

Platinsalz als Stressfaktor bei Chlorella

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	Seite 1
2) Allgemeines über Chlorella	Seite 2
3) Allgemeines über Platinsalze	Seite 2
4) Aufbau und Geräte	Seite 2
5) Kultivierungsbedingungen	Seite 3
6) Durchführung	Seite 4
7) Beobachtungen	Seite 7
8) Diskussion	Seite 10
9) Fehlerbetrachtung	Seite 12
10) Ausblick	Seite 13
11) Literaturquellen	Seite 13
12) Danksagungen	Seite 14

Einleitung

Zu dieser Arbeit habe ich mich entschlossen, weil ich durch die letzte Arbeit angeregt wurde an diesem Thema weiter zu arbeiten. In dieser wurde gezeigt, dass tierisches Plankton anfälliger auf Platin reagiert als pflanzliches. Der experimentelle Grundaufbau wurde beibehalten, da dieser praktikabel und gut reproduzierbar ist. Geändert wurde jedoch die Applikation des Platins mit EDTA als Komplexbildner, weil dieses ohne den Komplexbildner ausfällt [7], außerdem wurde eine computergestützte Ermittlung der Zellkonzentration vorgenommen. Nachdem Stresssymptome, in Form einer geringen Zellkonzentration und blasser Farbe aufgetreten sind, habe ich mich an die Arbeitsgruppe von Prof. Feierabend (Uni Frankfurt) gewandt, die Erfahrungen in diesem Thema hat, um tiefer an die Ursachen des Bleichens (bleaching) zu kommen. Ziel dieser Arbeit ist es, einen qualitativen Zusammenhang zwischen der Platinaufnahme und dem Ausbleichen herzustellen, und mögliche Angriffspunkte des Platins festzustellen.

Allgemeines über Chlorella

Bei Chlorella handelt es sich um eine einzellige, kugelförmige Grünalge. Bisher wurden über 12 Arten mit weiteren Untergattungen der Chlorella entdeckt, wobei es Süßwasser- und Salzwasserarten gibt. Alle Arten gehören dem Nanoplankton an ($2\mu\text{m} < \text{Teilchengröße} < 30\mu\text{m}$). Sie besitzt einen Chloroplasten und ihre Zellwand besteht aus Cellulose. Sie wird einzeln oder in Clustern vorgefunden. Ihre Vermehrung verläuft asexuell über Autosporen. Da sie leicht zu vermehren ist und den höchsten Chlorophyllanteil aller bekannten Pflanzenarten hat, ist sie eine beliebte Forschungsalge für Studien über Photosynthese, Massenkultivierungen und für die Klärung von Kloakenabwasser. Chlorella wird auch in der Nahrungsmittelproduktion verwendet, weil sie erstens eine sehr hohe Vermehrungsrate hat und zweitens reich an Proteinen (ca. 60 %) ist.

Außerdem besitzt sie alle essentiellen Aminosäuren und hat viel Vitamine. Es wird auch behauptet, dass sie gegen Krebs prophylaktisch wirkt, da sie den wachstumshemmenden Stoff Chlorellin produziert. Sie wird auch als Entgiftungsmittel bei Schwermetallvergiftung postuliert.

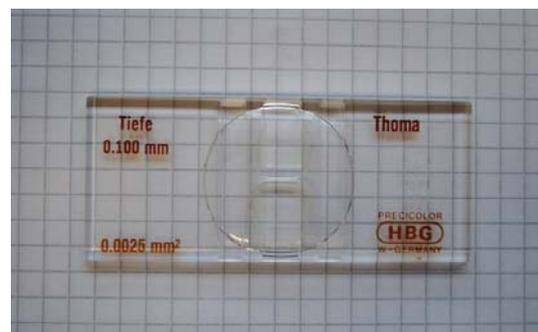
Allgemeines über Platinsalze

Das verwendete Kaliumtetrachloroplatinat bildet tetragonale rote Kristalle mit einer Dichte von $3,38\text{g}/\text{cm}^3$. Es ist gut in Wasser löslich und hat einen MAK-Wert von $0,002\text{ mg}/\text{m}^3$ [1]. Dieser reicht jedoch nicht aus, um Platin induzierte Allergien zu verhindern [4]. Dies zeigt die hohe Toxizität des Salzes, die von dem Schwermetall herrührt.

Die Cytotoxizität der Platinsalze, insbesondere die des Cis-Platins, werden bei der Chemotherapie ausgenutzt. Dabei setzt sich das Platin an die DNS sich teilender Zellen und verhindert deren Entspiralisieren, indem es Quervernetzungen von Einzelsträngen erstellt [2].

Aufbau und Geräte

Es wurden sechs Waschflaschen von zwei 75 Watt starken Pflanzenlampen aus 50 cm Entfernung beleuchtet. Je drei Waschflaschen sind über ein Dreiwegeventil an einen Aquariumsdurchlüfter (1100cc/min Toleranz: $\pm 5\%$ 2 W Leistung) angeschlossen worden, sodass pro Stunde 22 Liter Raumluft durch jede Flasche geleitet wurde. Die von den Aquariumspumpen durch die Nährlösung strömende Luft wurde nach außen frei abgegeben.



Neubauerzählkammer Abb.1

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Diese ist ein spezieller Objektträger, auf dem ein Raster eingraviert ist. Das Raster hat eine Fläche von 1mm^2 und eine Gitterbreite von

0.05 mm, sodass 400 Flächeneinheiten $a \approx 0.0025\text{mm}^2$ vorhanden sind. Zur Orientierung wurde alle fünf Kästchen ein zusätzlicher Strich gezogen. Um ein bestimmtes Volumen zu erreichen wird ein optisch geschliffenes Deckgläschen auf zwei Erhöhungen des Objektträgers gelegt, die 0,1 mm höher sind als das Raster. Damit wird ein Volumen von 10^{-7} Liter abgemessen. Das Volumen über einer Flächeneinheit beträgt somit $1/4 \times 10^6$ ml.

Über ein Lichtmikroskop, auf dessen Okular eine Digitalkamera montiert war, sind Fotos gemacht worden. Diese wurden anschließend im Computer mit dem Bildbearbeitungsprogramm Imaging pro Plus ausgewertet.

Ein Photometer wurde zur quantitativen Analyse des Chlorophylls und der Katalase benutzt, hierbei ist die Extinktion E gemessen worden. Diese ist proportional zur Konzentration der färbenden / absorbierenden Substanz. Es gilt das Lambert-Beer'sche-Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Substanz, d = Schichtdicke.

Zur Messung der Sauerstoffkonzentration wurde die Clark'sche Sauerstoffelektrode verwendet. Die Messsonde enthält eine Platin-Katode und eine Silber-Anode. Der Raum die Elektroden ist mit einer KCl-Lösung gefüllt und wird gegen den Reaktionsraum durch eine gasdurchlässige Teflonmembran abgegrenzt. Die Elektroden werden mit einer Gleichspannung von 0.8V polarisiert. Da diese Spannung die elektrochemische Potenzialdifferenz zwischen Pt und Ag noch nicht überschreitet, fließt kein Strom, der anwesende Sauerstoff wird hingegen reduziert. Dadurch kommt es zum Stromfluss, der durch einen Verstärker auf ein Schreiber übertragen wird. Die Fluoreszenz des PSII wurde über ein Puls-Amplituden moduliertes (PAM) Fluorometer gemessen. Das Gerät ist so konzipiert, dass es nur die Fluoreszenz als Messwert nimmt, die durch ein Messlicht induziert wird, dass mit der Frequenz von 1,6kHz moduliert wird.

Kultivierungsbedingungen

Die Chlorella wurde in sechs Waschflaschen kultiviert, in denen jeweils 200ml Suspension befanden. Diese wurde 24 Stunden pro Tag beleuchtet und durchlüftet. Die Temperatur schwankte zwischen $24,5^\circ$ und $25,4^\circ$ Celsius, der pH-Wert war abhängig von der zugesetzten Menge Platinsalz wegen des Komplexbildners EDTA (Ethylendiamintetraacetat), der bei der Bildung des Chelates zwei Protonen abgibt. (siehe Beobachtung).

Zum Ansetzen der Nährlösung wurden drei Stammlösungen hergestellt. Die erste für die Nährsalze, die zweite für die Spurenelemente und die dritte für das durch EDTA komplex gebundene Eisensulfat. Nach dem Verdünnen ergab sich folgende Nährlösung :

In 1000ml destilliertem Wasser kamen:

1) Nährsalze:	KNO_3	1011.1 mg (10^{-2} mol)
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	621.0 mg ($4 \cdot 10^{-3}$ mol)
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	89.0 mg ($5 \cdot 10^{-4}$ mol)
	$\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	246.5 mg (10^{-3} mol)
	$\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	14.63 mg (10^{-4} mol)
2) Spurenelemente:	H_3BO_3	61.83 μg (10^{-6} mol)
	$\text{MnSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	169.00 μg (10^{-6} mol)

ZnSO ₄ + 7H ₂ O	287.54 µg (10 ⁻⁶ mol)
CuSO ₄ + 5H ₂ O	2.49 µg (10 ⁻⁸ mol)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ + 4H ₂ O	12.36 µg (10 ⁻⁸ mol)

3) Eisensulfat +EDTA:	FeSO ₄ + 7H ₂ O	13.90 mg (5 · 10 ⁻⁴ mol)
	EDTA	18.60 mg (1.57 · 10 ⁻⁴ mol)

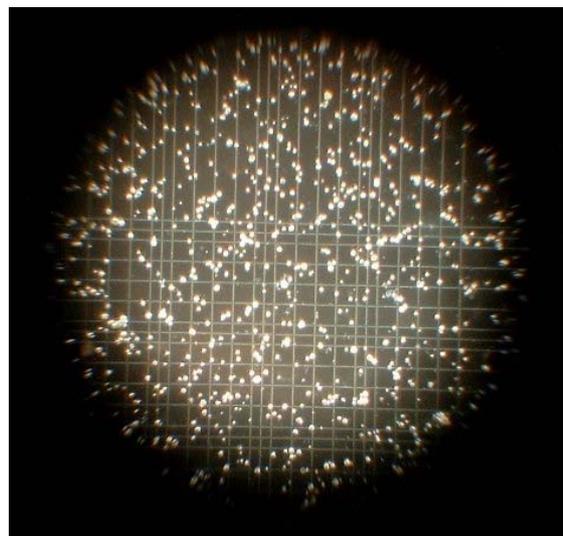
Dies entspricht im allgemeinen den üblichen Nährlösungen für Chlorella ([8] S. 223; [9])

Durchführung

Waschflasche	Pt-Konzentration
1+4	10 ⁻³ molar
2+5	10 ⁻⁴ molar
3+6	10 ⁻⁵ molar

Abb.2

Nachdem sich die Chlorella ca. zwei Wochen vermehrt hatte, bis die Population einen repräsentativen Wert erreicht hatte, wurde sie auf die sechs Waschflaschen verteilt. Dadurch waren in allen Waschflaschen die Zell-Konzentrationen der Chlorella gleich. Nun wurde die Chlorella mit variierenden Platinsalz-Konzentrationen versetzt, wobei je zwei Waschflaschen mit 10⁻³, 10⁻⁴, und 10⁻⁵ molarer Platinlösung kontaminiert wurden (Abb.2). Die Platinstammlösung ist vorher mit EDTA in jener Konzentration komplexiert worden, sodass auf jedes Tetrachloroplatinat-Ion 20 EDTA-Moleküle entfielen, d.h. in einer 10⁻³ molaren Platinlösung war eine 2·10⁻² molare EDTA Konzentration. Hiermit war eine möglichst hohe Komplexrate gewährleistet (Massenwirkungsgesetz). Die Stabilität des Komplexes ist zwar abhängig vom pH-Wert, aber diese liegt über der Stabilität anderer möglichen Komplexe innerhalb der Lösung. Während des Versuches, der über die Dauer von zwei Wochen durchgeführt wurde, ist die Zell-Konzentration täglich ermittelt worden. Hierfür wurde eine geringe Menge der Suspension (ca. 10⁻⁵ l) in eine Neubauerzählkammer gebracht. Über ein Mikroskop, an dessen Okular eine Digitalkamera befestigt war, wurden Aufnahmen angefertigt, die anschließend im Rechner über das Bildbearbeitungsprogramm Imaging Pro Plus bearbeitet und ausgezählt wurden. Dabei wurde eine Dunkelfeldmikroskopie verwendet, um einen möglichst hohen Kontrast zwischen den Zellen und der Flüssigkeit zu erreichen (Abb.3). Es wurde eine 32fache Vergrößerung verwendet, um möglichst viele Zellen auszählen zu können. Am Computer wurden nun die Farben in den Fotos ausgewählt, die zu den Zellen gehörten. Anschließend wurde gezählt und ermittelt wie viele Cluster als ein Objekt gezählt wurden. Nun wurde



Chlorella unter 32facher Vergrößerung in einer Neubauerzählkammer Abb.3

die Tabelle, die die Fläche der Zellen auf den Fotos anzeigt nach Excel übertragen und dort ermittelt, wie viele Zellen sich in den Clustern befinden. Dafür wurde empirisch diese Formel aufgestellt:

$$N_Z = N_O - N_C + \frac{A_C}{A_D} \quad (1)$$

N_Z = Anzahl der gezählten Zellen, N_O = Anzahl aller gezählten Objekte, N_C = Anzahl aller Cluster, A_C = Fläche aller Cluster, A_D = Durchschnittsgröße einer Zelle. Die Durchschnittsgröße wurde individuell abhängig von der Suspension ermittelt, jedoch lag sie meist zwischen 30-36 Pixel. Ein Cluster wurde als ein Objekt definiert, dessen Fläche mehr als das Doppelte einer Durchschnittszelle betrug. Als gezählte Objekte galten alle, die eine Größe von 10 Pixel überschritten, um Kratzer oder Verunreinigungen auf dem Objektträger nicht mitzuzählen. Die hierdurch ermittelte Zellzahl wurde auf die ausgezählte Fläche in der Neubauerzählkammer übertragen und anschließend auf Mio. Zellen / ml hochgerechnet hierfür galt die Formel:

$$c_Z = \frac{N_Z}{N_t \times V_t} \quad (2)$$

c_Z = Konzentration der Zellen, N_t = Anzahl der ausgezählten Flächeneinheiten, V_t = Volumen auf einer Flächeneinheit.

Beispiel: Gezählte Objekte N_O : 354

Durchschnittsgröße einer Zelle A_D : 34 Pixel

Anzahl der Cluster N_C : 87

Ausgezählte Flächeneinheiten N_t : 182 (13x14)

Fläche aller Cluster A_C : 13895

Rechnung: 1) $354 - 87 + 13895 / 34 = 675.68$

2) $(675.68 / 182) / (1 / 4 \times 10^6 \text{ ml}) = 14.85 \times 10^6 \text{ Zellen / ml}$

Nach dem Versuch sind drei der Waschflaschen abgefiltert und über ein induktives gekoppeltes Plasma-Emissionsspektrometer (ICP-OES) quantitativ auf Platin untersucht worden. Hierfür ist die Trockenmasse der Chlorella mit Königswasser ($3 \times \text{HCl}_{\text{konz.}} + 1 \times \text{HNO}_3_{\text{konz.}}$) aufgeschlossen worden.

Bei einem zweiten Versuch ist das Prinzip des doppelten Ansatzes aufgegeben worden, um mehr Versuche durchführen zu können. Nun sind die sechs Waschflaschen wie folgt mit der Platin-EDTA Lösung kontaminiert worden (Abb. 4). Die Auszählung wurde über einen längeren Zeitraum und nur alle zwei Tage durchgeführt, da sich herausgestellt hatte, dass sich die Aussagekraft der Populationskurven nicht ändert.

Um dem „bleaching“ der Lösung näher zu kommen ist die Chlorophyll-Konzentration bestimmt worden. Für diesen Versuch wurden zuerst jeweils 10 ml der verschiedenen Lösungen, sowie eine Kontrollprobe der Chlorella 10 min bei 3000 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit 5ml 80% Aceton aufgefüllt. Da nach mehrminütigen Rütteln sich erst wenig Chlorophyll gelöst hatte, wurde nun mehrfach kurz

Waschflasche	Pt-Konzentration
1	10^{-3} molar
2	$10^{-3,5}$ molar
3	10^{-4} molar
4	$10^{-4,5}$ molar
5	10^{-5} molar
6	ohne Platin

Abb.4

mit Ultraschall bestrahlt, was zu einem Bersten der Zellwand führen sollte. Trotz mehrfacher Wiederholung des Vorgangs ließ sich nur eine schwache Steigerung der gelösten Stoffe erkennen. Deswegen wurde die Suspension in flüssigen Stickstoff schockgefroren, doch als dies nun auch nicht das gewünschte Ergebnis brachte, wurden

die Proben mit je ein Gramm 250 µm großen Glaskugeln präpariert und erneut gerüttelt. Nach diesem Vorgang wurden die Proben erneut 10 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde ein Milliliter in eine genormte Küvette gefüllt, quantitativ analysiert und anschließend ausgerechnet. Aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes, das einen Zusammenhang zwischen Extinktion und Stoffkonzentration formuliert, ist es möglich, durch eine hergeleitete Formel die Chlorophyllkonzentration zu bestimmen. Aus der Literatur wurden folgende Formeln verwendet:

$$c_{(\text{Chl a})} \text{ (in mg/ml)} = 0.01178 \times E_{664} - 0.00229 \times E_{647} \quad \text{und} \quad c_{(\text{Chl b})} \text{ (in mg/ml)} = 0.02005 \times E_{647} - 0.00477 \times E_{664}.$$

[16] Der Index der Extinktionswerte entspricht den Absorptionsmaxima in nm von Chlorophyll a und b in 80% Aceton. Zusätzlich wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen, um den Anteil der Verunreinigung heraus zu rechnen. Außerdem musste der Faktor 0.5 eingeführt werden, da die Zellen von 10ml Lösung nur in 5ml 80% Aceton überführt worden sind.

Bei der O₂-Elektrolyse ist die Sauerstoffkonzentration in der Lösung sowohl während der Belichtung als auch ohne Licht bestimmt worden. Vor dem Versuch ist die Elektrode kalibriert worden, sodass eine bei 25° C gesättigte Lösung, die 8.11 mg O₂ enthält, 81.1 Einheiten auf der Skala des Papier beträgt. Es wurde mit einem Vorschub von 30 cm/ h gearbeitet. Es wurden je 3 ml in zwei Reaktoren aus Plexiglas gefüllt und diese mit der Elektrode verschlossen. Zuerst wurde die Photorespiration in Dunkelheit gemessen und anschließend die Suspension mit zwei unterschiedlich starken Halogenspots beleuchtet, bis es zu einer Sättigung in der Lösung kam, das heißt die Sauerstoffkonzentration nahm nicht mehr zu, da die Photorespiration gleich der CO₂-Fixierung war. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um eine Schwächung des Photosystems durch die hohe Lichtintensität (5000 µEinstein bzw. 3000 µEinstein) zu beobachten.

Für die Katalasemessung wurde die Eigenschaft der Katalase H₂O₂ in Wasser und O₂ zu zersetzt genutzt, indem die Abnahme des Wasserstoffperoxyds durch photometrische Methoden ermittelt wurde. Bei der Messung der Katalaseaktivität ist die Chlorellasuspension zuerst bei 4500 rpm 10 min lang abzentrifugiert worden, anschließend in 1ml Phosphatpuffer resuspendiert und in einem Mörser unter Kühlung 5-6 Minuten mit Seesand zerkleinert worden. Die Lösung ist nun in einem Eppendorfgefäß erneut mit 10.000 rpm 20 Minuten bei 4° Celsius abzentrifugiert worden. Aus dem Überstand wurden 0,1ml entnommen und in 2,9ml 0,01 molarer H₂O₂-Lösung überführt, die mit 0,01 molarem Phosphatpuffer gepuffert war, welche sich in einer Quarküvette befand. Nun wurde schnell gemischt und bei 240 nm die Extinktionsänderung des Wasserstoffperoxyds in der ersten Minute gemessen. Nach der Formel :

$$\frac{(E_2 - E_1) \times \text{Konzentrationsfaktoren}}{10^{-3} \times \epsilon \times (t_2 - t_1)}$$

konnte nun die Katalaseaktivität berechnet werden. Es ergibt sich die Katalaseaktivität in µmol/(ml x s) der Zellsuspension. Es hat sich bei der Extinktionsmessung gezeigt, das die Chlorella nicht genügend aufgespalten worden war, was dazu führte, dass die Extinktionsänderung marginal war. Dies führte zu einer zu geringen Katalaseaktivitäten. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu ermitteln wurde ein anderes Aufschlussverfahren verwendet, die „French-Press“. Dabei wird die Zelllösung unter hohem Druck durch ein Ventil geleitet. Bei den entstehenden extremen Geschwindigkeiten und Beschleunigungen wird die Zellwand aufgebrochen. Für den Aufschluss wurden 800 bar verwendet, die Lösung wurde zweimal durch die French-Press geleitet. Alle weiteren Schritte sind wie oben durchgeführt worden. Die Daten der Katalaseaktivität sind aus diesem Versuch errechnet worden. Die bei der O₂-Elektrolyse beobachtete unterschiedliche Aktivität wurde mit der Fluoreszenzmessung näher untersucht. Dabei stützt man sich auf die Annahme, dass das PSII seine Anregungsenergie auf drei

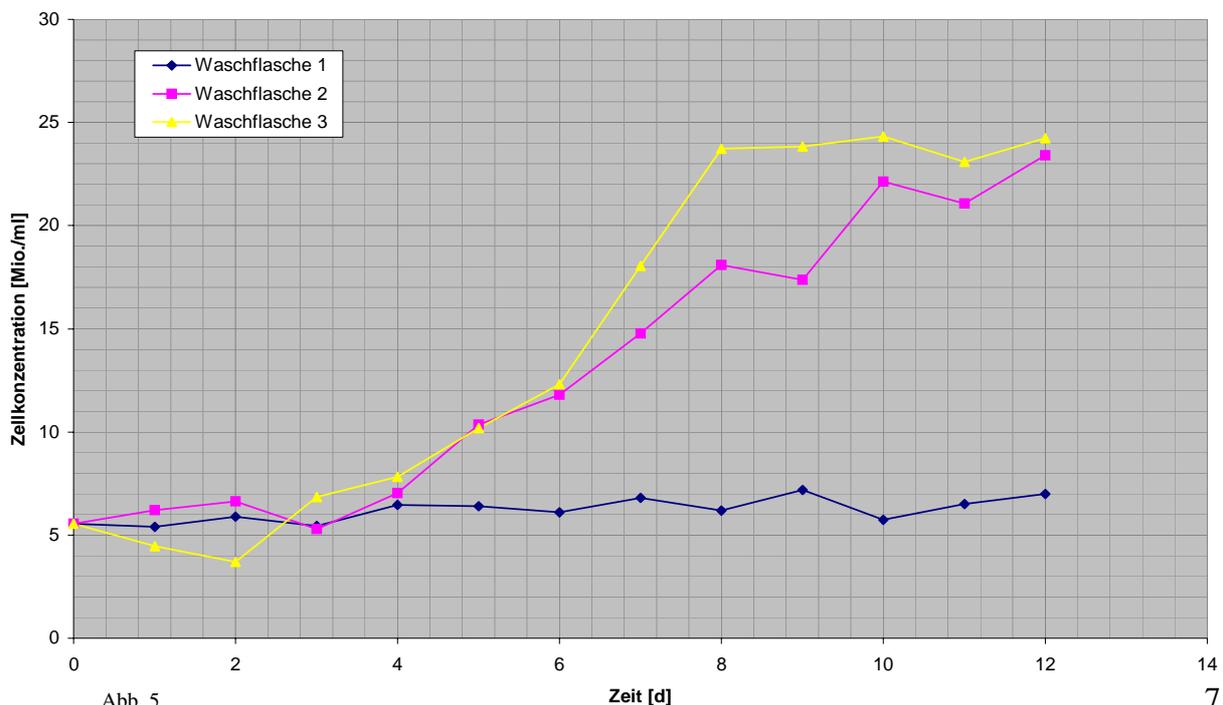
verschiedenen Arten abgeben kann. Erstens durch Ladungstrennung und anschließendem Elektronentransport, dies ist die eigentliche Aufgabe des Photosystems, zweitens durch Abstrahlung von Wärme als Schutzmechanismus gegen zuviel Elektronendruck durch das PSII und anschließender Überreduktion der weiteren Komponenten und schließlich durch Abstrahlung von Rotlicht, als unvermeidlichen Verlust. Bei der Fluoreszenz wird dieses Rotlicht gemessen, um auf die anderen beiden Werte zu schließen. Wenn die Aktivierungsenergie hauptsächlich für die Elektronentransportkette oder die Wärmeabstrahlung verwendet wird kommt es zu Fluoreszenzlöschung. Hierbei kann man die photochemische Löschung durch Elektronentransport und die energieabhängige Löschung durch Abstrahlung von Wärme unterscheiden, indem die maximalen Fluoreszenzen bei unterschiedlicher Belichtungsarten gemessen werden.

Bei diesem Versuch, der bei 20°C durchgeführt wurde, erfolgte die Messung der durch photochemische Effekte eintretende Löschung, um die Effektivität des PSII zu überprüfen. Als erstes wurde die Chlorellakonzentration um den Faktor 10 durch Abzentrifugieren und anschließendem Resuspendieren erhöht, um die messbare Minimalfluoreszenz zu überschreiten. Das anschließende abdunkeln der Chlorella hatte eine Dunkeladaptation zu Folge, dieser Prozess wurde auf zwei Stunden fest gesetzt. Jetzt wurde zuerst die variable Minimalfluoreszenz gemessen um anschließend während eines Starklichtimpulses die Maximalfluoreszenz zu ermitteln. Aus diesen Messdaten wurde eine dimensionslose Größe, die die Photosynthesekapazität anzeigt, mit der Formel $(f_{\text{variabel}} - f_{\text{max}})/f_{\text{max}}$ errechnet. Wenn man die unbehandelte Chlorellakultur mit 100% Photosyntheseleistung ansetzt, kann man die relative Leistung der anderen Kulturen ermitteln.

Beobachtungen

Während des ersten Versuches haben sich deutliche Unterschiede in der Zellkonzentration gezeigt. Die Zellkulturen mit 10^{-4} und 10^{-5} molaren Konzentrationen des Platins vermehrten sich ähnlich stark, während die Zellkulturen mit der 10^{-3} Konzentration kaum Wachstum zeigten.

Konzentrationsverlauf



Am Anfang hatten die Kulturen eine Zellkonzentration von 5,4 Mio Zellen/ ml, am Ende hatten die Waschflaschen 1 und 3 (10^{-3} molare Platinkonzentration) 7,0 Mio Zellen/ ml, die Waschflasche 2 und 4 (10^{-4} molare Pt-Konzentration) 23,2 Mio. Zellen/ ml und die Suspensionen mit der 10^{-5} molaren Konzentration (Waschflasche 3 und 6) 24,2 Mio Zellen/ ml. Bei Abbruch des Versuches ließ sich nicht feststellen, ob ein Sättigungsgrad innerhalb der Zellkulturen erreicht worden war, oder die Kulturen noch weiter gewachsen wären. In allen Kulturen war am Anfang eine Bakterienart nachweisbar, jedoch ist diese nach einigen Tagen ausgestorben. Schon am zweiten Tag des Versuches waren die Zellen in der 1. Waschflasche gut verteilt, während man in der 3. eine deutliche Verklumpung feststellen konnte. Dieser Morphologieunterschied ließ sich während des gesamten Versuches beobachten. Zudem sind Kristalle unter dem Mikroskop in der 1. Waschflasche erkennbar gewesen. Sie hatten eine Größe zwischen 2 und 10 μm und waren triklin koordiniert.



Waschflaschen nach vier Wochen Abb.6

Die Färbung der Kulturen änderte sich ab dem 4. Tag. Die Kultur mit der hohen Pt-Konzentration ist hell-grün geworden, während die Waschflaschen 2/5 und 3/6 mittelgrün bis dunkelgrün wurden (Abb. 6). Auch die Zellform in den Kulturen divergiert. In der Chlorella-Kultur mit der hohen Pt-Konzentration sind die Zellen groß und teilweise unförmig gewesen, in den Kulturen mit geringeren Konzentrationen kleiner und runder. Es lässt sich, besonders im späteren Versuchsabschnitt, eine verstärkte Schaumbildung in den Suspensionen mit höherer Pt-Konzentration feststellen. Der pH-Wert hat

Konzentrationsverlauf

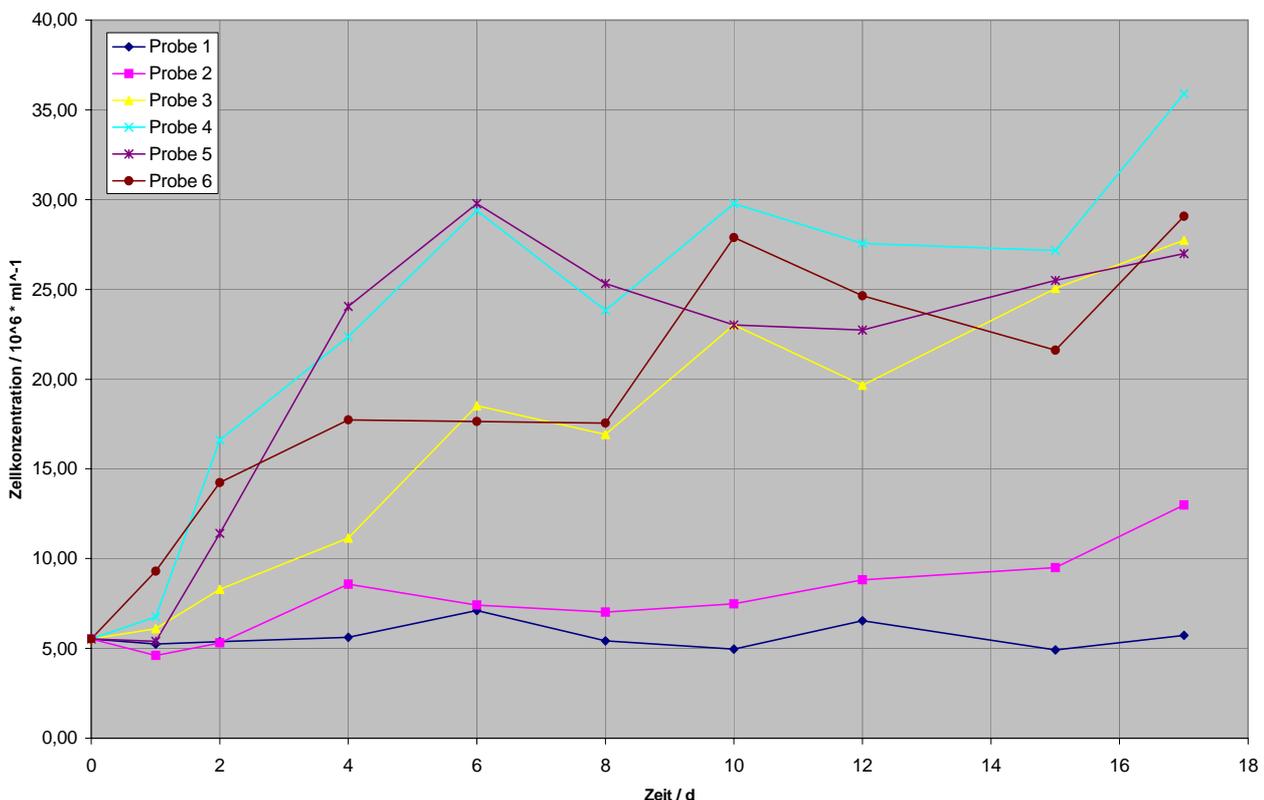


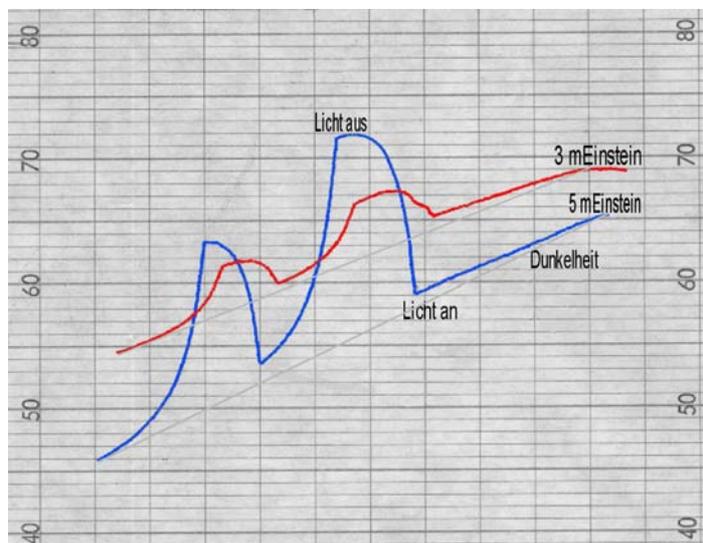
Abb.7

sich als abhängig von der zugesetzten Platinsalzmenge gezeigt. In der 1. und 4. Waschflasche herrschte ein pH-Wert von 5, in der 2. und 5. ein pH-Wert von 6.3 und in den Waschflaschen 3 und 6 ein pH-Wert von 7.4.

Bei dem zweiten Versuch hat sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Ansätzen 1 und 2 im Vergleich zu den Ansätzen 3 bis 6 gezeigt. (Abb.7) Die Anfangskonzentration hat sich bei den Kulturen 3-6 ca. verfünffacht, während bei den anderen entweder eine Verdopplung oder fast kein Wachstum zu verzeichnen war. Auch hier sind die Morphologieunterschiede aufgetreten, die während des ersten Versuches beobachtet wurden.

	$c_{Pt} = 10^{-3} \text{ M}$		$c_{Pt} = 10^{-4} \text{ M}$		$c_{Pt} = 10^{-5} \text{ M}$		Kontrolle	
Platinaufnahme (von 10^6 Zellen)	0.628 μg		0.029 μg		0.013 μg		Ohne Platin	
Prozentuale Platinaufnahme	2.25 %		3.4 %		16,2 %		k. A.	
Chlorophyll gesamt (von 10^6 Zellen)	0.036 μg		0.078 μg		0.223 μg		1.235 μg	
Chlorophyll a (von 10^6 Zellen)	0.025 μg		0.55 μg		0.171 μg		0.777 μg	
Chlorophyll b (von 10^6 Zellen)	0.011 μg		0.023 μg		0.055 μg		0.458 μg	
Respiration (von 10^6 Zellen)	1.5ng O_2/min		0.43ng O_2/min		0.67ng O_2/min		0.45ng O_2/min	
Max. positive Sauerstoff- Produktion (von 10^6 Zellen)	3mEins.	5mEins.	3mEins.	5mEins.	3mEins.	5mEins.	3mEins.	5mEins.
	59.3ng	166ng	16ng	77ng	13.5ng	16.5ng	65ng	160ng
	O_2/min	O_2/min	O_2/min	O_2/min	O_2/min	O_2/min	O_2/min	O_2/min
Absolute Sauerstoff-Produktion bis Sättigung (von 10^6 Z.)	43ng	160ng	9ng	60ng	>95ng	>137ng	>463ng	>632ng

Abb.8



O₂-Elektrolyse der 10⁻⁴ molaren Lösung Abb.9

(Es ist zu beachten, dass wegen des Papiervorschubs die Funktion von rechts nach links verläuft.)

Bei der Chlorophyll-Analyse wurde schon vor dem Extrahieren des Farbstoffes ein Unterschied beobachtet, der sich bei der Untersuchung erhärtet hat. Hier ist auch zu sehen, dass die in der Zellpopulation kaum geschwächten Chlorellen in der 10⁻⁵ molaren Lösung deutlich weniger Chlorophyll enthalten, als die gesunden Zellen. Dieser Umstand wurde bei den Kulturen mit der höheren Platinkonzentration noch deutlicher. Bei der Platinanalyse durch die ICP-OES hat sich zwar eine Abstufung der Konzentrationen gezeigt, jedoch nicht in der logarithmischen Reihenfolge, wie die

Versuche aufgebaut waren. Auffällig ist, dass die Zellkulturen mit abnehmender Konzentration relativ mehr Platin aufgenommen haben. Während in der 10⁻³ molaren Lösung nur 2.25% des Platins aufgenommen wurden sind dies bei der 10⁻⁵ molaren Lösung schon 16.2%. Man kann also von einer Anreicherung des Platins in der Zelle sprechen. Es lässt sich aber kein reziprokes Verhalten zwischen Platinaufnahme und Chlorophyll-Konzentration erkennen. Der Quotient von Chlorophyll a zu Chlorophyll b ist bei der Kontrollprobe am

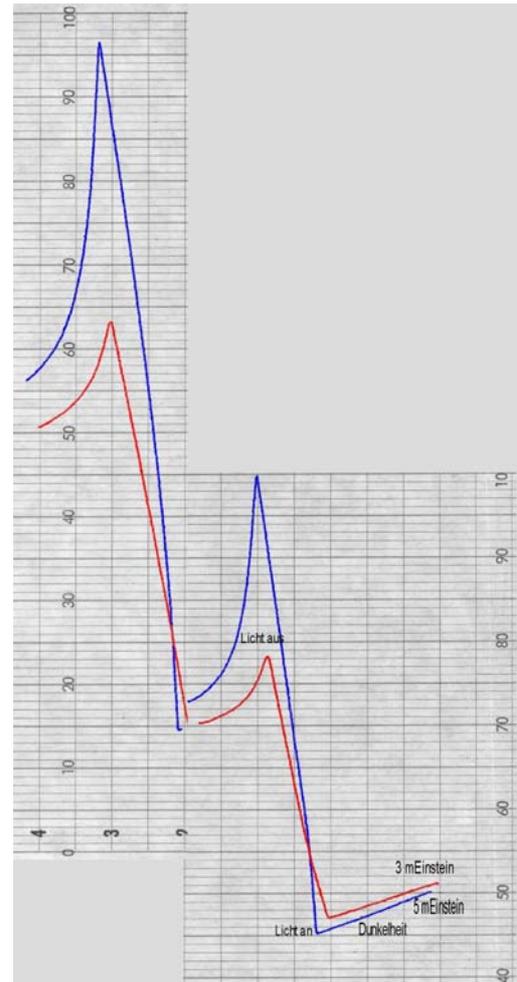
geringsten (1.7) bei den beiden niedriger kontaminierten Zellkulturen deutlich höher (3.1 (10^{-5}); 2.4 (10^{-4})) und bei der am höchsten kontaminierten Zellkultur wieder fast auf Normalmaß (2.2).

Die O_2 -Analyse hat besonders bei der Sättigung große Unterschiede gezeigt. Die Chlorellakultur mit der 10^{-3} molaren Platinlösung hat bei diesem Versuch überraschend gute Werte erreicht, die sogar die der 10^{-4} molaren Lösung übertrafen. Während die 10^{-3} molare Lösung eine starke Steigung hat, ist diese bei der 10^{-4} molaren nicht so stark ausgeprägt. Auch haben die Zellen länger Sauerstoff produziert, als die der 10^{-4} molaren Suspension. Bei beiden Proben ist jedoch auffällig, dass die Sauerstoffkonzentration, im Gegensatz zur Kontrollprobe, mit der Zeit abnimmt. Der einzige Unterschied, der anzeigen kann, dass die Zellen stärker geschädigt sind, ist die Respiration der Zellen in Dunkelheit, die den dreifachen Wert erreicht hat. Die 10^{-5} molar kontaminierte Chlorellakultur zeigte ein ähnliches Verhalten wie das der Kontrollprobe bei der Sättigung, d. h. dass die Sättigung nicht erreicht wurde. Die Sauerstoffproduktion pro Zeit ist jedoch geringfügig schwächer als die der höher konzentrierten Suspension.

Waschflasche	Katalaseaktivität in $nmol/(10^6 \text{ Zellen} \times s)$	Prozentuale Photosyntheseleistung
1	0	0
2	2,55	0
3	2,09	4
4	1,03	30,6
5	1,47	106,7
6	1,59	100

Abb.11

Kultur müsste einen höheren Wert anzeigen. Bei der Fluoreszenzmessung mit dem PAM-Fluorometer ist reziprokes Verhalten der Syntheseleistung zur Platinkonzentration festgestellt worden.



O_2 -Eletrolyse der Kontrollprobe, die Funktion ist in der Mitte unterbrochen, weil die Schreiber umgesetzt werden mussten, trotzdem ist der Sättigungsbereich nicht erreicht worden. Abb. 10

Die Katalasemessung hat selbst nach dem variierten Aufschluss durch die French-Press keine realitätsnahen Werte gezeigt, die Enzymaktivitäten liegen ungefähr eine Zehnerpotenz unter den zu erwartenden Ergebnissen, besonders die unbehandelte

Diskussion

Die Konzentrationsunterschiede in den Kulturen kann man durch die Wirkung des Platins begründen, jedoch ist nicht auszuschließen, dass andere Umwelteinflüsse auch eine Rolle gespielt haben. Wenn man jedoch davon ausgeht, dass die äußeren Einflüsse, wie Temperatur oder bakterieller Befall der Kulturen, zu vernachlässigen sind, dann bleiben fünf Gründe, warum die Kulturen unterschiedlich stark gewachsen sind.

1. Das Platin hat eine schädliche Wirkung auf die Chlorella,
2. Der stark divergierende pH-Wert hat zu unterschiedlichem Wachstum geführt,
3. Die hohe Ionenkonzentration der Nährlösung (evtl. wegen des EDTAs) hat zu einer Osmose geführt, die die Zellen geschwächt hat.
4. Das überschüssige EDTA hat die Ionen der Nährlösung und hier insbesondere die Spurenelemente komplex gebunden, wodurch die Aufnahme dieser in die Zelle gehindert oder unterbunden wurde.
5. Schließlich kann das EDTA selbst eine toxische Wirkung auf die Zellen haben.

Für eine platininduzierte Störung sind die großen unförmigen Zellen in der hoch konzentrierten Platinlösung ein Indiz, weil das Platin eine Zellteilung verhindern kann [2]. Hierfür können auch die geringen Zellkonzentrationen in den millimolaren Lösungen sprechen, jedoch ist dieser Zusammenhang nicht eindeutig, weil eine generelle Schwächung der Zellkulturen zu geringeren Konzentrationen führen kann. Dass Platin in vergleichsweise großen Mengen aufgenommen wurde, zeigt die ICP-OES, wo es jedoch in der Zelle eingelagert wurde lässt sich nicht genau analysieren. Nach Ballach und Wittig wird ein Großteil des Platins in die Zellwand „eingebaut“, was eventuell die Unterschiede in der Morphologie der Lösungen erklären kann [3]. Dieser Effekt wird von Klimmek und Stan bestätigt [5]. Das Bleichen, das wegen des geringen Chlorophyllanteil auftritt, kann auch durch das Platin induziert worden sein [6]. Dieses Verhalten muss allerdings noch näher untersucht werden, denn einerseits kann das Platin eine Zersetzung des Chlorophylls auslösen, andererseits kann aber auch die Biosynthese des Chlorophylls gehemmt sein, diese Möglichkeit wird aber wegen Hinweisen aus der Literatur nicht untersucht [6]. Ein möglicher Angriffspunkt des Platins der zu einer Zersetzung führen kann, ist die Katalase; da sie verantwortlich für den Abbau des toxischen H_2O_2 in der Zelle ist, das unter anderem bei der Überlastung des Photosystems II (PS II) auftritt. Die unterschiedlichen Chlorophyll-Quotienten bei den Messungen sind ein weiteres Indiz für eine Schädigung des PS II, da hier Chlorophyll b beteiligt ist, im Gegensatz zum PS I, wo nur Chlorophyll a zu finden ist. Das H_2O_2 , dass durch das Sauerstoff-Superoxid O_2^- über Superoxid-Dismutase (direkt an der Sammelfalle?) entsteht, greift nun diesen Sammelkomplex an und zersetzt damit überproportional viele Chlorophyll b -Moleküle. Der bessere Chlorophyllquotient der 10^{-3} molaren Lösung kann ein Grund sein, warum die Kultur bei der O_2 -Elektrolyse relativ gute Werte erreichte. Leider hat die Katalasemessung auf diesen Sachverhalt keinen klaren Hinweis geben können, denn trotz des veränderten Aufschlussverfahrens durch die „French-Press“ ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Kulturen ermittelt worden, die gemessenen Werte liegen deutlich unter den üblichen Werten (einige $\mu\text{mol/ml}$) Dies kann an mehreren Faktoren liegen:

- 1) Es ist extrem wenig Katalase in den Zellen, was ausgeschlossen werden kann, da sonst bei der Kontrollkultur mehr Katalase gefunden worden wäre.
- 2) Der Aufschluss ist nicht erfolgreich gewesen, weswegen nur wenig Katalase frei wurde, die reagieren konnte.
- 3) Bei dem French-Press-Verfahren wurde die Chlorella nicht in ein anderes Medium überführt, sodass die Katalase direkten Kontakt mit der Platinlösung hatte, dies kann zur vollständigen Inhibition führen. Außerdem spielt der pH-Wert auch eine Rolle, da der optimale pH-Wert für Katalase bei 7 liegt, jedoch müsste auch hier die Kontrollkultur einen anderen Wert anzeigen. Wahrscheinlich liegt der Fehler in dem Aufschlussverfahren, dieses könnte durch andere ersetzt werden, hier stehen einem die physikalische Variante durch eine Kugelmühle oder die enzymatische durch ein Cellulase-Rezept zur Verfügung. Insgesamt kann der Katalasemessung kein großes Aussagegewicht zugesprochen werden, sodass sie nicht zur Klärung des Bleichens beiträgt.

Der Einfluss des pH-Werts lässt sich nicht genau ermitteln, jedoch wird von Schwörbel der optimale pH-Wert für die Kultivierung von Chlorella zwischen 7,5-8 angegeben [8]. Es zeigt sich auch, dass der Puffer in der Lösung (durch die Phosphate) nicht ausreichend für die zugesetzten EDTA-Mengen ist. Da das EDTA bei der 10^{-3} molaren Platin-Lösung in einer 2×10^{-2} molaren Konzentration vorlag, hat dieses zu einer hypertonen Lösung geführt. Ein Indiz dafür, dass dies einen störenden Einfluss auf die Zellen hat, ist die Unförmigkeit der Zellen bei dieser Konzentration. Das EDTA bei diesen Konzentrationen selbst toxisch wirkt ist zwar nicht auszuschließen, jedoch unwahrscheinlich [2].

Die O_2 -Elektrolyse hat gezeigt, dass die Zellen mit sehr wenig Chlorophyll dieses extrem effektiv verwenden, während die geringer kontaminierten Kulturen mit dem Stress nicht so gut zurecht kamen. Man muss aber die unterschiedlichen Zellkonzentrationen der Kulturen während des Versuches beachten. Diese können besonders bei der 10^{-5} molaren Suspension, da hier die Zellkonzentration besonders hoch war, zu Schatteneffekten geführt haben, so dass nicht alle Zellen, im Gegensatz zu der millimolaren Kultur, ihr volles Potenzial bei der Photosynthese ausschöpfen konnten. Dieser Effekt könnte die Erklärung für die geringe, aber konstante Sauerstoffproduktion sein.

Die vermehrte Schaumbildung der Suspensionen mit den höheren Platinkonzentrationen kann auf eine verstärkte Proteinproduktion deuten, die durch das Platin ausgelöst wurde. Hier kann das Tripeptid Glutathion eine Rolle spielen, das Schwermetalle binden und entsorgen soll. Zudem kommen verschiedene sogenannte Hitzeproteine, die bei widrigen Umweltbedingungen von der Zelle gebildet werden, um die vegetativen Stoffwechselprozesse zu schützen

Die Fluoreszenzmessung hat eindeutige Ergebnisse gebracht, das PSII wird durch Platin konzentrationsabhängig gehemmt. Die unerwartet hohe Photosynthesekapazität der Kultur aus der 5. Waschflasche liegt noch innerhalb von tolerierbaren Fehlergrenzen, zudem zeigt dieser Messwert, dass bei solch niedriger Platinkonzentration für Chlorella kaum eine Schädigung festzustellen ist, was sich auch an dem Diagramm der Konzentrationsverläufe zeigt. Ein weiterer Hinweis für einen Lichtstress ist ein Versuch, der nicht quantitativ untersucht wurde, der aber genauso wie diese Messreihe angesetzt wurde. Hier war jedoch die Startzellkonzentration mehr als doppelt so hoch, sodass weniger Lichtquanten die einzelnen Zellen erreicht haben. Bei diesem Versuch ist auch nach Wochen kein deutlicher Unterschied zwischen den Kulturen zu erkennen gewesen. Dieser Effekt wird eventuell durch die schon stark vorhandenen Schatteneffekte in den Lösungen hervorgerufen, denn durch diese Schatteneffekte kommen die Photosysteme nicht in den kritischen Bereich, bei dem sie H_2O_2 produzieren, das nun das Photosystem zersetzt. Man kann deswegen von einem eskalierenden Effekt sprechen, da durch zu viel Licht das Chlorophyll zerstört wird. Dies führt zu einer geringeren Zellkonzentration, dadurch erreicht die restliche Zellen mehr Licht, wodurch der Zersetzungsprozess beschleunigt wird.

Fehlerbetrachtung

Das Fehlen einer Kontrollprobe während des Versuchs führt dazu, dass dieser Versuch nur untereinander vergleichbar ist, jedoch der Bezugspunkt fehlt. Ein weiteres Problem ist die geringe Versuchsanzahl, die nur einen stichprobenartigen Einblick zulässt. Dies lässt sich aber wegen des Material, Zeit und Raummangels nicht ändern. Die hohe Platinkonzentration, die nötig ist um große Unterschiede feststellen zu können ist ein Problem, da dadurch der Realitätsbezug verloren geht. Zudem kommt ein großer zeitlicher Abstand zwischen dem

Versuch und Chlorophyll-Messung bzw. O₂-Elektrolyse, dies ließ sich jedoch aus terminlichen Gründen des Institutes nicht anders durchführen. Als Fehler im Aufbau und Entwicklung des Versuches sehe ich die unterschiedlichen pH-Werte, sowie die hohe EDTA-Konzentration, die zu einem Nährsalzmangel und dadurch zur Störung des Versuches geführt haben können.

Ausblick

Um die Nebeneffekte auszuschließen, soll der Versuchsaufbau leicht abgeändert werden, indem der pH-Wert der Pt-EDTA-Stammlösung mit NaOH neutralisiert und eventuell ein Metall-Chlorid zugesetzt wird, um die überschüssigen EDTA-Moleküle zu binden. Dieser Komplex sollte so stabil sein, dass er keine Spurenelemente entziehen kann, jedoch darf er nicht stabiler sein als der Pt-EDTA-Komplex, weil sonst das Platin ausfällt [7]. Zusätzlich könnte man die Lösung puffern, dies verändert aber die Nährsalzlösung. Ansonsten kann man versuchen, weniger EDTA zu verwenden, hiermit löst man auch das Problem des Salzstresses. Mit diesem Aufbau sollte nun einen Hell-Dunkel-Parallelversuch durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede in der Photooxidation feststellen zu können. Dies sprengt jedoch meine Möglichkeiten. Nachdem die Fluoreszenzmessung einen Lichtstress am PSII bestätigt versuche ich diesen näher auf die Spur zu kommen. Die Katalasemessung hat nicht die erwarteten Ergebnisse gebracht und eine Wiederholung lohnt sich nur mit den oben genannten Mitteln, die mir zur Zeit nicht zur Verfügung stehen. Eine Untersuchung, die in die gleiche Richtung gehen würde wäre eine quantitative Messung des Glutathions durch eine HPLC, um zu zeigen, dass dieses verstärkt produziert wird. Jedoch reicht dies nicht aus, weil es einerseits H₂O₂ abbauen, andererseits das Platin binden und abtransportieren muss und schließlich die wirksame Hämgruppe der Katalase vor Oxidation ($\text{Fe}^{2+} - e^- \Rightarrow \text{Fe}^{3+}$) schützen muss. Ein weiterer Weg besteht in einer 2-D-Elektrophorese bei der die Proteine aufgespalten werden. Falls sich dort Unterschiede zwischen kontaminierter und unbehandelter Kultur ergeben, kann man anschließend über ein Massenspektrometer die Molmasse des entsprechenden Proteins bestimmen und diese mit Datenbanken vergleichen, um herauszufinden, um welches Protein es sich handeln könnte. Dies kann Aufschluss über den Angriffspunkt des Platins geben. Die praktische Anwendung der Versuche ist beschränkt, jedoch kann die Chlorella als mögliche Monitorpflanze, die Schwermetalle in Gewässern anzeigt, verwendet werden.

Literaturquellen

Artikel/Buch	Autor(en)	Jahr/ Auflage
1. Giftliste	Roth/Daunderer	4. Auflage 1981
2. Arzneimittelwirkungen	Ernst Mutschler	7. Auflage 1996
3. Reciprocal Effects of Platinum and Lead on the Water Household of Poplar Cuttings	H.-J. Ballach, R. Wittig	<i>Environ. Sci. & Pollut. Res.</i> 3 1996

- | | | |
|--|---|---|
| 4. Platinsalze als Berufsallergene | G. Schultze-Werninghaus, R. Merget, W. Zachgo, u.a. | <i>Allergologie, Jahrgang 12, Nr.4/1989,S.152f</i> |
| 5. Comparative Analysis of the Biosorption of Cadmium, Lead, Nickel, and Zinc by Algae | S. Klimmek, H.-J. Stan | <i>Environmental Science & Technology Vol. 35 No. 21/2001</i> |
| 6. Jugend-forscht Arbeit | C. Gasser, J. Lehr, C. Schölz | 1999 |
| 7. Jugend forscht Arbeit | J. Bierwagen | 2003 |
| 8. Methoden der Hydrobiologie | Jürgen Schwörbel | 1980 |
| 9. Biologie 2000 (CD) | P. v. Sengbusch u.v.a. | 2000 |
| 10. dtv-Atlas zur Biologie | G. Vogel, H. Ackermann | 6. Auflage, 1972 |
| 11. Lexikon der Chemie | s. Lexikon | Spektrum Akademischer Verlag, 1998 |
| 12. Stoffwechselphysiologie der Pflanzen | G. Richter | Thieme Verlag 1969 |
| 13. Lexikon Biochemie | Hrsg.: H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, u.a. | 1. Auflage 1976 |
| 14. Lehrbuch der anorganischen Chemie | Holleman, Wiberg | 1976 |
| 15. Basiswissen der Chemie | C. E. Mortimer | 2001 |
| 16. Praktikumskript Pflanzenphysiologie | Botanisches Institut Frankfurt | 2001 |
| 17. Praktikumskript Physiologie und Biochemie der Pflanzen | Botanisches Institut Frankfurt | 2002 |
| 18. www2.uni-jena.de/biologie/biochemphys/biochem/Lehre/versuch_1.pdf | | |

Danksagungen

Ich möchte besonders meiner Familie danken, die mich die ganze Zeit unterstützt hat. Außerdem will ich folgenden Personen, Instituten und Unternehmen danken:

Biologisches Institut der J.W. v. Goethe Universität:
Arbeitskreis Prof. Feierabend, Herrn Dr. M. Schmitt

Weiss-Imaging (Bildbearbeitungsprogramm)
ISEGA GmbH (Platin-Analyse)

Markus Schiller

Karl-Rehbein-Schule:
Hr. Winklmeier (Computer)
Hr. Pieh (Schlüssel)
Hr. Schwahn