

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Bachelorstudiengang: Biologie

## **Bachelorarbeit**

**Titel :** Untersuchungen zum Wachstum und Silikateinbau zweier zentrischer Diatomeenarten:  
*Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens*.

Vorgelegt von: Marius Désiré Wabo Wafo

(Matrikel Nr:9333840)

Betreuender Gutachter: PD Dr. Erhard Rhiel

Zweiter Gutachter: Dr. Gerd-Peter Zauke

Oldenburg, den 17. März 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Liste der Abkürzungen</b> .....	2
<b>Abbildungen und Tabellen</b> .....	3
<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1. Kieselalgen: Vorkommen.....	4
1.2. Kieselalgen: Zellaufbau.....	5
1.3. Kieselalgen: Vermehrung.....	5
1.4. Silikataufnahme und Zellwandsynthese.....	7
1.5. Der Farbstoff PDMPO .....	8
1.6. Fragenstellung.....	8
<b>2. Material und Methoden</b> .....	9
2.1. Organismen.....	9
2.2. Probenahme.....	9
2.3. Zellzahlbestimmung mit der Thoma-Zählkammer.....	10
2.4. Rasterelektronenmikroskopie.....	12
<b>3. Ergebnisse</b> .....	14
3.1. <i>Chaetoceros decipiens</i> .....	14
3.2. <i>Skeletonema costatum</i> .....	20
<b>4. Diskussion</b> .....	25
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	27
<b>6. Anhang</b> .....	29

## Liste der Abkürzungen

ca : circa

g: Gramm

%: Prozent

SDV(s) : silica depositing vesicle(s)

Si: Silizium

Si(OH)<sub>4</sub> : Siliziumsäure

CO<sub>2</sub> : Kohlendioxid

PDMPO: [2(4-pyridyl)-5-[4-dimethylaminoethyl-aminocarbamoyl]-Methoxy]Phenyl]oxazole]

%-uale : prozentuale

μmol Photonen/m<sup>-2</sup> .s<sup>-1</sup> : micromol Photonen pro Quadratmeter und pro Sekunde

μmol: micromol

nm : Nanometer

l: Liter

ml : Milliliter

TEM : Transmissionselektronenmikroskop

REM: Rasterelektromikroskopie

mm : Millimeter

mm<sup>2</sup>: Quadratmillimeter

mm<sup>3</sup>: Kubikmillimeter

μm : Mikrometer

UV: Ultraviolett

MW±SD : Mittelwert plus/minus Standardabweichung

Abb. : Abbildung

cm : Zentimeter

## Abbildungen und Tabellen

**Abbildung 1:** Asexuelle und sexuelle Fortpflanzung bei Diatomeen. (nach Raven et al., 1981)

**Abbildung 2:** Erlenmeyerkolben mit *Chaetoceros decipiens* (rechter Kolben) und *Skeletonema costatum* (linker Kolben)

**Abbildung 3:** Thoma-Zählkammer von links nach rechts: *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* [(400-fach, Einstellung Hellfeld und Skalierung 10µm (auf die Bilder ganz unten rechts)]

**Abbildung 4:** Wachstumskurve von *Chaetoceros decipiens*

**Abbildung 5:** Prozentualer Silikateinbau bei *Chaetoceros decipiens* (Zusammenhang zwischen Silikateinbau und Tagen)

**Abbildung 6:** Behandelte Zellen von *Chaetoceros decipiens* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Licht und im Dunkeln

**Abbildung 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Chaetoceros decipiens*

**Abbildung 8:** Wachstumskurve von *Skeletonema costatum* (Zusammenhang zwischen Zellenzahlen und Tagen)

**Abbildung 9:** Prozentualer Silikateinbau bei *Skeletonema costatum* (Zusammenhang zwischen Silikateinbau und Tagen)

**Abbildung 10:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von *Skeletonema costatum*

**Abbildung 11:** Behandelte Zellen von *Skeletonema costatum* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Licht und im Dunkeln

**Tabelle 1:** Zellenzahlen und Zellenzahlen/ml von *Chaetoceros decipiens*. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, um die unten stehende Abb.4 darzustellen

**Tabelle 2:** Tage und Silikateinbau (in %) von *Chaetoceros decipiens*

**Tabelle 3:** Zellenzahlen und Zellenzahlen/ml bei *Skeletonema costatum*. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, um die unten stehende Abbildung (Abb.8) darzustellen.

**Tabelle 4:** Tage und Silikateinbau (in %) bei *Skeletonema costatum*

## 1. Einleitung

### 1.1. Kieselalgen: Vorkommen

Diatomeen sind einzellige eukaryotische Algen. Taxonomisch werden sie innerhalb der Abteilung der *Heterokontophyta* in der Klasse *Bacillariophyceae* (*Diatomeae*) zusammengefasst. Die Klasse der *Bacillariophyceae* ist in zwei Ordnungen aufgeteilt: die Pennales und die Centrales. Diese Ordnungen unterscheiden sich voneinander in der Symmetrie der Schale und in ihrem Fortpflanzungsverhalten. Während sich die Pennales durch bilaterale Symmetrie und geißellose Isogameten auszeichnen, sind die Centrales radiärsymmetrisch und ihre männlichen Gameten sind aktiv beweglich begeißelt, wenn auch eine der beiden Geißeln fehlt und das Axonem vereinfacht sein kann. Die weiblichen Gameten zentrischer Diatomeen sind nicht begeißelt, und so kommt es zur Oogamie. Heutzutage werden ca. 100000 rezente Arten in ungefähr 250 Gattungen zusammengefasst. Hauptsächlich kommen Kieselalgen im Meer und in Süßgewässern, planktisch oder benthisch vor. Einige Arten sind auf Steinen oder Wasserpflanzen angesiedelt. Einige Arten sind terrestrisch, siedeln auf Böden, bzw. in tropischen Gebieten auch in/an/auf Blätter von Bäumen. Die meisten zentrischen Arten leben planktisch. Die Centrales bilden die Hauptmasse des Phytoplanktons der Ozeane. Daher stellen Kieselalgen ein Hauptbestandteil des Meeresphytoplanktons und spielen eine wesentliche Rolle als Primärproduzenten in der Nahrungskette. Sie erzeugen auch einen großen Teil des atmosphärischen Sauerstoffs. Auffallend ist die hohe Produktion in kalten Gewässern: in der Antarktis, in Aufquellgebieten vor der Küste Südwestafrikas und an den Westküsten Südamerikas und Kaliforniens. In diesen Gebieten beträgt die Produktion von organisch gebundenem Kohlenstoff ca. 200-400g Biomasse pro Quadratmeter und Jahr. Schätzungsweise 20-25% der gesamten globalen organischen Kohlenstofffixierung werden durch das in Diatomeen enthaltene Chlorophyll vollzogen (Nelson et al. 1995). Neben planktischen kommen auch viele benthische, epilithische und epiphytische Formen innerhalb der zentrischen Diatomeen vor. Pennate Kieselalgen sind meist benthisch und besitzen eine Zellorganelle, die Raphe, mit deren Hilfe sie über das Substrat kriechen können (van den Hoek et al., 1993).

## **1.2. Kieselalgen: Zellaufbau**

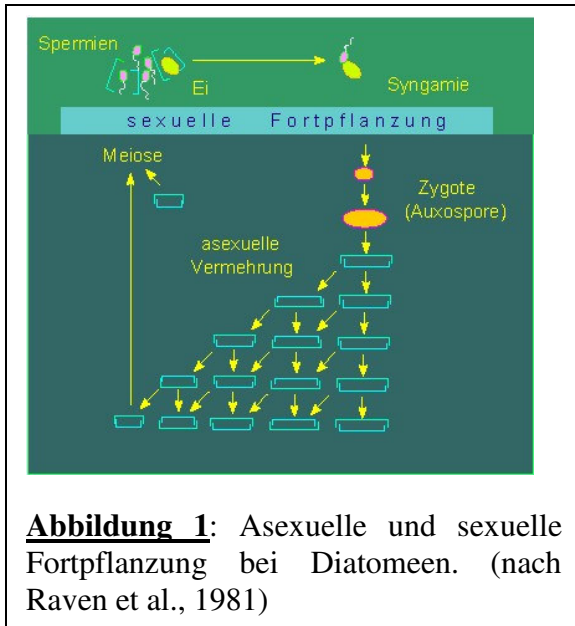
Kieselalgen sind braun gefärbte einzeln oder in Kolonien lebende Einzeller. Das Besondere der Kieselalgen ist ihr Kieselsäurepanzer. Er liegt auf einer Pektinmembran und besteht aus zwei Schalenhälften (Deckel und Boden). Während meiner Arbeit habe mich mit zwei zentralen Diatomeen, *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* beschäftigt. Die Zellwand besteht überwiegend aus amorpher, polymerisierter Kieselsäure, die also keine Kristallstruktur zeigt. Sie bestehen aus zwei unterschiedlich großen Teilen, die schachtelförmig oder wie Deckel und Boden einer Petrischale aufeinandergesetzt erscheinen. Der Deckel (die größere, obere Hälfte) wird als Epitheka bezeichnet, und der Boden (die kleinere, untere Hälfte) als Hypotheka. Die Flächen, die in Aufsicht zu erkennen sind, nennt man Valven. In Seitenansicht sieht man den Gürtel (das Gürtelband) und spricht daher auch von Gürtel(band)ansicht. Bei jeder Zellteilung wird die Hypotheka ersetzt. Bleiben nach der Teilung beide Hälften erhalten, entstehen in der einen Nachkommenschaftslinie ständig kleiner werdende Zellen. Die Reduktion der Größe kann je nach Art 30 bis 50 Prozent betragen. Siliziumoxyd wird in speziellen membranumschlossenen Vesikeln (den SDVs = silica depositing vesicles) unterhalb der künftigen Zelloberfläche im Cytoplasma deponiert und bildet komplex gebaute Strukturen aus (van den Hoek et al., 1993). Die Anlage einer Zellwand beginnt mit dem Erscheinen eines flachen Membransäckchens in der zentralen Cytoplasmabrücke, das sich seitlich ausdehnt und nach innen Kieselsäurematerial ausscheidet. Die Kieselsäure ist nicht kristallin, sondern zeigt eine äußerst feine, polarisationsoptisch isotrope Schaumstruktur. Die Membran dieser silica depositing vesicles, das Silicalemma, ist gestapelt und grenzt außen an das primäre Plasmalemma. Später bleibt von dieser Membran nur ein Teil erhalten (Kalbe, 1973). Die Schalenhälften der Diatomeen bestehen neben Kieselsäure primär aus pektinartigen Polysacchariden und Proteinen und sind artspezifisch durch regelmäßig angeordnete Poren oder Rillen durchbrochen, so dass ein Kontakt zwischen Zellinhalt und Umgebung gewährt bleibt. An anderen Stellen sind sie durch Vorsprünge, Auswüchse, Wülste, etc. verstärkt.

## **1.3. Kieselalgen: Vermehrung**

Die Zellen teilen sich immer in der Valvar-Ebene. Der Zellinhalt schwillt vor der Teilung an, so dass Epitheka und Hypotheka etwas auseinandergedrückt werden, ohne dass jedoch der Protoplast freigelegt wird. Die Mitose tritt in diesem Moment ein und die Teilung des

Protoplasten folgt. Nach der Teilung wird sofort in beiden Zellen die neue Zellwand abgelagert. In den Tochterzellen werden Epiheka und Hypotheka der Mutterzelle immer zu Epitheken, so dass die neu gebildeten Schalenhälften der beiden Tochterzellen immer Hypotheken sind. Dies hat zur Folge, dass im Vergleich zur Mutterzelle eine Tochterzelle gleich groß, die andere aber kleiner ist. Da also nach jeder Teilung ein Teil der Zellen kleiner geworden ist, nimmt die durchschnittliche Größe der Individuen in einer Diatomeen-Population im Laufe der aufeinander folgenden Teilungen ab. Die Verkleinerung der durchschnittlichen Zellgröße einer Diatomeenpopulation kann nicht unbegrenzt weitergehen. Letztendlich wird eine Minimalgröße erreicht, worauf die Zellverkleinerung durch die Bildung von Auxosporen kompensiert wird (van den Hoek et al. 1993).

Diatomeen sind diploid und vermehren sich ungeschlechtlich durch Zellteilung. Bei der Mitose wird die Kernhülle abgebaut, die Mitose ist also offen. Die Telophase-spindel ist ausdauernd und kollabiert nicht in der frühen Telophase. Die Spindel wird außerhalb des Kerns zwischen zwei dunklen Polplatten gebildet. Während der Mitose senkt die Spindel in den Kern. Die Spindel fasst zwei einander gegenüberliegende Bündel von Mikrotubuli um, die sich überlappen und fingerförmig verschränken. In der Überlappungsregion gleiten die Mikrotubuli der beiden entgegengesetzten Bündel aneinander vorbei und schieben so die beiden Mitosepole auseinander (van den Hoek et al., 1993). Bedingt durch die Bildung einer neuen Hypotheka vor der Teilung, werden die Zellen von Teilung zu Teilung immer kleiner. Irgendwann sind sie zu klein, um sich weiter zu teilen. In einem solchen Fall greifen die Diatomeen auf die sexuelle Reproduktion zurück. Hierbei durchlaufen die Zellen eine *Meiose*. Das heißt, dass ca. die Hälfte der Zellen weibliche Gameten (Eier), die andere Hälfte männliche Gameten (Spermien) bilden. Die *Gameten* (Keimzellen) verbinden sich. Es entstehen *Zygoten*. Die *Zygoten* entwickeln sich zu einzelligen Diatomeen und bilden eine silikathaltige Schale. Somit ist der Kreislauf geschlossen (Abb.1). Alle Kieselalgen, die sich geschlechtlich vermehren, haben einen diplonten Lebenszyklus und eine Meiose bei der Gametenbildung (van den Hoek et al. 1993).



**Abbildung 1:** Asexuelle und sexuelle Fortpflanzung bei Diatomeen. (nach Raven et al., 1981)

#### 1.4. Silikataufnahme und Zellwandsynthese

Silizium (Si) ist das dritthäufigste Element auf der Erde und einer der limitierenden Nährstoffe in weiten Regionen der Weltmeere (Dugdale et al., 1995). Dies liegt hauptsächlich an der biologischen Aufnahme durch Diatomeen. Diese entziehen dem Oberflächenwasser Kieselsäure und importieren es in die Tiefe als Bestandteil von Silikaten organischen Ursprungs (Leblanc et al., 2005).

Diatomeen nehmen gelöstes Si wie auch Siliziumsäure  $\text{Si}(\text{OH})_4$  auf (Martin-Jezequel et al. 2000), um ihre Silikat-Zellwände zu produzieren. Der biochemische Silizium-Kreislauf beeinflusst global die  $\text{CO}_2$  Konzentration aufgrund der chemischen Witterungsprozesse von mineralischem Silikat (Wollast und Mackenzie 1983), da Diatomeen signifikant zur Senkung des  $\text{CO}_2$ -Gehalts in der Atmosphäre beitragen (Tréguer und Pondaven 2000). Diatomeen tragen mit 25% bis 75% zur Gesamtprimärproduktion der Ozeane bei (Nelson et al., 1995) und sind die einzige ökologisch dominante Phytoplanktongruppe, die die Kieselsäure  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$  zum Wachsen braucht (Leblanc et al, 2005).



### 1.5. Der Farbstoff PDMPO

PDMPO [2(4-pyridyl)-5{[4-dimethylaminoethyl-aminocarbonyl]-Methoxy}Phenyl]oxazole] ist ein spezifischer Indikatorfarbstoff für Siliziumeinlagerung in die Zellwände von Diatomeen und liefert daher einzigartige, neue Informationen über den Si-Zyklus (Shimizu et al., 2001). Die Autoren zeigten mit ihren Studien an Diatomeekulturen von *Thalassiosira weissflogii*, dass PDMPO selektiv an polymerisiertes Silizium binden kann und eine intensive Fluoreszenz unter ultraviolette (UV) Anregung ausstrahlt. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 wurde vorher in einer ähnlichen Weise verwendet, um Si-Einlagerungen in Diatomeen zu verfolgen (Brzezinski und Conley 1994).

### 1.6. Fragenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Bachelorarbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. lässt sich die Silikateinlagerung bei den beiden Arten *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* mit dem Farbstoff PDMPO zeigen? und
2. findet man während des Wachstums in einer Kultur immer einen gleichbleibenden Anteil an Zellen, die aktuell Silikat einlagern, oder ändert sich der %-uale Anteil an Silikat-einlagernden Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Wachstumsphase (lag-, log-, bzw. stationäre Phase)?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Organismen

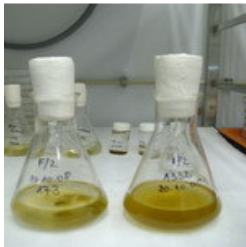
Die beiden Arten *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* wurden freundlicherweise von Herrn Rolf Weinert (AG Biologie geologischer Prozesse, ICBM) zur Verfügung gestellt, wo sie in einem Klimaraum bei einer Temperatur von 20°C kultiviert wurden. Die Lichtintensität variierte je nach Algenart. *Skeletonema costatum* wurde bei 18.7  $\mu\text{mol Photonen/m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und *Chaetoceros decipiens* bei 12.2  $\mu\text{mol Photonen/m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogen. Als Anzuchtmedium wurde F/2 Medium verwendet (siehe Anhang).

### 2.2. Probenahme

Das frisch angesetzte F/2-Medium (2 l) wurde auf drei Schottflaschen verteilt und anschließend autoklaviert. Danach wurde für jede Kultur jeweils ein Erlenmeyerkolben (Abb.2) mit jeweils 20 ml des F/2-Medium verwendet. Die Erlenmeyerkolben wurden mit den beiden Kulturen angeimpft und für eine Woche im Klimaraum der AG Geomikrobiologie bei 16 °C vorkultiviert, um zu sehen, ob sie sich gut entwickeln. Anschließend wurde dann mit den Versuchen begonnen. Das Ziel meiner Versuche war die Zellenzahl und den prozentuale Silikateinbau zu bestimmen. Für die Bestimmung der Zellzahlen zur Ermittlung einer Wachstumskurve habe ich eine Thoma-Zählkammer benutzt. 500 $\mu\text{l}$  der beiden Kulturen wurden in Abständen von jeweils zwei Tagen in der Thoma-Zählkammer ausgezählt. Die Beobachtung der Proben wurde immer mit der Einstellung **Hellfeld** und einer Vergrößerung von 400-fach durchgeführt. Jede entnommene Probe wurde mehrfach (3- bis 7-mal) gezählt, um einen Mittelwert zu berechnen. Ein Tropfen der vorbereiteten Probe wurde in der Mitte des gut gesäuberten Deckglases gebracht und in die Wölbung des Objektträgers gehängt.

Mit der molekularen Sonde PDMPO wurde der Silikateinbau untersucht. PDMPO kann selektiv an frisch polymerisiertes Silikat binden und unter UV Anregung eine intensive Fluoreszenz emittieren. Das Silikat zeigt dabei eine doppelte Fluoreszenz-Emission; im blauen Spektrum (417–483 nm) und im grün/gelben Spektrum (490–530 nm) (Diwu et al., 1999; Shimizu et al. 2001). Die Sonde PDMPO wird auch LysoSensor<sup>TM</sup> Yellow/Blue DND–160 genannt. Es wurde zu je 500 $\mu\text{l}$  Proben von beiden Kulturen je 5  $\mu\text{l}$  des Farbstoffes gegeben und die so behandelten Proben anschließend 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Schon ab dem zweiten Tag konnte man unter dem Fluoreszenz-Mikroskop das Wachstum und den Silikateinbau für beide Arten nachweisen und dokumentieren. Das Silikat scheint unter dem Fluoreszenz-Mikroskop blau und das Chlorophyll rot. Der Silikateinbau wurde in Prozentwerten angegeben und berechnet, indem die Summe aller Zellen mit blauer Färbung durch die Gesamtsumme aller gezählten Zellen (mit und ohne blauer Fluoreszenz) geteilt wurde. Die Wachstumskurve und der Silikateinbau von beiden Kulturen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen dokumentiert.



**Abbildung 2:** Erlenmeyerkolben mit *Chaetoceros decipiens* (rechter Kolben) und *Skeletonema costatum* (linker Kolben)

### 2.3. Zellzahlbestimmung mit der Thoma-Zählkammer

Zur mikroskopischen Zählung der beiden Arten wurde eine Zählkammer nach Thoma verwendet. Die Thoma-Zählkammer ist ein plangeschliffener Objektträger, der drei Stege beinhaltet. Auf den beiden äußeren Stegen liegt das Deckglas, auf dem mittleren Kammersteg ist ein 1mm großes Netzquadrat eingätzt. Dieses Quadrat ist wiederum in weitere Kleinquadrate ( $1/400\text{mm}^2$ ) unterteilt (Abb.3). Zuerst legt man die Zählkammer bei schwacher Vergrößerung (100-fach) unter das Mikroskop. Dann wird die Netzeinteilung gesucht. Diese muss scharf eingestellt werden, um dann bei stärkerer Vergrößerung (400-fach) mindestens 8 Großquadrate (b-Feld) auszuzählen. Es wurde immer mit der stärkeren Vergrößerung ausgezählt.

#### Berechnungen:

Grundquadrat: Kantenlänge:  $0,05\text{mm} = 50\ \mu\text{m}$

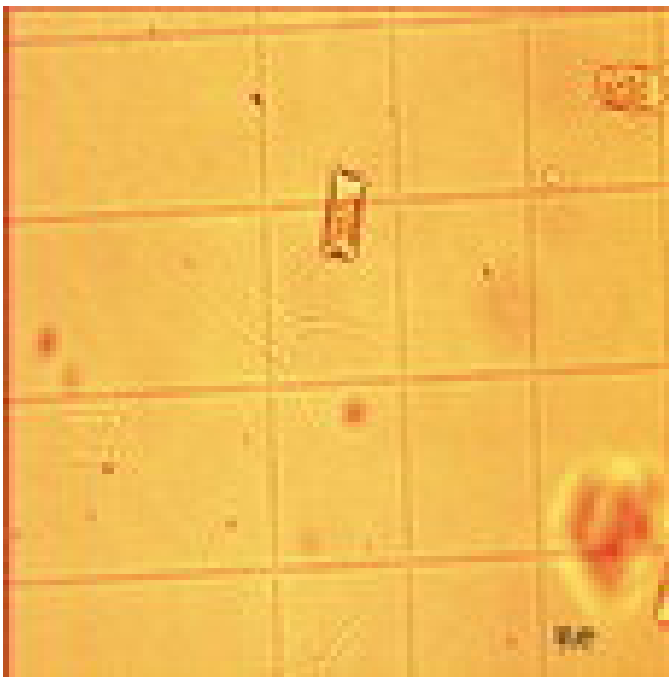
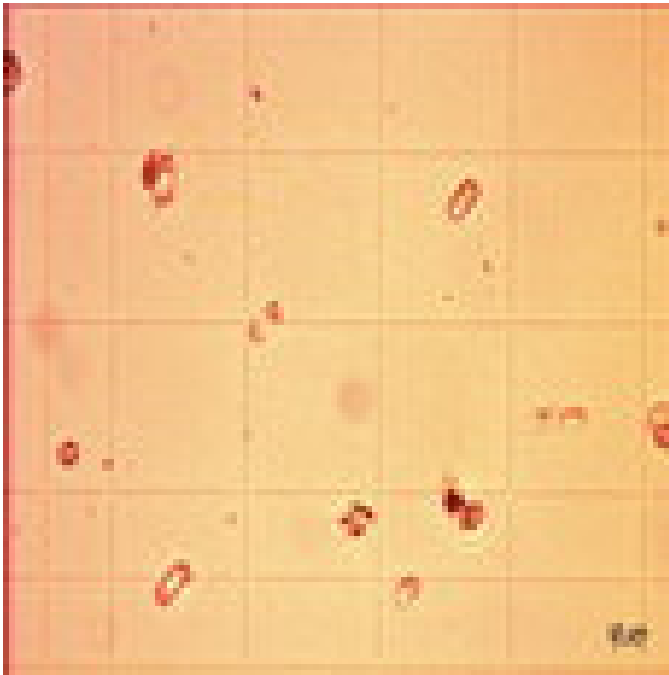
Fläche eines Grundquadrats:  $0,0025\text{mm}^2$

Gruppenquadrat:  $16\ \text{Grundquadrate} = 16 * 0,0025\ \text{mm}^2 = 0,04\ \text{mm}^2$

Höhe der Kammer:  $0,1\ \text{mm} = 100\ \mu\text{m}$

Volumen eines Grundquadrats:  $0,0025 * 0,1\ \text{mm} = 0,00025\ \text{mm}^3$

Volumen eines Gruppenquadrats:  $16 * 0,00025 \text{ mm}^3 = 0,004 \text{ mm}^3$



**Abbildung 3:** Thoma-Zählkammer von oben nach unten: *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* [(400-fach, Einstellung Hellfeld und Skalierung 10 $\mu$ m (auf die Bilder ganz unten rechts)]. Breite und Höhe jeweils 12cm.

Für die gefärbten Zellen wurden 500µl von jeder Proben entnommen und mit 5µl von der LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 Farblösung versetzt. Dann wurden sie für 24 Stunden bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Zählung der gefärbten Zellen mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer durchgeführt. Jede Proben wurde 3- bis 7-mal in mindestens 8-Quadrat ausgezählt.

#### **2.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die Technik des Rasterelektronenmikroskops eignet sich für morphologische Untersuchungen an biologischen Proben. Dabei tastet der in der Elektronenkanone erzeugte, gebündelte und durch die Anode geführte Elektronenstrahl die Oberfläche des Präparates ab. Die Elektronen verursachen dabei die Entstehung von Sekundärelektronen, die mit Hilfe eines Sekundärelektronendetektors erfasst werden. Das Bild auf dem Bildschirm entsteht durch eine Vielzahl unterschiedlich intensiver Lichtpunkte, ist also kein reales Bild.

Bedingt durch Zeitmangel wurde eine extrem verkürzte Präparationsmethode gewählt, wobei Artefakte infolge von Trocknungsprozessen bewusst in Kauf genommen wurden. Erstmal mussten die Zellsuspensionen auf einen Filter filtriert werden. Dann erhielt man einige Algenzellen auf den Filtern. Die Filter wurden ca. 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie auf einem Probenhalter befestigt und mit Hilfe eines Sputter Coaters (Bal-Tec, SCD005) mit Platin (Schichtdicke ca. 10-20 nm) beschichtet. Die beschichteten Filter mit den Algenzellen wurden in einem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-3200N) mikroskopiert.

Wie beim Transmissionselektronenmikroskop TEM wird auch beim REM der Elektronenstrahl von einer beheizten Kathode als Strahlungsquelle erzeugt. Im REM wird jedoch nicht das ganze Objekt ausgeleuchtet, sondern der Elektronenstrahl wird auf einen kleinen Punkt an der Oberfläche des Objekts fokussiert. Die von diesem Punkt gestreuten Elektronen werden von einem Detektor gesammelt. Das dabei entstehende Signal wird verstärkt und auf einer Bildröhre als Punkt abgebildet. Ein Punkt auf dem Leuchtschirm der Bildröhre entspricht also einem Punkt auf der Oberfläche des Objektes. Mithilfe einer Ablenkeinheit wird ein elektrisches Feld über den Elektronenstrahl im Mikroskop und über den Elektronenstrahl in der Bildröhre angelegt. Dadurch werden beide Strahlen um einen genau definierten Betrag ausgelenkt; ein anderer Punkt auf dem Objekt wird beleuchtet und auf der Bildröhre abgebildet. Ein Rastergenerator führt den

Elektronenstrahl des Mikroskops Punkt für Punkt über die Oberfläche des Objekts (deutsch: „rastern“, engl.: „scanning“), wodurch auf dem Leuchtschirm ein Bild der Oberfläche entsteht.

Ein Vergrößerungseffekt entsteht dadurch, dass über dem Elektronenstrahl der Bildröhre ein stärkeres elektrisches Feld angelegt wird als über den Strahl im Mikroskop. Um zu verhindern, dass sich das Präparat durch den Elektronenstrahl elektrisch auflädt, wird die gesamte Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz (meistens Kohlenstoff, Platin oder Gold) bedampft. Durch das hohe Auflösungsvermögen sind Vergrößerung bis zu 100000-fach möglich (Rothenberger, 2005).

### 3. Ergebnisse

Es konnte für beide Arten, *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens* eine Wachstumskurve erfasst und der prozentuale Anteil Silikateinlagernder Zellen bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Kap. 3.1 und 3.2 in Form von Graphen und Tabellen zusammengefaßt.

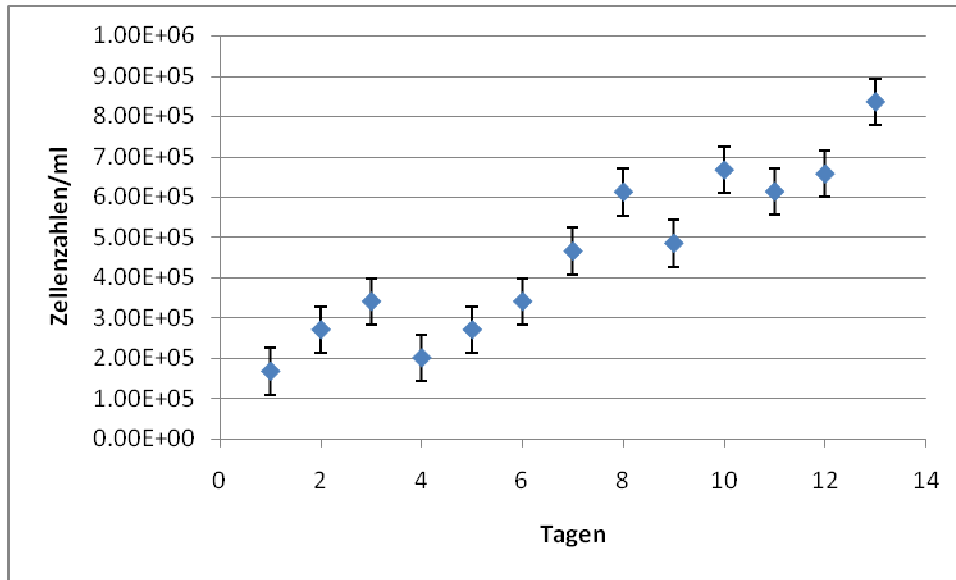
#### 3.1. Wachstum und Silikateinbau bei *Chaetoceros decipiens*

In der unten aufgeführten Tabelle 1 stehen die Angaben von meinen Ergebnissen für *Chaetoceros decipiens* über den Messzeitraum von einem Monat. Die Zellenzahlen der erste sechs Tage variieren anfangs zwischen 24 und 49 Zellen. Ab dem siebten Tagen stiegen die Zellenzahlen deutlich und stetig an und erreichten am letzten Tag einen Wert von 164 Zellen. Schon ab dem achten Tag hatten sich die Zellenzahlen verdoppelt. Die Zellenzahlen/ml lagen zwischen  $1.67^5$  bis  $8.36^5$ .

Tagen	Zellenzahlen	MW±SD	Zellenzahl/ml
1	24	4 ±1.78	$1.67^5$
2	27	5.4 ±3.36	$2.70^5$
3	49	8.16 ±1.83	$3.40^5$
4	24	4 ±1.78	$2^5$
5	27	5.4 ±3.36	$2.70^5$
6	49	8.16 ±1.83	$3.40^5$
7	67	11.16 ±2.48	$4.65^5$
8	120	17.14 ±3.48	$6.12^5$
9	95	13.57 ±4.75	$4.85^5$
10	96	16 ±5.79	$6.67^5$
11	103	14.71±3.45	$6.13^5$
12	129	18.42 ±5.44	$6.57^5$
13	164	23.42 ±5.96	$8.36^5$

**Tabelle 1:** Zellenzahlen und Zellenzahlen/ml von *Chaetoceros decipiens*. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, um die unten stehende Abb.4 darzustellen. Bei *Chaetoceros decipiens* (Abb.4) konnte man für die Wachstumskurve deutlich eine Lag-, und eine Log-Phase sehen. In der Lag-Phase gewöhnte sich die Alge an das frische Medium und vermehrte sich daher anfangs nicht. Sobald sie sich genügend erholt hatte, begann das

exponentielle Wachstum. Diese Phase ist durch eine konstante Vermehrungsrate gekennzeichnet. Die stationäre Phase wurde im Messzeitraum *Chaetoceros decipiens* leider nicht erreicht.



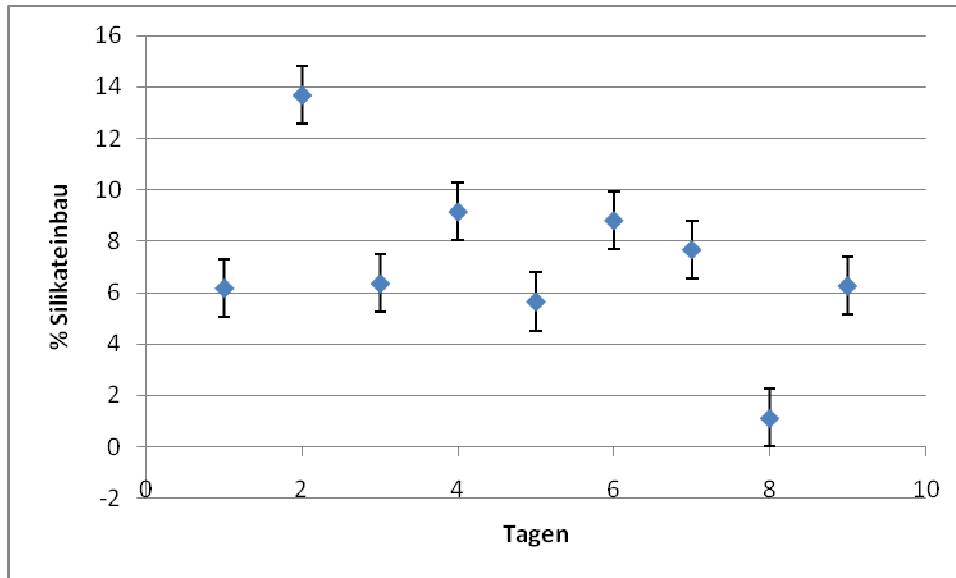
**Abbildung 4:** Wachstumskurve von *Chaetoceros decipiens*

Die Bestimmung des prozentualen Silikateinbaus zeigte, dass am Anfang der Messung ca. 6.17% der Zellen Silikat einlagerten (siehe Tab. 2 und Abb. 5). Der Wert stieg ab dem zweiten Tag an und betrug 13.67%. Nach dem siebten Tag fiel der prozentuale Silikateinbau wieder schnell ab und lag am letzten Tag bei 6.26%.

Tage	Silikateinbau (%)
1	6.17
2	13.67
3	6.35
4	9.14
5	5.65
6	8.80
7	7.67
8	1.12
9	6.26

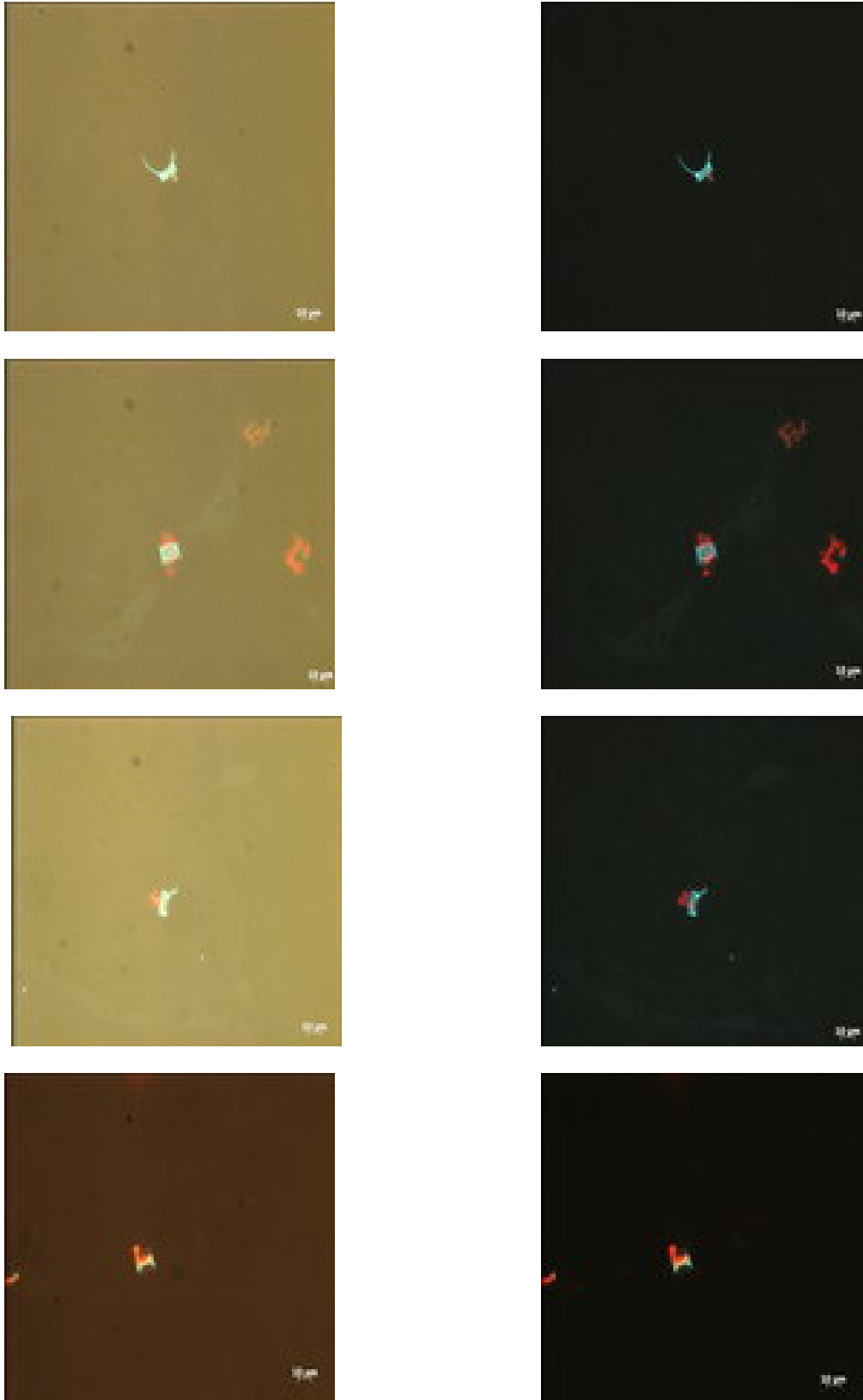
**Tabelle 2:** Tage und Silikateinbau(%) von *Chaetoceros decipiens*





**Abbildung 5:** Prozentualer Silikateinbau bei *Chaetoceros decipiens* (Zusammenhang zwischen Silikateinbau und Tagen)

Aus Abb. 5 lassen sich keine deutlichen Rückschlüsse ziehen. Weder lag-, noch log.- oder stationäre Phase sind deutlich zu erkennen. Die Abbildung 5 zeigt hier nur eine Lag-Phase zu betrachten. Bei *Chaetoceros decipiens* befindet sich viel Silikat in der Lag-Phase.

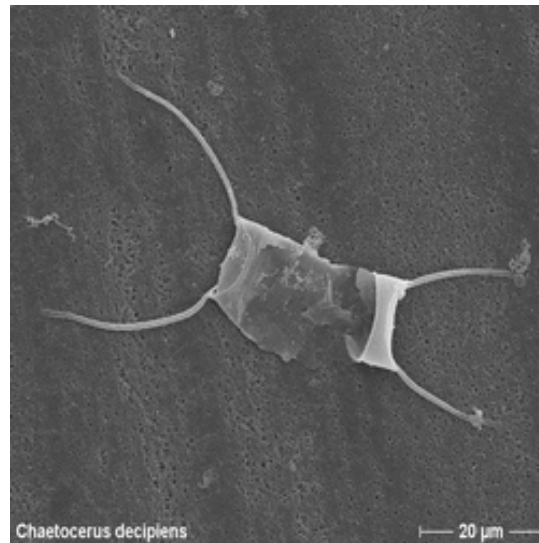
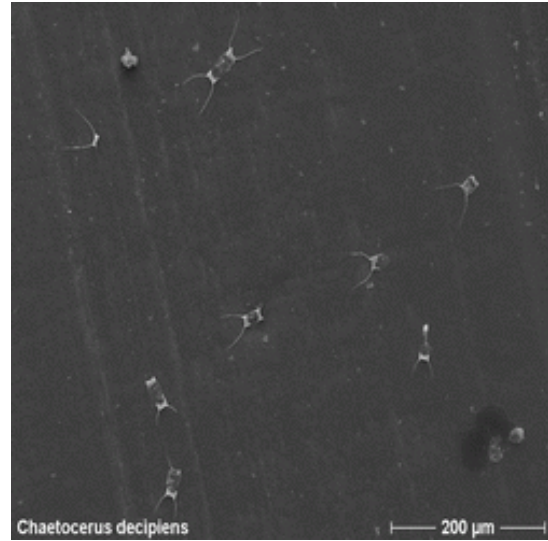
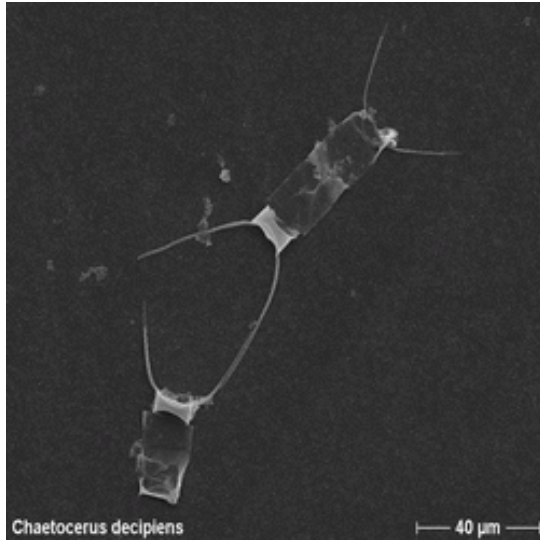


**Abbildung 6:** Behandelte Zellen von *Chaetoceros decipiens* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Licht und im Dunkeln (Breite und Höhe jeweils 7cm)

- a) Links: Bilder zeigen mit Farbelösung behandelte Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (400-fach, Hellfeld, Licht)
- b) Recht : Bilder zeigen mit Farbelösung behandelte Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (400-fach, Hellfeld, dunkel)

**Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse für *Chaetoceros decipiens*:**

Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie sind in Abb. 7 gezeigt. Von links nach rechts erkennt man die Kette mit Stacheln von *Chaetoceros decipiens*. Das erste Bild Links wurde mit einer Vergrößerung von 400x genommen, das Zweite Recht mit 100x und das untere eine Vergrößerung von 800x. Als typische Präparationsartefakte sieht man die kollabierten Silikatzellwände, vorwiegend im Bereich der Gürtelbänder.



**Abbildung 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Chaetoceros decipiens* (Breite und Höhe jeweils 9.5 cm)

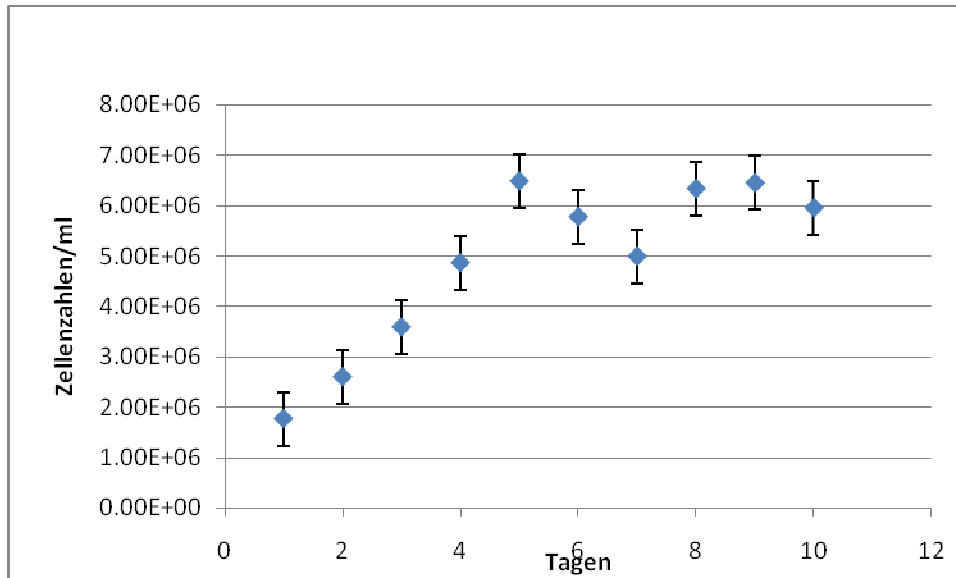
### 3.2. Wachstum und Silikateinbau bei *Skeletonema costatum*

Die unten stehende Tabelle 3 liefert Angaben von meinen Ergebnissen für *Skeletonema costatum*. Die Messungen wurden ebenfalls über die Zeitdauer von einem Monat durchgeführt. Die Zellzahlen der ersten beiden Tage stagnierten bei Werten von 177 und 260. Ab dem dritten Tag nahm die Zelldichte bis zum letzten Tag kontinuierlich zu. Eine Verdoppelung der Zellzahlen war für diese Diatomee bereits ab dem vierten Tag zu verzeichnen. Die Zellzahlen pro ml lagen zwischen  $1.77^6$  und  $5.96^6$ .

Tagen	Zellzahlen	MW±SD	Zellzahl/ml
1	177	35.4 ±7.98	$1.77^6$
2	260	52 ±18.92	$2.60^6$
3	517	86.16 ±37.44	$3.59^6$
4	701	116.83 ±25.48	$4.87^6$
5	1272	181.71 ±46.97	$6.49^6$
6	1133	161.85±38.59	$5.78^6$
7	979	139.85 ±85	$4.99^6$
8	1243	177.57 ±42.44	$6.34^6$
9	1265	180.71 ±37.95	$6.45^6$
10	1168	166.85 ±68.43	$5.96^6$

**Tabelle 3:** Zellzahlen und Zellzahlen/ml bei *Skeletonema costatum*. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, um die untenstehende Abbildung (Abb.8) darzustellen.

Bei *Skeletonema costatum* konnte man für die Wachstumskurve deutlich eine Log-Phase und eine stationäre Phase beobachten. Schon von Anfang an vermehrte sich die Diatomee kontinuierlich und zeigte sofort exponentielles Wachstum. Diese Phase war durch eine konstante Vermehrungsrate gekennzeichnet, gefolgt von der stationären Phase. Eine lag-Phase konnte nicht beobachtet werden.

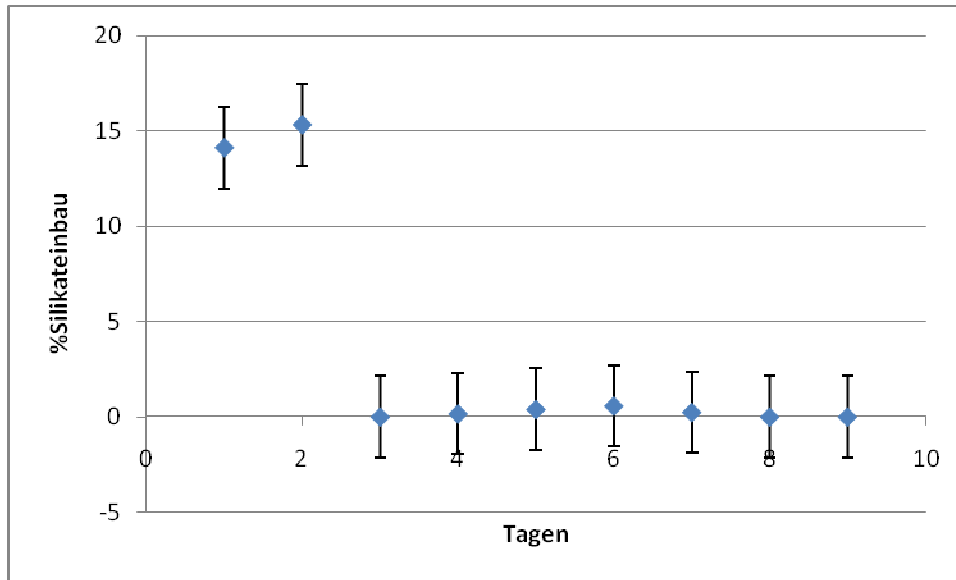


**Abbildung 8:** Wachstumskurve von *Skeletonema costatum* (Zusammenhang zwischen Zellzahlen und Tagen)

Die Bestimmung des prozentualen Silikateinbaus lieferte für die ersten beiden Tagen der Messungen Werte zwischen 14.10 und 15.30%. Ab dem dritten Tag fiel der prozentuale Silikateinbau auf 0% ab. Zwischen dem vierten und dem siebten Tag stieg der Silikateinbau dann wieder leicht an und sank anschließend wieder langsam auf 0 % ab.

Tagen	Silikateinbau (%)
1	14.10
2	15.30
3	0
4	0.168
5	0.39
6	0.57
7	0.24
8	0
9	0

**Tabelle 4:** Tage und Silikateinbau(%) bei *Skeletonema costatum*

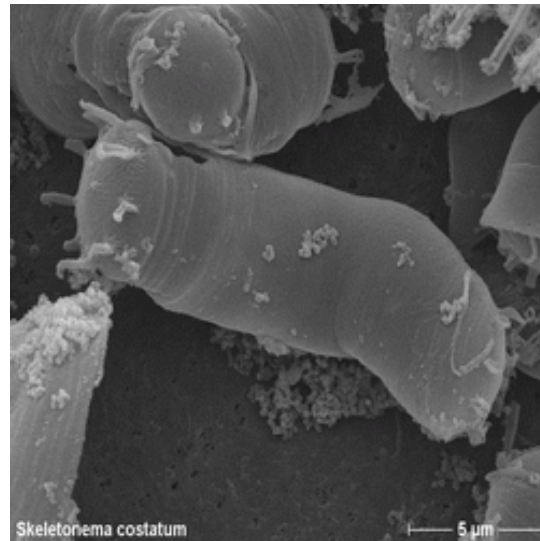
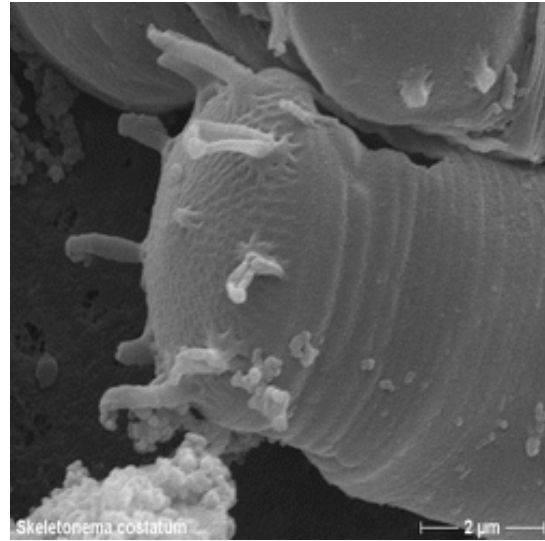
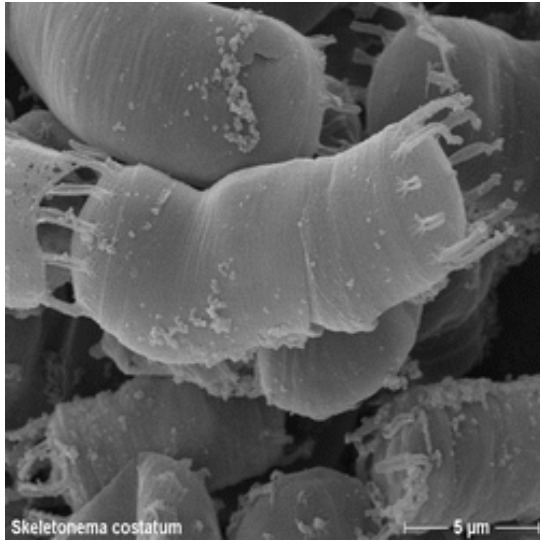


**Abbildung 9:** Prozentualer Silikateinbau bei *Skeletonema costatum* (Zusammenhang zwischen Silikateinbau und Tagen)

Hier befindet sich *Skeletonema costatum* in der Lag-Phase. Schon in den ersten beiden Tagen erreicht *Skeletonema costatum* somit ihre maximale prozentuale Silikatablagerung.

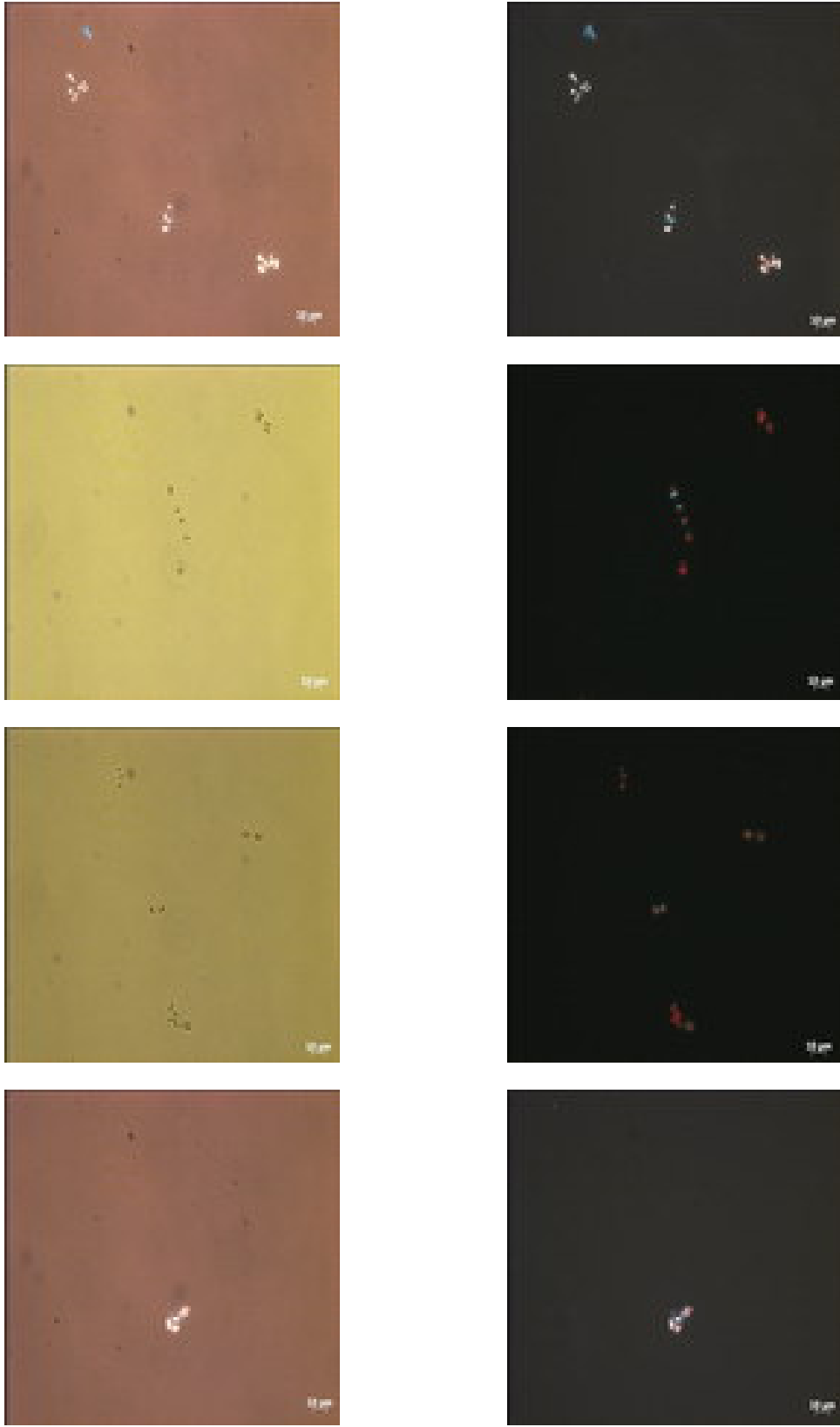
**Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von *Skeletonema costatum*:**

Einige repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Skeletonema costatum* sind in Abb. 10 zusammengefaßt. Von links nach rechts erkennt man schon die Oberfläche der Zellwände von *Skeletonema costatum*. Das erste Bild Links wurde mit einer Vergrößerung von 3500x aufgenommen, das Zweite Rechts mit 8000x und das Untere mit 3500x.



**Abbildung 10:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Skeletonema costatum* (Breite und Höhe jeweils 9.5cm)





**Abbildung 11:** Behandelte Zellen von *Skeletonema costatum* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop

mit Licht und im Dunkeln (Breite und Höhe jeweils 7cm)

- a) Links: Bilder zeigen mit Farbelösung behandelte Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (400-fach, Hellfeld, Licht)
- b) Recht: Bilder zeigen mit Farbelösung behandelte Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (400-fach, Hellfeld, dunkel)

Mit der Sonde PDMPO sieht man in der Zellmitte ein blaues Band, wo wurde Silikat abgelagert. Die Bildreihen in **a** und **b** zeigen den Prozess des Silikateinbaus. Zum Beginn der Messung (die ersten beiden Tage) bauten annähernd 100% der Zellen Silikat ein. Anschließend endete das Wachstum, die Zellen blieben inaktiv und lagerten kein neues Silikat ab. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop waren kaum neue frische blaue Bänder zu sehen.

#### **4.Diskussion**

Bei meiner Arbeit hatte ich vier Wochen Zeit das Wachstum der beiden Kulturen zu beobachten und zu dokumentieren. Die Messungen zeigten eine Lag- und Log-Phase bei *Chaetoceros decipiens*, und bei *Skeletonema costatum* eine Log-Phase und Stationäre Phase. Während der Lag-Phase gewöhnen sich die Zellen an das frische Medium und vermehren sie sich nur wenig, obwohl bei *Skeletonema* festzustellen war, dass sie sich schon am Anfang teilten. Zugabe von PDMPO zu den Zellen zeigte, dass schon fast 30% der Zellen Silikat einlagerten. Bei *Skeletonema costatum* wirkt Silikat als Wachstumsbegrenzender Faktor, so dass die stationäre Phase in der letzten Woche des Versuchszeitraumes erreicht wurde. Das Einlagern von Kieselsäure in die Zellwand ist ein Indiz für Zellwachstum. Dies bedeutet: je mehr Zellen-Silikat einbauen, umso höher ist die Wachstumsrate. Gründe für die Schwankungen der Wachstumsrate bei den beiden Kulturen sind folgende (Znachor et al., 2008):

- Außer dem PDMPO befindet sich auf das Medium viele Nährstoffe wie Phosphor, Sulfate, usw. Diese Nährstoffe sind sehr wichtig für das Wachstum der Diatomee. Unter diesen Nährstoffen absorbieren die Diatomee einige schneller im Vergleich zu den anderen.
- Die Abwesenheit von Der Lag-Phase bei *Skeletonema costatum*: Der Lag-Phase fängt in der Seneszenz oder während der Ruhephase dessen Zellzyklus.

- Kieselalgen leben einzeln oder in Kolonien. Wie bei *Fragilaria* können die Zellen, die in derselben Kolonie (in demselben Zellfaden) vorkommen, das Silikat nicht nach 24 Stunden gleichzeitig ablagern. Grund dafür ist ihr asynchrones Wachstum.

- Aufgrund der geringen Nährstoff-Konzentration im Medium, wird die Ablagerung des Silikats in den Zellen begrenzt. Im Vergleich zu *Chaetoceros decipiens* vermehrte sich *Skeletonema costatum* schneller. Dennoch sind sie kleiner als die Zellen von *Chaetoceros decipiens*. Hier steigt der prozentuale Anteil an Silikateinbau mit der Zellenzahl.

Zusammenfassend möchte ich anmerken, dass mit der LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 Farblösung Silikateinbau in den beiden untersuchten Kieselalgen nachgewiesen werden konnte. Bei *Skeletonema costatum* sieht man deutlich ein Log-Phase und ein Stationäre Phase, aber kein Lag- Phase und %-uale Anteil an Silikat-einlagernden Zellen. Bei *Chaetoceros decipiens* sieht man eine sehr kurze Lag-Phase und ein Log-Phase. Die Stationäre Phase des Wachstums wurde in dem Untersuchungszeitraum nicht erreicht.

## 5. Literatur:

- Brzezinski, M. A.; Conley, D. J., 1994: Silicon deposition during the cell-cycle of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) determined using dual rhodamine-123 and propidium iodide staining. J. Phycol. 30:45–55.
- Diwu, Z.; Chen, C. –S.; Zhang C.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P., 1999: A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. Chem. Biol. 6:411-418.
- Dugdale, R. C.; Wilkerson, F. P.; Minas, H. J., 1995: The role of silicate Pump in driving new production. Deep-Sea Res. 42:697-719.
- Kalbe, L., 1973: Kieselalgen in Binnengewässern. Die neue Brehm-Bücherei A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lucherstade
- Leblanc, K.; Hutchins, D. A., 2005: new applications of a biogenic silica deposition fluorophore in the study of oceanic diatoms. Limnol. oceanogr.: methods 3
- Martin-Jezequel, V.; Hildebrand, M.; Brzezinski, M. A., 2000: Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. J. Phycol. 36:821–40.
- Nelson, D. M.; Smith, W. O. J.; Muench, R. D.; Gordon L. I.; Sullivan, C. W.; Husby, D.M., 1989, 1995: Particulate matter and nutrient distributions in the ice-edge zone of the Weddell Sea Relationship to hydrography during late summer. Deep-Sea Res. 36:191-209
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Curtis, H., 1981: Asexuelle und sexuelle Fortpflanzung bei Diatomeen

- Rothenberger, M., 2005 : Funktionelle und morphologische Untersuchungen der Silikataufnahme und Nadelbildung im marinen Schwamm *Suberites domuncula* Johannes Gutenberg Universität Mainz
  
- Shimizu, K.; Del Amo, Y.; Brzezinski, M. A.; Stucky, G. D.; Morse, D. E., 2001: A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. *Chem. Biol.* 136:1-10.
  
- Tréguer, P.; Lindner, L.; Van Bennekom, A. J.; Leynaert, A.; Panouse, M.; Jacques, G., 1991: Production of biogenic silica in the Weddell-Scotia Seas measured with <sup>32</sup>Si. *Limnol. Oceanogr.* 36:1217-1227. and Pondaven, P., 2000: Silica control of carbon dioxide. *Nature* 406:358-359.
  
- Van den Hoek, C; Jahns, H. M.; Mann, D. G., 1993: *Algen: 5 Tabellen 3.*, Neubearb. Aufl., Stuttgart; New York: Thieme
  
- Vrieling, E. G., Gieskes, W. W. C.; Beelen, T. P. M., 1999: Silicification in diatoms: control by the pH inside the silicon deposition vesicle. *J. Phycol.* 35:548–59.
  
- Wollast, R.; Mackenzie, F. T., 1983: The global cycle of silica. In: S. R. Aston [eds.], *Silicon geochemistry and biogeochemistry*. Academic Press.
  
- Znachor, P.; Nedoma, J., 2008: Application of the PDMPO Technique in studying Silica deposition in natural populations of *Gragilaria crotonensis* (Bacillariophyceae) at different depths in a eutrophic reservoir. *J. Phycol.* 44

## 6. Anhang

### F/2-Medium in natürlichem Seewasser für *Skeletonema costatum* und *Chaetoceros decipiens*

Auf 1 l filtriertes Seewasser:

1 ml  $\text{NaNO}_3$  (3.75g/50l)

1 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.25g/50 ml)

1 ml  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0.64g/50 ml)

Metall-Lösung:

Auf 1 l Seralpur:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.157g/50 ml)

$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.218 g/50 ml)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.098g/10 ml)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.063g/10 ml)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.222 g/10 ml)

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1g/10 ml)

$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.502 g/10 ml)

Vor dem Autoklavieren:

-pH-Wert auf 7 einstellen

-Medium mit  $\text{CO}_2$  begasen

Nach dem Autoklavieren:

-Medium schnell abkühlen lassen (im Eisbad)

-Zugabe der Vitamin-Lösung

Thiamin \* HCl [B<sub>1</sub>] 20 mg

Biotin[H]0.1g/100ml wasser

B<sub>12</sub> 0.1g/100 ml Wasser

**\*\*Substanzen in folgender Reihenfolge hinzugeben**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Außerdem versichere ich, dass ich die allgemeinen Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit und Veröffentlichung, wie sie in den Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg festgelegt sind, befolgt habe.

Unterschrift