wasser
in schule und bildung

Band 7 (2021)
S. 8–14

Spektrofotometrische Untersuchung des Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteinkomplexes in Diatomeen

Jens Schelte [1] und Richard Müller [1*]

[1]Ökologische Station in der JH Sorpesee, Am Sorpesee 7, 59846 Sundern

ZUSAMMENFASSUNG

Fucoxanthin als Antennenpigment ermöglicht Diatomeen und Braunalgen die Nutzung von grünem Licht. Dadurch wird diesen Pflanzen die Fotosynthese auch in tieferen Gewässerschichten ermöglicht, in denen der Rotanteil des Sonnenlichts bereits absorbiert ist. Zur Untersuchung dieses Phänomens bietet sich die Methode der Spektralfotometrie an. Eine Extraktion der Pigmente mit organischen Lösungsmitteln, wie im Unterricht bei der Untersuchung der Fotosynthesepigmente üblich, ist hier nicht zielführend, da auf diese Weise isoliertes Fucoxanthin sein Absorptionsmaximum ändert. Statt dessen werden Plastidenmembranbruchstücke nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff untersucht. Da dies im Unterricht normalerweise nicht möglich ist, wird das Verfahren in einem Film dargestellt. Zwei Arbeitsblätter zu dem Thema sind beigefügt.

Abbildung 1 – Links *Gyrosigma* (Diatomee), rechts zum Vergleich *Pediastrum* (Grünalge)

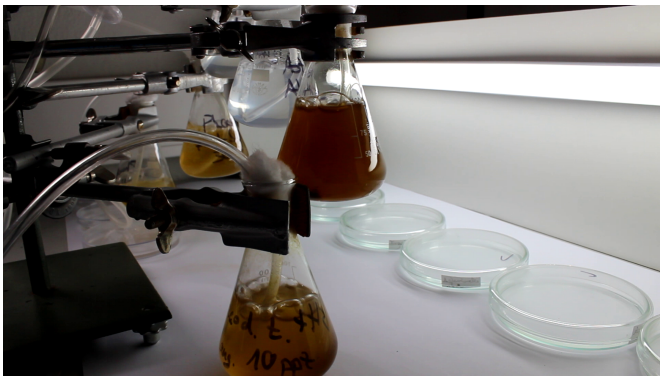

Abbildung 2 – Kultur von *Phaeodactylum tricornutum*

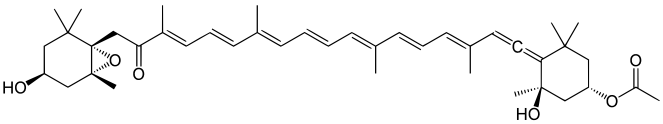

Abbildung 3 – Fucoxanthin

EINLEITUNG

Diatomeen können in Wassertiefen überleben, die für Grünalgen auf Grund der geringen Beleuchtungsstärke in der Regel lebensfeindlich sind. Um trotzdem eine ausreichende fotosynthetische Produktion zu erreichen, ist eine besondere physiologische Angepasstheit notwendig. Bei mikroskopischer Betrachtung fällt der braun-olive Chloroplast auf (Abb. 1). Die gleiche Farbe sieht man auch bei einer Kultur dieser Algen (Abb. 2). Ursache für diesen Farbton ist der relativ hohe Gehalt der Chloroplasten an Fucoxanthin (Abb. 3), einem Pigment aus der Gruppe der Xanthophylle, das sich auch dünnschichtchromatografisch gut nachweisen lässt (Abb. 4).

Der Besitz dieses Farbstoffs erweitert das Spektrum der für die Fotosynthese nutzbaren Lichtquanten in den grünen Bereich, der bei der normalerweise im Unterricht thematisierten Fotosynthese der Landpflanzen als „Grünlücke“ bezeichnet wird.

*eMail r.mueller@oeko-sorpe.de

© bei den Autoren CC-BY-NC-ND 3.0 (2021)

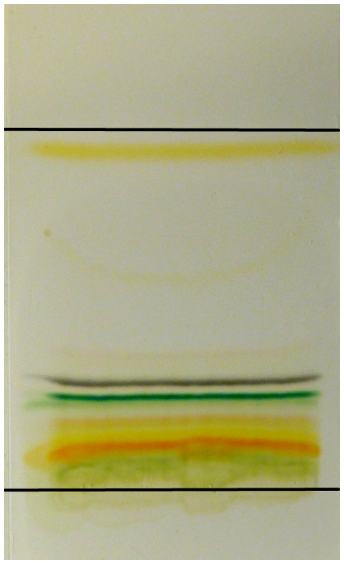

Abbildung 4 – Dünnschichtchromatogramm einer hauptsächlich aus Diatomeen bestehenden Freilandprobe. Orange Bande (2. von unten): Fucoxanthin

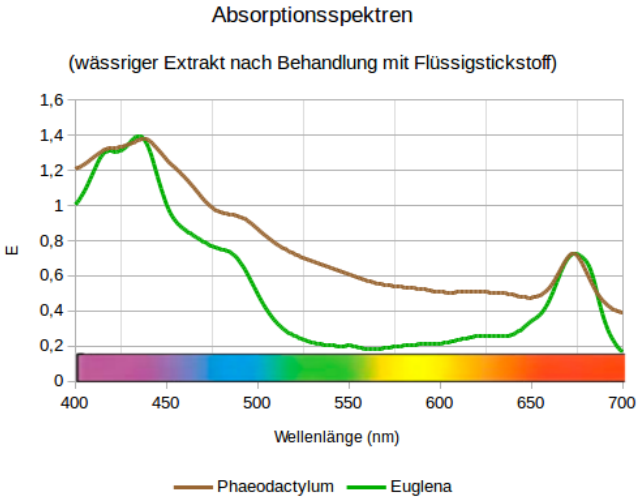

Abbildung 5 – An Membranbruchstücken gemessenes Absorptionsspektrum von *Phaeodactylum* und *Euglena*

DER FUCOXANTHIN-ANTENNENKOMPLEX

In die Thylakoidmembran von Diatomeen-Plastiden sind helikal strukturierte Transmembranproteine eingelagert, an die Chlorophyll *a*, Chlorophyll *c* und Fucoxanthin gebunden ist, die mit FCP („Fucoxanthin/Chlorophyll bindende Proteine“) bezeichnet werden. Fucoxanthin, Chlorophyll *a* und Chlorophyll *c* liegen etwa im Verhältnis 1 : 1 : 0,25 vor. Die Energieübertragung von Fucoxanthin auf Chlorophyll *a* erfolgt zumindest im Fotosystem I fast vollständig (Lepetit, 2010). Einen Vorschlag zur Struktur der FCPs liefert Wilhelm (2006) (Abb. 6).

Man darf nicht vergessen, dass Diatomeen auch hohen Lichtstärken ausgesetzt sein können, so etwa auf dem Wattboden lebende Arten, oder solche, die in Lebensräumen mit fluktuierenden Lichtstärken leben. Ein Teil der in den FCPs enthaltenen Proteine sind Lichtschutzproteine, die überschüssige Lichtenergie als Wärme abführen (Gundermann et al., 2019).

ABSORPTIONSSPEKTROGRAFISCHER NACHWEIS DES SCHLUSSES DER „GRÜNLÜCKE“

Es wäre leicht, die Pigmente aus Diatomeen mit organischen Lösungsmitteln zu extrahieren und ihr Absorptionsspektrum zu messen. Leider verändern sich bei Fucoxanthin jedoch bei der Auflösung der Bindung zum Protein auch die konjugierten Doppelbindungen innerhalb des Moleküls und damit auch seine Absorptionseigenschaften. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich um ca. 60 nm zum kurzwelligen Ende hin. Dieses Phänomen wurde von Goedheer (1970) bei der Braunalge *Laminaria* gezeigt - es lässt sich aber auch als Erklärung bei Diatomeen anwenden, da die fotosynthetischen Apparate ähnlich sind. Die für Diatomeen typische Nutzung des Grünbereichs kann also nur bei an Membranproteine gebundenem Fucoxanthin gezeigt werden.

Methodik

Es ist demnach von Bedeutung, dass bei der Präparation das Fucoxanthin nicht von den Proteinen des FCP getrennt wird. Um das zu erreichen, verbietet sich die Nutzung von organischen Lösungsmitteln. Stattdessen muss mit Thylakoid-Membranbruchstücken gearbeitet werden, bei denen diese Bindung noch intakt ist. Würden Diatomeen einfach nur gemörsert, erhielte man eine trübe Brühe, die das Licht des Fotometers sehr stark streuen würde. Die folgende Präparationsanleitung wurde uns von Frau Prof. Büchel (pers. Mitt.) zur Verfügung gestellt:

- Die Diatomeen abzentrifugieren. Ggf. die Sedimente mehrerer Ansätze vereinen und noch einmal zentrifugieren, so dass man ein etwa erbsengroßes Pellet erhält.
- Das Pellet in einen kleinen Mörser geben und mit einer kleinen Menge flüssigen Stickstoffs übergießen. Schutzbrille und Schutzhandschuhe nicht vergessen! Eine nicht zu kleine Spatelspitze Calciumcarbonat zugeben und zermörsern. Wenn der Brei olivgrün wird, war es zu wenig Calciumcarbonat.
- Kurz zentrifugieren (max. 5000 g und 10 min). Dabei werden die groben Zelltrümmer abgetrennt und im Überstand befinden sich die Membranbruchstücke, also auch Thylakoidmembranen. Die Suspension ist zwar immer noch trüb und das Licht wird gestreut, aber deutlich weniger als ohne diese Präparation.
- Überstand abnehmen und Absorptionsspektrum aufnehmen.

In Abb. 5 ist das Ergebnis dargestellt, dazu das von einer auf gleiche Weise präparierten *Euglena*-Kultur als Vergleich. Die Ausnutzung des grünen und gelben Lichts durch Diatomeen ist deutlich. Damit ist die „Grünlücke“ geschlossen.

EINBINDUNG IN DEN LEHRPLAN

Die Fotosynthese ist im NRW-Kernlehrplan Biologie für die Sekundarstufe II in den Bereich Ökologie eingebunden (MSW, 2013). Da bei dem hier dargestellten Phänomen der Zusammenhang zwischen Struktur und ökologischer Nische evident ist, bietet sich dieser Komplex hervorragend für die Behandlung im Unterricht an, sowohl unter ökologischen wie auch stoffwechselphysiologischen Gesichtspunkten.

EINSATZ DES MATERIALS IM UNTERRICHT

Das hier vorgestellte Unterrichtsmaterial kann im Rahmen des Ökologieunterrichts verwendet werden. Mit seiner Hilfe kann untersucht werden, durch welche physiologische Angepasstheit eine neue ökologische Nische gebildet werden kann. Dabei müssen allerdings grundlegende Kenntnisse über die Physiologie der Fotosynthese bereits vorhanden sein, so das Wissen über die durch Pflanzen hauptsächlich genutzten Wellenlängenbereiche.

Die Präparation der Membranbruchstücke dürfte in den meisten Schulen schwer durchzuführen sein, da flüssiger Stickstoff nur selten zur Verfügung steht. Deswegen wurde das Verfahren und die anschließende Messung in einem Film dokumentiert (`https://www.oeko-sorpe.de/wordpress/2020/04/13/absorptionsspektrum-von-kieselalgen/`) (Schelte, 2020), der im Unterricht statt des Experiments eingesetzt werden kann.

Arbeitsblätter

Die im folgenden dargestellten Lösungen können aus dem Vorwissen bzw. dem Material abgeleitet werden.

Arbeitsblatt 1 („Fotosynthese - auch in tiefen Seen?“) : Dieses Arbeitsblatt führt in die Fragestellung ein.

Aufgabe 1 bezieht sich auf die Abbildungen 1 und 2, in denen die Verteilung von Kieselalgen entlang eines Tiefengradienten in zwei verschiedenen Gewässern dargestellt ist. Beiden Gewässern ist gemeinsam, dass die Diatomeen einen Verbreitungsschwerpunkt zwischen 10 und 15 m haben. Die Messungen wurden offensichtlich während der Sommerstagnation durchgeführt, sodass die Verteilung nicht durch Zirkulation gestört wurde.

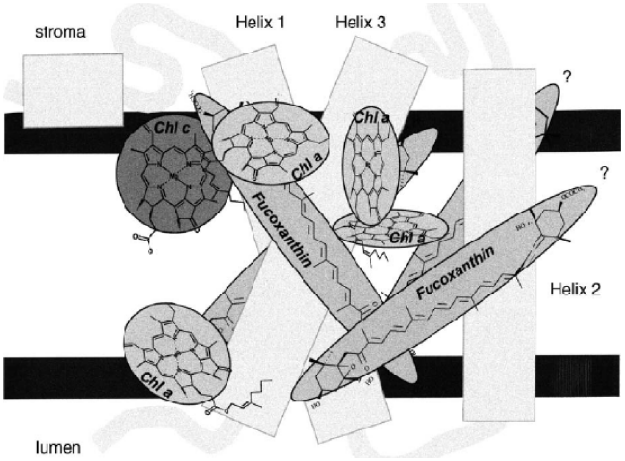

Abbildung 6 – Modell des Fucoxanthin-Chlorophyll-Protein-Komplexes in der Thylakoidmembran. Wilhelm (2006), aus Lepetit (2010)

Aufgabe 2 geht auf Abb. 3 ein. Hier ist das Ergebnis einer Untersuchung auf Grünalgen in einem flachen Gewässer wiedergegeben. Die Tiefenverteilung der Grünalgen konzentriert sich auf die Zone zwischen 1 und 3 m. Die geringe Tiefe des Gewässers kann aber hier nicht der Grund für die Begrenzung sein, denn unterhalb von 4 m wurden keine Grünalgen mehr gefunden, obwohl diese Tiefenzone in dem Gewässer noch existiert.

Im Vergleich mit Abb. 1 und 2 wird deutlich, dass die Diatomeen eine größere Wassertiefe bevorzugen, während die Grünalgen eher oberflächennah vorkommen. Es lässt sich also eine klare Nischentrennung beobachten.

Aufgabe 3a: Landpflanzen und Grünalgen nutzen in fast ausschließlichem Maße rotes und blaues Licht für die fotosynthetische Produktion.

Aufgabe 3b: Im Lunzer Untersee wurde im Sommer bei mittlerer Sonnenhöhe, also am Vor- bzw. Nachmittag, in Wassertiefen zwischen 1 und 20 m die Lichtintensität, unterschieden nach den verschiedenen Wellenlängen, gemessen und in Prozent der an der Oberfläche herrschenden Lichtintensität dargestellt.

Man sieht an der Grafik, dass Licht aus dem Grünbereich am geringsten absorbiert wird, also tiefer eindringen kann als Licht anderer Wellenlängen. Bereits in 5 m Tiefe hat das grüne Licht noch ca. 15 % der Intensität an der Oberfläche, während im Spektralbereich rot und blau die Intensität auf etwa 5 % abgesunken ist[1].

Aufgabe 3c: Aus dem unter 3b Gesagten ergibt sich, dass in größerer Wassertiefe (ab 5 m) das für die Fotosynthese von Grünalgen nötige rote und blaue Licht nur noch in eingeschränktem Maß zur Verfügung steht. Eine effektive Fotosynthese und damit ein Überleben dieser Pflanzen ist dort wahrscheinlich nicht möglich.

Aufgabe 3d: Da die roten und blauen Anteile des Lichts bereits in den oberen Schichten des Gewässers großenteils absorbiert werden, erreichen nur gelbe, grüne und orange Anteile die Wasserschichten darunter. Kieselalgen als fotosynthetisch aktive Organismen, die diesen Raum besiedeln, müssen also einen Mechanismus entwickelt haben, der die Nutzung der Energie dieser Lichtqualitäten ermöglicht. Sie müssen also Pigmente besitzen, die Licht dieser Qualität absorbieren und die aufgenommene Energie auf die Fotosysteme übertragen können.

Aufgabe 3e: Man müsste versuchen, ein Pigment aus Kieselalgen zu extrahieren, das grünes Licht absorbiert. Im Film wird deutlich, dass Kieselalgen ein solches Pigment, das Fucoxanthin, besitzen, das die Bereiche zwischen Blau und Rot in erhöhtem Maße (hier im Vergleich zu *Euglena* dargestellt) absorbieren kann. Es ist zu vermuten (aus dem vorhandenen Material allerdings nicht nachzuweisen[2]), dass hiermit absorbierte Lichtquanten zu den Fotosystemen

[1] Die in der Literatur häufig zu lesende Behauptung, blaues Licht dringe am tiefsten (werde also am geringsten absorbiert), trifft hier nicht zu. Ursache hierfür ist die, wenn auch geringe, aber trotzdem nicht zu vernachlässigende Population grüner Algen, die bereits in den oberen Schichte einen großen Teil des roten und blauen Lichts absorbiert.

[2] Weiterführende Experimente belegen allerdings diesen Sachverhalt, so z.B. Lepetit (2010); Büchel (o.J.).

ISSN 2194-3052

weitergeleitet werden. Dadurch bliebe die fotosynthetische Produktion gewährleistet und ein Überleben der Algen in diesen Tiefen wäre möglich.

Arbeitsblatt 2 („Das Absorptionsspektrums von Kieselalgenpigmenten“): Hier wird auf die Methodik der Isolierung und Absorptionsmessung der Membranbruchstücke eingegangen.

In **Aufgabe 1** wird das Spektrum von mit Aceton extrahierten *Phaeodactylum*-und *Euglena*-Pigmenten beschrieben. Die Absorptionsmaxima liegen bei beiden Algen bei ca. 435 bzw. 665 nm. Im Bereich von etwa 520 bis 620 nm ist nur eine geringe Absorption zu beobachten

Aufgabe 2: Auch im wässrigen Extrakt liegen die Maxima etwa bei den gleichen Werten. Im grünen und gelben Bereich allerdings ist die Absorption der *Euglena*-Pigmente etwas höher als beim den Acetonextrakt, bei *Phaeodactylum* allerdings deutlich höher.

Aufgabe 3: Bei *Euglena* ist die Absorption im grünen Bereich minimal, sie liegt im dargestellten Beispiel bei etwa 0,2, während sie bei *Phaeodactylum* bei etwa 0,7 liegt, also etwa 3,5-mal höher. Die fotosynthetische Produktion mit Hilfe der Energie des grünen Lichts bei *Euglena* kann also nur einen Bruchteil der Produktion bei *Phaeodactylum* betragen.

Aufgabe 4: Das Spektrum zeigt, dass *Euglena* im Gegensatz zu *Phaeodactylum* keine Fucoxanthin-Chlorophyll-Protein-Komplexe (FCP) besitzt. Offensichtlich sind die FCPs für die Steigerung der Produktion im Grünen verantwortlich.

Aufgabe 5: Wenn die Pigmente von *Phaeodactylum* mit Hilfe von Aceton extrahiert werden, lösen sie sich von den Transmembranproteinen. Dadurch ändert sich ihre Farbe; die Absorption im grünen Teil des Spektrums verringert sich.

DANKSAGUNG

Wir bedanken uns herzlich bei Prof. Dr. K. Hennes, Prof. Dr. E. Eisenbarth und Dipl. Ing. M. Poschmann für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des Labors sowie bei Herrn K. Glaeser (alle Fachhochschule Südwestfalen (Fachbereich für Naturwissenschaften und Informatik) in Iserlohn) für die technische Unterstützung.

LITERATUR

BÜCHEL, C. (o.J.): Untersuchungen zur Struktur und Funktion von photosynthetischen Proteinen in Eukaryoten. https://www.bio.uni-frankfurt.de/43967656/forschung, abgerufen 14.4.2020

GOEDHEER, J.C. (1970): On pigment system of brown algae. Photosynthetica 4, 97-106

GUNDERMANN, K.; WAGNER, V.; MITTAG, M.; BÜCHEL, C. (2019): Fucoxanthin-Chlorophyll Protein Complexes of the Centric Diatom Cyclotella Meneghiniana Differ in Lhcx1 and Lhcx6-1 Content. Plant Physiol. 179, 1779-1795

LEPETIT, B. (2010): Untersuchungen zur Struktur der Antennenkomplexe und zur Lokalisation der Xanthophyllzykluspigmente in Diatomeen. Diss. Univ. Leipzig

MINISTERIUM FÜR SCHULE UND WEITERBILDUNG DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN (2013): Kernlehrplan für die Sekundarstufe II Gymnasium / Gesamtschule in Nordrhein-Westfalen - Biologie. Heft 4722. Düsseldorf http://www.standardsicherung.schulministerium.nrw.de/lehrplaene/upload/klp_SII/bi/GOSt_Biologie_Endfassung.pdf

SCHELTE, J. (2020): Film: „Können Kieselalgen grünes Licht besser absorbieren als grüne Algen?“ (Download: https://www.oeko-sorpe.de/wordpress/2020/04/13/absorptionsspektrum-von-kieselalgen/)

WILHELM, C.; BÜCHEL, C.; FISAHN, J.; GOSS, R.; JAKOB, T.; LAROCHE, J.; LAVAUD, J.; LOHR, M.; RIEBESELL, U.; STEHFEST, K.; VALENTIN, K.; KROTH, P.G. (2006): The Regulation of Carbon and Nutrient Assimilation in Diatoms is Significantly Different from Green Algae. Protist 157, 91-124

(Rechtehinweis zu den Arbeitsblättern: Das Material der Arbeitsblätter kann nichtkommerziell zur Ausarbeitung eigener Arbeitsblätter verwendet werden, wenn Autorennennung erfolgt und die abgeleiteten Arbeitsblätter unter der gleichen Lizenz veröffentlicht werden (Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0)).

Arbeitsblatt 1: Fotosynthese - auch in tiefen Seen?

In verschiedenen stehenden Gewässern hat man das Vorkommen von Kieselalgen in Abhängigkeit von der Tiefe untersucht. Beim Lake Michigan in den USA stellte man die Besiedlung mit benthischen Kieselalgen fest (Kieselalgen, die auf dem sandigen Seegrund wachsen) (Abb. 1) und beim österreichischen Koralpensee das Vorkommen von planktischen Kieselagen im freien Wasser (Abb. 2). Zum Vergleich zeigt Abb. 3 die Tiefenverteilung einer Grünalge in Abbot‘s Pond (USA):

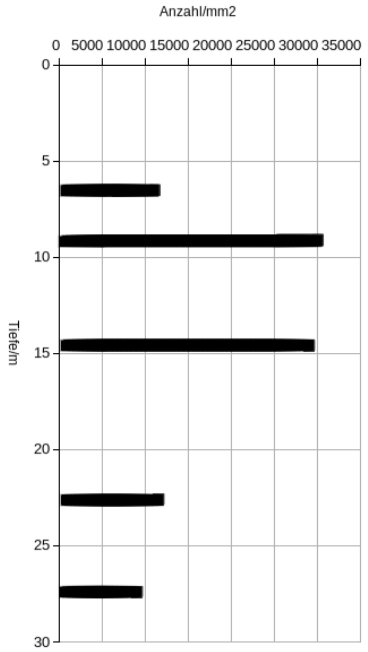

Abbildung 1: Vorkommen von bodenlebenden Kieselalgen im Lake Michigan in verschiedenen Tiefen [1]

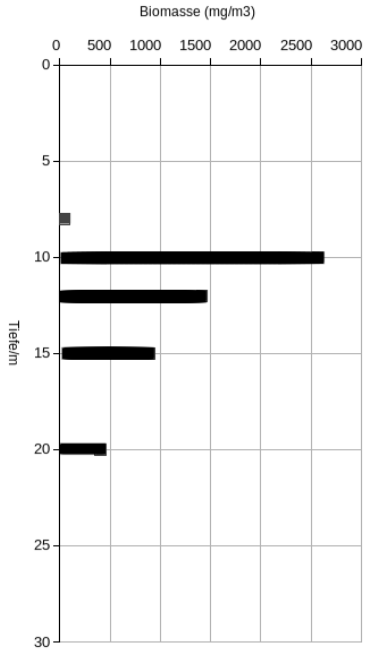

Abbildung 2: Vorkommen von planktischen Kieselalgen im Koralpenstausee in verschiedenen Tiefen [2]

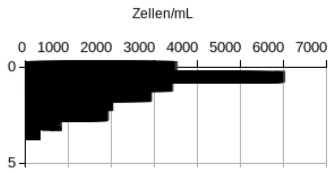

Abbildung 3: Tiefenverteilung von Chlorococcum (Grünalge] in Abbot's Pond [3]

1. *Beschreiben Sie die Abb. 1 und 2 und vergleichen Sie die Tiefenverteilungen der Kieselalgen.*

2. *Beschreiben Sie die Abb. 3 und vergleichen Sie die Tiefenverteilung der Grünalge mit der der Kieselalgen.*

3. *Um Unterschiede der Tiefenverteilung von Grün- und Kieselalgen zu erklären, nutzen Ökologen u.a. die Erkenntnisse über die Absorption des Sonnenlichts im Gewässer.*

   a) *Erläutern Sie, welche Anteile aus dem Spektrum des Sonnenlichts Grünalgen und Landpflanzen für ihre Fotosynthese hauptsächlich nutzen.*
   b) *Beschreiben Sie die Abb. 4 und fassen Sie die dargestellten Sachverhalte zusammen.*
   c) *Prüfen Sie, ob Grünalgen auch in größerer Gewässertiefe überleben könnten.*
   d) *Stellen Sie eine Hypothese auf, wie Kieselalgen in größerer Gewässertiefe überleben können.*
   e) *Entwickeln Sie einen Untersuchungsansatz, mit dem Sie Ihre Hypothese überprüfen könnten. Schauen Sie dann den Film [5].*

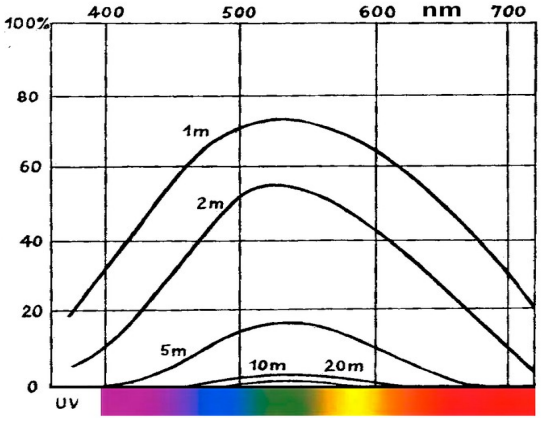

Abbildung 4: Intensität und spektrale Zusammensetzung des Lichts in verschiedenen Tiefen des Lunzer Untersees, in Prozent der auf die Oberfläche auftreffenden Strahlung (Sommerdurchschnittswerte bei mittlerer Sonnenhöhe) [4]

Copyright bei den Autoren: Dieses Werk steht unter der Creative Commons-Lizenz CC BY-NC-SA 4.0 (2020).

Quellenangaben:
(Alle Abbildungen umgezeichnet)

[1] Stevenson, R.J./Stoermer, E.F. (1981): Quantitative Differences Between Benthic Algal Communities Along a Depth Gradient in Lake Michigan. J. Phycol. 17, 29-36

[2] Meiritsch, M. (1997): Die Entwicklung des Phytoplanktons im neu errichteten Koralpenstausee. Carinthia II, 187/107, 489-498

[3] Happey-Wood, Ch. (1976): Influence of stratification on the growth of planktonic Chlorophyceae in a small body of water. Brit. Phycol. J. 11, 371-381

[4] nach Sauberer aus Ruttner, F. (1952): Grundriss der Limnologie, S. 16

[5] Schelte, J. (2020): Film: „Können Kieselalgen grünes Licht besser absorbieren als grüne Algen?“ *(Download: https://www.oeko-sorpe.de/wordpress/2020/04/13/absorptionsspektrum-von-kieselalgen/)*

Copyright bei den Autoren: Dieses Werk steht unter der Creative Commons-Lizenz CC BY-NC-SA 4.0 (2020).

Arbeitsblatt 2: Das Absorptionsspektrum von Kieselalgenpigmenten

Üblicherweise werden Fotosynthese-Pigmente aus Algen extrahiert, indem man die Zellen mit einem organischen Lösungsmittel wie Aceton behandelt. Alle Pigmente befinden sich dann im Lösungsmittel und im Fotometer kann das Absorptionsspektrum aufgenommen werden. Macht man dies mit Kieselalgen, so erhält man das Spektrum aus Abb. 1. Im Vergleich dazu ist auch das Spektrum von Euglena, einer grünen Alge, eingezeichnet.

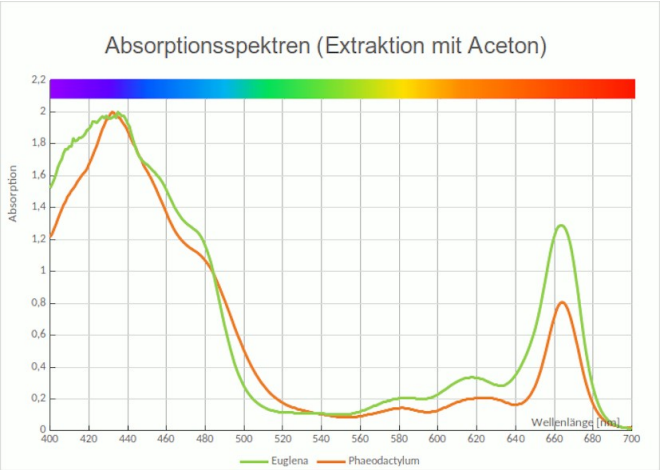

Abbildung 1: Absorptionsspektren von Phaeodactylum und Euglena in Aceton

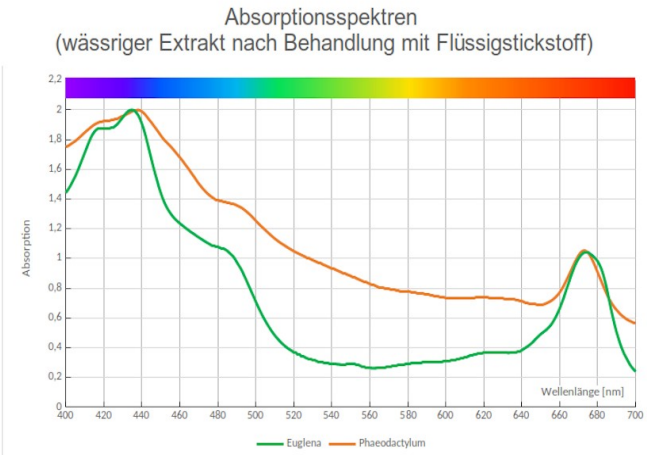

Abbildung 2: Absorptionsspektren wässriger Extrakte von Euglena und Phaeodactylum

1. *Beschreiben Sie die in Abb. 1 wiedergegebenen Spektren.*

Verwendet man allerdings nicht Aceton zur Extraktion, sondern geht wie im Film [1] dargestellt vor, so erhält man die Spektren aus Abb. 2.

2. *Beschreiben Sie die Spektren im Vergleich mit Abb. 1.*
3. *Untersuchen Sie die Spektren im Hinblick auf die Absorption von grünem Licht und leiten Sie ab, welchen Einfluss die Unterschiede bei diesen Wellenlängenbereichen im Hinblick auf die fotosynthetische Produktion haben.*

Abb. 3 zeigt einen (vereinfachten) Ausschnitt aus der Thylakoidmembran einer Kieselalge. Solche Membranbruchstücke wurden im Film untersucht. Die Abbildung zeigt einen Antennenkomplex, der Lichtquanten auffängt und an das Fotosystem I bzw. II weiterleitet. Drei schraubenförmige Proteine spannen sich durch die Membran. An sie sind Chlorophyllmoleküle und Fucoxanthinmoleküle gebunden. Fucoxanthin ist ein Farbstoff, der in Euglena nicht vorkommt.

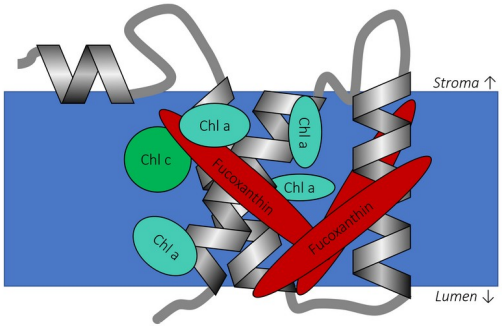

Abbildung 3: Ausschnitt aus der Thylakoidmembran einer Kieselalge. Nach [2]

4. *Leiten Sie aus dem bisher betrachteten Material ab, welchen Einfluss der Besitz von Fucoxanthin auf die fotosynthetische Produktion von Kieselalgen hat.*
5. *Erläutern Sie mit Hilfe von Abb. 1 und 2, wie sich die Absorption von Fucoxanthin ändert, wenn es mit Hilfe von Aceton von den Transmembranproteinen gelöst wird.*

Quellenangaben:

[1] Schelte, J. (2020): Film: „Können Kieselalgen grünes Licht besser absorbieren als grüne Algen?“ *(Download: https://www.oeko-sorpe.de/wordpress/2020/04/13/absorptionsspektrum-von-kieselalgen/)*

[2] Lepetit, B. (2010): Untersuchungen zur Struktur der Antennenkomplexe und zur Lokalisation der Xanthophyllzykluspigmente in Diatomeen. Diss. Univ. Leipzig

Copyright bei den Autoren: Dieses Werk steht unter der Creative Commons-Lizenz CC BY-NC-SA 4.0 (2020).