei jedoch die volle Zeitauflösung über den gesamten Meßbereich weder benötigt noch erwünscht ist (hohe Anzahl an Meßpunkten). Daher wurde der Meßaufbau von einem Computer PC/AT mit einer programmierbaren I/O-Karte (Kolter Electronic Multi-72) mit integriertem 4 MHz-Schwingquarz gesteuert. Die Software wurde im Rahmen

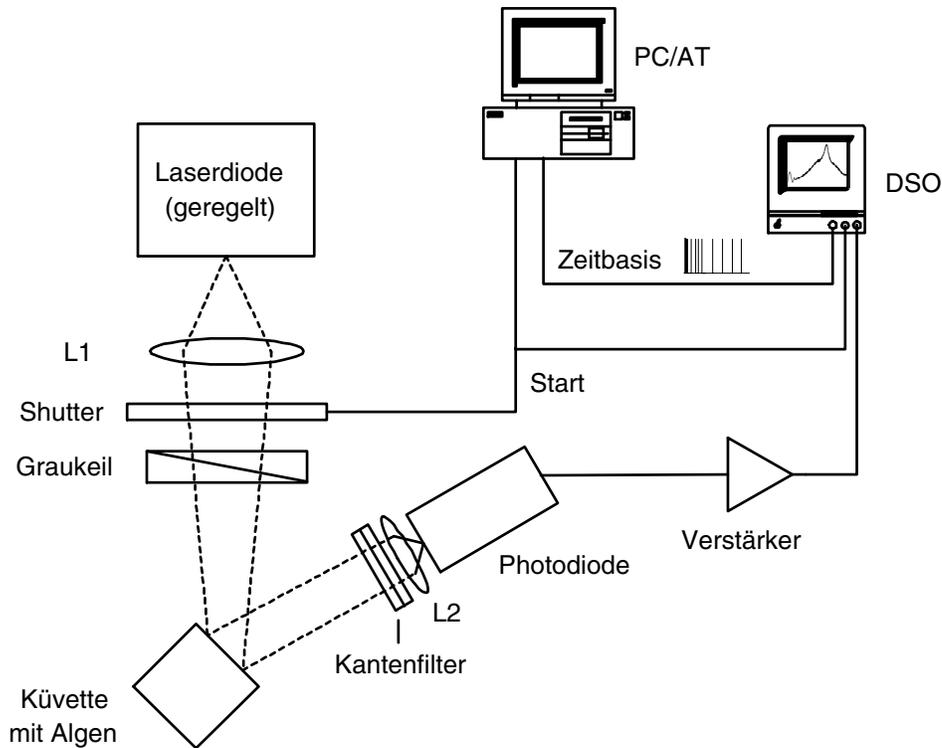


Abbildung 6.1: Meßaufbau zur transienten Erfassung von Kautskykurven

der vorliegenden Arbeit entwickelt.

Mittels eines Startpulses vom PC wird der Shutter geöffnet und zeitgleich das DSO im Einzelschußmodus über die Sync-Leitung gestartet. Über einen weiteren I/O-Kanal der PC-Steckkarte wird dem DSO eine externe Zeitbasis zugeführt. Diese Zeitbasis kann in sechs Stufen während der Messung mit einer Auflösung von $1 \mu\text{s}$ variiert werden. Somit kann die Abtastrate frei an das zu messende Fluoreszenzsignal angepaßt werden, indem in Bereichen starker Signaländerungen eine feinere Abtastrate gewählt wird als in Bereichen unveränderter Fluoreszenz. Die so erhaltenen Spannungskurven werden in den Computer übertragen und mit der angewandten nichtlinearen Zeitbasis gespeichert. Die zeitliche Auflösung dieses Aufbaus liegt bei etwa $70 \mu\text{s}$ bedingt durch die Öffnungszeit des Shutters und vor allem durch die Anstiegszeit der verwendeten Photodiode. Die tatsächliche Auflösung liegt bei niedrigen Intensitäten durch die dann notwendige elektronische Verstärkerschaltung deutlich niedriger (vgl. Kap. 7.3.5).

6.3 Meßaufbau zur Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven und Fluoreszenzspektren

Im folgenden Abschnitt werden das Lasersystem und die Detektionseinheiten vorgestellt, mit denen Fluoreszenzabklingkurven und cw-Fluoreszenzspektren¹ aufgenommen wurden.

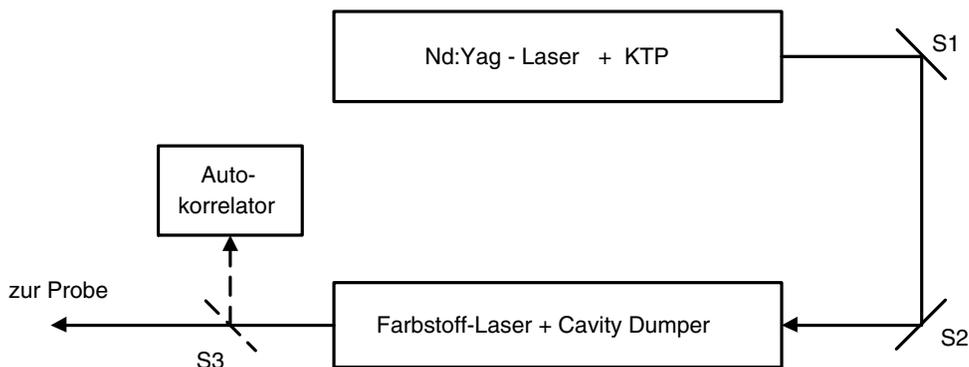


Abbildung 6.2: Pikosekunden-Lasersystem. S1, S2: Spiegel; S3: Strahlteiler

Die Anregung erfolgte mit dem in Abb. 6.2 dargestellten Lasersystem. Als Pump-laser dient ein aktiv modengekoppelter Nd:YAG-Laser (Spectra Physics Serie 3000) bei einer Wiederholrate von 82 MHz, dessen Emissionswellenlänge von 1064 nm mit einem KTP-Kristall frequenzverdoppelt wird. Mit den ausgekoppelten Pulsen der Wellenlänge von 532 nm wird ein durchstimmbarer Farbstofflaser (Spectra Physics 375B) mit dem Laserfarbstoff DCM (600-680 nm) gepumpt. Mit einem akustooptischen Auskoppler innerhalb des Resonators (Cavity Dumper) kann die Wiederholrate der aus dem Laser ausgekoppelten Laserpulse variiert werden. Die Qualität der Laserpulse kann mit einem Autokorrelator überprüft werden.

Die Messungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Laserpulsen einer Wellenlänge von 650 nm, einer Halbwertsbreite von 15 ps bei verschiedenen Intensitäten durchgeführt. Die Wiederholrate betrug 800 kHz.

Abb. 6.3 zeigt den schematischen Aufbau zur Detektion von Fluoreszenzabklingkurven und cw-Fluoreszenzspektren.

6.3.1 Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven

Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit der Methode des inversen zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens aufgenommen (O'Connor und Phillips, 1984).

¹cw = Continuous Wave

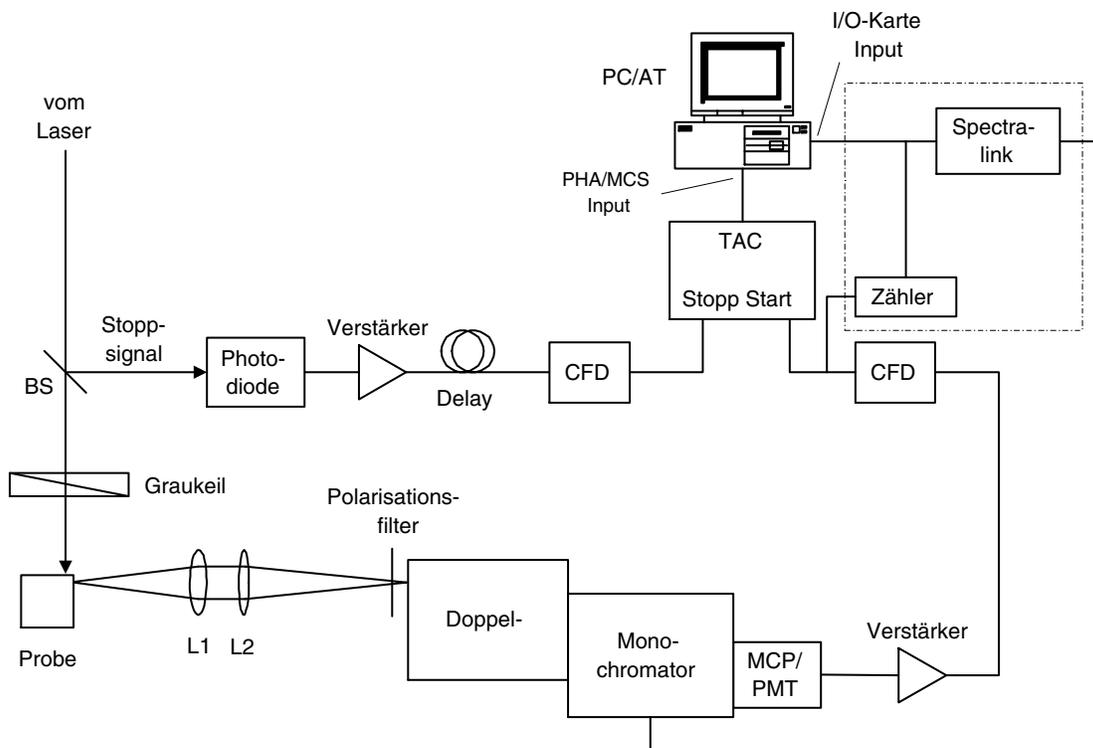


Abbildung 6.3: Fluoreszenzmeßplatz zur Detektion von Fluoreszenzabklingkurven und cw-Fluoreszenzspektren

Ein kleiner Teil der Intensität der Laserpulse wird über den Strahlteiler BS ausgekoppelt und dient so als Stoppsignal (s.u.). Die Intensität des Hauptanteils wird über einen Neutralglas-Graukeil (Schott) auf die gewünschte Meßintensität angepaßt und auf die Probe gelenkt. Die von der Probe abgestrahlte Fluoreszenz wird über die Linsen L1 und L2 auf den Eingangsspalt des Doppelmonochromators ($2 \times$ Jobin Yvon H25, 1200 Lines/mm, 500 nm Blaze) abgebildet. Zusätzlich kann ein Polarisationsfilter (Spindler & Hoyer 10k) in die Detektionsstrecke eingebracht werden um Rotationsdepolarisationseffekte zu beobachten bzw. auszuschließen. Die Photonen der gewünschten Wellenlänge werden von einem schnellen Photomultiplier (MCP Hamamatsu R1564u-07) detektiert. Das Signal wird verstärkt (EG & G VT110), mit einem Constant Fraction Discriminator (Quad-CFD, Tennelec TC 454) aufbereitet und an einen Time-to-Amplitude Converter (TAC, Tennelec TC 864) als Startsignal weitergeleitet. Aus dem anregenden Laserpuls wird ein kleiner Anteil mit einem Strahlteiler BS ausgekoppelt und mit einer schnellen Photodiode (Amko S171P) detektiert. Das verstärkte (EG&G ESN VT110) Signal wird mit einem Delaykabel verzögert, mit einem zweiten CFD aufbereitet und dient dem TAC als Stopp. Der TAC konvertiert den Zeitunterschied zwischen Start- und Stoppsignal in eine dazu proportionale Spannung zwischen 0 V und 10 V. Dieses Spannungssignal

wird an einen PC/AT mit einer integrierten Pulshöhen-Analysator- und Vielkanal-Analysator-Einsteckkarte (PHA/MCA, Oxford PCA3) weitergeleitet. Der PHA bildet dieses Spannungsintervall auf die Kanäle des MCA ab und erhöht den Kanalinhalt des entsprechenden Kanals bei jedem Meßereignis um Eins. So erhält man nach hinreichend vielen Einzelmessungen die Fluoreszenzabklingkurve.

Die so erhaltene Abklingkurve $I(t)$ stellt eine Faltung der wahren Fluoreszenzabklingkurve $F(t)$ mit der Apparatefunktion des Gesamtsystems dar (O'Connor und Phillips, 1984).

$$I(t) = \int_0^t dt' F(t-t')A(t') \quad (6.1)$$

Um daraus das wahre Fluoreszenzabklingen der Probe $F(t)$ zu erhalten, muß die Apparatefunktion ermittelt und aus der gemessenen Kurve $I(t)$ herausgefaltet werden. Die Apparatefunktion wurde mit Hilfe der Messung des Fluoreszenzabklingens eines Standards mit einer bekannten, möglichst kurzen Fluoreszenzlebensdauer gewonnen. Aus dieser Abklingkurve läßt sich die wahre Apparatefunktion durch Rückfaltung der bekannten Fluoreszenzabklingdauer des Standards iterativ bestimmen. Als Fluoreszenzstandard wurde DQTCI in Ethanol ($1 \cdot 10^{-5}$ M) mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 40 ps verwendet (Algermissen, 1994).

Die Eichung der Zeitachse wurde durch Messung der bekannten Fluoreszenzlebensdauer τ eines Farbstoffes, hier Oxazin 1 in Ethanol ($5 \cdot 10^{-6}$ M, $\tau = 1024$ ps) vorgenommen (Fleming und Waldeck, 1981).

Die Datenanalyse wurde mit einem von Tom Weber geschriebenen Computerprogramm durchgeführt (Weber, 1992). Eine Abklingkurve wird durch Faltung einer Summe aus Exponentialfunktionen mit der wahren Apparatefunktion modelliert und mit der gemessenen Abklingkurve verglichen. Die Variation der Parameter führt unter Verwendung des Marquardt-Algorithmus sehr schnell zu Konvergenz. Die Güte der Fits wird durch Summe der gewichteten quadratischen Abweichungen χ_{red}^2 und die Verteilung der Residuen bewertet. So soll χ_{red}^2 zwischen 0.8 und 1.2 liegen und die Residuen sollen gleichmäßig um Null streuen (O'Connor und Phillips, 1984).

Als weiterer Meßplatz für Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven kam in Kap. 7.2 eine modifizierte Version des in der Arbeitsgruppe MOBI entwickelten 'Mobilen Pikosekundenfluorimeters' zum Einsatz. Es ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Berg, 1995; Maier *et al.*, 1995; Terjung *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 1995; Oellerich *et al.*, 1999). Das Fluorimeter beruht ebenfalls auf dem Meßprinzip des inversen zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens, wobei jedoch die Anregung durch eine gepulste Laserdiode erfolgt (Philips CQL 820/D, 655 nm, 80 ps FWHM) und die Detektionswellenlänge mit Filterkombinationen aus Kanten- und Interferenzfiltern selektiert wird. Die Detektion erfolgt mit einem Photomultiplier Hamamatsu R5600U-01. Die zusätzlichen sättigenden Pulse (s.u.) wurden mit einer zweiten Laserdiode (Philips CQL 820/D, 655 nm, 20 ns FWHM) erzeugt.

6.3.2 Aufnahme von cw-Fluoreszenzspektren

Zur Aufnahme von cw-Spektren von Algen nach verschiedenen Vorbeleuchtungszeiten (s.u.) diene ebenfalls der in Abb. 6.3 gezeigte Aufbau mit den Modifikationen, die in dem gestrichelten Kasten dargestellt sind. Weiterhin wurde der Detektor durch einen besonders rotempfindlichen Photomultiplier (RCA C31034A) ersetzt, der auf -20°C gekühlt wurde.

Für die externe Steuereinheit des Doppelmonochromators (ISA Spectralink) wurde eine Einsteckkarte entwickelt, die über eine I/O-Einsteckkarte in einem PC/AT angesteuert werden kann. Der Monochromator wird zur gewünschten Startwellenlänge des Spektrums gefahren. Mit einem Zähler (Ortec Photon Counter 9315) werden die innerhalb einer vorgegebenen Integrationszeit detektierten Fluoreszenzphotonen gezählt. Dieser wird mit der I/O-Einsteckkarte im PC/AT ausgelesen und zurückgesetzt. Der Doppelmonochromator wird zum nächsten Meßpunkt gefahren und die Messung wiederholt sich bis das gesamte Spektrum im PC vorliegt.

Die Software zur Versuchssteuerung und Datenvisualisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt und programmiert.

Die spektrale Korrekturfunktion für den verwendeten Aufbau wurde durch Vergleich des Fluoreszenzspektrums von Oxazin 1 in Ethanol ($5 \cdot 10^{-6}\text{M}$) mit dem entsprechenden Normspektrum ermittelt. Das Normspektrum wurde von Lutz Ressel im Rahmen seiner Diplomarbeit gewonnen (Ressel, 1998).

Weitere cw-Spektren über den gesamten sichtbaren Spektralbereich wurden mit einem in der AG Mobi entwickelten Standard-Fluoreszenzmeßplatz durchgeführt, der an anderer Stelle beschrieben ist (Berg, 1995; Terjung, 1998).

6.4 Optisches Pumpen

Wie bereits einleitend erwähnt, ist es zur Überprüfung und Erweiterung von Modellvorstellungen des Photosyntheseapparates neben der Untersuchung ungestörter Organismen interessant, gezielte Eingriffe am System vorzunehmen um deren Wirkung auf Meßgrößen zu beobachten. Solche Veränderungen können entweder durch chemische Präparation oder durch die Züchtung von Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften erreicht werden. Die Proben werden so aber in der Regel irreversibel beeinflußt oder sogar zerstört. Weiterhin können unerwünschte und schwer abzuschätzende Nebenwirkungen den gewünschten Effekt verdecken oder sogar verfälschen. So wird beispielsweise Hydroxylamin eingesetzt, um die Elektronentransferrate aus der Wasserspaltung an das PSII künstlich abzusenken. Damit soll ein Elektronendefizit auf der oxidierenden Seite erzeugt werden. Bei höheren Konzentrationen und längeren Einwirkdauern wird jedoch zusätzlich die reduzierende Seite des PSII geschädigt (Canaani *et al.*, 1986; Terjung *et al.*, 1995b). Darüberhinaus ist eine Präparation von Übergangszuständen zur Untersuchung nichtstationärer Systeme, wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, nicht zu erreichen.

Durch geeignete Beleuchtung eines photosynthetischen Systems vor oder während der Messung ist es aber möglich, solche gezielten Zustandsänderungen des Photosyntheseapparates noninvasiv zu präparieren. Im Folgenden werden zwei neu entwickelte Meßverfahren vorgestellt, die auf diesem Prinzip des *optischen Pumpens* beruhen.

6.4.1 Optisches Pumpen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen

Bei vielen Fluoreszenzstudien am Photosyntheseapparat ist es wünschenswert, den Elektronentransport aus dem PS II zu unterbrechen, um so die oxidierende und die reduzierende Seite des PS II möglichst getrennt zu untersuchen. Dies kann durch die Anwendung von DCMU erreicht werden, das die Bindungsnische des sekundären Chinons Q_B am D1/D2-Protein-Komplex blockiert. Dieses Verfahren kann aber dann nicht angewendet werden, wenn eine irreversible Schädigung vermieden werden muß, oder schon die Anwendung des Lösungsmittels Wasser die Messungen verfälschen würde, z.B. bei der Untersuchung von Wasserstreß.

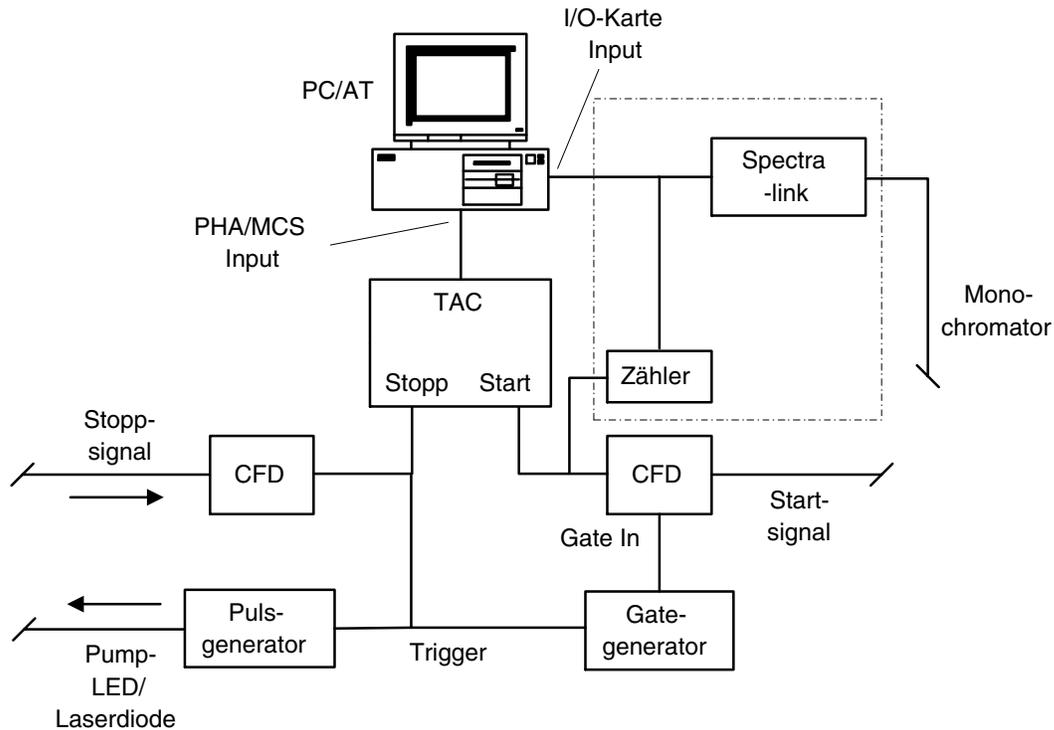


Abbildung 6.4: Optisches Pumpen: Modifikationen zur Messung mit zusätzlichen sättigenden Pulsen

Um nun Messungen bei blockiertem Elektronentransport noninvasiv durchführen zu können wurde in Zusammenarbeit mit Frank Terjung die Methode des *optischen*

Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen in der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik entwickelt (Berg *et al.*, 1995; Terjung *et al.*, 1995b; Terjung *et al.*, 1997).

Dabei wird die zu untersuchende Probe bei Fluoreszenzmessungen zusätzlich mit Lichtpulsen hoher Intensität beleuchtet, um den Photosyntheseapparat zu sättigen. Diese zusätzlichen Pulse werden jeweils zwischen zwei Meßpulsen auf die Probe gelenkt, damit die von ihnen erzeugte Fluoreszenz nicht in das Meßfenster des TAC fällt und somit diese Photonen nicht direkt detektiert werden, sondern lediglich deren Wirkung auf die von den eigentlichen Meßpulsen erzeugte Fluoreszenz.

Zusätzlich muß dabei die Probe während der Messung verschoben werden, um nur eine möglichst geringe Anpassung des Organismus an die hohe Lichtintensität der zusätzlichen Pulse zuzulassen. Die nötige Verschiebegeschwindigkeit kann bei verschiedenen Organismen variieren, liegt aber typischerweise um 0.5 mm s^{-1} .

Abb. 6.4 zeigt die Modifikationen, die an der Detektionsseite zur Realisierung dieser Meßmethode vorgenommen wurden. Mit dem Ausgangssignal des Stopp-CFD wird zum Einen ein Pulsgenerator (HP 80138) getriggert, der wiederum die Pump-LED (HP HLMP-8150) betreibt. Die so erzeugten LED-Pulse werden auf die Probe gelenkt. Die Pulsdauer beträgt hier $t_{\text{LED}} = 800 \text{ ns}$, die Pulse liegen exakt zwischen den anregenden Laserpulsen. Die Intensität wird an die jeweils gewünschten Meßbedingungen angepaßt. Zum Anderen wird mit dem Stopp-CFD ein Gategenerator (Ortec 416 A + EG&G GG202/NL) getriggert, der den Start-CFD nur für die Zeit der Fluoreszenz der Laserpulse aktiviert ($t_{\text{Gate}} = 100 \text{ ns}$, siehe Abb. 6.5). So werden im Falle von cw-Spektren keine Fluoreszenzphotonen gezählt, die von der Pump-LED erzeugt werden, im Fall von Fluoreszenzabklingkurven wird der TAC nicht unnötig von diesen Photonen gestartet. Dies würde wegen der relativ hohen Totzeit des TAC zu einer erheblichen Senkung des Signal-Rausch-Verhältnisses innerhalb des Meßfensters führen.

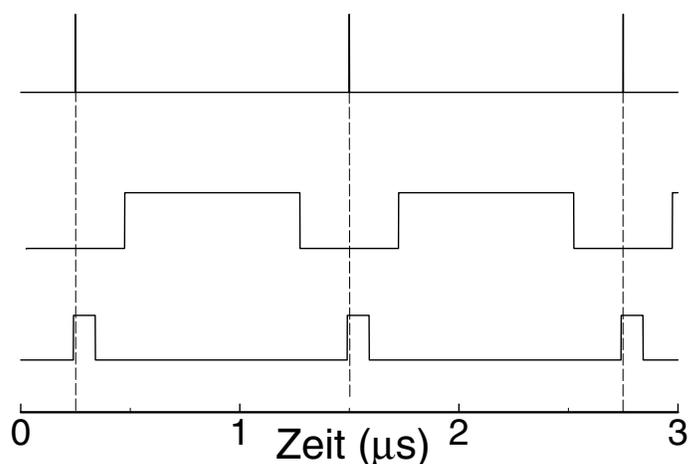


Abbildung 6.5: Puls-Pausen-Verhältnis beim optischen Pumpen. Oben: Anregende Laserpulse ($t_{\text{Las}} = 15 \text{ ps}$). Mitte: Zusätzliche Pulse der Pump-LED ($t_{\text{LED}} = 800 \text{ ns}$). Unten: Gate zur Aktivierung des Start-CFD ($t_{\text{Gate}} = 100 \text{ ns}$)

6.4.2 Variables Vorbeleuchtungssystem

Zur Untersuchung des Kautsky-Effekts durch die Messung von Fluoreszenzabklingkurven und cw-Spektren während der Fluoreszenzinduktion war es notwendig, einen Meßaufbau zu entwickeln, der es ermöglicht, photosynthetische Organismen für eine definierte Zeit vorzubeleuchten und den so erzeugten Zustand für die Dauer einer Messung nach einem der obigen Verfahren (typischerweise mehrere Minuten) in diesem Zustand zu halten. Dabei soll die Vorbeleuchtungszeit in möglichst kleinen Schritten (idealerweise wenige Mikrosekunden) bis über das Maximum der Kautskykurve hinweg (im Sekundenbereich) verlängert werden können. Dies ist durch ein einfaches Verschieben fester Proben nicht zu erreichen. Deswegen wurde dies mit einem Fließsystem realisiert, in dem Grünalgen, bevor sie in den Meßpuls des Lasers treten, mit variablem Tempo durch eine beleuchtete Kapillare veränderlicher Länge gepumpt werden. Der Aufbau und die Spezifikationen dieses Fließsystems werden im Folgenden erläutert.

Aufbau des Fließsystems

Der schematische Aufbau des Fließsystems ist in Abb. 6.6 dargestellt. Einzellige Grünalgen werden aus einem Reservoir (25 l) mit einer Jetpumpe (Micropump Concord Calif) in Richtung des Beleuchtungsrohres gepumpt.

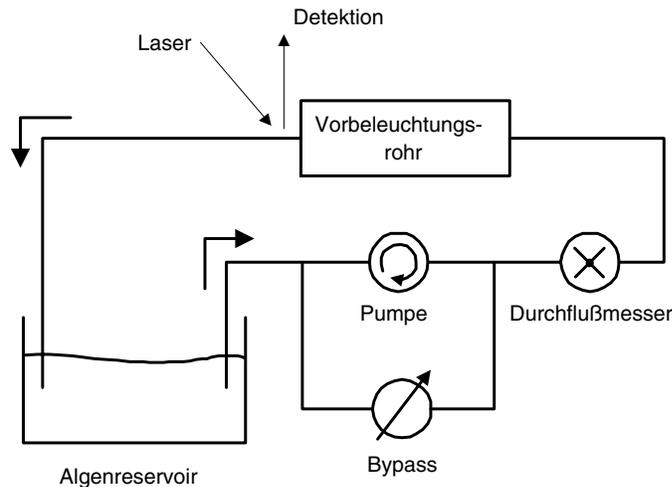


Abbildung 6.6: Die Vorbeleuchtungsstrecke

Durch Variation der Pumpengeschwindigkeit und Öffnen des Bypass an der Pumpe kann die Fließgeschwindigkeit verändert werden. Der Durchflußmesser (Kobold DPL-060) liefert ein Frequenzsignal ν_K , das proportional zum Volumenfluß ist. Nachdem sie das gesamte System durchflossen haben, werden die Algen zurück in das Reservoir gepumpt. Innerhalb des Reservoirs müssen die Algen zwischen Aus- und

Einströmöffnung ein Labyrinth durchlaufen, um eine möglichst lange Verweildauer zurückgeflossener Algen zu gewährleisten, bevor sie erneut in das Beleuchtungssystem gepumpt werden.

Mit der so eingestellten Geschwindigkeit fließen die Algen in das Vorbeleuchtungsrohr (Abb. 6.7). Dieses besteht aus einem V2A-Rohr, das zur Verspiegelung innen elektropoliert wurde, und einer Glaskapillare (Innendurchmesser 4 mm) im Inneren. In das Rohr sind von außen drei Reihen mit je 70 Power-LEDs (Farnell 253-662) unter einem Winkel 120° zueinander eingebaut. Die LEDs wurden einzeln vermessen und entsprechend ihres individuellen Wirkungsgrades mit einem Strom betrieben, der jeweils gleiche optische Ausgangsleistung erzeugt. Innerhalb der Glaskapillare ist eine V2A-Kapillare angebracht, die mit einer Verschiebeeinheit (ISEL) verschoben werden kann, so daß jeweils nur ein Teil der Algen in der Glaskapillare innerhalb des LED-Rohrs beleuchtet wird, der Rest wird von der V2A-Kapillare abgeschattet. Die Windows-Software zur Steuerung der Verschiebeeinheit wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

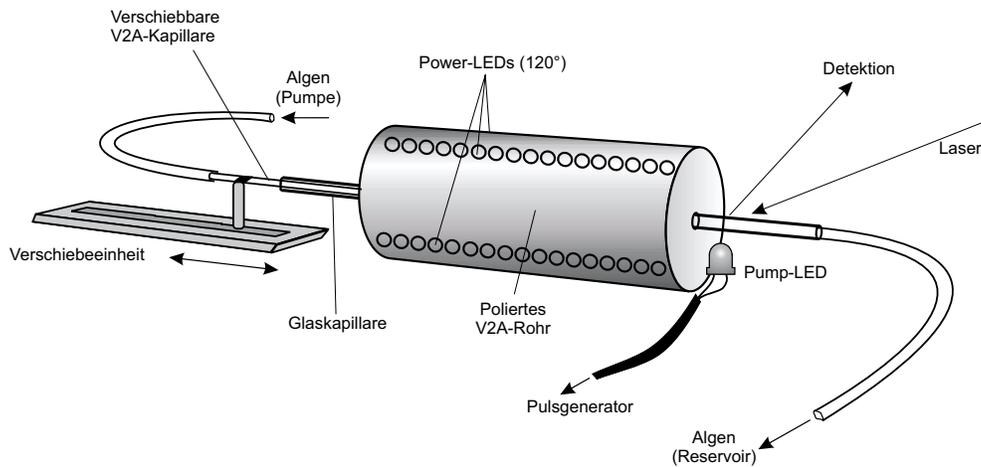


Abbildung 6.7: Das Vorbeleuchtungsrohr

In Abb. 6.8 ist ein Halbschnitt durch das Vorbeleuchtungsrohr dargestellt. Nach dem Verlassen der V2A-Kapillare fließen die Algen von links nach rechts mit der nach Gl. 6.5 ermittelten Geschwindigkeit durch die beleuchtete Glaskapillare. Am Austritt aus dem Beleuchtungsrohr wurde die Glaskapillare unterbrochen und 1 mm schwarzes Glas als Lichtfalle eingesetzt.

So wird sowohl die Streuung des Vorbeleuchtungslichtes in die Detektionsoptik als auch die Störung des Signals durch die dadurch erzeugte Fluoreszenz vermieden. Etwa 8 mm nach dem Verlassen des Rohres fließen die Algen in den eigentlichen Meßbereich, wo Anregung durch den Laser und Detektion der Fluoreszenz erfolgen. Dieser Meßbereich wurde mit einer Blende auf eine Strecke von 1 mm begrenzt. Die Strecke zwischen Austritt aus dem Rohr und dem Meßbereich wird mit einer

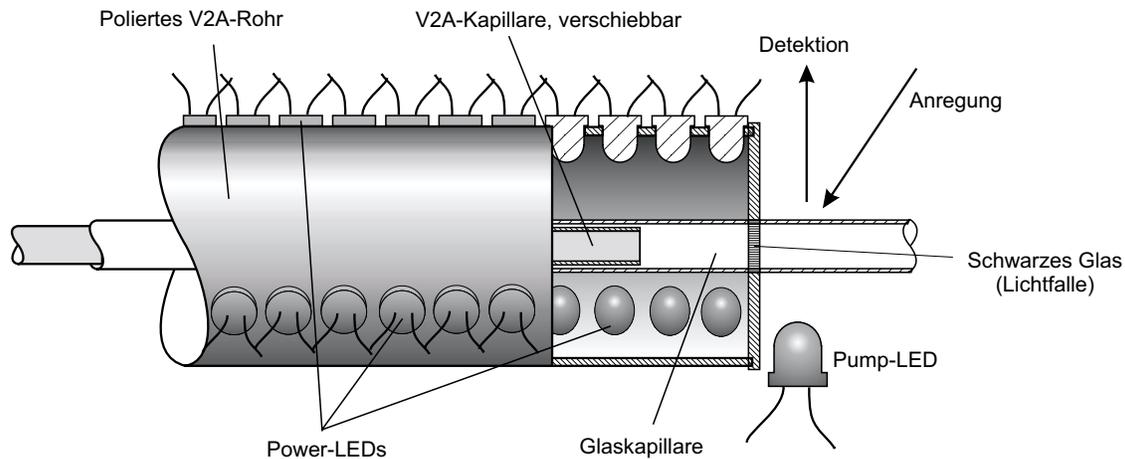


Abbildung 6.8: Schnitt durch das Vorbeleuchtungsrohr

Pump-LED (HP HLMP 8150) gepulst beleuchtet. Dies wird durch Anwendung der neu entwickelten Methode des *optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen* erreicht, wobei lediglich die Intensität der gepulsten LED an die Erfordernisse angepaßt wird (siehe Abschnitt 6.4.1). Sie ist hier um 90° gedreht dargestellt. Im Meßaufbau war sie „über der Zeichenebene“ angebracht, so daß sie nicht direkt in Richtung des Monochromators (Detektion) leuchtete. Die Intensität der Pump-LED wurde jeweils der Intensität innerhalb des Vorbeleuchtungsrohres angeglichen. Diese andere Art der Beleuchtung führt zu veränderten Bedingungen auf den letzten 8 mm der Beleuchtungsstrecke, deren Effekt schwierig abzuschätzen ist. Die Auswirkung auf Messungen wurde daher anhand von Testmessungen in Kapitel 7.3 untersucht.

Beleuchtungsqualität und -intensität

Die maximal erreichbare Intensität im Inneren des Rohres liegt bei $I_{\max} = 24 \text{ W/m}^2$. In Abb. 6.9 ist das Spektrum der LEDs im Vergleich zum terrestrischen Sonnenspektrum abgebildet. Mit AM1, AM2 und AM5 werden Sonnenspektren unter dem Einfluß verschiedener Atmosphärendicken bezeichnet, wobei AM1 bei senkrechtem Sonneneinfall, AM2 bei einem Einfallswinkel von 60,1° und AM5 unter einem sehr flachen Winkel (Sonnenuntergang) gemessen wird. Die maximale Intensität der Vorbeleuchtungsstrecke im Emissionsbereich der LEDs entspricht etwa der Intensität des Sonnenspektrums AM2. Im unteren Teil des Bildes ist als Vergleich die Extinktion eines Pigmentextraktes von Grünalgen in Methanol dargestellt. Wie man sieht, wird nahezu optimal in die langwellige Absorptionsbande (vgl. Abb. 4.1) der Pigmentsysteme eingestrahlt, die ihre absorbierte Energie direkt dem Photosyntheseapparat zuführen. Mit dem Beleuchtungssystem können so Lichtbedingungen für die Algen erzeugt werden, die bei maximaler Intensität zu einer Anregung der Photosysteme ähnlich wie unter starker Sonneneinstrahlung führen.

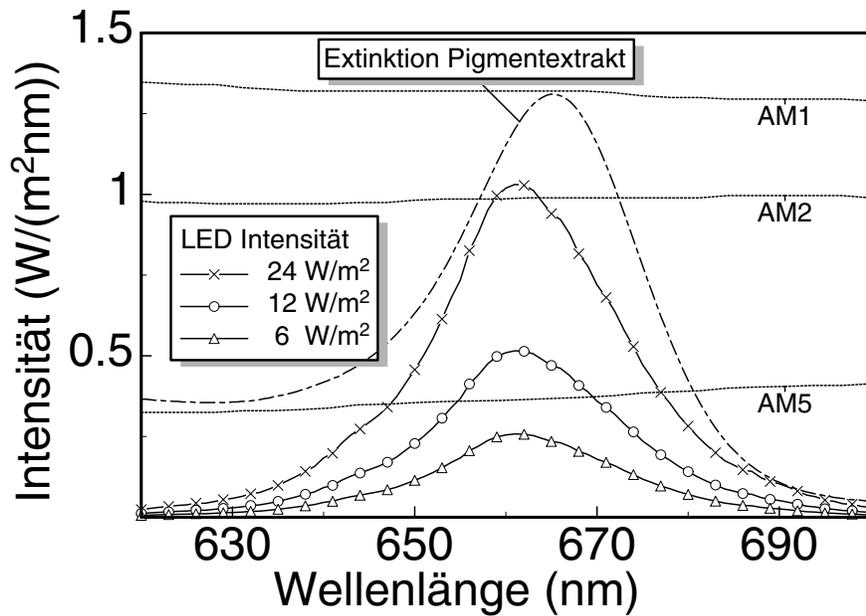
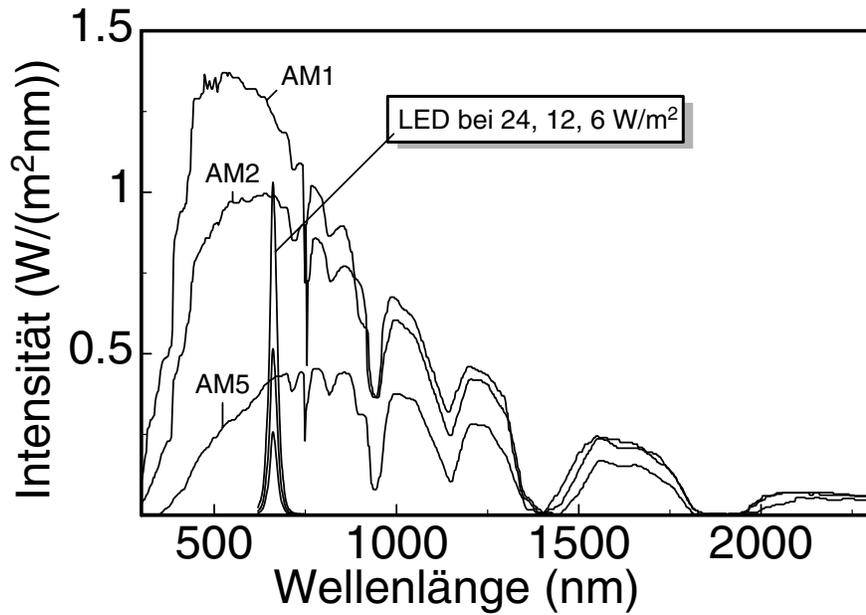


Abbildung 6.9: Spektrum der Vorbeleuchtungs-LEDs im Vergleich zum terrestrischen Sonnenspektrum (Sonnenspektren von Iqbal (Iqbal, 1983)). Als Vergleich ist die Extinktion eines Pigmentextraktes von Grünalgen in Methanol dargestellt.

Vorbeleuchtungsdauer

Zur Berechnung der Vorbeleuchtungszeit der Algen t_{bel} muß neben der mittleren Vorbeleuchtungstrecke \bar{s}_{bel} auch die mittlere Fließgeschwindigkeit \bar{v}_f bekannt sein. Es gilt dann

$$t_{\text{bel}} = \frac{\bar{s}_{\text{bel}}}{\bar{v}_f}. \quad (6.2)$$

Die Vorbeleuchtungsdauer ist dabei mit einem Fehler von

$$\begin{aligned} \Delta t_{\text{bel}} &= \sqrt{\left(\frac{\partial t_{\text{bel}}}{\partial \bar{s}_{\text{bel}}}\right)^2 \cdot \Delta s_{\text{bel}}^2 + \left(\frac{\partial t_{\text{bel}}}{\partial \bar{v}_f}\right)^2 \cdot \Delta \bar{v}_f^2} \\ &= \sqrt{\frac{1}{\bar{v}_f^2} \cdot \Delta s_{\text{bel}}^2 + \left(\frac{\bar{s}_{\text{bel}}}{\bar{v}_f^2}\right)^2 \cdot \Delta \bar{v}_f^2} \end{aligned} \quad (6.3)$$

behaftet. Die beiden Einzelfehler für die Beleuchtungstrecke Δs_{bel} und die Fließgeschwindigkeit Δv_f setzen sich ihrerseits wieder aus jeweils zwei Teilen zusammen: einem makroskopischen Anteil, der durch apparative Fehler bzw. Toleranzen entsteht und für alle Teilchen gleichermaßen gilt, und einem mikroskopischen Anteil, der aus der Charakteristik einer Rohrströmung resultiert und so auf jedes Teilchen einzeln wirkt. Diese beiden Anteile werden zunächst gesondert untersucht. Dazu wird hier die mittlere Fließgeschwindigkeit \bar{v}_f definiert als Volumenfluß \dot{V} durch eine Fläche, hier die Kreisfläche des Rohres mit dem Rohrradius R

$$\bar{v}_f = \frac{\dot{V}}{\pi R^2} = \frac{2}{R^2} \int_0^R v(r) r dr \quad (6.4)$$

Makroskopischer Anteil Bei der Bemessung der Vorbeleuchtungstrecke entsteht ein Fehler durch die Festlegung des Nullpunktes, da der eigentliche Meßbereich einen Durchmesser von 1 mm hat. Die weitere Positionierung der inneren V2A-Kapillare erfolgt mit einer schrittmotorgesteuerten Verschiebeeinheit, deren Toleranz deutlich unter dieser Unsicherheit des Nullpunktes liegt. Daher wird der Fehler großzügig mit $\Delta s_{\text{bel}} = 1 \text{ mm}$ angesetzt.

Durch direkte Messung der jeweiligen Durchflußmenge durch das Fließsystem bei verschiedenen Frequenzen am Durchflußmesser ν_K kann der Volumenfluß \dot{V} und somit \bar{v}_f bestimmt werden. Dabei wird ein Fehler von $\Delta \nu_K = 5 \text{ Hz}$ angenommen, wie er als maximale Schwankung am Frequenzzähler (Philips PM 6675) während der Eichmessungen beobachtet wurde. In Abb. 6.10 ist der gemessene Zusammenhang zwischen ν_K und \bar{v}_f für eine Kapillare mit $R = 2 \text{ mm}$ gezeigt. Lineare Regression ergibt

$$\bar{v}_f = 5.4 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \nu_K \quad (6.5)$$

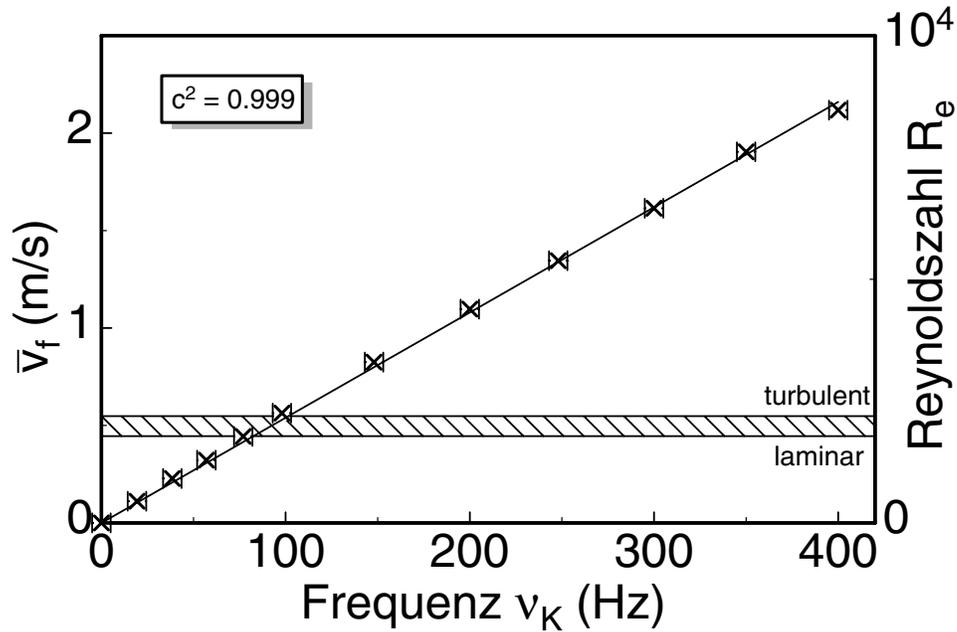


Abbildung 6.10: Eichung des Durchflußmessers. Mittlere Fließgeschwindigkeit \bar{v}_f und Reynoldszahl R_e als Funktion der Frequenz am Durchflußmesser ν_K in einer 4 mm-Kapillare. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der beobachteten Schwankung der Frequenz am Durchflußmesser während der Messung. Der gestrichelte Bereich markiert den Übergangsbereich von laminarer zu turbulenter Strömung (s.u.)

bei einem Korrelationskoeffizienten von $c^2 = 0.999$.

Daher wird die mittlere Fließgeschwindigkeit im Folgenden aus dieser Gerade berechnet. Die maximale Fließgeschwindigkeit liegt bei $v_{f_{\max}} \approx 2.15$ m/s. Bei der maximalen Fließgeschwindigkeit fließen etwa 1.5 l/min Suspension durch das System.

Mikroskopischer Anteil Die Vorbeleuchtungsdauer nach Gl. 6.2 ist mit einem weiteren Fehler behaftet, der aus den Strömungsverhältnissen im Rohr resultiert. Innerhalb der Glaskapillare bildet sich ein nicht-gleichförmiges Geschwindigkeitsprofil aus, so daß nicht alle Teilchen mit gleicher Geschwindigkeit durch das System fließen und somit auch eine unterschiedliche Zeit für diese Strecke benötigen.

Zur Fehlerabschätzung der Fließgeschwindigkeit muß die Geschwindigkeitsverteilung $v(R)$ in einer Kapillare mit dem Radius R untersucht werden. Dazu werden zunächst folgende Voraussetzungen angenommen:

- Eine Glaskapillare kann als völlig glattes Rohr betrachtet werden (Gerhart und Gross, 1985),
- Algen in Nährlösung seien eine wasserähnliche, nichtkomprimierbare, Newtonsche Flüssigkeit, da die Grünalgen lediglich eine Größe von wenigen Mikrome-

tern haben und die Nährstoffe in Form von Salzen nur in geringen Konzentrationen im Wasser gelöst sind,

- die Strömung sei stationär, d.h. an verschiedenen Orten kann die Geschwindigkeit verschieden sein ($v(r_1) \neq v(r_2)$), die Geschwindigkeit an einzelnen Stellen des Strömungsfeldes ist aber zeitunabhängig ($\partial v(r)/\partial t = 0$).

Mit diesen Annahmen gilt für die Bewegung der Flüssigkeit die Navier–Stokes–Gleichung für stationäre Strömungen:

$$\rho \vec{a} = -\text{grad}p + \eta \Delta v \quad (6.6)$$

Dabei ist ρ die Dichte der Flüssigkeit, \vec{a} die Beschleunigung, die ein Teilchen erfährt, wenn es zu einem Ort anderer Geschwindigkeit translatiert wird, p der Druck und η die Viskosität.

Wirkt nun lokal eine kleine Störung der Größe l auf eine zunächst laminare Strömung, so bewirkt sie dort eine lokale Erhöhung der Fließgeschwindigkeit. Aus der Bernoulli-Gleichung

$$p + \frac{1}{2} \rho v^2 = \text{const.} \quad (6.7)$$

folgt eine lokale Druckerniedrigung proportional zu $\frac{1}{2} \rho v^2$. Dies hätte eine Vergrößerung der Störung zur Folge, die Strömung wird instabil, also turbulent. Dem entgegen wirkt die innere Reibung $\eta v/l$, die das Geschwindigkeitsgefälle entlang der Störung abzubauen versucht. Je nachdem, ob der Trägheitseinfluß oder der Reibungseinfluß überwiegt, bildet sich laminare oder turbulente Strömung aus. Setzt man für Rohrströmungen die Abmessung der Störung gleich dem Rohrradius $l = R$ dann ist das Verhältnis beider die sogenannte Reynoldszahl R_e :

$$R_e = \frac{2 \rho v R}{\eta} \quad (6.8)$$

Der Übergang zwischen laminarer und turbulenter Strömung findet bei $R_e \approx 2000$ statt (Truckenbrodt, 1968). In Abb. 6.11 sind die unterschiedlichen Geschwindigkeitsprofile qualitativ dargestellt. Das turbulente Profil ist 'völliger', es kommt einer konstanten Geschwindigkeit über den gesamten Rohrquerschnitt näher als das laminare Profil. Näherungsweise läßt sich die Geschwindigkeit $v(r)$ in einem Abstand z vom Rohrrand in einer voll ausgebildeten turbulenten Strömung mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit v_{\max} in der Rohrmitte durch die Interpolationsformel

$$\frac{v}{v_{\max}} = \left(\frac{z}{R} \right)^n = r^n \quad (6.9)$$

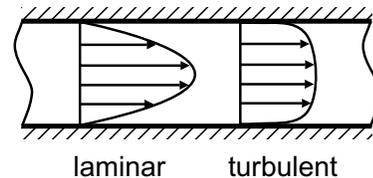


Abbildung 6.11: Strömungsarten

beschreiben (Truckenbrodt, 1968). Dabei ist r der relative Abstand von der Rohrwand. Der Exponent $n = n(R_e)$ hängt von der Reynoldszahl ab und variiert von $n = 1/6$ bei $R_e = 4 \cdot 10^3$ bis zu $n = 1/10$ bei $R_e = 3,2 \cdot 10^6$. Dabei wird die Geschwindigkeitsverteilung mit steigender Reynoldszahl immer gleichförmiger (siehe Abb.6.12). Setzt man diesen Potenzansatz in Gl. 6.4 ein und integriert über r , dann erhält man für $n = 1/6$

$$\frac{\bar{v}}{v_{\max}} = \frac{2}{(1+n)(2+n)} = 0.79 = \frac{1}{1.26} \quad (6.10)$$

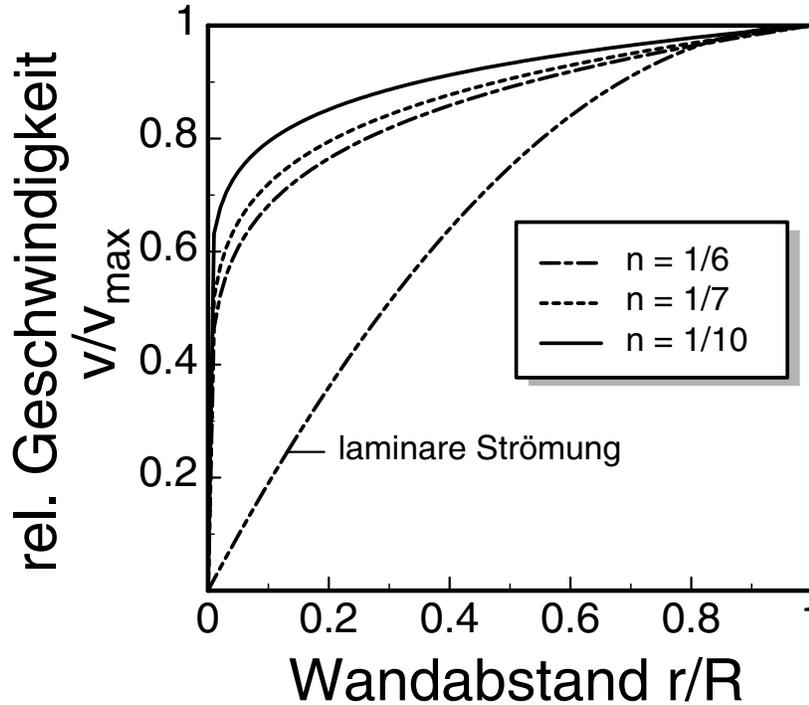


Abbildung 6.12: Geschwindigkeits-Potenzprofile für turbulente Rohrströmungen für verschiedene Exponenten bzw. Reynoldszahlen. Zum Vergleich ist das Geschwindigkeitsprofil einer laminaren Strömung abgebildet

Während also bei laminarer Rohrströmung die maximale Geschwindigkeit in der Rohrmitte noch doppelt so hoch ist wie die mittlere Fließgeschwindigkeit, so zeigt das Verhältnis bei turbulenter Strömung ein deutlich homogeneres Strömungsprofil (Truckenbrodt, 1968). Diese Interpolationsformel berücksichtigt nicht die viskose Randschicht. Die Dicke dieser viskosen Randschicht δ_0 in einer voll ausgebildeten turbulenten Strömung läßt sich berechnen zu

$$\delta_0 = 5\eta \cdot \left(\sqrt{\frac{\lambda}{8}} \cdot v \right)^{-1}, \quad (6.11)$$

wobei die Rohrreibungszahl λ für $Re < 10^5$ recht gut durch das Blasius'sche Gesetz

$$\lambda = 0.316 \cdot Re^{-1/4} \quad (6.12)$$

gegeben ist. Bei den hier vorliegenden geometrischen Verhältnissen ($R = 4 \text{ mm}$) und Fließgeschwindigkeiten ($2000 < Re < 8000$) beträgt die Dicke der Randschicht zwischen 4% und 12% des Rohrdurchmessers.

Im hier entwickelten Fließsystem kann basierend auf den bisherigen Ausführungen jedoch nur eine grobe Fehlerabschätzung vorgenommen werden, da die Querschnittserweiterung beim Übergang von der verschiebbaren V2A-Kapillare in die Glaskapillare eine starke Störung darstellt und die turbulente Strömung daher nicht als voll ausgebildet bezeichnet werden kann. Durch diese große Störung kann andererseits von einer recht starken Durchmischung quer zur Flußrichtung auch in Randnähe ausgegangen werden, durchströmende Partikel werden während ihrer Durchflußzeit verschiedene Fließgeschwindigkeiten annehmen.

Für diese grobe Abschätzung werden daher folgende Annahmen gemacht:

- Die Geschwindigkeitsverteilung über den gesamten Rohrquerschnitt folge dem Potenzansatz aus Gl. 6.9 mit $n = 1/6$,
- bei $Re = 2000$ haben Wirbel eine typische Abmessung von $r_w \sim \frac{1}{40} R$ (R : Rohrdurchmesser) (Gerthsen *et al.*, 1986),
- nach Durchfließen der Strecke in Flußrichtung, die eben einer solchen Wirbelabmessung entspricht, kann ein Teilchen seine Position quer zur Flußrichtung um genau diesen Betrag ändern oder die aktuelle Position beibehalten und fließt dann mit der neuen Geschwindigkeit nach Gl.6.9,
- ändert ein Teilchen seinen Abstand vom Rohrrand r , so legt es dabei die Strecke $s = r_w \cdot \sqrt{2}$ zurück, als ob es sich diagonal durch ein Quadrat bewegt, in das ein Wirbel mit dem Durchmesser r_w eingeschrieben ist.

Mit diesen Voraussetzungen wird der Durchfluß von vielen Teilchen durch ein Rohr simuliert: Jedes Teilchen fließt durch ein Rohr der Länge l und legt dabei eine Anzahl von

$$l_R = l/r_w = 40 \cdot l/R \quad (6.13)$$

Simulationsschritten zurück, die ab hier als relative Rohrlänge l_R bezeichnet wird. Beim j -ten Schritt hat es einen relativen Abstand r_j vom Rohrrand, die Geschwindigkeit v_j und legt die Strecke s_j zurück. Die Durchflußzeit t_i für das i -te Teilchen ist dann

$$t_i = \sum_{j=0}^{l_R} \frac{s_j}{v_j}. \quad (6.14)$$

Mit dem Potenzansatz für die Geschwindigkeiten v_j (Gl. 6.9) folgt dann

$$t_i = \sum_{j=0}^{l_R} \frac{s_j}{v_{\max} \cdot r_j^n} \quad (6.15)$$

Sei nun p_j ein l_R -dimensionaler Vektor mit Zufallszahlen aus $\{-1, 0, 1\}$, der für das Teilchen i bestimmt, ob es nach Durchlaufen eines Simulationsschrittes seinen Abstand vom Rohrrand beibehält oder um den Betrag r_w ändert. Dann gilt für alle Teilstrecken s_j und Abstände vom Rohrrand r_j mit $j = 1..l_R$

$$s_j = r_w \cdot (1 + |p_j| \cdot (\sqrt{2} - 1)) \quad (6.16)$$

$$r_j = \begin{cases} 2 - (r_{j-1} + |p_j| \cdot r_w) & \text{für } r_{j-1} = 1 \\ |r_{j-1} + p_j \cdot r_w| & \text{sonst} \end{cases} \quad (6.17)$$

mit der zufälligen Anfangsposition r_0 . Der erste Teil von Gl. 6.17 sorgt dafür, daß $r_j \leq 1$ bleibt, das Teilchen verläßt die Rohrmitte in Richtung der anderen Rohrwand. Der zweite Teil gewährleistet $r_j \geq 0$, das Teilchen tritt an der anderen Rohrwand wieder ein. Quer zur Flußrichtung wird somit eine Zufallsbewegung (*random walk*) ausgeführt. Einsetzen liefert

$$t_i = \frac{r_w}{v_{\max}} \cdot \sum_{j=0}^{l_R} \frac{1 + |p_j| \cdot (\sqrt{2} - 1)}{r_j^n} \quad (6.18)$$

Der erste Term beschreibt einfach die benötigte Zeit für die Strecke r_w in Flußrichtung bei maximaler Fließgeschwindigkeit, der Zähler der Summe korrigiert die Strecke gegebenenfalls um den Faktor $\sqrt{2}$ und der Nenner korrigiert die Fließgeschwindigkeit im Abstand r .

Diese Bedingungen wurden für die Simulation in einem C-Programm implementiert und so der Durchfluß für 10^6 Teilchen durch ein Rohr berechnet. Dabei wurden zufällige Startpositionen r_0 über den Querschnitt des Rohres durch eine Monte-Carlo-Simulation ermittelt. Daraus wurden folgende Werte für die Durchflußzeit t und die Fließstrecke s , bzw. deren Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta t}{\bar{t}} &= 0.11 \\ \bar{s} &= 1.26 \cdot l_R \\ \frac{\Delta s}{\bar{s}} &= 0.009 \end{aligned}$$

Hierbei ist zu beachten, daß die Verlängerung der Gesamtlängstrecke \bar{s} im Vergleich zur geradlinig in Flußrichtung zurückgelegten Strecke s_{lin} zu einer Spreizung der

Zeitachse gegenüber den linear gerechneten Fließzeiten führt. Die Durchfluß- bzw. Beleuchtungszeit berechnet sich dann zu

$$t_{\text{bel}} = f_{\text{korrr}} \cdot \frac{s_{\text{lin}}}{\bar{v}_f}. \quad (6.19)$$

Der Korrekturfaktor f_{korrr} wird, da die Annahme für die Verlängerung der Strecke sehr vereinfachend gewählt wurde, die Verhältnisse in der Fließstrecke aber wahrscheinlich wesentlich komplizierter sind, experimentell bestimmt.

In Abb. 6.13 sind der makroskopische und der mikroskopische Anteil am relativen Fehler $\Delta t_{\text{bel}}/t_{\text{bel}}$ als Funktion von Vorbeleuchtungsstrecke s_{bel} und Fließgeschwindigkeit \bar{v}_f dargestellt. Dabei ist zu beachten, daß der mikroskopische Anteil der Anschaulichkeit wegen auch im Bereich laminarer Strömung ($\bar{v}_f < 0.5$ m/s) als konstant eingezeichnet ist. Es ist deutlich zu sehen, daß der makroskopische Fehler erst unterhalb von $\bar{v}_f = 0.5$ m/s zum Tragen kommt. Unterhalb dieser Geschwindigkeit steigt dieser Anteil stark an, der Fehler der Pumpe überwiegt.

Als niedrigste Fließgeschwindigkeit wurde im Folgenden $v_{f_{\text{min}}} = 0.5$ m/s gewählt, um immer im Bereich turbulenter Strömung zu bleiben (vgl. Abb. 6.10) und den Bereich des großen Pumpenfehlers zu meiden. Lediglich zwei Meßpunkte wurden innerhalb der Meßreihen bei niedrigeren Fließgeschwindigkeiten aufgenommen, um den weiteren Verlauf der Induktionsverlauf zumindest qualitativ zu zeigen.

Der gesamte Fehler in der Vorbeleuchtungszeit Δt_{bel} gilt nun für jedes einzelne Teilchen bzw. hier für jede in den Meßbereich einfließende Alge. Jedes detektierte Fluoreszenzphoton kann also von einem Teilchen stammen, dessen Vorbeleuchtungszeit t_{bel} um einen Betrag δt von der mittleren Vorbeleuchtungsdauer \bar{t} abweicht. Somit sind alle aufgenommen Fluoreszenzspektren zusätzlich zum Poisson-Rauschen um diesen Betrag verrauscht. Insbesondere bei den Multiexponentialanalysen der Fluoreszenzabklingkurven wird sich dies in der Güte und Sicherheit der Fits niederschlagen.

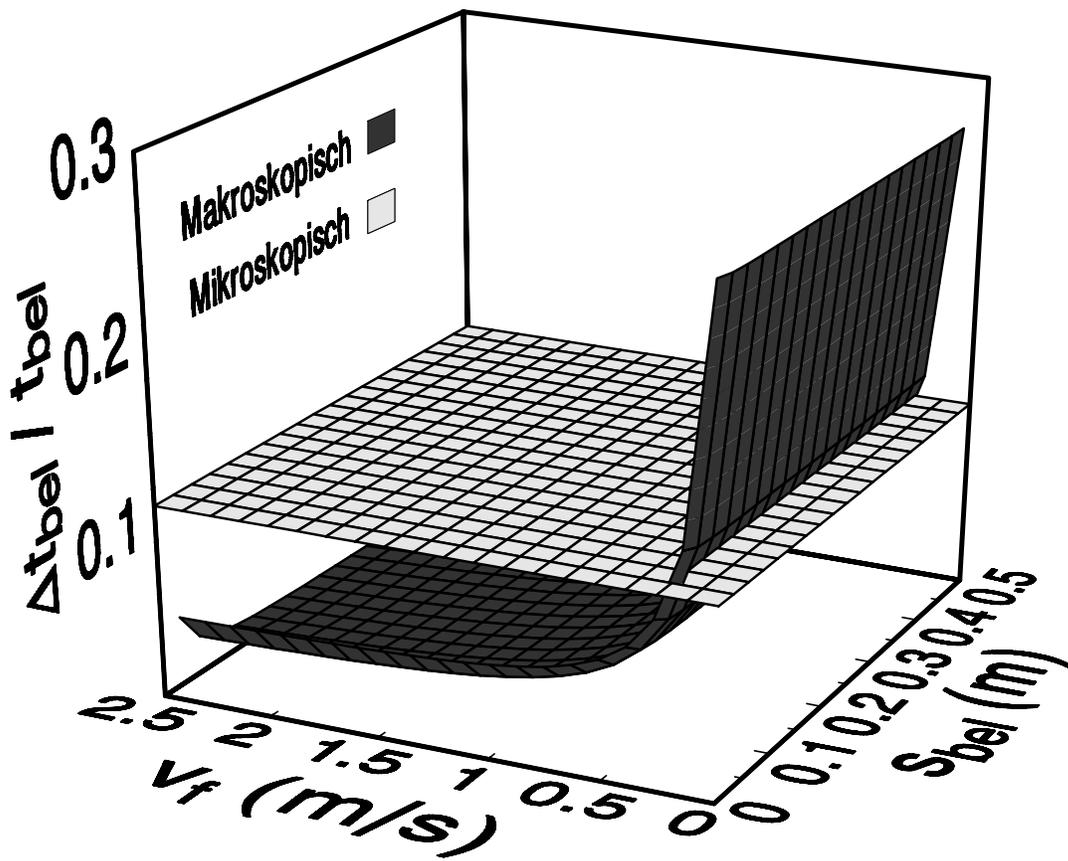


Abbildung 6.13: Makroskopischer und mikroskopischer Anteil am relativen Fehler für die Vorbeleuchtungszeit $\Delta t_{bel}/t_{bel}$ in Abhängigkeit von Vorbeleuchtungsstrecke s_{bel} und Fließgeschwindigkeit \bar{v}_f

Kapitel 7

Messungen und Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Kapitels werden grundlegende Messungen zu photosynthetischen Eigenschaften gezeigt, danach werden Messungen mit der neu entwickelten Methode des *optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen* vorgestellt. In Kap. 7.3 werden Messungen zur Charakterisierung des hier entwickelten variablen Fließsystems und im letzten Teil Messungen zur Fluoreszenzinduktion gezeigt.

7.1 Grundlegende Messungen

7.1.1 Absorption und cw-Fluoreszenz von Grünalgen

In Abb. 4.1, S. 16 sind ein Extinktionsspektrum der Pigmente von Chlorella in Methanol und ein korrigiertes Fluoreszenzspektrum von Chlorella-Algen in Nährlösung dargestellt. Aufgrund der Absorptions- und Emissionsmaxima wurden für die weiteren Fluoreszenzmessungen 650 nm als Anregungswellenlänge und 685 nm als Detektionswellenlänge gewählt. Die Anregungswellenlänge wurde unterhalb des Absorptionsmaximums gewählt, um noch selektiver in das PSII_α-Pigment Chl *b* einzustrahlen, zu längeren Wellenlängen würde hingegen die Absorption des Chl *a* weiter zunehmen (vgl. Kap. 3.2.2 und 8.3.1). Weiterhin wird der Streuanteil des anregenden Lichts vermindert.

Um den Anteil der PSI-Fluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz abzuschätzen, wurden Fluoreszenzspektren von Algen mit intaktem und unterbrochenem Elektronentransport aus dem PSII aufgenommen (Abb. 7.1). Die Blockade wurde durch Kontamination mit 10⁻³ M DCMU erreicht, das die Bindungsnische des sekundären Chinons Q_B blockiert.

Dabei ändert sich unter DCMU-Einfluß lediglich die Gesamtfluoreszenzausbeute, wobei die spektrale Verteilung jedoch nahezu konstant bleibt (siehe normierte Kurve frischer Algen).

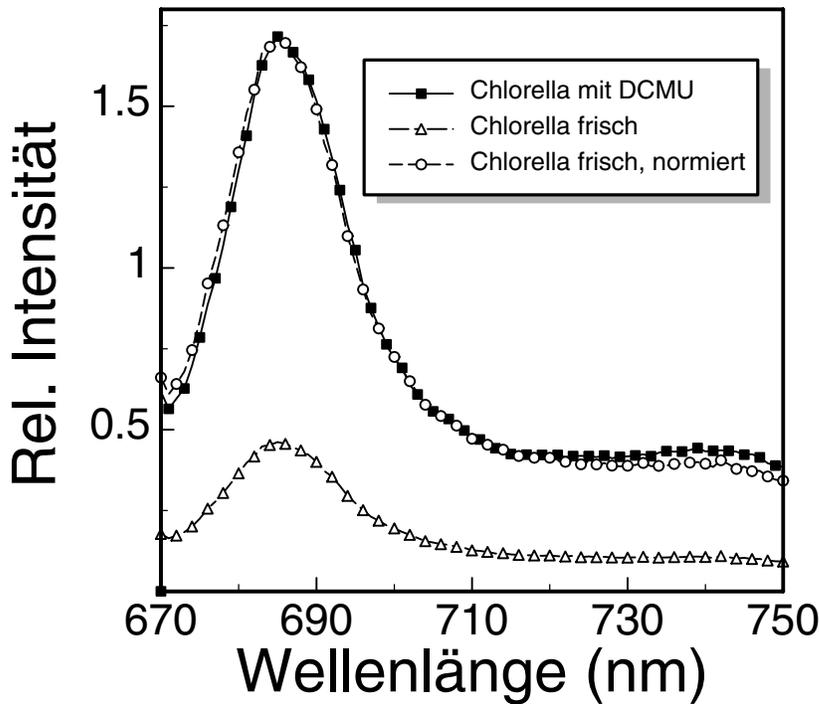


Abbildung 7.1: Korrigierte Fluoreszenzspektren von *Chlorella vulgaris* in Nährlösung mit und ohne DCMU. Als Vergleich ist das Spektrum der unbehandelten Algen auf das Maximum der DCMU-versetzten Algen normiert abgebildet.

7.1.2 Fluoreszenzabklingkurven von Algen

In diesem Kapitel werden Fluoreszenzabklingkurven von *Chlorella*-Algen in den beiden Extremzuständen F_0 (bzw. F'_0 , vgl. Kap. 7.3.4) und F_m des photosynthetischen Apparates bzw. des PSII gezeigt und für spätere Vergleiche im Exziton-Radikalpaar-Gleichgewichts-Modell betrachtet.

Die Fluoreszenzabklingkurven von *Chlorella vulgaris* für die beiden Extremzustände bei intaktem (F_0 : kein reduziertes Q_A) und blockiertem Elektronenfluß (F_m : sämtliches Q_A reduziert, $k_2 = 0$) sind in Abb. 7.2 dargestellt. Hier sind exemplarisch sowohl die Apparatefunktion (APD: FWHM = 60 ps) als auch die Residuen der Fits gezeigt. Die Fitparameter und berechneten Übergangsraten gemäß Gl. 4.10–4.12 sind in Tab. 7.1 angegeben.

Tabelle 7.1: Fitparameter von Fluoreszenzabklingkurven von *Chlorella vulgaris* in F_0 und F_m . In F_m verschwindet die Rate k_2 für die Ladungsstabilisierung, die vorletzte Spalte entspricht in diesem Fall somit der strahlungslosen Dissipation im Reaktionszentrum k_D . In den mit PSII gekennzeichneten Spalten wurde die Summe der dem Photosystem II zugeordneten Amplituden auf 100% skaliert.

	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	α_1	α_2	α_3	α_1 PSII	α_2 PSII	τ_m (ps)	k_1 (ns ⁻¹)	k_{-1} (ns ⁻¹)	$k_2 + k_D$ (ns ⁻¹)
F_0	264	508	80	0.28	0.34	0.38	0.45	0.55	395	2.4	0.26	2.6
F_m	998	2393	80	0.17	0.40	0.43	0.3	0.7	2121	0.29	0.24	0.58

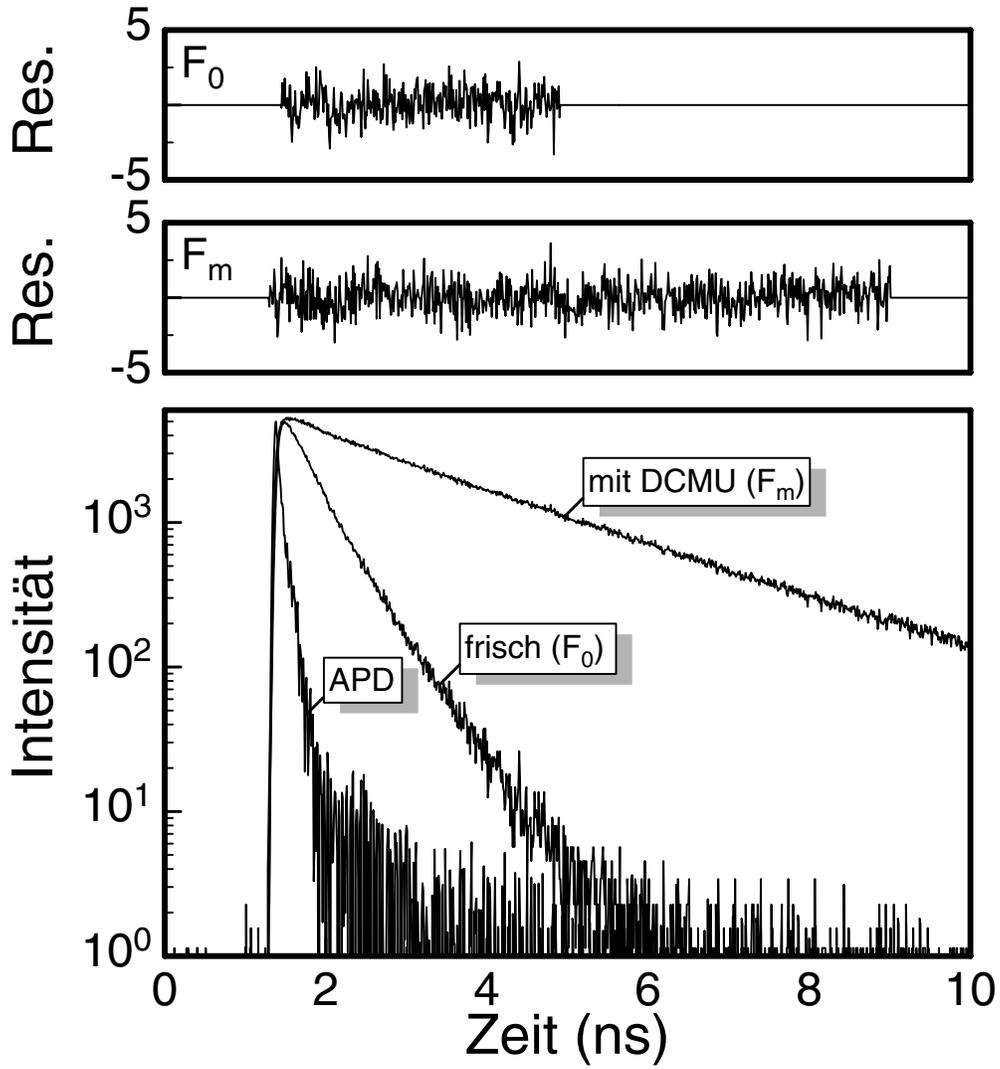


Abbildung 7.2: Fluoreszenzabklingkurven von *Chlorella vulgaris* in F_0 und F_m . APD: Apparatfunktion

7.2 Optisches Pumpen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen

Das in Kap. 6.4.1 beschriebene *optische Pumpen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen* wurde als neue Meßmethode in der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik im Rahmen der vorliegenden Arbeit und der Dissertation von Frank Terjung (Terjung, 1998) entwickelt. Mit dieser Methode konnten zuvor gewonnene Erkenntnisse und Modellvorstellungen (Berg, 1995; Terjung *et al.*, 1995a; Berg *et al.*, 1997) überprüft und erweitert werden.

Die Ergebnisse wurden in verschiedenen Postern vorgestellt (Berg *et al.*, 1995; Terjung *et al.*, 1995b) und zusammenfassend publiziert (Terjung *et al.*, 1997). Daher werden die grundlegenden Messungen hier lediglich kurz vorgestellt und exemplarisch die auf eigenen Vorarbeiten basierenden Messungen zu Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat gezeigt (Berg, 1995; Berg *et al.*, 1997).

Die Messungen dieses Kapitels wurden mit dem modifizierten 'Mobilen Pikosekundenfluorimeter' durchgeführt. Die Intensität der Meßpulse betrug $2 \cdot 10^8$ Photonen $\text{Puls}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei einer Wiederholrate von 740 kHz, die Intensität der zusätzlichen sättigenden Pulse 10^{12} Photonen $\cdot \text{Puls}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Erbsen-Pflanzen (*Pisum sativum*) wurden zwei Wochen lang bei 20°C in einem natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus gezogen. Zu Beginn der Meßreihen wurden die Blätter von der Pflanze abgetrennt. Die Verschiebegeschwindigkeit während der Messungen mit den zusätzlichen sättigenden Pulsen betrug 0.5 mm s^{-1} .

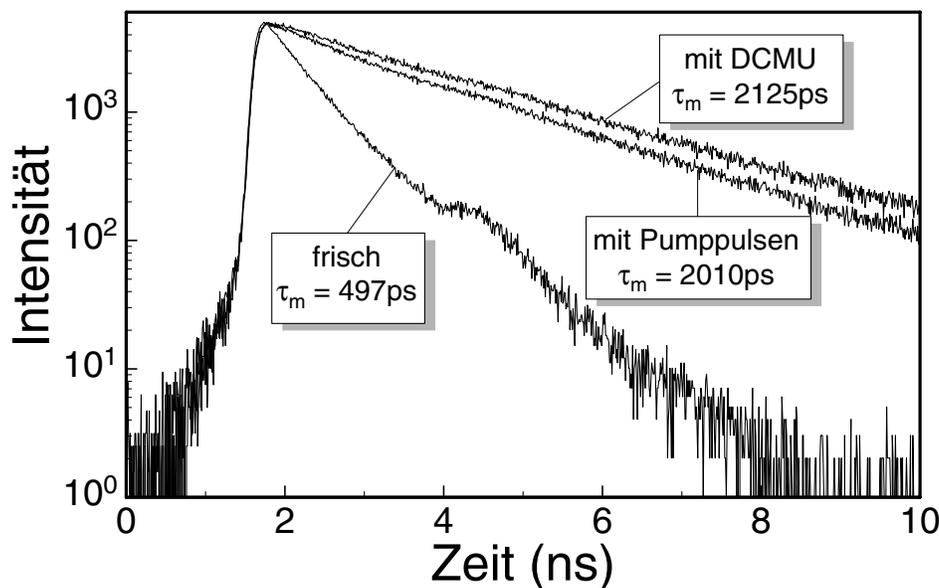


Abbildung 7.3: Optisches Pumpen: Fluoreszenzabklingkurven eines frischen Erbsenblattes mit und ohne zusätzliche Pulse im Vergleich mit dem Abklingen eines DCMU-vergifteten Blattes

Abb. 7.3 zeigt zunächst den Vergleich zwischen optischer (zusätzliche Pulse) und chemischer (DCMU) Blockade des PSII. Dazu wurden Fluoreszenzabklingkurven eines frischen Erbsenblattes mit und ohne zusätzliche Pulse sowie eines DCMU-vergifteten Blattes aufgenommen. Durch optisches Pumpen wird hier nicht ganz der Zustand der chemischen Blockade erreicht, die mittleren Fluoreszenzlebensdauern sind jedoch sehr ähnlich. Die Abweichung entsteht durch die einsetzende Fluoreszenzinduktion während die Blätter in das Meßlicht geschoben werden. Durch gute Anpassung der Verschiebegeschwindigkeit kann diese Abweichung weiter minimiert werden. (Zur Verdeutlichung wurde hier eine Kurve mit sättigenden Pulsen dargestellt, bei der die Verschiebegeschwindigkeit nicht ganz optimal angepasst wurde).

7.2.1 Anwendung des optischen Pumpens: Wasserstreß

Um die in einer früheren Arbeit entwickelte Modellvorstellung zu Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat (Berg *et al.*, 1997) zu überprüfen, wurden entsprechende Messungen unter Anwendung der neuen Methode wiederholt.

Erbsenblätter wurden zu Beginn der Meßreihen von der Pflanze abgetrennt und auf Küvetten aufgebracht. Die Blätter wurden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30 % getrocknet. Währenddessen wurden sie in Dunkelheit gehalten, um den Einfluß konkurrierender Prozesse wie z.B. verstärkte Anfälligkeit gegen Photoinhibition zu minimieren (Demmig-Adams, 1990; Horton *et al.*, 1994; Kyle, 1987; De Las Rivas *et al.*, 1993).

Nach verschiedenen Trockenzeiten wurden Fluoreszenzabklingkurven mit und ohne zusätzliche Pumppulse aufgenommen und der relative Massenverlust

$$\Delta m_{\text{rel}} = \frac{m_{\text{fr}} - m_{\text{tr}}}{m_{\text{fr}}} \quad (7.1)$$

bestimmt, wobei m_{fr} die Masse des frischen Blattes und m_{tr} die Masse des getrockneten Blattes ist.

In Abbildung 7.4 sind die mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m der einzelnen Messungen als Funktion der Trockenzeit dargestellt. Ohne Pumppulse ist zunächst nur ein leichter Anstieg mit zunehmender Trockenzeit zu beobachten, bis nach etwa 70 Stunden ein starker Anstieg beobachtet wird. Nach dem Erreichen eines Maximums fällt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer wieder stark auf ähnliche Werte wie vor dem Maximum ab. Mit Pumppulsen fällt τ_m zunächst langsam und nimmt nach 70 Stunden Trockenzeit denselben Verlauf wie ohne Pumppulse. Nur bis zum Erreichen des Maximums ohne Pumppulse führt ein Einlegen der Blätter in Wasser zu einer vollständigen Erholung, die Fluoreszenzparameter gehen auf die anfänglichen Werte zurück.

Werden Blätter bei verschiedenen relativen Luftfechtigkeiten dem Wasserstreß ausgesetzt, so wird das charakteristische Maximum ohne Pumppulse nach verschiedenen Trockenzeiten erreicht, es tritt jedoch immer bei einem relativen Massenverlust von etwa $\Delta m_{\text{rel}} = 80\%$ auf (Abb. 7.5).

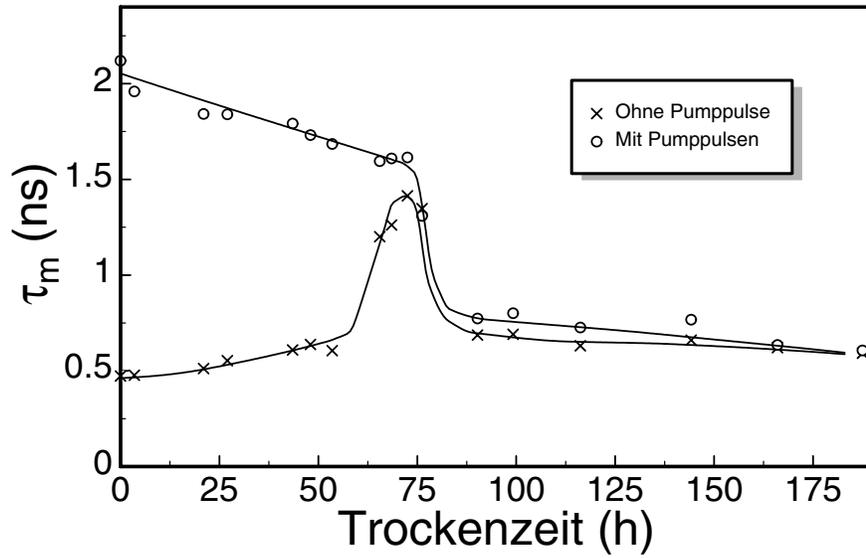


Abbildung 7.4: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m von Erbsenblättern unter dem Einfluß von Wasserstreß als Funktion der Trockenzeit

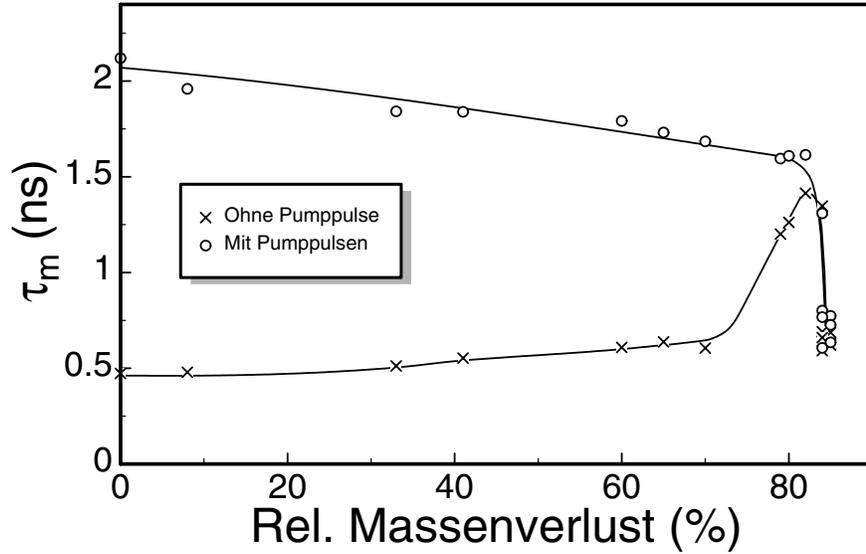


Abbildung 7.5: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m von Erbsenblättern unter dem Einfluß von Wasserstreß als Funktion des relativen Massenverlustes Δm_{rel}

7.3 Charakterisierung des Fließsystems

Bei dem in Kapitel 6.4.2 vorgestellten Fließsystem zur variablen Vorbeleuchtung von flüssigen Proben handelt es sich um eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Neuentwicklung. Das Fließsystem wurde unter der Vorgabe entwickelt, eine möglichst hohe Zeitauflösung über eine große Zeitspanne bei extrem konstanten Beleuchtungsbedingungen zu ermöglichen.

Hier werden nun nach theoretischen Fehlerbetrachtungen zur Vorbeleuchtungszeit sowie Messungen zur Homogenität der Beleuchtungsintensität (siehe Kap. 6.4.2) innerhalb des Systems Messungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit vorgestellt. Zunächst wird der Einfluß verschiedener Meßparameter auf die Qualität der Meßergebnisse untersucht.

7.3.1 Einfluß der Algendichte

In vorbereitenden Messungen an Algen wurde der Einfluß der Algen- bzw. Chlorophyll-Konzentration auf die Meßergebnisse im Fließsystem untersucht. Dazu wurden Meßreihen mit verschiedenen Chlorophyll-Konzentrationen zwischen 8 mg/l und 30 mg/l (vgl. Kap. 5) durchgeführt, jedoch keine signifikanten Änderungen beobachtet. Daher konnte in allen weiteren Meßreihen darauf verzichtet werden, eine jeweils identische Algendichte vor den Messungen einzustellen.

7.3.2 Messungen zur Anregungsintensität im Vorbeleuchtungsrohr

Für die Messungen im Fließsystem ist es von höchster Wichtigkeit, daß die Beleuchtungsintensität im Vorbeleuchtungsrohr möglichst homogen ist, um systematische Fehler zu minimieren. Daher wurden die LEDs einzeln vermessen und entsprechend ihres individuellen Wirkungsgrades mit einem individuellen Strom betrieben, der jeweils gleiche optische Ausgangsleistung erzeugt. So konnte durch Messungen mit einer empfindlichen Photodiode innerhalb des Rohres ermittelt werden, daß in der Rohrmitte die Intensitätsschwankungen in axialer Richtung unter 1% liegen. In radialer Richtung konnten von der Mitte ausgehend bis zum doppelten Kapillardurchmesser keine Änderungen in der Intensität festgestellt werden.

7.3.3 Einfluß von Streulicht aus der Vorbeleuchtungsstrecke

Zunächst wurde die spektrale Korrekturfunktion des in Abb. 6.3 gezeigten Aufbaus unter dem Einfluß der zusätzlichen optischen Anregung durch die Pump-LED außerhalb des Vorbeleuchtungsrohres bestimmt. Der CFD zur Pulsformung wird bei diesen ebenso wie bei zeitaufgelösten Messungen *gated* betrieben, d.h. es werden nur Fluoreszenzphotonen detektiert, die nach Anregung durch den Pulslaser, nicht jedoch nach Anregung durch die Pump-LED, emittiert werden (vgl. Kap. 6.4.1).

Der Detektor ist nicht gatebar und wird daher bei der Meßmethode mit zusätzlichen Pulsen sehr stark belastet. Bei Wellenlängen nahe dem Emissionsmaximum der Pump-LED wird der maximal zulässige mittlere Anodenstrom kurzzeitig knapp überschritten. Um einen eventuellen Einfluß auf die Messungen zu untersuchen, wurden cw-Spektren von Oxazin 1 in Ethanol ($5 \cdot 10^{-6}\text{M}$) mit und ohne zugeschaltete Pump-LED aufgenommen und mit einem korrigierten Oxazin 1 Normspektrum nach (Ressel, 1998) verglichen (Abb. 7.6 links).

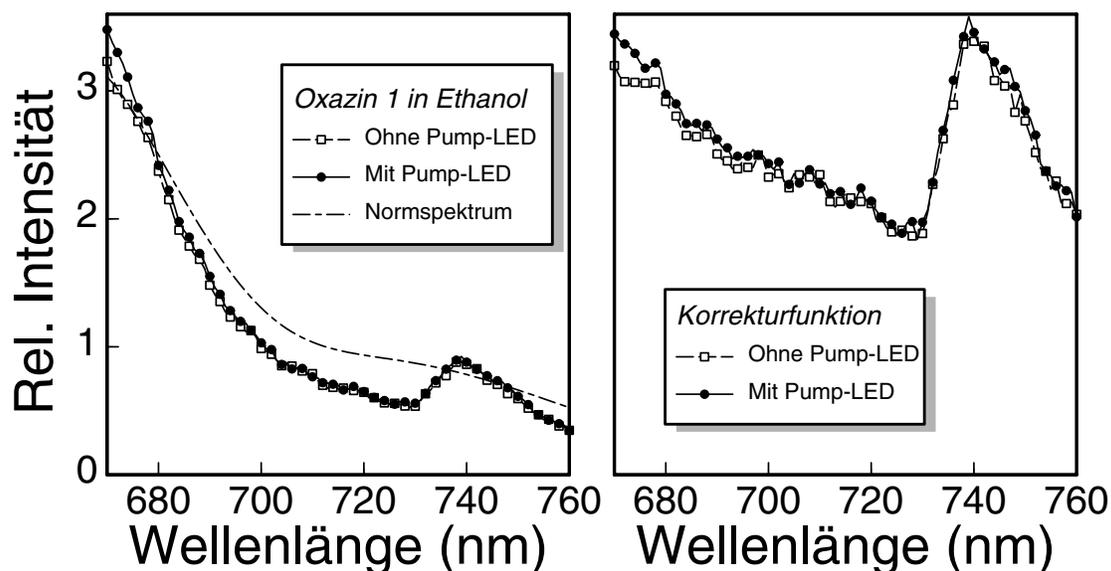


Abbildung 7.6: Spektrale Korrektur mit und ohne Pump-LED

Die daraus resultierenden Korrekturfunktionen sind in Abb. 7.6 rechts abgebildet. Ein geringer Einfluß der Pump-LED ist lediglich ab 680 nm zu kürzeren Wellenlängen hin zu beobachten. Es muß je nach Meßart (mit bzw. ohne zugeschaltete Pump-LED) jeweils die entsprechende Korrekturfunktion angewendet werden, die Pump-LED beeinflusst die Qualität der Spektren jedoch nicht weiter.

7.3.4 Einfluß der Laserintensität

Messung von Fluoreszenzabklingkurven erfordern die Durchführung vieler Einzelmessungen, die zusammen typischerweise mehrere Sekunden bis Minuten dauern. Daher muß sich die untersuchte Probe für die gesamte Meßdauer in einem stationären Zustand befinden.

Da photosynthetische Organismen ein Induktionsverhalten bei Beleuchtung zeigen (vgl. Kap. 4.3) erfordert dies, daß sie vor einer Messung an die vorliegenden Beleuchtungsbedingungen adaptiert werden müssen. Daher können Fluoreszenzspektren im dunkeladaptierten Zustand F_0 nicht ohne weiteres gemessen werden. In

der Praxis wird dazu die Intensität des anregenden Lichts so niedrig gewählt, daß eine weitere Erniedrigung zu keiner signifikanten Änderung der Fluoreszenzspektren von adaptierten Organismen mehr führt. Jedoch auch bei geringsten Intensitäten ($I < 10^6$ Photonen \cdot Puls $^{-1}$ \cdot cm $^{-2}$) verschwindet das Induktionsverhalten nicht vollständig das System befindet sich in einem undefinierten Zustand F'_0 .

Das hier entwickelte Fließsystem ermöglicht Messungen im Zustand F_0 , indem Algen bei maximaler Fließgeschwindigkeit $v_{f_{\max}} = 2.15$ m/s ohne Vorbeleuchtung in den Meßbereich gepumpt werden. Dabei werden sie lediglich der Beleuchtung durch die anregenden Laserpulse mit einer Pulslänge $t_l = 15$ ps und einer Wiederholrate von $f_l = 800$ kHz ausgesetzt. Damit sind sie zur Zeit der Messung maximal (am Ende des Meßbereichs der Breite $d = 10^{-3}$ m) für

$$t_{\text{bel}} = \frac{d}{v_{f_{\max}}} \cdot f_l \cdot t_l \approx 5.5 \text{ ps} \quad (7.2)$$

vorbeleuchtet. Nach dieser kurzen Zeit kann davon ausgegangen werden, daß sich das PS II noch im dunkeladaptierten Zustand befindet, d.h. sämtliches Q_A liegt noch im oxidierten Zustand vor (Strasser *et al.*, 1995; Stirbet *et al.*, 1998).

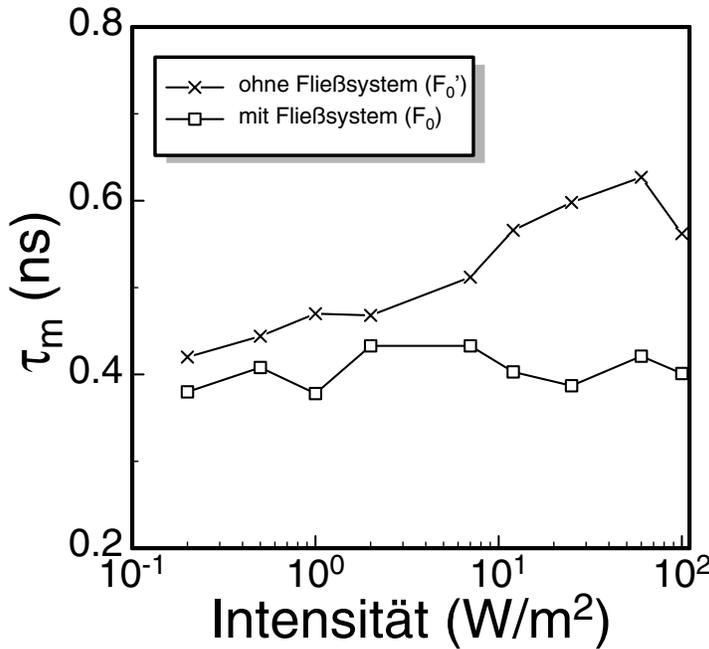


Abbildung 7.7: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m gemessen an *Chorella vulgaris* in F_0 und F'_0 bei verschiedenen Anregungsintensitäten. Die Messungen in F_0 wurden im Fließsystem bei maximaler Fließgeschwindigkeit und ohne Vorbeleuchtung durchgeführt, für Messungen in F'_0 wurden die Algen an das Meßlicht adaptiert

In Abb. 7.7 sind die mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m gemäß Gl. 2.9 von *Chlorella* bei verschiedenen Anregungsintensitäten gezeigt. Die Messungen wurden jeweils im Fließsystem (Erhaltung des dunkeladaptierten Zustands F_0) und ohne Fließsystem (an das Meßlicht adaptierter Zustand F'_0) durchgeführt.

Man sieht deutlich die Unabhängigkeit von der Intensität der Meßpulse im Fließsystem und im Gegensatz dazu den Einfluß selbst schwächster Anregungsintensitäten auf die Spektren bei an das Meßlicht adaptierten Proben. Daher können

Messungen im wahren Zustand F_0 im Fließsystem im Gegensatz zu herkömmlichen statischen Aufbauten korrekt durchgeführt werden.

Alle weiteren Messungen in diesem Kaptiel wurden bei einer Vorbeleuchtungsintensität der Pump-LED und/oder der LEDs im Vorbeleuchtungsrohr von $I = 24 \text{ W/m}^2$ durchgeführt um die jeweils maximale Auswirkung der Vorbeleuchtung zu untersuchen. Die Meßpulse hatten jeweils eine Intensität von $2 \cdot 10^8 \text{ Photonen} \cdot \text{Puls}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, was einer mittleren Intensität von $I = 0.5 \text{ W/m}^2$ entspricht. Sie wurde damit so niedrig gewählt, daß die Pulse selbst keinen nennenswerten Einfluß auf den Zustand der Algen haben (s. Kap. 7.1.2).

7.3.5 Eichung und Genauigkeit der Vorbeleuchtungsstrecke

Vor den Messungen wurden jeweils 251 Algen in Nährlösung aus den Aufzuchtkolben entnommen und in das Reservoir des Fließsystems gefüllt. Bei der maximal möglichen Fließgeschwindigkeit (1.5 l/min) verweilen die Algen so nach einmaligem Durchfließen der Meßstrecke für 16.7 Minuten im Reservoir in Dunkelheit, bevor sie erneut in das Vorbeleuchtungsrohr gepumpt werden. Es kann also von einer Dunkeladaptation der Algen beim Eintritt in das Fließsystem ausgegangen werden.

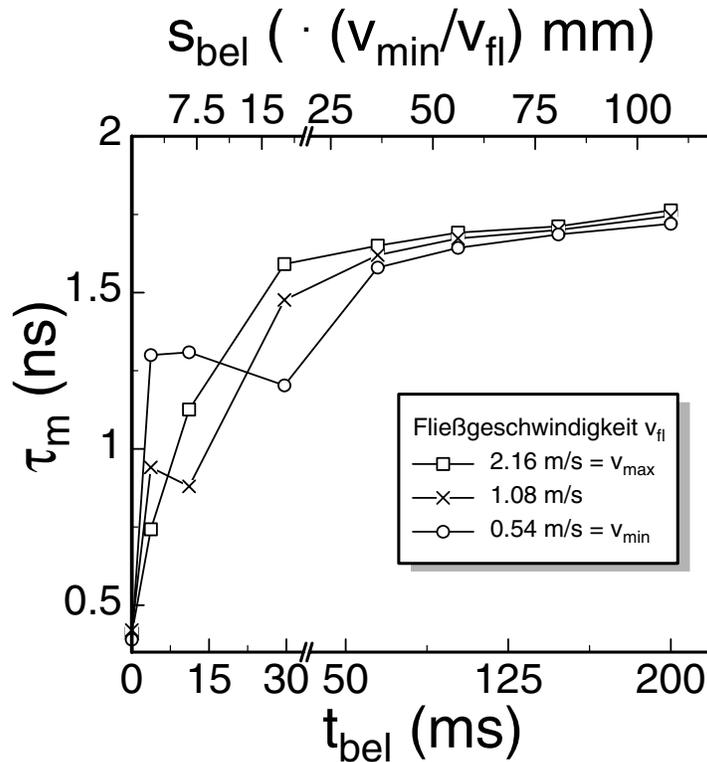


Abbildung 7.8: Vergleichsmessungen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten, Teil I: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von *Chorella vulgaris* mit verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern. Die obere Skalierung der X-Achse zeigt die Vorbeleuchtungsstrecke für die langsamste Geschwindigkeit, für höhere muß entsprechend mit v_{min}/v_{fl} skaliert werden.

Abb. 7.8 und Abb. 7.9 zeigen zwei Meßreihen zur Konsistenz der empirischen Gleichung 6.5, S. 43, zur Berechnung der Fließgeschwindigkeit innerhalb der Kapillare.

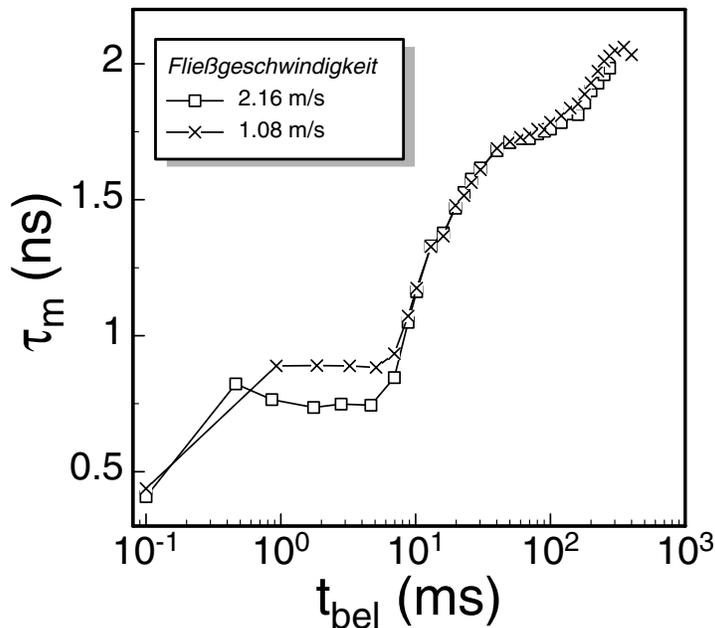


Abbildung 7.9: Vergleichsmessungen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten, Teil II: mittlere Fluoreszenzlebensdauer von *Chorella vulgaris* mit verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern aufgenommen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten

Zunächst wurden Fluoreszenzabklingkurven von Chlorella mit verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern bei drei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten aufgenommen. Dabei wurde die Vorbeleuchtungsstrecke so eingestellt, daß für die drei Fließgeschwindigkeiten jeweils die gleiche Vorbeleuchtungsdauer erreicht wurde. In Abb. 7.8 sind die mittleren Fluoreszenzlebensdauern aufgetragen. Die X-Achsen wurden geteilt und im vorderen Bereich gespreizt. Die Fehlerbalken nach Gl. 6.3 sind der Übersichtlichkeit wegen nur für die niedrigste Fließgeschwindigkeit von $v_{\text{min}} = 0.54 \text{ m/s}$ eingezeichnet, für die beiden anderen sind sie entsprechend um einen Faktor zwei bzw. vier kleiner. Theoretisch müßten alle drei Kurven übereinstimmen, es ist jedoch im Bereich kürzerer Vorbeleuchtungszeiten eine deutliche Abweichung zu erkennen. Dies ist einerseits konsistent mit dem Verlauf des zu erwartenden Fehlers (vgl. Abb. 6.13), andererseits sind die Abweichungen sehr groß. Dies wird darauf zurückgeführt, daß sich die Beleuchtungsbedingungen auf den letzten 10 mm der Vorbeleuchtungsstrecke von denen innerhalb des Rohres unterscheiden. Nach etwa 60 ms liefern alle drei Versuchsbedingungen die gleichen Ergebnisse, ab diesen Meßpunkten arbeitet das System sehr genau.

Dies bedeutet umgerechnet in die Vorbeleuchtungsstrecke, daß das System bei einer Fließgeschwindigkeit von $v_{\text{n}} = 0.54 \text{ m/s}$ erst nach einer Beleuchtungsstrecke von 35 mm korrekte Ergebnisse liefert, bei höherer Geschwindigkeit entsprechend früher. Dies führt zu einer maximalen Auflösung bzw. zu einem ersten 'verlässlichen' Meßpunkt nach einer Vorbeleuchtung von 15 ms bei maximaler Fließgeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 2.16 \text{ m/s}$. Die feiner gerasterten Kurven in Abb. 7.9 bei den höheren Fließgeschwindigkeiten zeigen jedoch, daß schon ab 10 ms mit verlässlichen Ergebnissen gerechnet werden kann und bei kürzeren Vorbeleuchtungszeiten zumindest

qualitative Aussagen getroffen werden können. Weiterhin kann der erste Meßpunkt als sehr genau angesehen werden, da die Algen mit maximaler Geschwindigkeit ohne

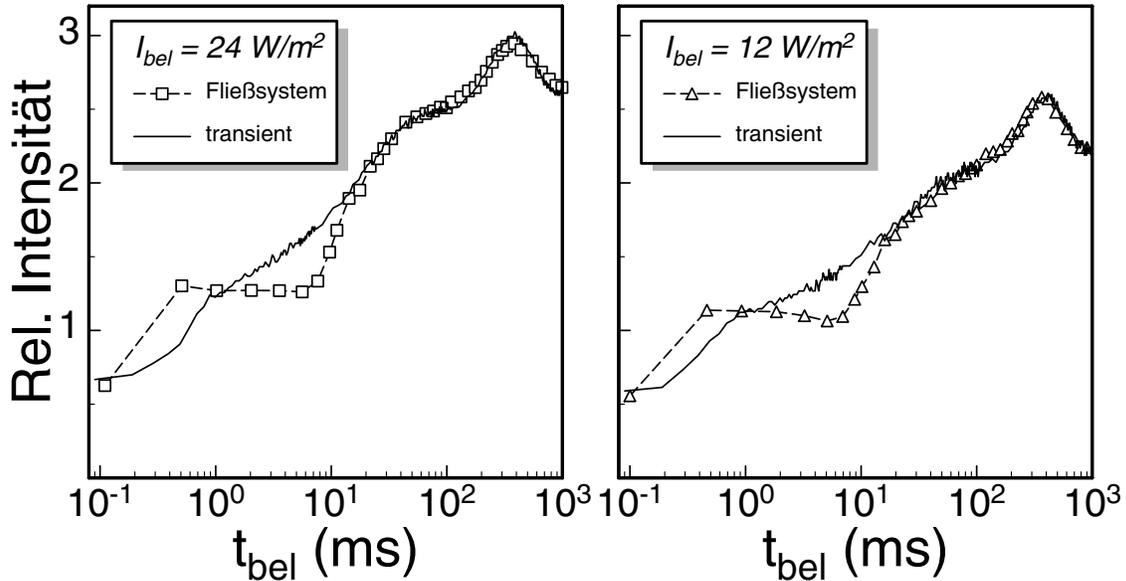


Abbildung 7.10: Vergleich transienter Messungen mit im Fließsystem durchgeführten Messungen bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten. Die im Fließsystem gemessenen Meßpunkte sind mit Symbolen gekennzeichnet, die transient gemessenen Kurven sind nur als Linien dargestellt.

Mehrfache Wiederholung dieser Messung zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch im Bereich von Vorbeleuchtungsdauern bis zu 20 ms innerhalb gleicher Fließgeschwindigkeiten. Dies deutet weiter auf einen systematischen Fehler aufgrund der gepulsten Vorbeleuchtung der letzten 10 mm hin, der aber nicht zu eliminieren war. Eine Variation der Intensität der Puls-LED von $\pm 5\%$ zeigte keinerlei Veränderungen.

Zur Ermittlung des Korrekturfaktors f_{korrr} der Zeitachse aus Gl. 6.19 S. 49 wurden Induktionskurven unter verschiedenen Bedingungen sowohl transient, als auch im Fließsystem gemessen. Dazu wurden Fluoreszenzabklingkurven nach unterschiedlichen Vorbeleuchtungsdauern aufgenommen und die Fläche unter der jeweiligen Kurve, die zur Gesamtfluoreszenz proportional ist, nach Multiexponentialanalyse aus den Fitparametern gemäß

$$F \propto A = \sum_i \alpha_i \tau_i$$

bestimmt. In Abb. 7.10 sind die Messungen dargestellt. Die durchgezogenen Kurven zeigen die transienten Messungen, die zentrierten Symbole kennzeichnen Meßpunkte,

die im Fließsystem gemessen wurden. Zur optimalen Anpassung an die transient gemessenen Kurven wurde dabei der Korrekturfaktor der Zeitachse ermittelt zu

$$f_{\text{kor}} = 1.1$$

Ähnlich wie bei den vorangegangenen Meßreihen ist zu beobachten, daß das Meßsystem ab einer Vorbeleuchtungszeit von ca. 20 ms Ergebnisse liefert, die sehr genau mit den transienten Messungen übereinstimmen. Im vorderen Bereich der ersten Flexion (J-Phase) weichen die beiden Meßmethoden jedoch voneinander ab. Die Flexion J und das Zwischenminimum D sind in den transienten Messungen nur im Ansatz zu erkennen. Die zeitliche Ausdehnung dieser Intensitätsvariationen liegt jedoch weit über dem Auflösungsvermögen der in Kap. 6.2 beschriebenen Meßapparatur, wenn man nur die Anstiegszeit der Photodiode betrachtet. Hier zeigt sich ein grundsätzlicher Vorteil der Messungen Fließsystems gegenüber der transienten Meßmethode: wird die Fluoreszenzintensität bei geringen Anregungsintensitäten in kurzen Zeitintervallen gemessen, so steigt das Poisson-Rauschen mit sinkender Integrationszeit durch die sinkende Anzahl an Photonen pro Integrationsschritt. Dies wird durch die Transformation des transienten Einschwingvorgangs in viele stationäre Einzelmessungen vermieden.

7.4 Messungen zur Fluoreszenzinduktion

Das folgende Kapitel beschreibt die Messungen zur Fluoreszenzinduktion, die an *Chlorella vulgaris* im hier entwickelten Fließsystem durchgeführt wurden.

Algen wurden unter den identischen Meßbedingungen wie bei den Eichmessungen (Kap. 7.3.5) durch das Fließsystem gepumpt. Durch verschiedene Kombinationen aus Vorbeleuchtungsstrecke und Fließgeschwindigkeit wurden nacheinander 40 verschiedene Vorbeleuchtungsdauern zwischen $t_{\text{bel}} \approx 0$ s (maximale Fließgeschwindigkeit, keine Vorbeleuchtung) und $t_{\text{bel}} \approx 1.5$ s (maximale Vorbeleuchtungsstrecke, minimale Fließgeschwindigkeit) gewählt und Fluoreszenzabklingkurven bzw. Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dabei ist der kleinstmögliche Abstand zwischen zwei Meßpunkten $t_{\text{bel}}^{\text{min}}$ begrenzt durch die minimale Variation der Vorbeleuchtungsstrecke s_{min} bei maximaler Fließgeschwindigkeit v_{max} :

$$\Delta t_{\text{bel}}^{\text{min}} = \frac{\Delta s_{\text{min}}}{v_{\text{max}}} \approx 0.5 \text{ ms.}$$

Eine Serie von Messungen bei diesen 40 Vorbeleuchtungsdauern und ansonsten gleichen Meßbedingungen wird im Folgenden als eine Meßreihe bezeichnet.

7.4.1 Fluoreszenzabklingkurven

Meßreihen mit Fluoreszenzabklingkurven wurden für drei verschiedene Vorbeleuchtungsintensitäten ($I_1 = 24 \text{ W/m}^2$, $I_2 = 12 \text{ W/m}^2$ und $I_3 = 6 \text{ W/m}^2$) durchgeführt. Sie wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit jeweils mehrfach wiederholt (jeweils 10 Meßreihen bei 24 W/m^2 und 12 W/m^2 , fünf Meßreihen bei 6 W/m^2). Die Meßzeit für jeden einzelnen Meßpunkt betrug 10 Minuten, die anregende Laserintensität wurde während der gesamten Messungen kontrolliert und nachgeregelt. Die Spaltbreite am Monochromator betrug 1 mm bei $I_1 = 24 \text{ W/m}^2$, 3 mm bei $I_2 = 12 \text{ W/m}^2$ und 4 mm bei $I_3 = 6 \text{ W/m}^2$.

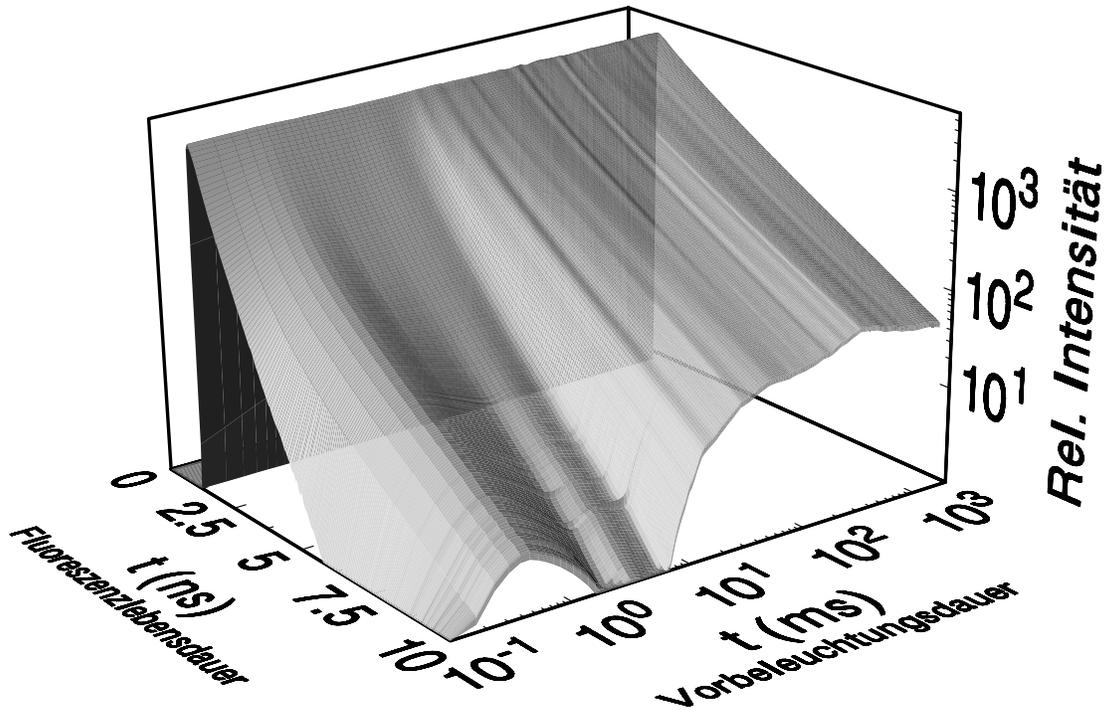


Abbildung 7.11: Fluoreszenzabklingkurven von *Chlorella vulgaris* nach verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern. Entlang der Achse der Vorbeleuchtungsdauer in Millisekunden sind die einzelnen Fluoreszenzabklingkurven in einem Fenster von 10 ns dargestellt. Für die Meßkurve, die ohne Vorbeleuchtung bei maximaler Fließgeschwindigkeit aufgenommen wurde, ist in der logarithmischen Darstellung $t_{\text{bel}} = 0.1 \text{ ms}$ gesetzt.

In Abb. 7.11 ist eine solche Meßreihe bei der maximalen Vorbeleuchtungsintensität von $I = 24 \text{ W/m}^2$ exemplarisch dreidimensional dargestellt. Alle Abklingkurven wurden mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen mit den Amplituden α_i und den Abklingzeiten τ_i gefittet ($i = 1, 2, 3$), dabei lag χ_{red}^2 jeweils zwischen 0.8 und 1.2.

Während der Fits wurde die Zeitkonstante τ_3 , die dem PSI zugeordnet wird und somit von der Fluoreszenzinduktion nicht beeinflusst wird, bei 80 ps festgehalten (vgl.

Kap. 4.1). Aufgrund der hohen Anzahl an freien Parametern ist die Sicherheit der ermittelten Fitparameter jedoch nicht sehr hoch, trotz eines vorgegebenen Konvergenzradius von 10^{-8} können einzelne Parameter beim Fit entweder in lokalen Minima gefangen werden oder durch die große Breite des Minimums unscharf bleiben. Zur Erhöhung der Signifikanz der Fitparameter wurde daher über mehrere Meßreihen, die bei gleichen Vorbeleuchtungsintensitäten durchgeführt wurden, gemittelt: es wurde das arithmetische Mittel der gefitteten Abklingdauern τ_i von Abklingkurven, die bei gleicher Vorbeleuchtungsdauer und -intensität aufgenommen gebildet. Sämtliche Fits wurden dann mit diesen gemittelten Abklingdauern als feste Parameter wiederholt. Alle Messungen ließen sich mit sehr hoher Güte fitten, die Streuung der übrigen Parameter wurde so verringert und der Verlauf der Fitparameter während der Fluoreszenzinduktion wurde jeweils deutlich glatter. Weiterhin wurde trotz einer Abhängigkeit der Fluoreszenzamplituden von extrinsischen Parametern wie Meßzeit und Meßgeometrie sowie Probenkonzentration im Weiteren versucht, die im freien Fit leicht schwankende (ca. $\pm 10\%$) Amplitude α_3 ebenfalls im Fit festzuhalten, da die eine Mittelung über Fluoreszenzquantenausbeute des PSI $\phi_3 = \alpha_3 \cdot \tau_3$ konstant bleibt. Um auch hier eine Mittelung über mehrere Meßreihen, die bei gleichen Vorbeleuchtungsintensitäten durchgeführt wurden, durchführen zu können, wurden mußten die verschiedenen Meßreihen zuvor untereinander skaliert werden. Durch verschiedene Algenkonzentrationen in verschiedenen Meßreihen können sich trotz jeweils gleicher Meßdauer die Kurven um einen Faktor unterscheiden. Daher wurden alle Meßkurven innerhalb einer Meßreihe mit der normierten Fluoreszenzquantenausbeute bei $t_{\text{bel}} = 0$ skaliert. Die daraus erhaltenen Amplituden α_3 wurden gemittelt und als fester Wert beim neuerlichen Fit vorgegeben. Dadurch konnte die Streuung weiter verringert und somit die Signifikanz der übrigen Fitparameter deutlich erhöht werden.

In Abbildung 7.12 sind zunächst der Verlauf des Verhältnisses der aus den Fitparametern errechneten mittleren Fluoreszenzlebensdauer zur Gesamtfluoreszenzintensität I_{ges}/τ_m sowie der Verlauf der Gesamtfluoreszenzamplitude $a_{\text{ges}} = \sum_i \alpha_i$ bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten I_{bel} gezeigt. Beide Parameter bleiben über den gesamten Bereich der Fluoreszenzinduktion nahezu konstant. Insbesondere läßt sich also der Intensitätsverlauf der Induktionskurve I_{ges} auch in der Repräsentation der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m darstellen (Abb. 7.14 (a)), was den Übergang von einem extrinsischen zu einem intrinsischen Parameter erlaubt.

Den Verlauf der einzelnen Fitparameter der beiden dem PS II zugeordneten Komponenten mit den Amplituden α_1 und α_2 und den Abklingzeiten τ_1 und τ_2 zeigt Abb. 7.13. Lediglich die Abklingdauer τ_1 zeigt bei einer Vorbeleuchtungsintensität von 6 W/m^2 immer noch eine relativ hohe Streuung, was wahrscheinlich an der geringeren Anzahl an Meßreihen, die zur Mittelung herangezogen wurden, liegt (fünf Meßreihen, bei den beiden anderen Vorbeleuchtungsintensitäten jeweils zehn Meßreihen).

Die Variation der Parameter in Abhängigkeit von der Anregungsintensität I_{bel} ist sehr gering, lediglich bei beiden Abklingzeiten τ_1 und τ_2 zeigt sich ein Effekt im Bereich zwischen $10 \text{ ms} < t_{\text{bel}} < 100 \text{ ms}$, sowie in τ_2 im Bereich bis 10 ms . Die beiden

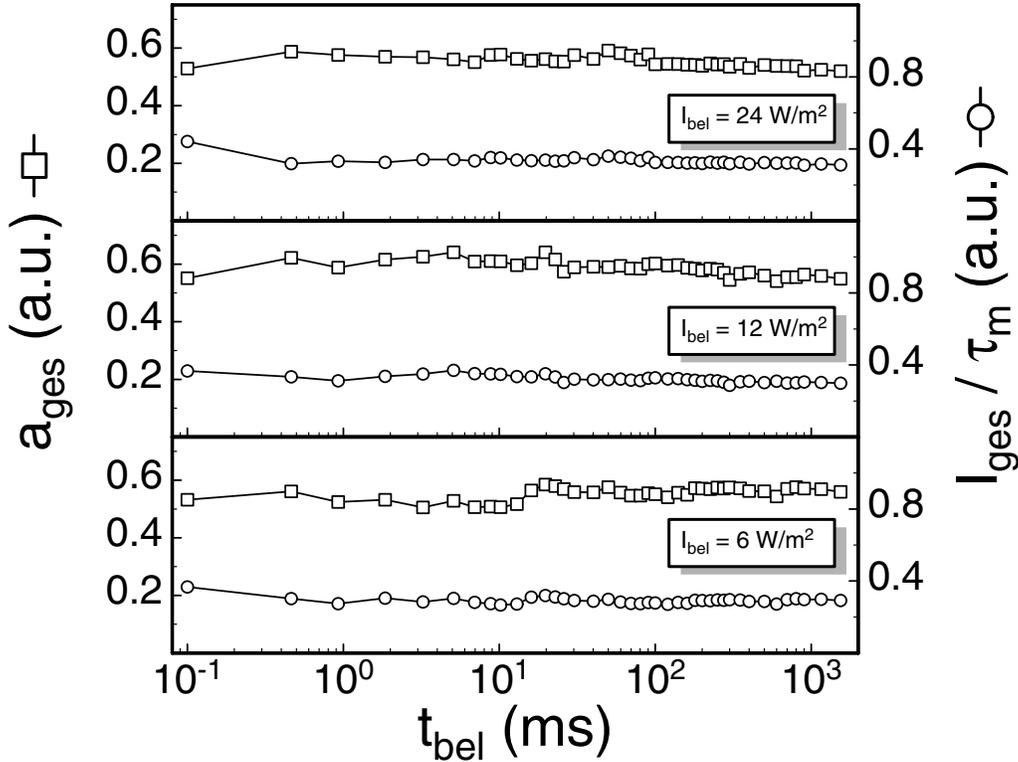


Abbildung 7.12: Fluoreszenzamplitude $a_{\text{ges}} = \sum_i \alpha_i$ und Verhältnis von Fluoreszenzintensität I_{ges} zu mittlerer Fluoreszenzlebensdauer τ_m während der Fluoreszenzinduktion bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten I_{bel} . Die Messungen wurden bei verschiedenen Spaltbreiten am Monochromator durchgeführt und sind daher untereinander nicht skaliert

Abklingzeiten folgen dem Anstieg der Fluoreszenzinduktion, wobei die Flexionen sich vor allem in der längeren Zeit τ_2 widerspiegelt. Der Verlauf des Amplitudenverhältnisses zeigt eine starke Verschiebung zugunsten der ersten Komponente α_1 während der ersten Flexion I und des Zwischenminimums D.

In Abb. 7.14 (b) – (d) sind die nach dem Exzitonen–Radikalpaar–Gleichgewichtsmodell berechneten Übergangsraten (Gl. 4.10 - Gl. 4.12, S. 20) dargestellt. Die Rate für die Ladungstrennung k_1 fällt bis zur ersten Flexion um ca. 30% und bleibt zunächst konstant, bis sie ab $t_{\text{bel}} = 10$ ms stark weiter bis zu ihrem Minimum fällt. Die Rate der Ladungsstabilisierung $k_2 + k_D$ fällt sofort sehr stark ab. Setzt man die strahlungslose Dissipation im Reaktionszentrum k_D als konstant an (Vredenberg, 2000), so kann sie mit dem aus Messungen mit DCMU-behandelten Algen ermittelten Wert bei $k_D \approx 0.6$ festhalten (vgl. Tab. 7.1, S. 52). Das bedeutet, daß die Rate k_2 in diesem Bereich nur noch sehr klein ist und bis auf einen kurzen Anstieg um 8 ms während der gesamten Fluoreszenzinduktion sehr niedrig bleibt. Die Werte für die Rekombinationsrate k_{-1} streuen sehr stark, da die formale Abhängigkeit von den Meßparametern (Gl. 4.11, S. 20) sehr empfindlich ist.

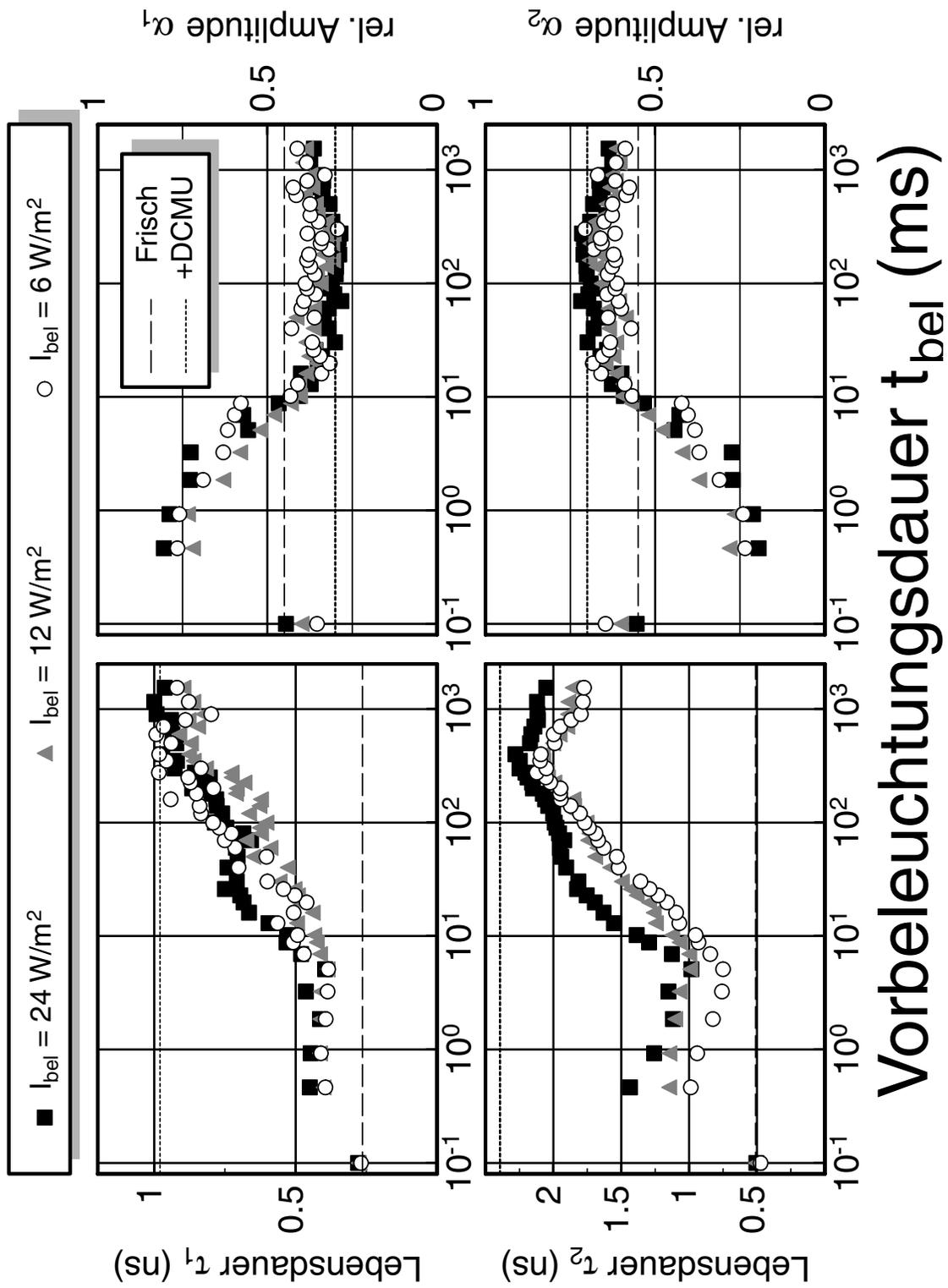
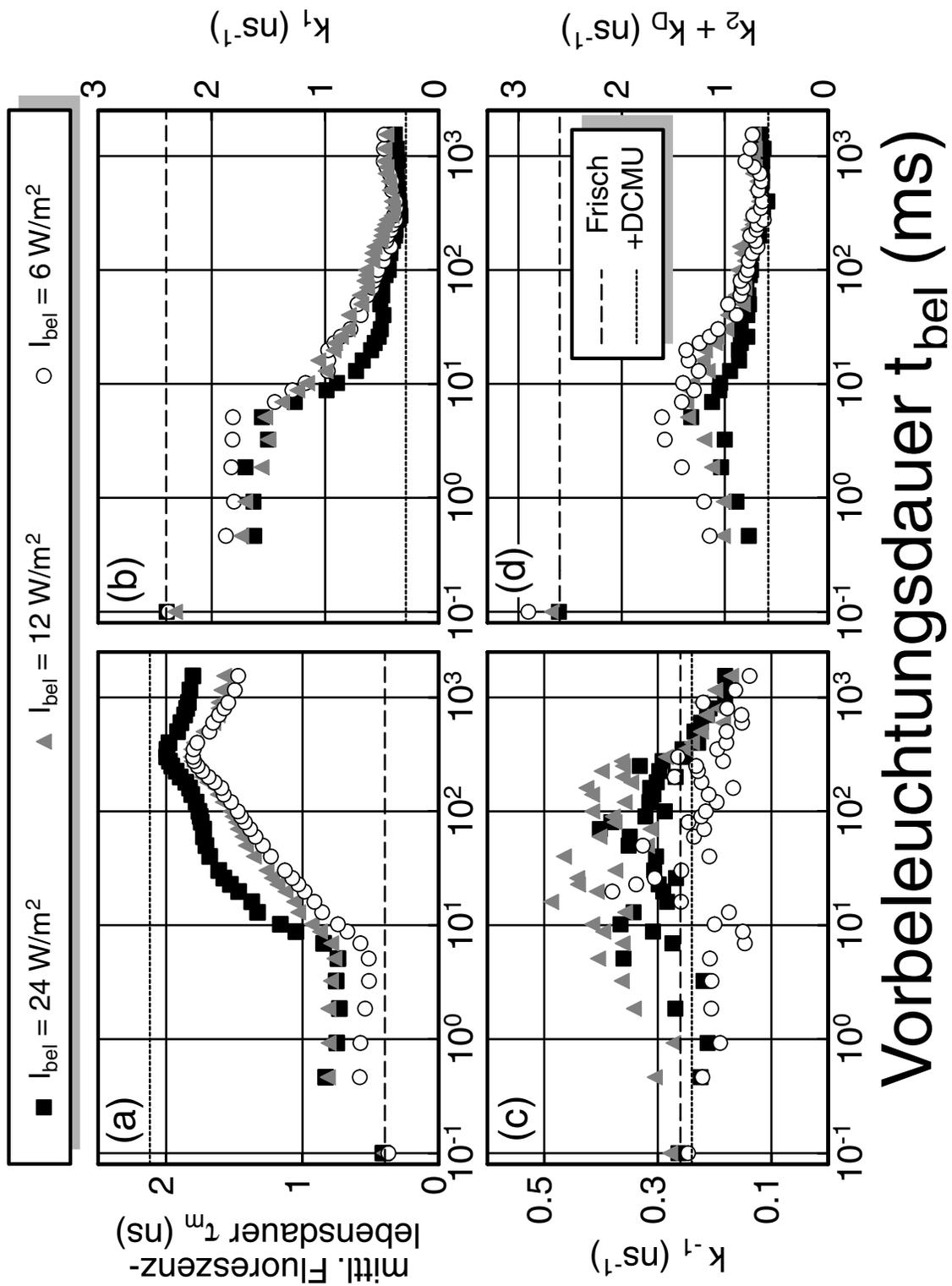


Abbildung 7.13: Fitparameter von Fluoreszenzabklingkurven während der Fluoreszenzinduktion bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten. Als Vergleich sind die Werte für an Meßlicht adaptierte Algen mit und ohne DCMU angegeben.



Vorbeleuchtungsdauer t_{bel} (ms)

Abbildung 7.14: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m und Übergangsraten nach dem Exziton-Radikalpaar-Gleichgewichtsmodell während der Fluoreszenzinduktion. Als Vergleich sind die Werte für an Meßlicht adaptierte Algen mit und ohne DCMU angegeben.

Eine signifikante Abhängigkeit der Übergangsraten von der Vorbeleuchtungsintensität I_{bel} ist hier nur für die Rate k_1 im Bereich von $10 \text{ ms} < t_{\text{bel}} < 100 \text{ ms}$ zu beobachten. Für die Rate $k_2 + k_D$ zeigt sich im Bereich bis $t_{\text{bel}} \sim 30 \text{ ms}$ darüber hinaus eine abnehmende Ausprägung des Zwischenmaximums, die aber lediglich als Tendenz betrachtet werden kann.

Im Folgenden wurden Messungen mit DCMU-vergifteten Grünalgen im Fließsystem durchgeführt, um bei blockiertem Elektronentransport die Mechanismen der Fluoreszenzinduktion auf der Donorseite des PSII möglichst getrennt zu untersuchen. Abbildung 7.15 zeigt eine Vergleichsmessung von im Fließsystem gewonnenen Daten mit transient gemessenen Fluoreszenzinduktionskurven (vgl. Abb. 7.10 ohne DCMU).

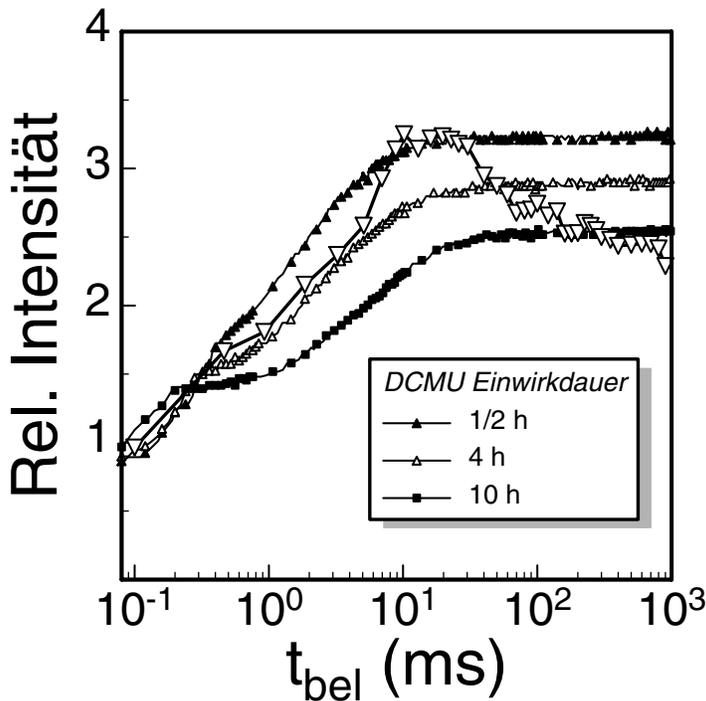


Abbildung 7.15: Vergleich transienter Messungen mit Messungen im Fließsystem aufgenommen bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten unter DCMU-Einfluß. Die im Fließsystem gemessenen Datenpunkte sind mit großen nichtgefüllten Dreiecken (∇) gekennzeichnet, die übrigen Kurven wurden nach verschiedenen Einwirkdauern von DCMU transient gemessen.

Ab dem Erreichen des Fluoreszenzmaximums F_m ist hier eine deutliche Abweichung der Messungen, die im Pumpsystem gewonnen wurden, von den transienten Daten nach halbstündiger Einwirkzeit des DCMU zu beobachten. Obwohl eine komplette Hemmung des Elektronentransportes durch das DCMU vorliegen sollte, scheint die Gesamtfluoreszenz nach dem Erreichen des Maximums P im Gegensatz zur transienten Messung wieder zu sinken. Dies zeigt sich auch in den weiteren transienten Messungen nach längeren Einwirkdauern des DCMU. Die Betrachtung des Verlaufs der einzelnen Fitparameter sowie der mittleren Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzintensität (Abb. 7.16) zeigt aber, daß sich hier nicht lediglich die Algenkonzentration durch Absinken der geschädigten Algen im Vorratsgefäß verringert: auch der intrinsische Parameter τ_m sinkt, wobei die Proportionalität zur

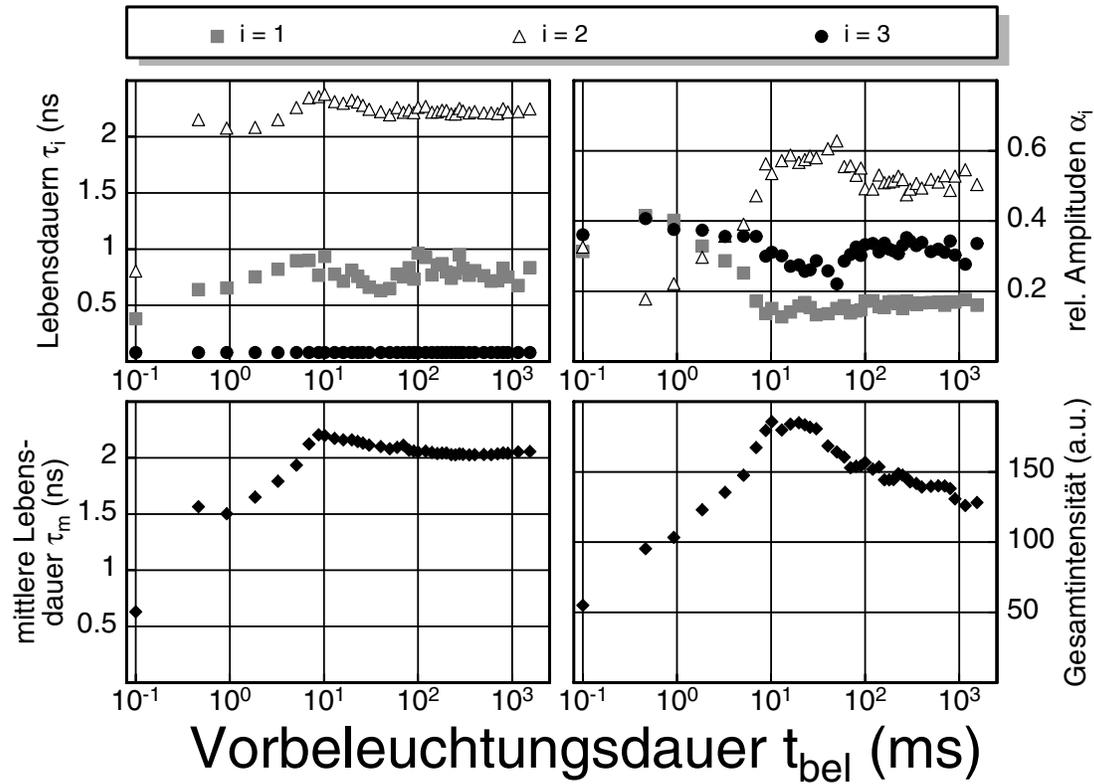


Abbildung 7.16: Fitparameter von Fluoreszenzabklingkurven während der Fluoreszenzinduktion unter DCMU-Einfluß

Gesamtfluoreszenzintensität jedoch verloren geht. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der langen Einwirkdauer des DCMU. Der Zustand der Algen kann nicht über die Zeit einer gesamten Meßreihe (etwa dreizehn Stunden) konstant gehalten werden: neben der Blockade des sekundären Chinons Q_B kommt es offenbar zu weiteren Schädigungen am Photosyntheseapparat der Algen. Da Teilmessungen untereinander kaum skalierbar sind und bei jeder (Teil-)Meßreihe mit DCMU etwa 25 l Grünalgen benötigt werden, können keine Meßreihen über den gesamten Bereich der Induktionskurve berücksichtigt werden. Daher werden nur die Meßpunkte der ersten zwei Stunden bis zu einer Vorbeleuchtungsdauer von etwa 10 ms betrachtet, die aber schon den interessanten Bereich des Anstiegs der Induktionskurve beinhalten.

Es ist bemerkenswert, daß die Induktionskurve auch hier eine Flexion zeigt, die allerdings früher endet als bei Algen ohne DCMU und sich durch eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität F_{sc} bzw. mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m^{sc} auszeichnet. Sie liegt bei

$$\tau_m^{sc} - \tau_m^0 = 0.54 \cdot (\tau_m^m - \tau_m^0), \quad (7.3)$$

wobei τ_m^0 die mittlere Fluoreszenzlebensdauer ohne Vorbeleuchtung und τ_m^m diejenige im Maximum der Induktionskurve ist.

7.4.2 cw-Fluoreszenzspektren

Meßreihen mit cw-Fluoreszenzspektren wurden für zwei verschiedene Vorbeleuchtungsintensitäten ($I_1 = 12 \text{ W/m}^2$ und $I_2 = 6 \text{ W/m}^2$) durchgeführt. Die Integrationszeit pro Meßpunkt betrug 2 s bei einer Schrittweite von 1 nm, die Spaltbreite am Monochromator betrug 1 mm.

In Abb. 7.17 ist exemplarisch eine Meßreihe bei einer Vorbeleuchtungsintensität von $I_{\text{bel}} = 12 \text{ W/m}^2$ dargestellt. Die scheinbaren Nebenmaxima bei Vorbeleuchtungsdauern von $t_{\text{bel}} > 300 \text{ ms}$ sind Artefakte, die durch den großen Fehler bei den dort angewendeten niedrigen Fließgeschwindigkeiten entstehen können (vgl. Kap. 6.4.2).

Sowohl im Bereich der maximalen Fluoreszenzemission um 685 nm als auch im langwelligeren Spektralbereich um 740 nm ist ein Induktionsverhalten zu beobachten.

Betrachtet man das Verhältnis der beiden Emissionsmaxima F685 und F740, so steigt die Fluoreszenz im Hauptmaximum bis zu einer Vorbeleuchtungsdauer von $\sim 20 \text{ ms}$ deutlich stärker an als bei 740 nm. Dieser Effekt verstärkt sich bei höherer Vorbeleuchtungsintensität (Abb. 7.18).

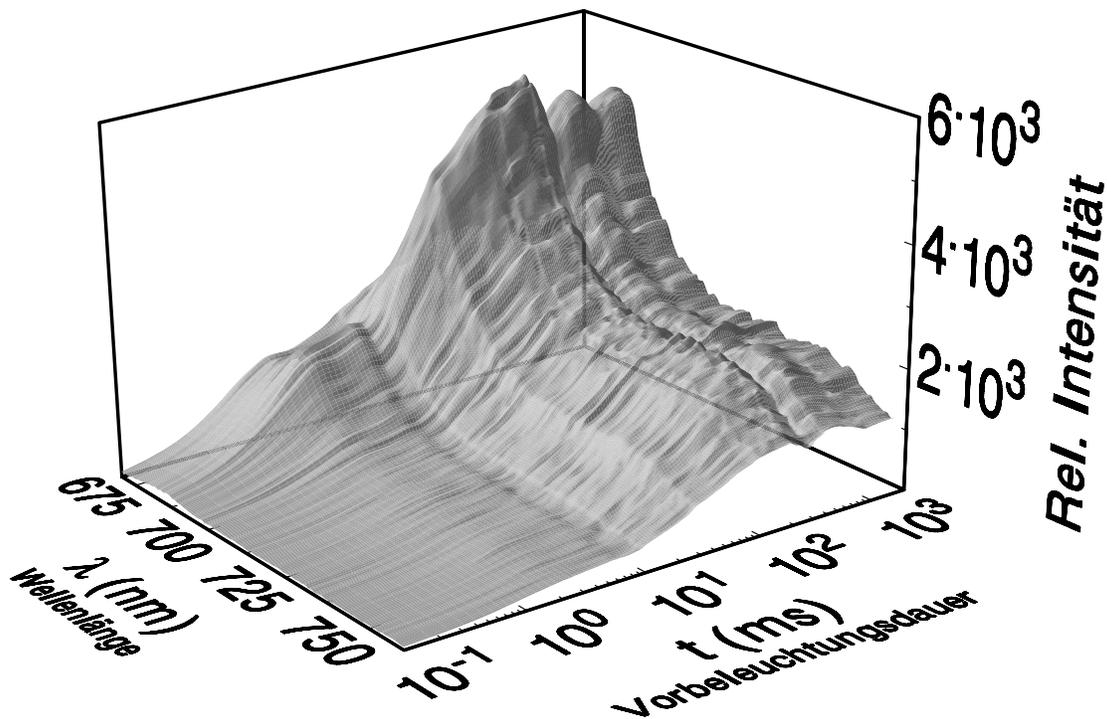


Abbildung 7.17: Korrigierte cw-Fluoreszenzspektren von *Chlorella vulgaris* nach verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern. Für die Meßkurve, die ohne Vorbeleuchtung bei maximaler Fließgeschwindigkeit aufgenommen wurde, ist in der logarithmischen Darstellung $t_{\text{bel}} = 0.1 \text{ ms}$ gesetzt. Die Nebenmaxima bei $t_{\text{bel}} > 300$ sind Artefakte (siehe Text).

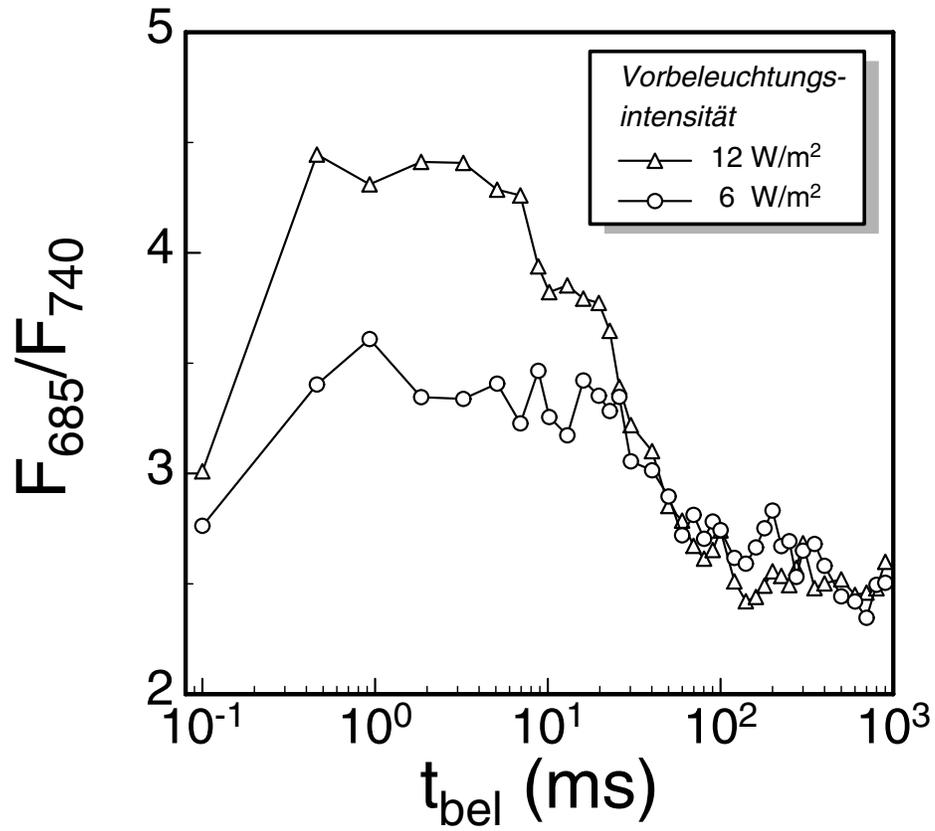


Abbildung 7.18: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm während der Fluoreszenzinduktion bei verschiedenen Vorbeleuchtungsintensitäten.

Kapitel 8

Diskussion

In diesem dreiteiligen Kapitel werden zunächst die Leistungsfähigkeit und Grenzen der neu entwickelten Meßmethoden des optischen Pumpens untersucht. Danach wird die Anwendung zusätzlicher sättigender Pulse zur Untersuchung der Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat diskutiert, und im dritten Teil die Modellvorstellung zur Fluoreszenzinduktion anhand von Messungen im Fließsystem überprüft und besprochen.

8.1 Analyse der Möglichkeiten des optischen Pumpens

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war es, noninvasive Meß- bzw. Präparationsmethoden zu entwickeln, mit denen sich gezielte Zustandsänderungen an photosynthetischen Systemen vornehmen und deren Auswirkungen auf Fluoreszenzparameter untersuchen lassen.

Dazu wurden zwei neue Meßmethoden entwickelt, deren Möglichkeiten in Eich- und Standardmessungen überprüft wurden. Hier werden nun Leistungsfähigkeit und Grenzen dieser Methoden diskutiert.

8.1.1 Methode der zusätzlichen sättigenden Pulsen

Zunächst wurde die Methode des optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen entwickelt, die es unabhängig vom physiologischen Zustand des Organismus erlaubt, Messungen bei blockiertem Elektronentransport aus dem PS II (F_m) vorzunehmen. Im Vergleich der optischen mit der chemischen Blockade konnte gezeigt werden, daß die sättigenden Pulse es ermöglichen, eine vollständige Blockade auf der reduzierenden Seite zu erzeugen und so einen chemischen Eingriff unnötig zu machen (Abb. 7.3, S. 54). Dies ermöglicht Meßreihen, bei denen über einen längeren Zeitraum immer wieder Messungen im normalen und blockierten Zustand am selben

Organismus vorgenommen werden können, ohne weiter in das System einzugreifen oder es sogar zu zerstören.

In weiteren Messungen wurde gezeigt, daß diese neue Methode eine Unterscheidung von Hemmungen auf der oxidierenden und reduzierenden Seite des PS II ermöglicht (Terjung *et al.*, 1995b; Terjung *et al.*, 1997, siehe auch Kap. 8.2).

Das Problem dieser Methode liegt in der Notwendigkeit, die Verschiebegeschwindigkeit der Probe entsprechend der Lage des Maximums der Induktionskurve, die sich von Organismus zu Organismus unterscheidet, genau anzupassen. Weiterhin muß die Probe derart beschaffen sein, daß sie für die notwendige Meßdauer eines Spektrums oder einer Fluoreszenzabklingkurve in den Meßbereich nachgeschoben werden kann, sehr kleine oder flüssige Proben scheiden also aus.

8.1.2 Variables Vorbeleuchtungssystem

Zur Untersuchung der Fluoreszenzinduktion wurde das optische Pumpen mit variabler Pumpdauer entwickelt. Dies wurde mit einem Fließsystem realisiert, das es ermöglicht, dunkeladaptierte Algen für eine definierte Zeit vorzubeleuchten, bevor sie in den eigentlichen Meßbereich fließen. So konnte die Fluoreszenztransiente in viele stationäre Zwischenzustände zerlegt werden, um in jedem dieser Zustände Fluoreszenzabklingkurven und -spektren aufnehmen zu können. In Kap. 7.3 wurde gezeigt, daß dieses Fließsystem bis in den Millisekundenbereich mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit arbeitet.

Darüberhinaus erlaubt der Aufbau genaue Untersuchungen des dunkeladaptierten Zustandes F_0 , in dem die Reaktionszentren aller PSII geöffnet sind. Dies ist mit herkömmlichen Meßmethoden nicht möglich, da selbst geringste Anregungsintensitäten bereits eine Veränderung dieses Zustandes hervorrufen (Kap. 7.3.4).

Weiterhin wurde in Kap. 6.4.2 generell gezeigt, daß in ähnlich gearteten Fließsystemen unbedingt darauf geachtet werden muß, die Fließgeschwindigkeit so hoch zu halten, daß sich eine turbulente Rohrströmung ausbildet. Bei laminarer Strömung wäre die mittlere Durchflußzeit mit einem extrem hohen Fehler behaftet, der mit der durchflossenen Strecke zunimmt, da dann alle Teilchen mit gleichbleibender Geschwindigkeit $v(r)$ bei gleichbleibendem Abstand von der Rohrmitte r durch das System fließen würden.

Für die Anwendung dieser Methode scheiden feste Proben, wie z.B. Blätter aus: wollte man Blätter mit einer Zeitauflösung im Bereich von Millisekunden variabel vorbeleuchten müßten sie entsprechend schnell durch eine Vorbeleuchtungsstrecke geschoben werden. Bei Meßzeiten von mehreren Minuten kann so, begrenzte Größe von Blättern, nicht ständig dunkeladaptiertes Blattmaterial nachgeführt werden. Die weiteren Grenzen des Fließsystems liegen in der begrenzten Auflösung, der maximal erreichbaren Vorbeleuchtungsdauer und der maximalen Vorbeleuchtungsintensität. Die ersten beiden Parameter könnten mit einem technisch entsprechend höheren Aufwand relativ einfach optimiert werden, indem einerseits mit einer leistungsfähigeren Pumpe für eine höhere Fließgeschwindigkeit gesorgt und anderer-

seits die Fließstrecke verlängert wird. Einer Erhöhung der Vorbeleuchtungsintensität hingegen sind Grenzen gesetzt. Für viele Messungen wäre eine Vorbeleuchtungsintensität von 1000 W/m^2 und mehr interessant, eine sehr homogene Beleuchtung der relativ langen Strecke mit einer 50fach höheren Intensität ist jedoch nicht ohne weiteres realisierbar. So ist einerseits die optische Ausgangsleistung von LEDs begrenzt, andererseits lassen sich rein geometrisch nicht beliebig viele kommerziell erhältliche LEDs um die Fließkapillare anordnen.

8.2 Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat

Die Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat lassen sich in drei Phasen untergliedern (Abb. 7.5, S. 56). Bis zu einem relativen Massenverlust von $\Delta m_{\text{rel}} \approx 70\%$ sind in den Messungen sowohl mit als auch ohne zusätzliche sättigende Pulse nur geringe Änderungen in den Fluoreszenzparametern zu beobachten. Ein Einlegen eines Blattes mit $\Delta m_{\text{rel}} < 70\%$ in Wasser führt zur vollständigen Wiederherstellung der Fluoreszenzparameter wie zu Beginn der Messung. Erstaunlicherweise nimmt der Photosyntheseapparat also trotz des hohen Grades an Dehydrierung bis zu diesem Zeitpunkt keinen irreversiblen Schaden. Dies ist in Übereinstimmung mit Fluoreszenz- und Gasaustauschmessungen von Stuhlfauth *et al.* (Stuhlfauth *et al.*, 1988). Die Auswirkungen konkurrierender Prozesse wie z.B. Photoinhibition konnten durch die Meß- bzw. Trocknungsbedingungen minimiert werden (vgl. Kap. 7.2.1).

Der Anstieg der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m nach länger anhaltendem Wasserstreß zeigt eine beginnende Hemmung des Elektronenflusses aus dem PSII wie er unter DCMU-Einwirkung zu beobachten ist (Terjung *et al.*, 1997). Dies ist wahrscheinlich die Folge des Zusammenbruchs des D1-Kreislaufs, es wird kein ausreichendes D1-Protein nachgebildet, der Anteil an zerstörtem D1 verdoppelt sich (Moran *et al.*, 1994). Eine weitere Bestätigung findet sich in Experimenten an einer Mutante mit fehlendem Wasserspaltungskomplex (Bowyer *et al.*, 1992). Bowyer *et al.* stellten fest, daß ohne aktive Wasserspaltung kein D1-Protein umgesetzt wird.

Jedoch werden die Fluoreszenzparameter eines DCMU-vergifteten Blattes nie erreicht, sondern τ_m fällt in den Messungen ohne sättigende Pulse innerhalb weniger Stunden auf Werte, wie sie bei gesunden Blättern gemessen werden. Daher muß ein neuer quenchender Prozeß einsetzen. Bereits in Vorarbeiten (Berg, 1995; Berg *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 1997) wurde daher angenommen, daß dieses Fluoreszenzquenching ein durch Wassermangel induziertes Elektronendefizit auf der oxidierenden Seite des PSII als Ursache hat: das P 680 kann angeregt werden, Ladungstrennung und -stabilisierung (Reduktion des primären Chinons Q_A) finden statt (vgl. Abb. 4.3):



Das oxidierte Reaktionszentrum P 680⁺ kann jedoch nicht wieder reduziert werden und kann so nicht erneut ein Photon absorbieren. Somit kann keine erneute Ladungstrennung stattfinden, es kann nicht zu einer Besetzung der Form



kommen, die unter DCMU-Einfluß durch die starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Pheo⁻ und dem Q_A⁻ für die hohe Wiederbesetzung des strahlenden Zustands verantwortlich ist. Es kommt zu einer Stabilisierung des Radikalpaars P 680⁺ Pheo⁻. Dadurch sinkt die Rate k_{-1} der Rekombination unter Besetzung des strahlenden Zustands zugunsten der Rate k_D der strahlungslosen Rekombination (Krieger *et al.*, 1992; Krieger und Weis, 1992).

Diese Hypothese wird nun durch die Messungen mit zusätzlichen sättigenden Pulsen bestätigt: Nach der ersten Phase, in der nur sehr geringe und reversible Änderungen in den Fluoreszenzabklingkurven zu beobachten sind, sinkt der Einfluß der sättigenden Pulse auf die Meßergebnisse, es werden nahezu identische Fluoreszenzparameter ermittelt, wie ohne sättigende Pulse. Ein Vergleich dieser Meßergebnisse mit in derselben Arbeit veröffentlichten Messungen nach DCMU-Inhibition auf der reduzierenden Seite des PSII sowie nach einem künstlich herbeigeführten Elektronendefizit auf der oxidierenden Seite des PSII durch Anwendung von 10⁻¹ M Hydroxylamin (NH₂OH) (Canaani *et al.*, 1986) zeigt die Ursache: Das Absinken der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m , sowohl mit als auch ohne zusätzliche Pumpulse, liegt in dem oben beschriebenen Elektronenmangel; zwar führen beide Arten der Hemmung der oxygenen Photosynthese zu einem Verschwinden der Wirkung der Pumpulse, im Falle des Elektronendefizits werden jedoch Fluoreszenzparameter wie die eines frischen Blattes gemessen, wohingegen die Anwendung von DCMU zu den bekannt langen Fluoreszenzlebensdauern führt (Terjung *et al.*, 1997).

8.3 Analyse der Fluoreszenzinduktion

8.3.1 Fluoreszenzabklingkurven

Bei der Auswertung der Fluoreszenzabklingkurven, die nach verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern während der Fluoreszenzinduktion aufgenommen wurden, konnten alle Meßkurven mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen gefittet werden. Trotz der Heterogenität des PSII scheint eine Berücksichtigung weiterer Komponenten (für PSII_β-Zentren) nicht notwendig zu sein, da überwiegend PSII_α-Zentren angeregt werden: neben der geringeren Größe der Antennen bei den PSII_β-Zentren trägt auch die Anregung bei 650 nm zu einer noch selektiveren Anregung bei, da verstärkt in das Chl *b* eingestrahlt wird, das den β-Zentren fehlt. Es wurden von anderen Gruppen zwar auch Versuche unternommen (Roelofs *et al.*, 1991), zusätzliche Raten für PSII_β-Zentren zu berücksichtigen, jedoch steigt die Unsicherheit einzelner Komponenten mit der Anzahl freier Parameter so stark an, daß hier versucht wurde, mit möglichst wenigen Parametern auszukommen.

Zunächst konnte für den gesamten Verlauf der schnellen Phase der Fluoreszenzinduktion festgestellt werden, daß die gefittete Gesamtamplitude ($a_{\text{ges}} = \sum_i \alpha_i$) der Fluoreszenzabklingkurven bei allen Vorbeleuchtungsintensitäten nahezu konstant bleibt (Abb. 7.12, S. 66). Da diese Fluoreszenzamplitude proportional zur Anzahl angeregter (strahlender) Antennenmoleküle direkt nach einer Anregung ist, kann daraus geschlossen werden, daß sich der Absorptionswirkungsquerschnitt des Gesamtsystems aller photosynthetischer Antennen nicht wesentlich ändert. Ebenfalls konstant bleibt das Verhältnis zwischen der Gesamtfluoreszenzintensität I_{ges} und der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m , was bei Betrachtungen der Fluoreszenzquantenausbeute den Übergang von der extrinsischen Größe Intensität zur intrinsischen Größe Abklingdauer erlaubt.

Während der Fluoreszenzinduktion steigt τ_m direkt mit Einsetzen der Vorbeleuchtung an und bleibt bis zu einer Vorbeleuchtungsdauer von $t_{\text{bel}} \sim 8$ ms konstant, wobei das Niveau mit steigender Vorbeleuchtungsintensität etwas höher liegt. Dieses quasistationäre Niveau wird im Folgenden als Zustand F_{sc} bezeichnet. Es ist auch im Verlauf der Übergangsraten der Ladungstrennung k_1 und der Ladungsstabilisierung $k_2 + k_D$ zu beobachten (Abb. 7.14, S. 68). Dabei bleibt k_1 unabhängig von der Vorbeleuchtungsintensität noch sehr hoch im Vergleich, die Rate $k_2 + k_D$ fällt hingegen sofort stark ab, steigt aber zu einem Zwischenmaximum an, dessen Ausprägung bei niedrigeren Intensitäten steigt.

Wie im Meßkapitel bereits erwähnt, ist die Unsicherheit in der Rate der Rekombination k_{-1} aufgrund der formalen Abhängigkeit von den Fitparametern recht groß, für die weitere Betrachtung ist eine Abschätzung von k_{-1} jedoch notwendig. Dazu wird das Amplitudenverhältnis der beiden Exponentialfunktionen, mit denen die Fluoreszenz des PSII beschrieben wird, eingehender betrachtet. Im Zustand F_{sc} verschiebt sich dieses Verhältnis stark zugunsten der ersten Komponente α_1 . Da sich die Änderung einzelner Fitparameter nicht direkt in eine Auswirkung auf Übergangsraten übersetzen läßt (vgl. Gl. 4.6 - Gl. 4.9, S. 19), werden die Raten nun auf ihre Abhängigkeit vom Amplitudenverhältnis α_1/α_2 untersucht (vgl. Gl. 4.10 - Gl. 4.12, S. 20). Da für die Summe der relativen Amplituden $\alpha_1 + \alpha_2 = 1$ gilt, kann im Folgenden die äquivalente Repräsentation durch die Amplitude α_2 der zweiten Komponente mit der längeren Lebensdauer τ_2 gewählt werden.

Stellt man die drei Übergangsraten als Funktion von α_2 dar, so läßt sich die Abhängigkeit von den beiden Abklingdauern τ_1 und τ_2 in Diagrammen verdeutlichen, indem man für fest gewählte Abklingdauer-Tupel (τ_1, τ_2) die Raten für alle theoretisch möglichen Amplituden $0 \leq \alpha_2 \leq 1$ berechnet. So erhält man *Abklingdauer-Tupel-Isolinien*, die alle denkbaren Werte der Raten für feste Abklingdauern zeigen. In Abb. 8.1 sind solche $k_i(\alpha_2)$ -Diagramme abgebildet. Es wurden Isolinien für Abklingdauer-Tupel von frischen Algen (F_0) und DCMU-behandelten Algen (F_m) berechnet, sowie die gemessenen Punkte mit dem tatsächlichen Amplitudenverhältnis eingetragen. Zusätzlich sind die Isolinien und Meßpunkte für den Zustand F_{sc} (Abklingdauern aus Abb. 7.13, S. 67) für verschiedene Vorbeleuchtungsintensitäten angegeben, der experimentell abgedeckte Bereich wurde grau eingefärbt. Wie sich

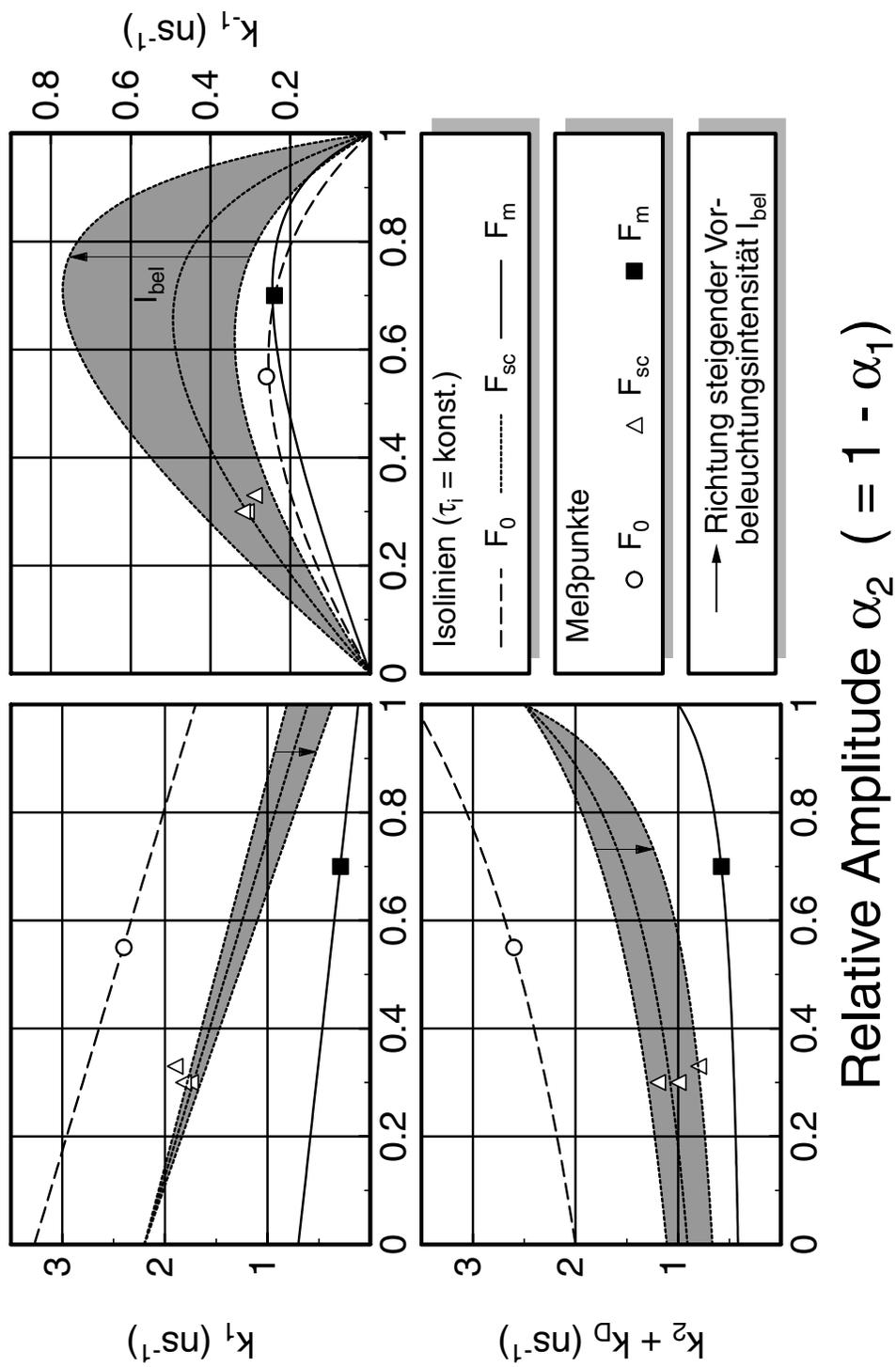


Abbildung 8.1: Übergangsraten in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 .

zeigt, fällt hier die Rekombinationsrate k_{-1} im Zustand F_{sc} sogar für die beobachteten Minimalamplituden ($\alpha_2^{\min} = 0.2$ bei $I_{\text{bel}} = 24 \text{ W/m}^2$ und $\alpha_2^{\min} = 0.25$ bei $I_{\text{bel}} = 6 \text{ W/m}^2$) nicht unter Werte der Rate k_{-1} im Zustand F_0 (die formale Ursache liegt in der von der Vorbeleuchtungsintensität unabhängigen Abklingdauer $\tau_2 \sim 400 \text{ ps}$). Subtrahiert man von der Rate $k_2 + k_D$ den konstanten Anteil $k_D = 0.6 \text{ ns}^{-1}$, so sieht man, daß k_{-1} insbesondere bei höheren Vorbeleuchtungsintensitäten größer als die Rate k_2 werden kann. Damit sind die Bedingungen erfüllt, die Vredenberg für den halbgeschlossenen Zustand in seinem Drei-Zustands-Modell des PS II postuliert (Vredenberg, 2000, siehe Kap. 4.3.2): nach einem sogenannten *single turnover*, der Absorption eines Photons, Ladungstrennung und -stabilisierung, befinden sich alle PS II im halbgeschlossenen Zustand (Abb. 4.8 (d), S. 29).

Die 100 %-ige Besetzung des halbgeschlossenen Zustands gilt jedoch nur für hohe Anregungsintensitäten, d.h. wenn die Exzitonenerzeugungsrate deutlich höher ist als die Rate k_2 . Bei geringen Anregungsintensitäten kann sich daher kein stabiler Zustand F_{sc} ausbilden, der Zustand wird durch das Schließen halbgeschlossener Zentren und durch Rückreaktionen in den offenen Zustand entvölkert. Dies spiegelt sich im Verlauf der Rate k_2 (Abb. 7.14 (d), S. 68) wieder, die bei niedrigeren Intensität nicht konstant niedrig bleibt.

In den Messungen an DCMU-vergifteten Algen wird durch die Blockade des Elektronentransports aus dem PS II die Rate $k_2 = 0$, alle PS II werden sich nach einem *single turnover* im halbgeschlossenen Zustand befinden. Für diesen Zustand fordert das Vredenberg-Modell eine Fluoreszenzquantenausbeute, die halb so groß ist wie im Zustand F_m (vgl. Gl. 4.30, S. 29). Dies stimmt sehr gut mit dem hier ermittelten Faktor von 0.54 überein (vgl. Gl. 7.3, S. 70).

Abb. 8.2 zeigt dieselben Diagramme wie Abb. 8.1, in denen zusätzlich der Verlauf der einzelnen Raten während der Fluoreszenzinduktion bei einer Vorbeleuchtungsintensität von $I_{\text{bel}} = 12 \text{ W/m}^2$ dargestellt ist. Verfolgt man die Entwicklung der Rate $k_{-1}(\alpha_2)$ mit wachsender Vorbeleuchtungsdauer vom mit dem Kreuz (\times) gekennzeichneten Meßpunkt ($t_{\text{bel}} = 0$) zum letzten Meßpunkt (\diamond , $t_{\text{bel}} = 1.5 \text{ s}$), so fällt zunächst die Amplitude α_2 stark ab, gefolgt von einem Anstieg der Amplitude und der Rate k_{-1} . Danach sinkt die Rate wieder bei gleichbleibender Amplitude. Über die schnelle Phase der Fluoreszenzinduktion ist somit ein Verlauf von $k_{-1}(\alpha_2)$ im Uhrzeigersinn zu beobachten. Als Vergleich ist in Abb. 8.3 die Rate $k_{-1}(\alpha_2)$ aus oben erwähnten Messungen an Erbsenblättern (Terjung *et al.*, 1997) gezeigt, bei denen selektiv entweder die Elektronentransferrate aus der Wasserspaltung zum PS II (NH_2OH) oder der Elektronentransport aus dem PS II (DCMU) gehemmt wurde. Dort kann der zeitliche Verlauf mit steigender Kontaminationszeit der Hemmstoffe beobachtet werden. Vom gemeinsamen Startpunkt (\times , $t_{\text{kont}} = 0$) aus entwickelt sich die Rekombinationsrate k_{-1} zunächst verschieden. Wie zu erwarten ist, sinkt durch den NH_2OH -induzierten Elektronenmangel auf der oxidierenden Seite des PS II sofort die Rekombinationsrate, da das oxidierte P 680^+ nicht wieder reduziert wird, während das erste Elektron über die Chinone in die Elektronentransportkette abgegeben wird (Krieger *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1997). Erst nach längerer Einwirkdauer schädigt

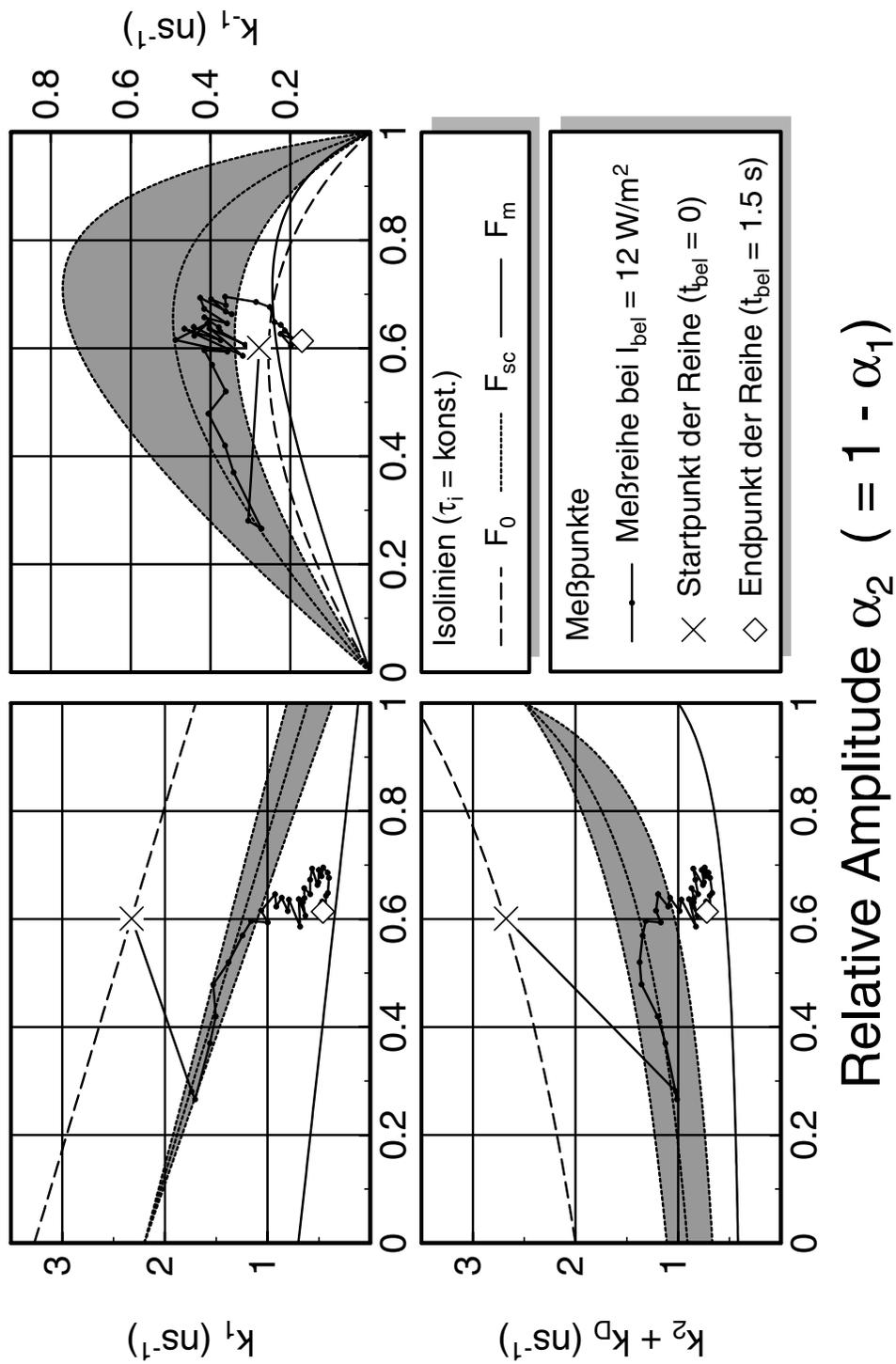


Abbildung 8.2: Übergangsraten in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 während der Fluoreszenzinduktion.

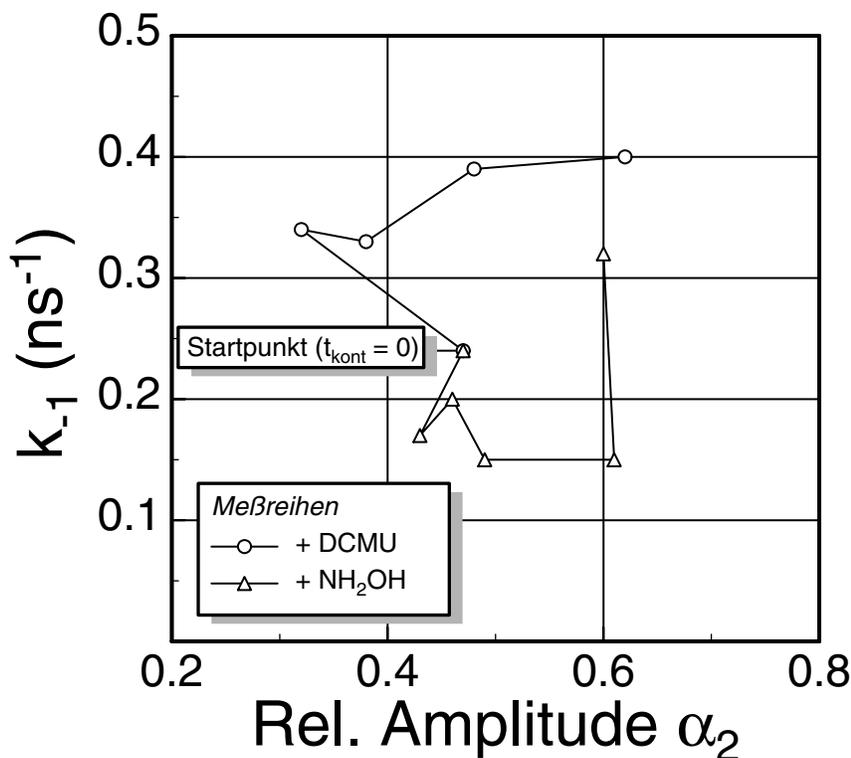


Abbildung 8.3: Rekombinationsrate k_{-1} in Abhängigkeit von der Fluoreszenzamplitude α_2 unter DCMU- und NH_2OH -Einwirkung nach verschiedenen Kontaminationszeiten t_{kont} . Diese Messungen wurden an Erbsen blättern durchgeführt (Terjung *et al.*, 1997).

das NH_2OH ebenfalls die reduzierende Seite des PS II, die Raten nähern sich denen von DCMU-behandelten Blättern an. Es ist deutlich zu sehen, daß $k_{-1}(\alpha_2)$ während der Fluoreszenzinduktion qualitativ den gleichen Verlauf nimmt wie ein Organismus unter DCMU-Einwirkung und sich deutlich vom Verlauf unter NH_2OH -Einfluß mit entgegengesetztem Umlaufsinn unterscheidet.

Bei den hier verwendeten niedrigen Vorbeleuchtungsintensitäten ist also die Hemmung des Elektronenflusses auf der reduzierenden Seite des PS II der dominierende Effekt zur Stabilisierung des Zustands F_{sc} . Bei höheren Anregungsintensitäten müßte sich auch die vom Vredenberg-Modell geforderte niedrige Rate k_{S1} für die Reduktion des P680^+ bemerkbar machen, ein sofortiges Absinken der Rate k_{-1} wäre zu erwarten (vgl. Abb. 4.8, S. 29).

Im Modell von Vredenberg werden die beiden Anstiege in den halbgeschlossenen Zustand und von dort in den geschlossenen Zustand jeweils durch ein Produkt aus zwei Exponentialfunktionen beschrieben (Vredenberg, 2000, S. 33, Gl. 3 u. 4), die bei einer verschwindenden Konnektivität übergehen in exponentielle Anstiege der

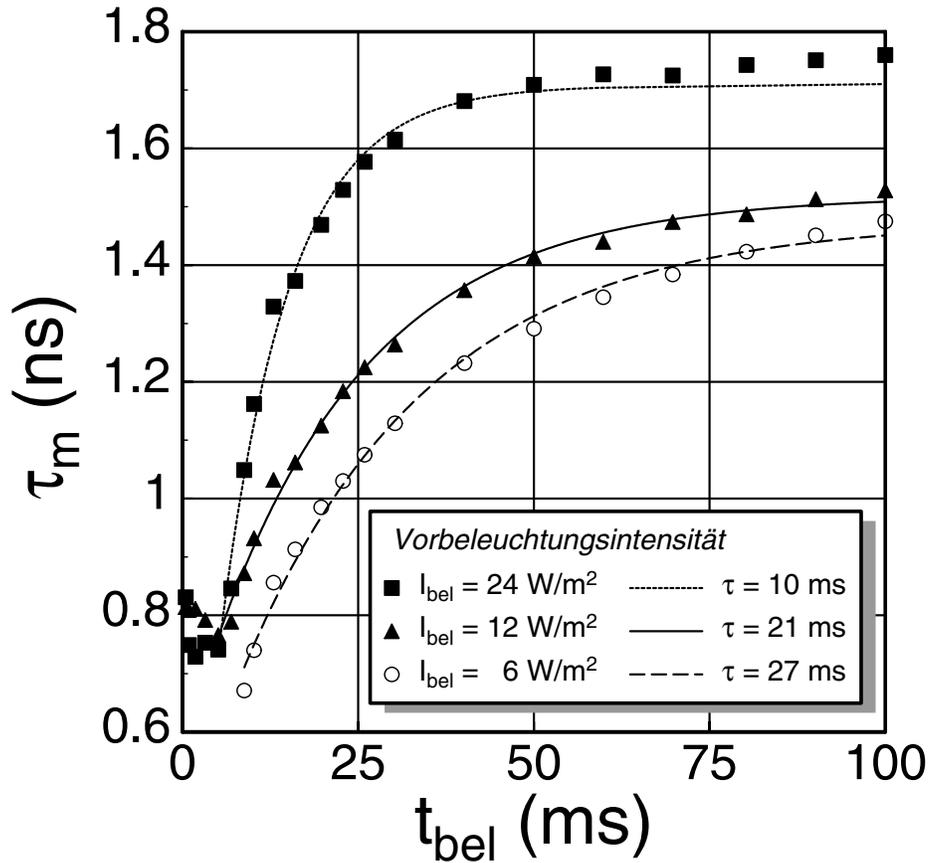


Abbildung 8.4: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer beim Übergang von F_{sc} zu F_m . Die Symbole kennzeichnen Meßpunkte aus Abb. 7.14 (a), die Linien zeigen Exponentialfunktionen gemäß Gl. 8.1. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.99 für alle drei Kurven.

Form

$$F(t) = b \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) \quad (8.1)$$

Der Anstieg von F_0 nach F_{sc} ist mit dem hier entwickelten Fließsystem zeitlich nicht aufzulösen, Vredenberg konnte in derselben Arbeit jedoch eine sehr gute Übereinstimmung des Modells mit transienten Messungen zeigen. Der Übergang vom halbgeschlossenen in den geschlossenen Zustand wird dem Anstieg von der ersten Flexion J zur zweiten Flexion I zugeordnet.

Der weitere Anstieg von I zum Maximum P wird bei DCMU-behandelten Organismen nicht beobachtet. Daher muß dessen Ursache auf der reduzierenden Seite des PSII liegen. Der Anstieg wird mit Änderungen im Fluoreszenzquenching durch den Plastochinon-Pool (Vernotte *et al.*, 1979) in Verbindung gebracht, die Interpretation ist aber im Vredenberg-Modell noch völlig unklar.

Betrachtet man nun die Meßdaten für den Übergang vom halbgeschlossenen Zustand F_{sc} zur zweiten Flexion J ($4 \text{ ms} < t_{\text{bel}} < 100 \text{ ms}$), so ist eine deutliche Abhängigkeit von der Anregungsintensität zu beobachten (Abb. 8.4). Dieser Anstieg läßt sich sehr gut mit einem einfachen exponentiellen Anstieg der in Gl. 8.1

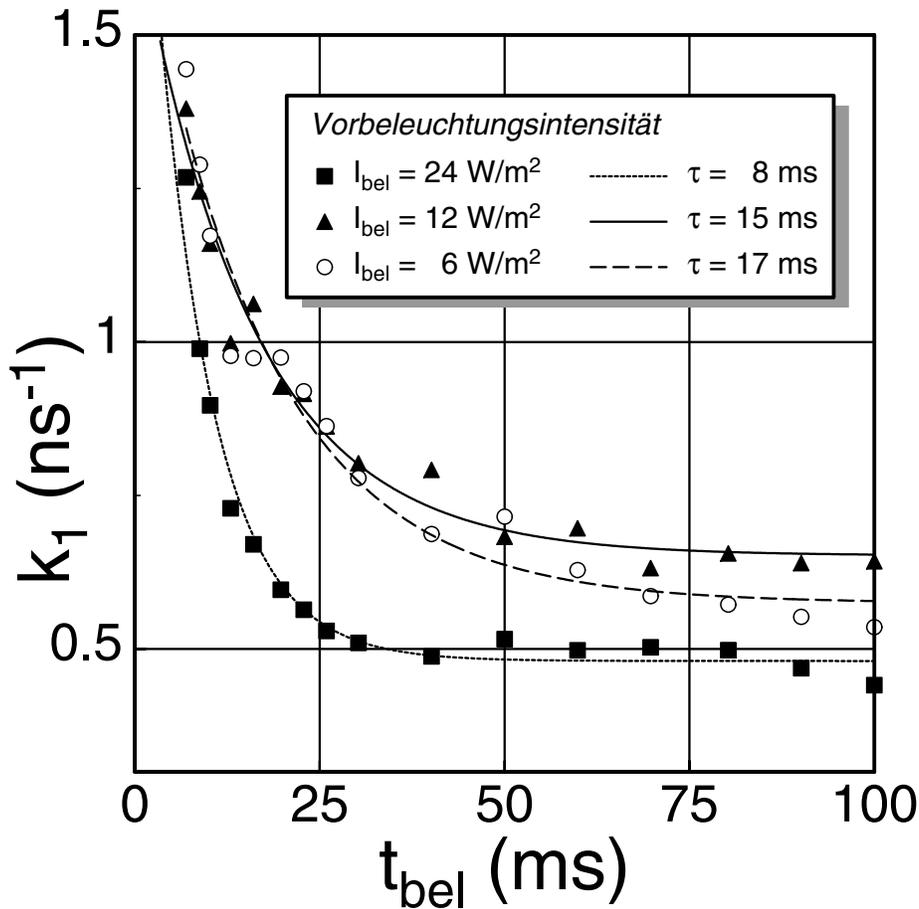


Abbildung 8.5: Rate k_1 für die Ladungstrennung beim Übergang von F_{sc} zu F_m . Die Symbole kennzeichnen aus Meßpunkten berechnete Raten aus Abb. 7.14 (b), die Linien zeigen Exponentialfunktionen gemäß Gl. 8.2. Der Korrelationskoeffizient beträgt zwischen 0.96 und 0.98.

angegebenen Form beschreiben. Bei den hier verwendeten niedrigen Intensitäten und somit niedriger Exzitonenerzeugungsrate läßt sich dieser Übergang also hervorragend durch ein System von getrennten photosynthetischen Einheiten beschreiben. Dies spiegelt sich auch in der Rate für die Ladungstrennung k_1 wieder (Abb. 8.5): sie fällt nahezu monoexponentiell mit ähnlichen Zeitkonstanten, wie die Fluoreszenz zunimmt. Dabei muß Gl. 8.1 modifiziert werden zu

$$F(t) = b \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (8.2)$$

Erst bei höheren Intensitäten könnten nicht mehr alle erzeugten Exzitonen zum direkten Schließen einer PSE genutzt werden, immer mehr Exzitonen besuchen bereits geschlossene PSE, die nichtverschwindende Konnektivität zwischen verschiedenen PSE würde zum Tragen kommen. Messungen bei höheren Vorbeleuchtungsintensitäten wären also sehr interessant, um die Voraussagen des Vredenberg-Modells in Bereichen zu überprüfen, in denen sigmoidale Anstiege erwartet werden.

Interessanterweise scheint der Anstieg von I nach P analog wie in Messungen an DCMU-behandelten Organismen auch bei niedrigeren Vorbeleuchtungsintensitäten zu verschwinden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß sich bei niedrigen Intensitäten die Konzentrationen im Plastochinon-Pool nicht ändern, also alle Elektronen direkt vom PSI aufgenommen werden und sich somit das Fluoreszenzquenching durch den Plastochinon-Pool nicht ändert.

Nach Erreichen des Maximums P der Induktionskurve sinkt die Fluoreszenzintensität über Minuten ab, bis sich ein Gleichgewicht einstellt und die Photosynthese optimal arbeitet. In den hier durchgeführten Messungen ist nur der Beginn des Absinkens zu sehen, zunächst scheint vor allem die Rekombinationsrate k_{-1} unabhängig von der Vorbeleuchtungsintensität zu sinken (Abb. 7.14, S. 68), was im Vergleich mit den oben gezeigten Messungen mit Hydroxylamin auf eine Limitierung der Reduktion des $P680^+$ in diesem Bereich hindeuten könnte. Im weiteren Verlauf pendeln sich auch die Ladungstrennung k_1 und -stabilisierung k_2 über Minuten auf Werte frischer Algen ein (F'_0). Um den weiteren Verlauf der Fluoreszenzinduktion, die sogenannte langsame Phase, im Detail zu untersuchen, wäre es nötig, ein Fließsystem zu entwickeln, in dem längere Vorbeleuchtungsdauern möglich sind. Da eine niedrigere Fließgeschwindigkeit zu sehr großen Fehlern führen würde (vgl. Kap. 6.4.2), wäre dies nur durch eine längere Vorbeleuchtungsstrecke realisierbar.

Vor allem die Ratenbilanz während der ersten Flexion J bestätigt das Modell von Vredenberg sehr gut. Der weitere Anstieg unterstützt das Modell weiter; ohne Messungen der postulierten sigmoidalen Form der Induktionskurve bei höheren Intensitäten kann aber keine eindeutige Aussage getroffen werden.

8.3.2 cw-Fluoreszenzspektren

In den cw-Spektren von frischen und DCMU-vergifteten Algen (Abb. 7.1, S. 52), sowie in den cw-Spektren, die im Fließsystem während der Fluoreszenzinduktion aufgenommen wurden (Abb. 7.17 S. 71), zeigt sich eine Abhängigkeit der Spektren vom Zustand des Photosyntheseapparates, die den erwarteten Variationen bei einem Übergang von offenen zu geschlossenen PSII widerspricht. Ein Schließen des PSII sollte lediglich die Fluoreszenzintensität des PSII erhöhen, während die des PSI unverändert bleiben sollte (vgl. Kap. 4.1). Folglich müßte sich das Intensitätsverhältnis der beiden Emissionsmaxima F_{685} und F_{740} zugunsten des kurzwelligeren Maximums verschieben, da das PSI bei 685 nm nur einen verschwindend geringen Anteil an der Gesamtfluoreszenz hat, wohingegen sein Anteil bei 740 nm bis zu 30% betragen kann (Dau, 1994; Roelofs *et al.*, 1992). Vor allem in den Messungen im Fließsystem zeigt sich jedoch, daß dieses Intensitätsverhältnis nicht den erwarteten Verlauf hat (Abb. 7.18, S. 72).

Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_{Δ} läßt sich durch die Anteile der beiden Photosysteme F_{λ}^I bzw. F_{λ}^{II} an der Gesamtfluoreszenz bei der Wellenlänge λ beschreiben:

$$F_{\Delta}(t) = \frac{F_{685}(t)}{F_{740}(t)} = \frac{F_{685}^{\text{II}}(t) + F_{685}^{\text{I}}(t)}{F_{740}^{\text{II}}(t) + F_{740}^{\text{I}}(t)} \quad (8.3)$$

Dies kann unter der Annahme, daß die PSI-Fluoreszenz bei 685 nm sehr gering ist, vereinfacht werden zu

$$F_{\Delta}(t) = \frac{F_{685}^{\text{II}}(t)}{F_{740}^{\text{II}}(t) + F_{740}^{\text{I}}(t)} \quad (8.4)$$

Hier beschreibt $F_{685}^{\text{II}}(t)$ den bekannten Verlauf der Fluoreszenzinduktion, der bei 685 nm detektiert wurde (Abb. 7.14 (a), S. 68).

Nimmt man nun zunächst die spektrale Verteilung der PSII-Fluoreszenz als zeitunabhängig an, dann unterscheiden sich die Spektren jeweils nur um einen Faktor $c(t)$:

$$F^{\text{II}}(t, \lambda) = c(t) \cdot F^{\text{II}}(\lambda) \quad (8.5)$$

und für jeden beliebigen Zeitpunkt t_i gilt dann

$$F_{740}^{\text{II}}(t_i) = n \cdot F_{685}^{\text{II}}(t_i) \quad (8.6)$$

Damit läßt sich der reziproke Wert von $F_{\Delta}(t)$ vereinfacht darstellen als

$$\frac{1}{F_{\Delta}(t)} = \frac{n \cdot F_{685}^{\text{II}}(t) + F_{740}^{\text{I}}(t)}{F_{685}^{\text{II}}(t)} = n + \frac{F_{740}^{\text{I}}(t)}{F_{685}^{\text{II}}(t)} \quad (8.7)$$

Ist nun darüberhinaus die PSI-Fluoreszenz zeitunabhängig, so kann $F_{740}^{\text{I}}(t)$ durch den konstanten Wert zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ ersetzt werden. Da der Anteil des PSI an der Gesamtfluoreszenz bei 30 % liegt kann so $F_{740}^{\text{I}}(t) = 0.3 \cdot n \cdot F_{685}^{\text{II}}(t_0)$ eingesetzt werden.

Somit erhalte man für $F_{\Delta}(t)$

$$F_{\Delta}(t) = \frac{1}{n} \cdot \left(1 + \frac{0.3 \cdot F_{685}^{\text{II}}(0)}{F_{685}^{\text{II}}(t)} \right)^{-1} \quad (8.8)$$

Im Wesentlichen spiegelt sich in dieser Gleichung der Verlauf der Induktionskurve wider. Setzt man für n und $F_{685}^{\text{II}}(t)$ Meßwerte ein so erhält man den in Abb. 8.6 gezeigten Verlauf für $F_{\Delta}(t)$. Im Vergleich mit den aus den gemessenen cw-Spektren gewonnenen Daten (Abb. 7.18, S. 72) zeigt sich gute Übereinstimmung nur bis zu einer Vorbeleuchtungsdauer von $t_{\text{bel}} \approx 10$ ms. Bei längeren Vorbeleuchtungsdauern dagegen widersprechen sich berechnete und gemessene Daten grundsätzlich.

Daher können nicht gleichzeitig die PSI-Fluoreszenz und die spektrale Verteilung der PSII-Fluoreszenz zeitunabhängig sein. Also gilt

$$\frac{d(F_{685}^{\text{II}}(t)/F_{740}^{\text{II}}(t))}{dt} \neq 0 \quad \text{und/oder} \quad (8.9)$$

$$\frac{dF_{740}^{\text{I}}(t)}{dt} \neq 0 \quad (8.10)$$

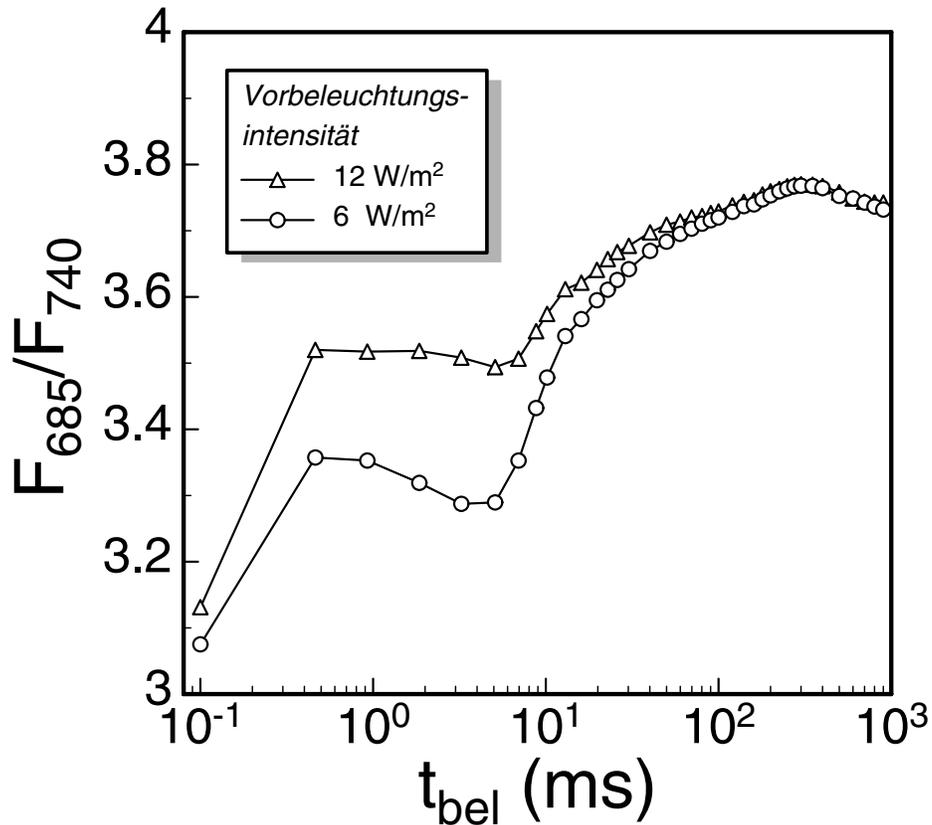


Abbildung 8.6: Berechnetes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm für nach Gl. 8.8. Die Werte für n und $F_{685}^{\text{II}}(t)$ wurden aus Messungen der mittleren Fluoreszenzlebensdauern bei 685 nm entnommen (Abb. 7.14 (a), S. 68)).

Für eine Änderung des Spektrums der PSII-Fluoreszenz nach Gl. 8.9 in dieser Zeitdomäne von ca. 10 ms finden sich keine Hinweise, sie kann aber hier nicht ausgeschlossen werden.

Die zweite Möglichkeit (Gl. 8.10) fordert Fluoreszenzinduktion beim PSI bei 740 nm. Ein solches Induktionsverhalten kann theoretisch durch eine variierende Konzentration oxidierter Reaktionszentren $[\text{P700}^+]$ entstehen: positiv geladene Zentren stehen für eine Anregung nicht zur Verfügung und senken so die Konzentration aktiver, strahlender Zentren. Allerdings wurde in bisherigen Messungen keine PSI-Induktion beobachtet.

Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der Konzentration $[\text{P700}^+]$, so steigt sie zu Beginn der Fluoreszenzinduktion unmittelbar auf ein Maximum an, die Ladungstrennung am PSI findet innerhalb weniger Pikosekunden statt (vgl. Abb. 3.5, S. 13). In Messungen nach kurzer Blitzanregung konnte Haehnel zeigen, daß der Beginn der P700^+ -Reduktion jedoch erst mit einer Verzögerung von 2-3 ms einsetzt (Haehnel,

1984). Diese Verzögerungszeit stimmt sehr gut mit dem Beginn des Schließens der halbgeschlossenen PSII-Zentren überein: ein zweites Elektron wird an das sekundäre Chinon Q_B übertragen, es wird doppelt protoniert und kann abkoppeln, die ersten Elektronen aus dem PSII können an das PSI weitergegeben werden.

Nach dieser Verzögerung könnte simultan zum Anstieg der PSII-Fluoreszenz durch das sukzessive Schließen der Reaktionszentren ein Anstieg der PSI-Fluoreszenz durch die Reduktion der oxidierten Zentren erfolgen. So kann die Intensität der PSI-Fluoreszenz in diesem Bereich in erster Näherung exponentiell ansteigend angesetzt werden als

$$F_{740}^I(t) = \begin{cases} F_{740}^I(0) & \text{für } t < 3 \text{ ms} \\ F_{740}^I(0) \cdot (1 + v_I \cdot [1 - \exp(-t/\tau)]) & \text{sonst} \end{cases} \quad (8.11)$$

Dabei beschreibt der Faktor v_I die Variabilität der Fluoreszenz und τ die Zeitkonstante der Induktion. Setzt man Gl. 8.11 in Gl. 8.7 ein, so läßt sich das Verhältnis der

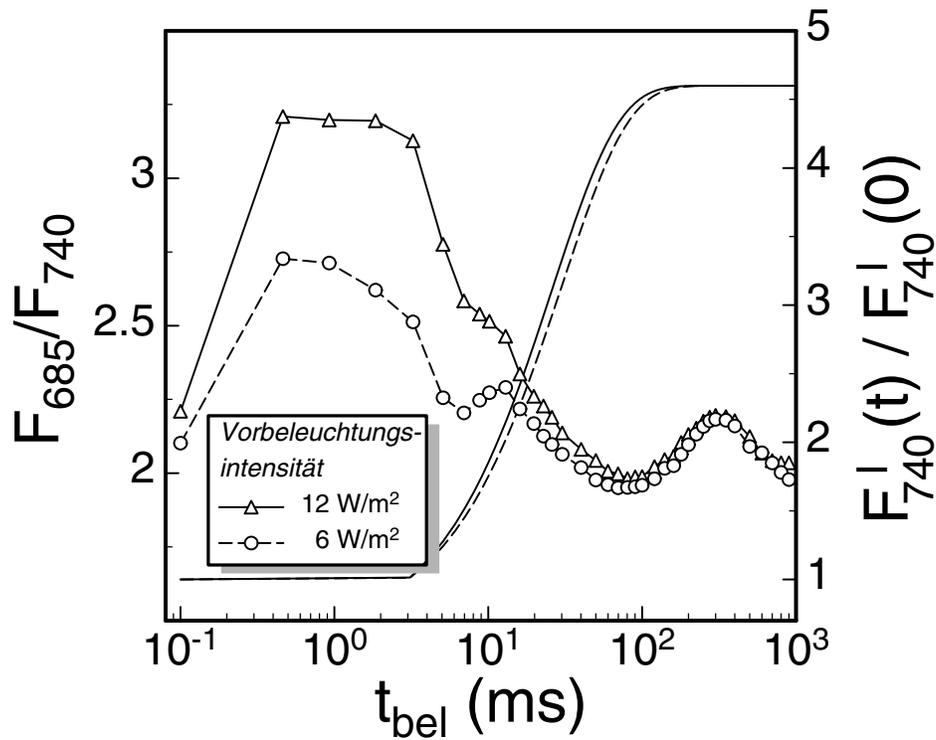


Abbildung 8.7: Berechnetes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 685 nm und 740 nm bei nicht-verschwindender PSI-Induktion gemäß Gl. 8.7 und 8.11. Die relative Fluoreszenz des PSI ist mit den Kurven ohne Symbole gekennzeichnet. Die Zeitkonstanten wurden analog zur PSII-Induktion aus Abb. 8.4 entnommen.

Fluoreszenzintensitäten F_{Δ} erneut aus dem gemessenen Verlauf von $F_{685}^{\text{II}}(t)$ berechnen. Dabei wird $F_{740}^{\text{I}}(0)$ wieder mit 30 % der gesamten Fluoreszenz bei 740 nm zur Zeit $t = 0$ angesetzt. In Abb. 8.7 sind die Ergebnisse für zwei verschiedene Vorbeleuchtungsintensitäten abgebildet. Als Zeitkonstante τ wurde dieselbe Zeitkonstante wie für das Schließen der PS II-Zentren (vgl. Abb. 8.4) angenommen, die Variabilität der Fluoreszenz wurde als freier Parameter mit $v_I = 3.6$ angepaßt.

In den so berechneten Kurven ist eine deutlich bessere Übereinstimmung mit den aus den cw-Spektren gewonnenen Daten auch bei längeren Vorbeleuchtungszeiten zu beobachten.

Jedoch muß dieser Ansatz sehr kritisch betrachtet werden. Mit höheren Zeitkonstanten und/oder einem späteren Einsetzen der PSI-Induktion können die berechneten Daten sogar noch besser an die gemessenen Daten angepaßt werden, es gibt aber keine Hinweise aus der Physiologie oder Messungen anderer Gruppen, die solche Anpassungen rechtfertigen würden. Weiterhin ist, wie bereits erwähnt, bisher kein Induktionsverhalten beim PSI bekannt. Auch in den eigenen Messungen von Fluoreszenzabklingkurven bei 685 nm konnte kein Hinweis für variable Fluoreszenz des PSI gefunden werden (vgl. Kap. 7.4.1). In der Amplitude α_3 der dem PSI zugeordneten Exponentialfunktion ließen sich auch im freien Fit nur zehnpromtente Schwankungen beobachten. Der geringe Anteil des PSI an der Gesamtfluoreszenz bei 685 nm läßt aber keine abschließende Aussage zu.

Diese kritische Betrachtung ändert jedoch nichts an der Gültigkeit der Gleichungen 8.9 und 8.10: um die gemessenen Daten erklären zu können, muß der starke Anstieg von $F_{685}^{\text{II}}(t)$ während der Fluoreszenzinduktion in Gl. 8.4 im Nenner kompensiert werden. Ob diese Kompensation tatsächlich durch PSI-Induktion oder doch durch eine Änderung der spektralen Verteilung der PS II-Fluoreszenz entsteht, kann hier nicht entschieden werden.

Eine weitere denkbare Ursache wäre Fluoreszenz der hier nicht berücksichtigten PS II $_{\beta}$ -Zentren. Aufgrund der Ähnlichkeit der cw-Spektren der beiden Modifikationen des PS II (Roelofs *et al.*, 1992) scheint dies aber unwahrscheinlich zu sein; die Folge wäre nur ein additiver Beitrag in Zähler und Nenner von Gl. 8.4.

Um weitere Hinweise für die tatsächliche Ursache zu finden, könnten Fluoreszenzabklingkurven bei einer Wellenlänge von 740 nm dienen, die während der Fluoreszenzinduktion aufgenommen werden. Durch den deutlich höheren Anteil des PSI an der Fluoreszenz müßte sich dort variable Fluoreszenz in den Fitparametern finden lassen.

Solche Messungen waren im hier entwickelten Aufbau nicht möglich, da einerseits die Photokathode des zur Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven zur Verfügung stehenden Detektors bei dieser Wellenlänge nur noch eine sehr schlechte Quantenausbeute hat, und andererseits die Effizienz der Monochromatorgitter ebenfalls ab etwa 710 nm stark nachläßt.

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Methoden zur gezielten und noninvasiven Präparation und Untersuchung von Zustandsänderungen photosynthetischer Systeme eingeführt. Beide beruhen auf dem Prinzip des optischen Pumpens, bei dem durch geeignete additive Beleuchtung vor, beziehungsweise während der Messung in den Ablauf der Photosynthese eingegriffen wird. So konnten mit diesen Methoden grundsätzlich neue Erkenntnisse zur Funktionsweise des Photosyntheseapparates gewonnen werden.

Die neu entwickelte Methode des optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen ermöglicht es erstmals, Fluoreszenzabklingkurven von Blättern bei geschlossenen Reaktionszentren des Photosystems II aufzunehmen, ohne den Organismus durch eine chemische Blockade zu stören und somit für weitere Messungen unbrauchbar zu machen.

Unter Anwendung dieser Methode wurden die Auswirkungen von Wasserstreß auf den Photosyntheseapparat untersucht. Dabei konnte mit zunehmender Dauer des Wassermangels der zeitliche Verlauf von Hemmungen der Photosynthese aufgezeigt werden und zwischen Schädigungen auf der oxidierenden und der reduzierenden Seite des Photosystems II diskriminiert werden. Es konnte ein Nachweis für die in eigenen Vorarbeiten bereits vorgeschlagene Modellvorstellung der Wirkung von Wasserstreß erbracht werden: erst nach starker Dehydrierung zeigen sich irreversible Schädigungen auf der reduzierenden Seite des Photosystems II, während das Reaktionszentrum selbst sogar bei einem relativen Massenverlust der untersuchten Blätter von 80 % noch intakt ist. Die Ladungstrennung bleibt nach wie vor möglich. Durch das wassermangel-induzierte Elektronendefizit auf der oxidierenden Seite wird die Schädigung auf der reduzierenden Seite des Photosystems II überdeckt: es werden ähnliche Fluoreszenzlebensdauern wie bei intakten Blättern gemessen. Erst mit der Methode des optischen Pumpens mit zusätzlichen sättigenden Pulsen kann eine solche Hemmung auf der oxidierenden Seite detektiert werden.

Das Fließsystem zur variablen Vorbeleuchtung flüssiger Proben ermöglicht es erstmals, detaillierte Fluoreszenzuntersuchungen während des Einschwingvorgangs des Photosyntheseapparates, der sogenannten *O-J-I-P*-Transiente, von dunkelad-

aptierten Grünalgen durchzuführen. Algen können in diesem Fließsystem mit einer Zeitauflösung bis in den Millisekundenbereich für eine definierte Zeit vorbeleuchtet werden und in diesem Zustand sofort in den eigentlichen Probenbereich überführt werden, an dem die Fluoreszenzmessungen vorgenommen werden. Damit kann der nichtstationäre Übergang der Fluoreszenzinduktion in verschiedene stationäre Zwischenzustände zerlegt werden. So können Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzabklingkurven, deren Aufnahme jeweils mehrere Minuten in Anspruch nimmt, nach verschiedenen Vorbeleuchtungsdauern aufgenommen werden, indem die photosynthetische Aktivität dieser Algen in jedem dieser Zwischenzustände festgehalten wird.

Aus den während der Fluoreszenzinduktion gemessenen Fluoreszenzabklingkurven konnten Daten zur Überprüfung eines von Vredenberg neu entwickelten Drei-Zustands-Modells für das Photosystem II gewonnen werden. Der von Vredenberg vorgeschlagene semistabile Zwischenzustand beim Übergang vom offenen zum geschlossenen Reaktionszentrum des Photosystems II konnte experimentell bestätigt werden. Die ermittelte Ratenbilanz für die Be- und Entvölkerung dieses Zwischenzustands erfüllt die geforderten Voraussetzungen. Insbesondere konnten Abschätzungen zur Rate der Ladungsrekombination am Reaktionszentrum gemacht werden, deren Größe aus den üblichen transienten Messungen nicht ermittelbar ist.

Weiterhin konnte aus Messungen an Algen mit biochemisch blockiertem Elektronentransport ermittelt werden, daß im Vergleich zum offenen Zustand die Fluoreszenzquantenausbeute des Zwischenzustands etwa halb so groß ist wie die des geschlossenen Zustands des Photosystems II. Der gemessene Faktor 0.54 stimmt sehr gut mit dem von Vredenberg postulierten Faktor 0.5 überein.

Es konnte nachgewiesen werden, daß sich der weitere Anstieg der Fluoreszenztransienten vom Zwischenzustand zur zweiten Flexion *I* bei niedrigen Anregungsintensitäten mit einem monoexponentiellen Anstieg beschreiben läßt. Daraus kann geschlossen werden, daß in diesem Bereich kein Energieaustausch zwischen benachbarten Photosystemen II stattfindet.

Durch das Verschwinden des *I-P*-Anstiegs der Transienten bei niedrigen Anregungsintensitäten läßt sich, in Analogie zu Messungen bei biochemisch blockiertem Elektronentransport, die Ursache für diesen Anstieg auf die reduzierende Seite des Photosystems II nach dem sekundären Elektronenakzeptor Q_A eingrenzen. Dies deutet darauf hin, daß das Schließen der Reaktionszentren bereits beim Erreichen der Flexion *I* abgeschlossen ist. Dadurch wird eine weitere Forderung der Modellvorstellung Vredenbergs erfüllt.

Als überraschend müssen die Ergebnisse der nach verschiedenen kurzen Vorbeleuchtungsdauern aufgenommenen Fluoreszenzspektren angesehen werden. Es konnte der Nachweis geführt werden, daß sich die Meßwerte nur durch eine bisher nicht bekannte Fluoreszenzinduktion des Photosystems I oder durch eine Änderung der spektralen Verteilung der PSII-Fluoreszenz während der Induktion erklären lassen.

Zur weiteren Überprüfung der Mechanismen während der Fluoreszenzinduktion wäre es interessant, das hier entwickelte Fließsystem bezüglich seiner Spezifikationen zu verbessern:

Eine Erhöhung der Zeitaufösung bis in den Mikrosekundenbereich würde Untersuchungen in der ersten Phase der Fluoreszenzinduktion (Anstieg $O-J$) ermöglichen. Damit könnte die sukzessive Besetzung des halbgeschlossenen Zustands im Vredenberg-Modell überprüft werden.

Zur Untersuchung der begrenzenden Faktoren auf der oxidierenden Seite des Photosystems II während der Fluoreszenzinduktion muß die Anregungsrate und die damit verbundene Konzentration oxidierter Reaktionszentren so hoch werden, daß sie die Rate der Reduktion durch die Wasserspaltung übersteigt. Dazu wäre eine Vorbeleuchtungsstrecke mit deutlich höheren Vorbeleuchtungsintensitäten notwendig. Mit höheren Anregungsdichten könnten auch weitere Informationen zur Konnektivität der Photosysteme II gewonnen werden.

Darüberhinaus könnte so das Vredenberg-Modell bezüglich des Übergangs vom halbgeschlossen in den geschlossenen Zustand des Photosystems II überprüft werden, da bei höheren Anregungsintensitäten ein sigmoidaler Anstieg vorausgesagt wird.

Um eine Erklärung für die hier gemessenen Fluoreszenzspektren zu finden, könnte eine Erweiterung der Detektionseinheit des verwendeten Aufbaus dienen. Eine Messung von Fluoreszenzabklingkurven bei einer Emissionswellenlänge von 740 nm könnte Hinweise zum besseren Verständnis der hierfür verantwortlichen Mechanismen liefern.

Literaturverzeichnis

- Algermissen, J. (1994). Ultrakurze Fluoreszenzspektroskopie zur Charakterisierung von Cyaninfarbstoffen. Doctoral Thesis, C.v.O-University, Oldenburg, Germany.
- Berg, D. (1995). Mobiles Pikosekunden-Fluorimeter zur Analyse der Photosyntheseaktivität grüner Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Oldenburg.
- Berg, D., Maier, K., Otteken, D. und Terjung, F. (1995). Improved sensing of water stress. *Proc. Int. Col. Photosynth. Rem. Sens.*, 1:73–76.
- Berg, D., Maier, K., Otteken, D. und Terjung, F. (1997). Picosecond fluorescence decay studies on water-stressed pea leaves: energy transfer and quenching processes in photosystem 2. *Photosynthetica*, 34(1):97–106.
- Bernhardt, K. und Trissl, H.W. (1999). Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry: how, if at all, can different models of antenna organization be distinguished experimentally? *Biochim. Biophys. Acta*, 1409:125–142.
- Boekma, E.J., Boonstra, A.F., Dekker, J.P und Rögner, M. (1994). Electron microscopic structural analysis of photosystem I, photosystem II and the cytochrome b₆/f complex from green plants and cyanobacteria. *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 26:17–29.
- Boekma, E.J., Wynn, R.M. und Malkin, R. (1990). The structure of spinach photosystem I studied by electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1017:49–56.
- Bowyer, J.R., Packer, J.C.L., McCormack, B.A., Whitelegge, J.P., Robinson, C. und Taylor, M.A. (1992). Carboxyl-terminal Processing of the D1 Protein and Photoactivation of Water-splitting in Photosystem II. *J. Biol. Chem.*, 267(8):5424–5433.
- Butler, W.L. (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 29:345–378.
- Butler, W.L. und Kitajima, M. (1975). Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 376:116–125.

- Butler, W.L., Magde, D. und Berens, S.J. (1983). Fluorescence lifetimes in the bipartite model of the photosynthetic apparatus with α , β heterogeneity in photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(24):7510–7514.
- Butler, W.L. und Strasser, R.J. (1977). Tripartite modell for the photochemical apparatus of green plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:3382–3385.
- Canaani, O., Havaux, M. und Malkin, S. (1986). Hydroxylamine, hydrazine and methylamine donate electrons to the photooxidizing side of Photosystem II in leaves inhibited in oxygen evolution due to water stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 851:151–155.
- Connolly, J.S., Janzen, A.F. und Samuel, E.B. (1982). Fluorescence lifetimes of chlorophyll a: Solvent, concentration and oxygen dependence. *Photochem. Photobiol.*, 36:559–563.
- Dau, H. (1994). Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.*, 60(1):1–23.
- De Las Rivas, J., Shipton, C.A., Ponticos, M. und Barber, J. (1993). Acceptor Side Mechanism of Photoinduced Proteolysis of the D1 Protein in Photosystem II Reaction Centers. *Biochemistry*, 32(27):6944–6950.
- Demmig-Adams, B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1020:1–24.
- Den Hollander, W.T.F., Bakker, J.G.C. und van Grondelle, R. (1983). Trapping, loss and annihilation of excitations in photosynthetic system I. Theoretical aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 725:492–507.
- Fleming, G.R. und Waldeck, D. (1981). Applications of Synchronously Pumped Dye-Lasers to Time-Resolved Emission and Absorption Spectroscopy. *Il Nuovo Cimento*, 28:47–54.
- Forster, R.M., Haker, A. und Schubert, H. (1997). Wavelength dependence of photo-inhibition in the green alga *Chlorella vulgaris*. *Photosynthetica*, 33(3-4):541–552.
- Gerhart, P.M. und Gross, R.J. (1985). *Fundamentals of fluid mechanics*. Addison Wesley Publishing Company, Reading.
- Gerthsen, C., Kneser, H.O. und Vogel, H. (1986). *Physik*. Springer, Berlin.
- Goltsev, V. und Yordanov, I. (1997). Mathematical model for prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica*, 33(3-4):571–586.

- Govindjee (1995a). Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll *a* Fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22:131–160.
- Govindjee (1995b). Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll *a* Fluorescence: Correction. *Aust. J. Plant Physiol.*, 24:711.
- Govindjee und Coleman, W.J. (1992). Oxidation of water to molecular oxygen. In: Abrol, Y.P., Mohanty, P. und Govindjee, Hrsg., *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity*, S. 83–108. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Haehnel, W. (1984). Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 35:659–693.
- Haken, H. und Wolf, H.C. (1992). *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekma, E., Jansson, S. und Barber, J. (1997). Isolation and biochemical characterization of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, 243:422–429.
- Hoff, A.J. und Amesz, J. (1991). Visible Absorption Spectroscopy of Chlorophylls. In: Scheer, H., Hrsg., *Chlorophylls*, S. 723–738. CRC Press, Boca Raton.
- Holzwarth, A.R. (1991). Excited-state kinetics in chlorophyll systems and its relationship to the functional organization of the photosystems. In: Scheer, H., Hrsg., *Chlorophylls*, S. 1125–1151. CRC Press, Boca Raton.
- Horton, P., Ruban, A.V. und Walters, R.G. (1994). Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiol.*, 106:415–420.
- Hsu, B.-D. (1992). A theoretical study on the fluorescence induction curve of spinach thylakoids in the absence of DCMU. *Biochim. Biophys. Acta*, 1140(1):30–36.
- Iqbal, M. (1983). *An introduction to solar radiation*. Academic Press, London.
- Jahns, P. und Trissl, H.-W. (1997). Indications for a dimeric organization of the antenna-depleted reaction center core of Photosystem II in the thylakoids of intermittent light grown pea plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1318:1–5.
- Joliot, P. und Joliot, A. (1964). Etudes cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygene au cours de la photosynthese. *Acad. Sci. Paris*, 258:4622–4625.
- Joliot, P., Joliot, A., Bouges, B. und Barbieri, G. (1971). Studies of system II photocentres by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission. *Photochem. Photobiol.*, 14:287–305.

- Joliot, P. und Kok, B. (1975). Oxygen evolution in photosynthesis. In: Govindjee, Hrsg., *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, London.
- Kautsky, H. und Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, 48:964.
- Keller, W.W.A. (1986). Pikosekunden-Fluoreszenz und Energietransfer von selbst-aggregierten Chlorophyll *a* Molekülen. Dissertation, Universität Oldenburg.
- Krieger, A., Moya, I. und Weis, E. (1992). Energy-dependent quenching of chlorophyll *a* fluorescence: effect of pH on stationary fluorescence and picosecond-relaxation kinetics in thylakoid membranes and Photosystem II preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1102:167–176.
- Krieger, A. und Weis, E. (1992). Energy-dependent quenching of chlorophyll-*a*-fluorescence: The involvement of proton-calcium exchange at photosystem 2. *Photosynthetica*, 27(1-2):89–98.
- Kuhl, A. und Lorenzen, H. (1964). Handling and culturing of *Chlorella*. In: Prescott, D.M., Hrsg., *Methods in Cell Physiology*, S. 152–187. Academic Press, New York, London.
- Kyle, D.J. (1987). The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. und Arntzen, C.J., Hrsg., *Photoinhibition*, Kap. 9, S. 197–226. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).
- Lavergne, J. und Leci, E. (1993). Properties of inactive photosystem II centres. *Photosynth. Res.*, 35:323–343.
- Lavergne, J. und Trissl, H.W. (1995). Theory of Fluorescence Induction in Photosystem II: Derivation of Analytical Expressions in a Model Including Exciton-Radical-Pair Equilibrium and Restricted Energy Transfer Between Photosynthetic Units. *Biophys. J.*, 68(6):2474–2492.
- Lazár, D., Brokeš, M. und Dvořák, L. (1998). Mathematical Modelling of 3-(3',4'-diclorophenyl)-1,1-dimethylurea Action in Plant Leaves. *J. Theor. Biol.*, 191:79–86.
- Lazár, D., Nauš, J., Matouškoveá, M. und Flašorová, M. (1997). Mathematical Modeling of Changes in Chlorophyll Fluorescence Induction Caused by Herbicides. *Pest. Biochem. Physiol.*, 57:200–210.
- Lazár, D. und Pospíšil, P. (1999). Mathematical simulation of chlorophyll *a* fluorescence rise measured with 3-(3',4'-diclorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures. *Eur. Biophys. J.*, 28:468–477.

- Lebedeva, G., Riznichenko, N.E. Belyaeva G.Y., Rubin, A. und Demin, O.V. (2000). Kinetic Model of Photosystem II of Higher Green Plants. *Russ. J. Phys. Chem.*, 74(10):1702–1710.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350–382.
- Maier, K., Didschun, K., Otteken, D., Berg, D. und Terjung, F. (1995). Monitoring of Herbicide Effects and Water Stress on Plants Using the Mobile Picosecond-Fluorimeter. *EARSeL Adv. in Remote Sensing*, 3(3):207–214.
- Melis, A. (1985). Functional properties of photosystem II β in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 807:334–342.
- Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1058:87–106.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V. und Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194:346–352.
- O'Connor, D.V. und Phillips, D. (1984). *Time-correlated Single Photon Counting*. Academic Press.
- Oellerich, S., Berg, D., Maier, K. und Terjung, F. (1999). Influence of molecular oxygen on the chlorophyll fluorescence decay of green algae. *Z. Naturforsch. C*, 54(5-6):348–352.
- Ort, D.R. (1986). Energy Transduction in Oxygenic Photosynthesis: An Overview of Structure and Mechanism. In: Staehelin, L.A. und Arntzen, C.J., Hrsg., *Encyclopedia of Plant Physiology: Photosynthesis III*. Springer-Verlag, Berlin.
- Paillotin, G. (1976a). Capture frequency of excitations and energy transfer between photosynthetic units in the photosystem II. *J. Theor. Biol.*, 58:219–235.
- Paillotin, G. (1976b). Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II. *J. Theor. Biol.*, 58:237–252.
- Pearlstein, R.M. (1982). Chlorophyll singlet excitons. In: Govindjee, Hrsg., *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, S. 293–330. Academic Press, New York.
- Percival, M.P., Weber, A.N. und Baker, N.R. (1984). Evidence for the role of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in photosystem II heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta*, 767:582–589.

- Ressel, L. (1998). Untersuchungen an Sensitizermolekülen. Diplomarbeit, Universität Oldenburg.
- Riznichenko, G., Lebedeva, G., Demin, O. und Rubin, A. (1999). Kinetic Mechanisms of Biological Regulation in Photosynthetic Organisms. *J. Biol. Phys.*, 25:177–192.
- Roelofs, T.A., Gilbert, M., Shuvalov, V.A. und Holzwarth, A.R. (1991). Picosecond fluorescence kinetics of the D₁-D₂-cyt-*b*-559 Photosystem II reaction center complex. Energy transfer and primary charge separation processes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1060:237–244.
- Roelofs, T.A., Lee, C.-H. und Holzwarth, A.R. (1992). Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. *Biophys. J.*, 61:1147–1163.
- Schatz, G.H., Brock, H. und Holzwarth, A.R. (1988). Kinetic and energetic model for the primary processes in Photosystem II. *Biophys. J.*, 54:397–405.
- Schlösser, U.G. (1994). SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen, catalogue of strains 1994. *Bot. Acta*, 107:113–186.
- Seely, G.R. (1973). Effects of spectral variety and molecular orientation on energy trapping in the photosynthetic unit: a model calculation. *J. Theor. Biol.*, 40:173–187.
- Srivastava, A., Strasser, R.J. und Govindjee (1995). Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.*, 43:131–141.
- Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B.J. und Strasser, R.J. (1998). Chlorophyll *a* Fluorescence Induction in Higher Plants: Modelling and Numerical Simulation. *J. theor. Biol.*, 193:131–151.
- Stirbet, A.D. und Strasser, R.J. (1996). Numerical simulation of the in vivo fluorescence in plants. *Mathematics and Computers in Simulation*, 42:245–253.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. und Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, 61(1):32–42.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. und Tsimilli-Michael, M (1998). The Fluorescence Transient as a Tool to Characterize and Screen Photosynthetic Samples. In: Mohanty, Yunus und Pathre, Hrgg., *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation*. Taylor & Francis, London.

- Stuhlfauth, T., Sültemeyer, D.F., Weinz, S. und Fock, H.P. (1988). Fluorescence quenching and gas exchange in a water stressed C₃ plant, *Digitalis lanata*. *Plant Physiol.*, 86:246–250.
- Terjung, F. (1998). Spektroskopische Analyse der Adaptionsmechanismen von Blättern an erhöhte Lichtintensitäten. Dissertation, Universität Oldenburg.
- Terjung, F., Berg, D., Maier, K. und Otteken, D. (1995a). Effects of D1/D2-protein degradation in water stressed leaves of *Pisum sativum*. In: Mathis, P., Hrsg., *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Terjung, F., Berg, D., Maier, K. und Otteken, D. (1995b). Inhibition of the electron transfer at the oxidizing and reducing site of Photosystem II: New insights from fluorescence decay measurements with additional saturating light pulses. *Proc. Int. Col. Photosynth. Rem. Sens.*, 1:143–146.
- Terjung, F., Berg, D., Maier, K. und Otteken, D. (1997). Investigations on the electron transfer processes in photosystem 2. New insights by chlorophyll fluorescence decay measurements with additional saturating light pulses. *Photosynthetica*, 53:29–34.
- Thielen, A.P.G.M., van Gorkom, H.J. und Rijgersberg, C.P. (1981). Chlorophyll composition of photosystem II_α, II_β and I in tobacco chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 635:121–131.
- Trissl, H.W. (1994). A Comment on the Call to Throw Away Your Fluorescence Induction Apparatus - Response. *Biophys. J.*, 66(3):925–926.
- Trissl, H.W., Gao, Y. und Wulf, K. (1993a). Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. *Biophys. J.*, 64:974–988.
- Trissl, H.W., Gao, Y. und Wulf, K. (1993b). Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential-equations describing the primary photochemistry of photosystem-II by an exciton radical pair equilibrium (64: 974-988 1993) - Correction. *Biophys. J.*, 65(2):982.
- Trissl, H.W., Hecks, B. und Wulf, K. (1993c). Invariable trapping times in photosystem I upon excitation of minor long-wavelength-absorbing pigments. *Photochem. Photobiol.*, 57:108–112.
- Trissl, H.W. und Lavergne, J. (1995a). Fluorescence Induction from Photosystem II: Analytical Equations for the Yields of Photochemistry and Fluorescence Derived from Analysis of a Model Including Exciton-Radical Pair Equilibrium

- and Restricted Energy-Transfer between Photosynthetic Units. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22:183–193.
- Trissl, H.W. und Lavergne, J. (1995b). Fluorescence Induction from Photosystem II: Analytical Equations for the Yields of Photochemistry and Fluorescence Derived from Analysis of a Model Including Exciton-Radical Pair Equilibrium and Restricted Energy-Transfer between Photosynthetic Units. *Corrigenda. Aust. J. Plant Physiol.*, 24:711.
- Truckenbrodt, E. (1968). *Strömungsmechanik*. Springer Verlag, Berlin.
- Valkunas, L., Geacintov, N.E. und France, L.L. (1992). Fluorescence induction in green plants revisited; Origin of variabilities in sigmoidicities on different time scales of irradiation. *J. Luminescence*, 51:67–78.
- Valkunas, L., Liuolia, V., Dekker, J.P. und van Grondelle, R. (1995). Description of energy migration and trapping in photosystem I by a model with two distance scaling parameters. *Photosynth. Res.*, 43:149–154.
- Vernotte, C., Etienne, A.L. und Briantais, J.-M. (1979). Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochim. Biophys. Acta*, 545:519–527.
- Vredenberg, W.J. (2000). A Three-State Model for Energy Trapping and Chlorophyll Fluorescence in Photosystem II Incorporating Radical Pair Recombination. *Biophys. J.*, 79(1):26–38.
- Wagner, B., Goss, R., Richter, M., Wild, A. und Holzwarth, A.R. (1996). Picosecond time-resolved study on the nature of high-energy-state quenching in isolated pea thylakoids. Different localization of zeaxanthin dependent and independent quenching mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B*, 36:339–350.
- Weber, T. (1992). Farbstoffmoleküle in Flüssigkeiten und auf Oberflächen: Untersuchung der Wechselwirkung mit Pikosekunden-Spektroskopie. Diplomarbeit, Universität Oldenburg.
- Weidlein, J., Müller, U. und Dehnicke, K. (1982). *Schwingungsspektroskopie*. Thieme, Stuttgart.
- Winkler, U. (1996). *Methodische Anleitungen zum pflanzenphysiologischen Praktikum*. Universität Oldenburg.
- Witt, H.T. (1996). Primary reactions of oxygenic photosynthesis. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 100(12):1923–1942.

Yamamoto, H.Y. und Bassi, R. (1996). Carotenoids: Localization and function.
In: Ort, D.R. und Yocum, C.F., Hrsg., *Oxygenic Photosynthesis: The Light
Reactions*, S. 539–563. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Danksagung

Prof. Dr. Karlheinz Maier danke ich für die Betreuung der vorliegenden Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und die Begutachtung.

Bei Prof. Dr. Dr. Birger Kollmeier bedanke ich mich dafür, daß er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat, und besonders für den 'SFB-Support'

Dr. Wilfried Tuszynski danke ich für viele hilfreiche Diskussionen.

Besonderer Dank gilt Dr. Frank Terjung. Die lange, hervorragende Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Bei Dirk Otteken möchte ich mich für die zahllosen 'Bastel- und Schraubstunden' bedanken, ohne die kein Laser die endlosen Messungen durchgestanden hätte.

Silke Öllerich und Ilka Swalve danke ich für die Hilfe bei der Algenaufzucht.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meines Studiums und der Promotion jederzeit unterstützt haben.

Allen hier nicht explizit genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die Diskussionen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Daniel Berg

geboren am 20.08.1967

in Oldenburg/Holst.

Staatsangehörigkeit: Deutsch

- Sommer 1973 bis Sommer 1977: Grundschule Weingarten/Württ.
- Sommer 1977 bis Sommer 1983: Gymnasium Weingarten/Württ.
- Sommer 1983 bis Sommer 1986: Technisches Gymnasium Ravensburg mit Abiturabschluß
- Herbst 1988 bis Sommer 1991: Grundstudium und Vordiplom der Physik an der Albert–Ludwig–Universität in Freiburg i. Br.
- Herbst 1981 bis März 1995: Hauptstudium Diplom–Physik an der Carl von Ossietzky–Universität Oldenburg mit Erlangung des Diploms
- seit März 1995: Wissenschaftlicher Angestellter im Fachbereich Physik an der Carl von Ossietzky–Universität Oldenburg

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

(Daniel Berg)