wasser
in schule und bildung

Band 7 (2021)
S. 12–15

Untersuchungen mit dem Junior-PAM am Fotosystem II von *Chlorella*

Richard Müller [1]*

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

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung des Fotosystems II wurde von der Firma Heinz Walz GmbH das „Junior-PAM" entwickelt. Hiermit lässt sich das non-chemical-Quenching bestimmen, d.h. es kann der Anteil der am Fotosystem II umgewandelten Energie gemessen werden, der nicht in chemischer Energie gebunden wird, sondern in Form von Fluoreszenzlicht und Wärme abgegeben wird. Da das Gerät von Hause aus eher zur Untersuchung von Blättern gedacht ist und weniger für Algenkulturen, wurden zwei Verfahren getestet, trotzdem Algen, hier *Chlorella*, zu untersuchen. Als geeignet hat sich die Untersuchung eines Glasfaserfilters erwiesen, auf das die Algen filtriert werden. Die Unterbrechung des fotosynthetischen Elektronentransports zur Bestimmung des Quenching wurde durch das Herbizid Metribuzin hervorgerufen.

EINLEITUNG

Der Ökologischen Station in der JH Sorpesee wurde ein Junior-PAM leihweise überlassen, um herauszufinden, ob dieses Gerät im Rahmen von Kursen oder bei betreuten schulischen Forschungsarbeiten verwendet werden kann. Da der Schwerpunkt der Arbeit an der Station gewässerökologisch ausgerichtet ist und Fragestellungen zur Fotosynthese entsprechend meist mit planktischen Algen oder ihren Kulturen bearbeitet werden, war die erste Frage, inwieweit sich die Messvorrichtungen des PAM dafür adaptieren lassen. Das PAM wird mit mechanischen Klammern und Magneten geliefert, in die Laubblätter eingeklemmt werden können.

Das Prinzip des PAM basiert auf Fluoreszenzmessungen, die durch schwache Lichtblitze, die selber noch nicht zur Fotosynthese ausreichen, induziert werden. Darüber hinaus können stärkere Lichtblitze (aktinisches Licht) gegeben werden, die eine Fotosyntheseantwort auslösen. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz wird analysiert. Um das Licht an seinen jeweiligen Bestimmmungsort zu bringen, wird mit einem Kunststoff-Lichtleiter gearbeitet.

MESSAUFBAU

Die Verwendung des PAM mit Algenkulturen birgt eine Schwierigkeit: Die Zellen müssen innerhalb eines bestimmten Zeitraums im Messstrahl bleiben (Cosgrove/Borowitzka, 2006). Da sie aber in der Kultur sedimentieren, ist das nicht trivial. Rühren würde die Sache noch verschlimmern. Zwei Auswege bieten sich an:

*eMail r.mueller@oeko-sorpe.de

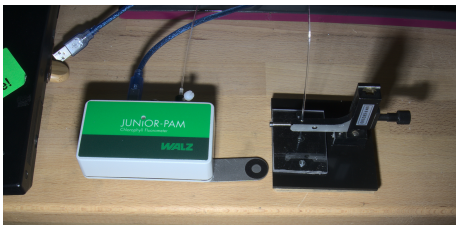

Abbildung 1 – Junior-PAM: Der Lichtleiter berührt die Oberfläche des Tropfens mit der *Chlorella*-Kultur

Abbildung 2 – Junior-PAM: Glasfaserfilter mit *Chlorella* in der eigentlich für Laubblätter bestimmten Magnethalterung

- Das Messvolumen muss möglichst klein gemacht werden. Hierzu wurde eine Plexiglasplatte mit einerAusfräsung von 2 mm Durchmesser und 1,8 mm Tiefe angefertigt und der Lichtleiter mit einer verschiebbaren Halterung so befestigt, dass er die Oberfläche des Tropfens gerade berührt (Abbildung 1).
- Die Algen werden auf ein Glasfaserfilter filtriert, welches dann wie ein Blatt in die Magnethalterung des Junior-PAM eingespannt wird (Abbildung 2).

Die erste Methode kommt mit sehr wenig Material aus, bei der zweiten mussten ca. 70 mL Kultur filtriert werden, dann war das Filter zugesetzt und die maximale Zelldichte erreicht. Das Filter wurde zur Dunkeladaption in einem kleinen verschlossenen Gefäß aufbewahrt, um ein Austrocknen zu verhindern.

VERGLEICH DER BEIDEN ANSÄTZE

Ohne die Messergebnisse bereits hier im einzelnen zu besprechen, zeigt ein Vergleich der ermittelten Grafen (Abbildung 3, 4) schon, welche Methode geeigneter zu sein scheint:

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

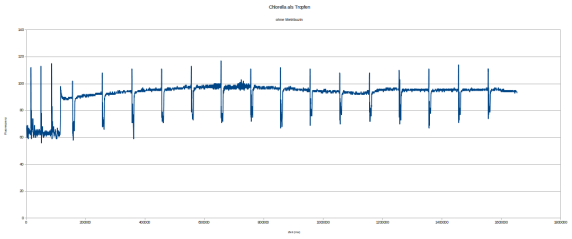

Abbildung 3 – Messung am Tropfen

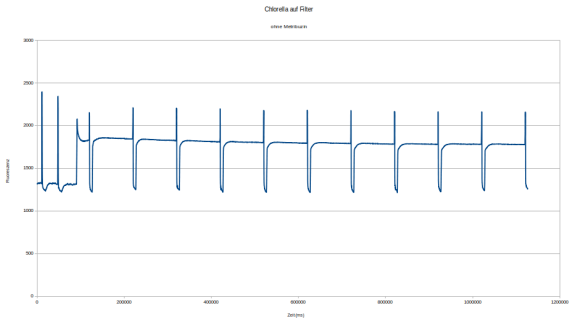

Abbildung 4 – Messung auf dem Glasfaserfilter

Die auch im kleinen Tropfen noch nicht zu vernachlässigende Beweglichkeit der Zellen zeigt sich in einem wesentlich unruhigeren Grafen. Die Filtration auf ein Glasfaserfilter ist also vorzuziehen. Auch ist die Fluoreszenzantwort aufgrund der dichter liegenden Zellen um das ca. 20-fache erhöht, was ebenfalls für diese Methode spricht.

Im weiteren Verlauf wird also mit der Filter-Methode weitergearbeitet.

VERSUCHE MIT METRIBUZIN

Um den Elektronentransport zu hemmen werden Herbizide eingesetzt. In unseren Versuchen haben wir Metribuzin verwendet, ein vor allem im Kartoffelanbau benutztes Herbizid. Es hemmt, ähnlich wie DCMU (= Diuron) nur den Elektronentransport am PSII, und zwar unmittelbar vor Plastochinon (Trebst/Wietoska, 1975).

Leider ist Metribuzin schlecht in Wasser löslich. Zum Experimentieren müsste es eigentlich in Acetonitril gelöst werden, welches mit Wasser mischbar ist. Da dieses nicht zur Verfügung stand, wurde eine geringe Menge (etwa 1 mm^3) als Feststoff in etwa 70 mL der Kultur aufgeschwemmt und durch Rühren so gut wie möglich gelöst. Diese Mischung wurde mit Unterdruck auf ein Glasfaserfilter filtriert, welches nach 30 min Aufbewahrung im Dunkeln wie oben beschrieben untersucht wurde. Eine gleich behandelte Probe ohne Metribuzin diente als Kontrolle.

Die Bedienung des Geräts und die Berechnungen wurden nach Schansker (2020) vorgenommen. Die Einstellungen am PC für das Junior-PAM waren entsprechend den Standardvorgaben (default). Es wurde das Programm der Fa. Walz „WinControl 3 Teaching Edition" verwendet.

Beide Filter wurden nach folgendem Schema untersucht:

- 30 min Dunkeladaption
- Einspannen des Filters in die Halterung
- Nach ca. 15 s Sättigungspuls (SAT)
- Nach ca. 30 s Sättigungspuls (SAT)
- Nach ca. 30 s Einschalten der aktinischen Beleuchtung (Act. L.)
- Nach ca. 30 s Sättigungspuls (SAT)
- mehrfache Wiederholung des Sättigungspulses alle 100 s

Kontrolle ohne Metribuzin

Im Dunkeln sind alle Reaktionszentren „offen", d.h. bereit für die Elektronenaufnahme. Sobald das Messlicht (kurze, schwache Lichtpulse) eingeschaltet ist, wird der Fluoreszenzlevel F_0 erreicht. Er spiegelt die Erregungsenergie wider, die nicht für Fotosynthese benutzt und als Fluoreszenszlicht (plus Wärme) wieder abgegeben wird. Wird der Sättigungspuls (SAT, kurzer Lichtblitz, der alle Reaktionszentren „schließt") ausgelöst, muss die gesamte eingestrahlte Energie abgegeben werden, da sie nicht für fotochemische Prozesse genutzt werden kann. Dies entspricht dem Fluoreszenzlevel F_m. Aus diesen beiden wird der Wert F_v abgeleitet (Abbildung 5):

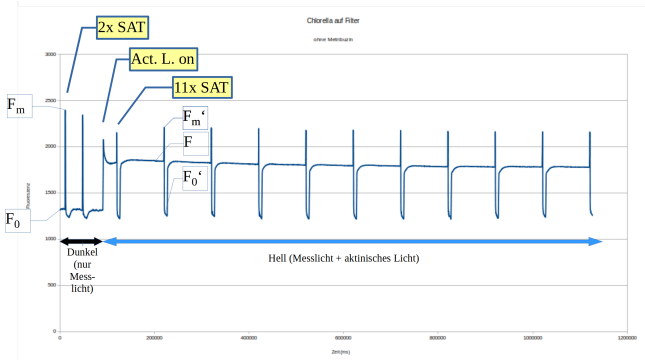

Abbildung 5 – Chlorella ohne Metribuzin

$$F_v = F_m - F_0 \tag{1}$$

Das Verhältnis (oder) gibt die maximale Fotosyntheseeffizienz des PSII wieder. Bei gesunden Pflanzen liegt dieser Wert zwischen 0,8 und 0,83. Im gezeigten Versuch beträgt der Wert allerdings nur 0,451. Der nicht für die Fotosynthese genutze Anteil (hier 0,55 (55

LITERATUR

COSGROVE, J., BOROWITZKA, M. (2006): Applying Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry to microalgae suspensions: stirring potentially impacts fluorescence. Photos. Res. **88**, 343-350 (https://doi.org/10.1007/s11120-006-9063-y)

SCHANSKER, G. (2020): Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: Simple Experiments with the JUNIOR-PAM Chlorophyll Fluorometer. Heinz Walz GmbH (https://www.walz.com/downloads/manuals/junior-pam/SimpleExperiments01.pdf)

TREBST, A./WIETOSKA, H. (1975): Wirkungsmechanismus und Struktur-Aktivitätsbeziehungen des Aminotriazinon-Herbizids Metribuzin. Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports von Chloroplasten durch Metribuzin. Z. f. Naturf. **30c**, 499-504 (https://doi.org/10.1515/znc-1975-7-813)

ISSN 2194-3052