

Mikroanalytik in der pflanzlichen Biochemie

Rüdiger Hampf

Institut für Biologie I der Universität,
D-7400 Tübingen

William H. Outlaw, Jr.

Biology I, Florida State University,
Tallahassee, FL 31306, USA

Even between adjacent cells profound biochemical differences can exist. In order to resolve these differences, methods have been developed for analyzing small amounts of tissue. By a combination of microdissection of freeze-dried tissue and quantitative histochemistry even single cells can be biochemically characterized. We illustrate the power of this analytical system by comparing activities of some enzymes in different types of cells from a *Vicia* leaf. In addition, an assay is described, which allows the determination of photosynthetic oxygen evolution from single cells.

Pflanzliche wie tierische Gewebe sind aus einzelnen Zellen aufgebaut, die sich, auch wenn sie eng benachbart sind, in ihren biochemischen Eigenschaften grundlegend unterscheiden können. In einem Laubblatt grenzen z.B. Zellen, die den Gasaustausch regulieren (Stomata), unmittelbar an andere, die entweder das Blatt nach außen hin abgrenzen (Epidermis) oder Photosynthese betreiben (Mesophyll). Schon aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion sind deshalb ganz spezifische biochemische Eigenschaften zu erwarten. Die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung und Analyse kleinster Probenmengen war und ist eine Herausforderung an den Biologen. In diesem Beitrag sollen zwei Beispiele für Mikroanalytik herausgegriffen werden, die noch wenig verbreitet sind, deren Anwendung aber völlig neue Aussagen zur Funktion einzelner Zellen und zur Arbeitsteilung in Geweben ermöglicht.

Quantitative Mikroanalytik einzelner Zellen

Als besonders leistungsfähig und vielfältig anwendbar hat sich das Lowry'sche System der quantitativen Histochemie erwiesen [7]. Diese Technik erlaubt die Bestimmung jeder Stoffwechselverbindung, die selektiv an die Reduktion oder Oxidation von Pyridin-Nukleotiden (NAD, NADP bzw. NADH, NADPH) gekoppelt werden kann. Damit lassen sich zahlreiche Stoffwechsel-Intermediate und Enzyme erfassen, aber auch Substanzen wie z.B. K^+ [8], die für die Aktivität von Enzymen nötig sind oder diese erhöhen. Die Nachweisempfindlichkeit ist dabei so hoch, daß sich Enzymaktivitäten an Ultradünnschnitten (z.B. durch den Zellkern) quantifizieren lassen [6]. Im folgenden wird am Beispiel eines Blattes der Saubohne (*Vicia faba*) die Präparation einzelner Zellen und deren biochemische Charakterisierung dargestellt.

Mikrodissektion

Sollen Aussagen zum stoffwechselphysiologischen und biochemischen Zustand des zu untersuchenden Gewebes zum Zeitpunkt der Probennahme gemacht werden, darf die Aufarbeitung keine Veränderungen hervorrufen. Dies wird erreicht durch den sog. „Gefrierstopp“ der Proben (Einbringen in entgasten, flüssigen Stickstoff; -196°C) und deren anschließende Trocknung bei -30 bis -40°C (Lyophilisierung). Höhere Temperaturen sind ungeeignet, da in zunehmendem Maß Stoff-

wechselreaktionen ablaufen und Veränderungen in der Gewebestruktur auftreten können.

Die erhaltenen Gewebe werden in kleinere Bruchstücke zerlegt und unter einem Stereomikroskop mit einem selbstgefertigten Mikromesser (an Nylonborsten geklebte Rasierklingsplitter; Fig. 1a) zunächst grob zertrennt (z.B. in Oberflächen (Epidermis)- und Innen (Mesophyll)- Gewebe). In weiteren Schritten können nun einzelne Epidermiszellen, Stomata (= „Münder“: Zellpaare, die gegeneinander beweglich sind und den Gasaustausch des Blattes regulieren) und Blattmesophyllzellen (aus dem sog. Palisaden- und Schwammparenchym; Ort der Photosynthese) präpariert werden (Fig. 2). Da mit abnehmender Partikelgröße elektrostatische Kräfte das Arbeiten zunehmend erschweren, ist es zweckmäßig, alle Werkzeuge und Kontaktflächen mit, z.B. durch Hochspannung, ionisierter Luft abzublasen oder einer α -Strahlenquelle (z.B. ^{210}Po Poloniumchromat-Stab) auszusetzen.

Um Eigenschaften verschiedener Zellen vergleichen zu können, ist eine Bezugsgröße nötig. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung des Trockengewichtes. Da es sich aber um einzelne Zellen handelt und damit um mikroskopische Dimensionen (Nanogramm-Bereich), sind konventionelle Waagen nicht einsetzbar. Es werden deshalb spezielle Quarzfaser-Waagen benötigt. Figur 3 zeigt dazu eine schematische Darstellung. Als Gehäuse wird der obere Teil einer Hubkolbenpipette verwendet.

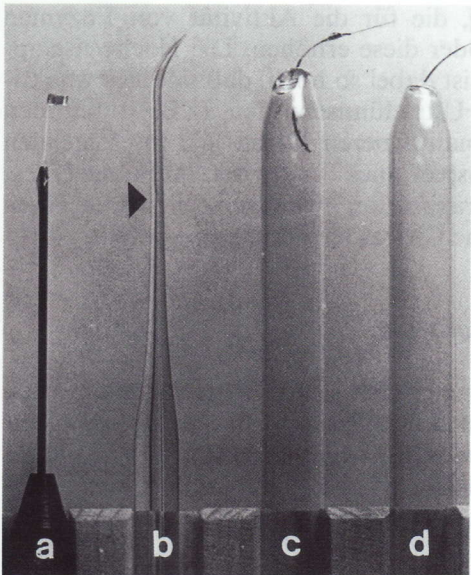


Fig. 1. Verschiedene, zur Mikrodissektion und Analyse nötige Hilfsmittel, a Mikromesser, b Konstriktionspipette (Konstriktion), c Glasfaser oder d Haar zum Transfer der Zellen zwischen verschiedenen Arbeitsgängen

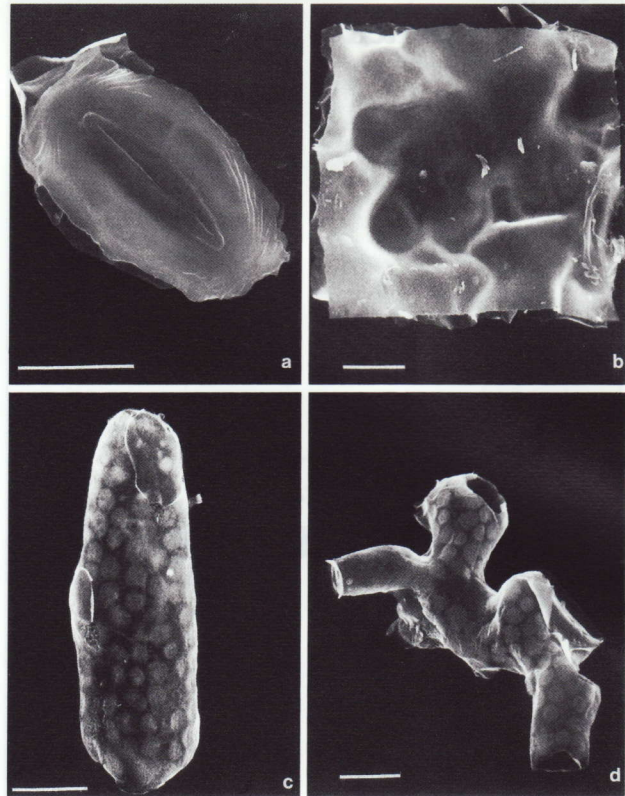


Fig. 2. Mikrodissektion lyophilisierten Blattgewebes von *Vicia faba*. Rasterelektronenmikroskopische Bilder einzeln präparierter Zellen: a) Spaltöffnung, b) Epidermiszelle, c) Palisaden- und d) Schwamm-Parenchymzelle (Länge des Strichs jeweils 20 μm)

An den Kolbenboden ist ein Stück Kupferdraht geklebt, dessen freies Ende zur Befestigung einer Quarzfaser dient. Länge und Durchmesser dieser Faser bestimmen Wägenempfindlichkeit und Umfang des linearen Wägebereiches. Die zu wiegende Probe wird auf einem Träger mit Hilfe eines 2-dimensionalen Triebes möglichst dicht an die Quarzfaser herangeführt und mit einem dünnen Haar oder einer anderen Quarzfaser (Fig. 1c, d) auf deren Ende übertragen. Die durch das Gewicht der Probe hervorgerufene Absenkung der Faserspitze wird über ein waagrecht angeordnetes Stereomikroskop mit Okularmikrometer bestimmt und läßt sich mit Kristallen eichen [7]. Veränderungen der Position der Quarzfaser aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen können durch ionisierende Strahlung (^{241}Am Americiumoxid-Plättchen; Fig. 3) gering gehalten werden. Um die Übertragung von Schwingungen auf die Waage weitgehend auszuschließen, sind Waagen-Befestigung und Stereomikroskop auf einer schwingungsarmen Platte angeordnet, unabhängig von einem Querbalken, der den Vortrieb trägt und gleichzeitig als Stütze für die Hände des Experimentators dient.

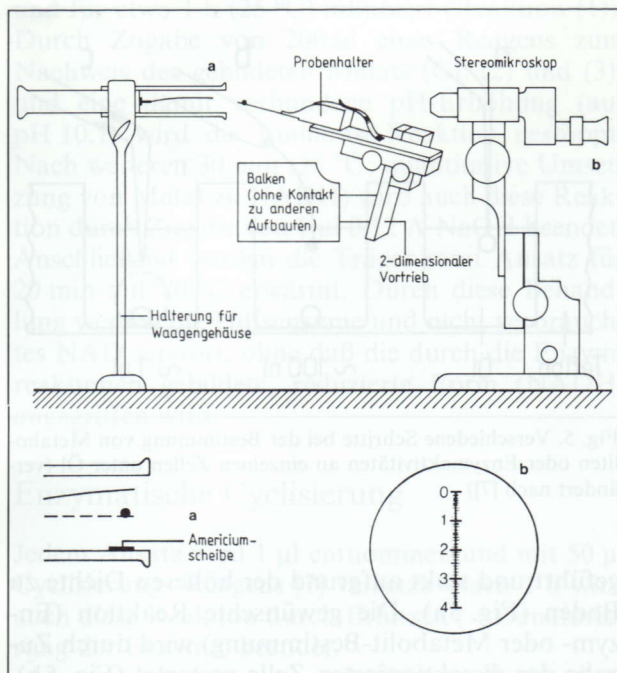
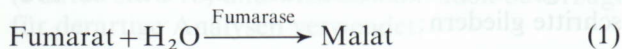


Fig. 3. Anordnung zur Bestimmung des Gewichtes einzelner Zellen. Die zu wiegende Zelle wird auf einem Träger mit Hilfe eines 2-dimensionalen Feintriebes in die Nähe der Quarz-Faser (a) gebracht und mit einer Glasfaser (Fig. 1c) auf deren Spitze übertragen. Die vertikale Ablenkung der Quarz-Faserspitze wird über ein Okularmikrometer (b) bestimmt. Stereomikroskop und Waagengehäuse ruhen auf einer schwingungsfreien Platte, ohne Kontakt zu dem an einem Balken befestigten Mikrotrieb

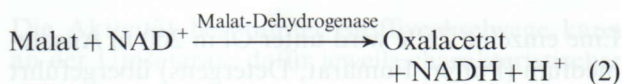
Um eine Wasseraufnahme und damit Stoffwechselreaktionen zu vermeiden, müssen alle aufgeführten Schritte unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden (18–20 °C, max. 40% rel. Luftfeuchte).

Grundlagen der biochemischen Mikro-Analyse

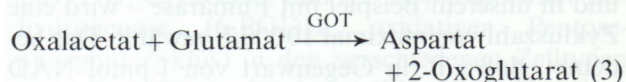
Das analytische System beruht auf der selektiven Oxidation oder Reduktion von Pyridin-Nukleotiden und soll am Beispiel einer Enzymaktivitäts-Bestimmung erläutert werden. Fumarase, ein Enzym des mitochondrialen Citronensäure-Zyklus, katalysiert bei pH 7 folgende Reaktion:



Das entstehende Malat kann nun in einer nachgeschalteten Reaktion stöchiometrisch zur Reduktion von NAD verwendet werden:



Da das Gleichgewicht dieser Reaktion aber in Richtung Malat-Bildung liegt, muß für eine quantitative Umsetzung das entstehende Oxalacetat dauernd entnommen werden. Dies wird durch ein weiteres Enzym erreicht (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GOT), das Oxalacetat in die Aminosäure Aspartat überführt:



Die Kinetik der Nachweisreaktionen (2) und (3) für Malat wird mit Malat-Standards und Gewebeeextrakten in einem Makroansatz (Photometer, 1–3 ml Reaktionsvolumen) überprüft.

Alle im folgenden beschriebenen Umsetzungen dienen dem quantitativen Nachweis von NADH. Da die absoluten Mengen im Mikroansatz (etwa 100 nl) im pmol-Bereich liegen, ist dies mit konventionellen Methoden nicht möglich. Eine Lösung bietet hier die „enzymatische Cyclisierung“ von Pyridin-Nukleotiden, die im Prinzip nach dem in Fig. 4 wiedergegebenen Schema abläuft.

Der Ansatz enthält die Enzyme 1 und 2 sowie einen Überschuß der Substrate A und C. Wird z.B. die Reaktion mit einem oxidierten Pyridin-Nukleotid (NAD, NADP) gestartet, so führt dessen Umwandlung in die reduzierte Form (NADH, NADPH) über Enzym 2 zur Bildung eines Produktes D, die sofortige Rückführung in die oxidierte Form (Enzym 1) zur Anreicherung von B. Der Umfang der Anreicherung von D und B hängt nun von der Anzahl der Oxidations- und Reduktions-

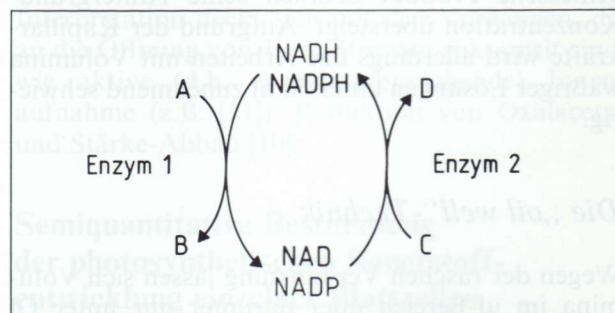


Fig. 4. Schema zum Ablauf der enzymatischen Cyclisierung von Pyridin-Nukleotiden. Je nach Pyridin-Nukleotid werden unterschiedliche Hilfsenzyme und Substrate benötigt. Grundsätzlich werden immer beide Formen (reduzierte [NAD(P)H] und oxidierte [NAD(P)]) erfaßt. Zur selektiven Bestimmung muß die eingesetzte Probe entsprechend vorbehandelt werden: Säure (z.B. 0,1 N HCl) zerstört die reduzierten, Lauge (0,1 N NaOH) die oxidierten Pyridin-Nukleotide selektiv. Im Falle der NAD-Cyclisierung bedeuten 1 Malat-Dehydrogenase, 2 Alkohol-Dehydrogenase, A Oxalacetat, B Malat, C Ethanol, D Acetaldehyd. Für die NADP-Cyclisierung werden andere Enzyme und Substrate verwendet.

vorgänge/Zeit (Zykluszahl) ab. Diese sind abhängig von der Konzentration der Enzyme 1 und 2 und der Temperatur. Je nach Wahl beider Parameter können Cyclisierungsraten von bis zu 70000/h erreicht werden (NADP-Cyclisierung mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*; „Super cycle“ [5]). Im Normalfall – und in unserem Beispiel mit Fumarase – wird eine Zykluszahl von maximal 10000/h gewählt. Das bedeutet, daß z.B. in Gegenwart von 1 pmol NAD in einer Stunde 10 nmol Malat gebildet werden, die sich – nach entsprechender Umsetzung (Reaktionen (2) und (3)) als NADH ohne Probleme messen lassen (Fluorometer oder Spektralphotometer). Da interne Standards (jeweiliges Pyridin-Nukleotid) in Parallelansätzen zugegeben werden, ist die genaue Kenntnis der Zykluszahl nicht von Bedeutung.

Die Empfindlichkeit dieser Methode ist nahezu unbegrenzt und ermöglicht theoretisch den Nachweis eines einzelnen Moleküls. In der Praxis erzeugen aber Verunreinigungen der Enzyme (Reaktionen (2), (3) und Cyclisierungsschritt) mit Pyridin-Nukleotiden einen gewissen Hintergrund, der die Sensitivität aufgrund des erhöhten Rausch/Signal-Verhältnisses verringert. Da der Hintergrund, bei gegebenen Enzymkonzentrationen (Reaktionen (2), (3)), absolut vom Ansatzvolumen abhängt, wird er um so niedriger, je kleiner dieses ist. Liegt zum Beispiel die eingeschleppte NAD-Konzentration bei $0,1 \mu\text{M}$, dann sind in 1 ml 0,1 nmol, in 1 μl 0,1 pmol, in 1 nl aber nur 0,1 fmol NAD als Hintergrund enthalten. Es ist daher sinnvoll, das Ansatzvolumen so zu wählen, daß das in der Probe gemessene Produkt deutlich seine Hintergrundkonzentration übersteigt. Aufgrund der Kapillarkräfte wird allerdings das Arbeiten mit Volumina wäßriger Lösungen unter 50 nl zunehmend schwierig.

Die „oil well“-Technik

Wegen der raschen Verdunstung lassen sich Volumina im μl -Bereich oder darunter nur unter Öl handhaben. Besonders gut eignen sich dafür Teflonträger (etwa $30 \times 120 \text{ mm}$, 6 mm dick), in die Löcher (3 mm \varnothing) so gebohrt sind, daß ein hauchdünner und damit gut lichtdurchlässiger Boden erhalten bleibt (Fig. 5). In die Bohrungen, z.B. 80 pro Träger, wird ein schwerflüchtiges Mineralöl pipettiert. Mit Konstriktionspipetten (fein ausgezogene Glas-Kapillaren mit eingeschmolzener Verengung (= Konstriktion); Fig. 2b) wird das jeweilige Inkubationsmedium (50 bis 100 nl) in das Öl über-

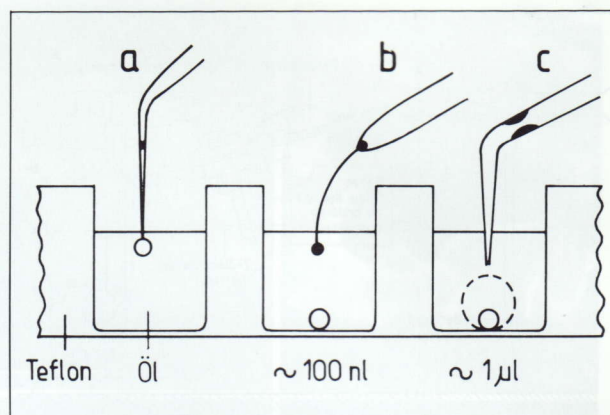


Fig. 5. Verschiedene Schritte bei der Bestimmung von Metaboliten oder Enzymaktivitäten an einzelnen Zellen unter Öl (verändert nach [7])

geführt und sinkt aufgrund der höheren Dichte zu Boden (Fig. 5a). Die gewünschte Reaktion (Enzym- oder Metabolit-Bestimmung) wird durch Zugabe der dissektionierten Zelle gestartet (Fig. 5b). Für diesen Schritt haben sich Haare mit einer leichten Krümmung, eingeklebt in eine zugeschmolzene Pasteur-Pipette (Fig. 2c), bewährt. Das erfolgreiche Einbringen der lyophilisierten Zelle in die wäßrige Lösung ist an einer spontanen Aufhellung des Objekts als Folge der Hydratisierung zu erkennen. Nach einer Inkubationszeit zwischen 40 und 90 min, je nach Ansatz, werden die chemischen Reaktionen durch Zugabe von Säure (HCl) oder Lauge (NaOH) gestoppt (Fig. 5c). Die Teflonträger werden anschließend für 20 min auf 80°C erwärmt. Durch diese Behandlung werden weitere Enzymreaktionen unterbunden, gleichzeitig aber auch die nicht erwünschten Formen der Pyridin-Nukleotide selektiv zerstört (vgl. „Enzymatische Cyclisierung“ und Legende zu Fig. 4). Ein Aliquot (0,5 bis $1 \mu\text{l}$) wird entnommen und in den jeweiligen Cyclisierungsansatz ($50 \mu\text{l}$; vgl. oben) übergeführt.

Ablauf einer Analyse

(Beispiel: Fumarase-Bestimmung)

Der gesamte Versuchsablauf läßt sich in Teilschritte gliedern:

Spezifischer Schritt (Reaktionen (2), (3))

Eine einzelne Zelle wird unter Öl in 200 nl Ansatzmedium (Puffer, Fumarat, Detergens) übergeführt

und für etwa 1 h (25 °C) inkubiert (Reaktion (1)). Durch Zugabe von 200 nl eines Reagens zum Nachweis des gebildeten Malats (Gl. (2) und (3)) und eine damit verbundene pH-Erhöhung (auf pH 10,1) wird die Fumarase-Reaktion gestoppt. Nach weiteren 30 min (25 °C; quantitative Umsetzung von Malat zu NADH) wird auch diese Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,12 N NaOH beendet. Anschließend werden die Träger samt Ansatz für 20 min auf 80 °C erwärmt. Durch diese Behandlung werden die Hilfsenzyme und nicht verbrauchtes NAD zerstört, ohne daß die durch die Enzymreaktionen gebildete, reduzierte Form (NADH) angegriffen wird.

Enzymatische Cyclisierung

Jedem Ansatz wird 1 µl entnommen und mit 50 µl Cyclisierungs-Reagens [7] versetzt. Nach 1 h wird auch diese Reaktion durch Erhitzen (= Denaturierung der Enzyme) beendet.

Indikator-Reaktion

Im Falle des NAD-Cyclisierens wird das gebildete Malat nachgewiesen. Dazu werden wieder die Reaktionen (2) und (3) verwendet, die Malat unter stöchiometrischer Bildung von NADH umsetzen (jetzt in nano- statt picomolaren Mengen). Aus meßtechnischen Gründen wird diese Reaktion in 1 ml durchgeführt, einem für die anschließende Bestimmung (über Absorption oder Fluoreszenz) von NADH geeigneten Volumen. Im Unterschied zu den oxidierten Formen absorbieren die reduzierten Pyridin-Nukleotide (NADH, NADPH) nicht nur Licht im Bereich von 340 nm, sondern lassen sich auch zu einer Fluoreszenzstrahlung anregen, deren Maximum bei 460 nm liegt. Bei spektralphotometrischen Messungen wird der Anteil von Licht gemessen, der durch eine Probe hindurchgeht, d.h. von ihr nicht absorbiert wird. Man arbeitet deshalb immer vor einem hohen Licht-Hintergrund und damit relativ unempfindlich. Bei der Fluorimetrie wird dagegen nur von der Probe (NAD(P)H) abgegebenes Fluoreszenzlicht erfaßt (Hintergrund = 0). Damit ist diese Methode wesentlich empfindlicher (Faktor etwa 10) und wird deshalb auch bevorzugt für derartige Analysen verwendet.

Aktivitäten einer Reihe von Enzymen in verschiedenartigen Blattzellen

Die Aktivität bestimmter Stoffwechselwege kann an der Umsatzrate dafür jeweils charakteristischer

Enzyme abgeschätzt werden. Wir haben deshalb die Aktivitätsniveaus außer von Fumarase (Citrat-Zyklus, Mitochondrien) auch von Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Rubisco, photosynthetische CO₂-Fixierung), Hydroxypyruvat-Reduktase (Photorespiration), NAD-abhängiger Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (NAD-GAPDH, Glykolyse) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH, oxidativer Pentosephosphat-Zyklus) in den verschiedenen Zelltypen eines *Vicia*-Blattes bestimmt (Fig. 6; für Details s. [3]). Ein Vergleich der über das Zellgewicht auf Protein bezogenen [9] Umsatzraten läßt charakteristische Unterschiede erkennen: Während Mesophyllzellen Rubisco besitzen, ist eine Aktivität dieses Enzyms in Spaltöffnungs- und Epidermiszellen nicht nachzuweisen. Da dies auch für verschiedene andere Enzyme der photosynthetischen CO₂-Reduktion und für die eng damit verbundene Photorespiration gilt (Hydroxypyruvat-Reduktase), verfügen diese Zellen nicht über die Fähigkeit, CO₂ lichtabhängig in Kohlenhydrate überzuführen. Dies ist um so erstaunlicher, als Spaltöffnungszellen für die Umsetzung von Licht in Energie- und Reduktions-Äquivalente voll funktionsfähige Chloroplasten besitzen.

Im Gegensatz dazu zeigen in Spaltöffnungen solche Enzyme eine deutlich erhöhte Aktivität, die Bestandteile zur Energie-Gewinnung führender Stoffwechselwege sind (6-PGDH, NAD-GAPDH, Fumarase). Wenn dies gleichbedeutend ist mit hohen Umsatzraten von Glykolyse, oxidativem Pentosephosphat- und Citrat-Zyklus, dann haben diese Zellen eine hohe Kapazität für heterotrophe Prozesse der Energiegewinnung entwickelt. Diese Interpretation deckt sich mit den Vorgängen, die an die Öffnung von *Vicia*-Stomata gekoppelt sind, wie aktive (d.h. energieverbrauchende) Ionenaufnahme (z.B. [11]), Reduktion von Oxalacetat und Stärke-Abbau [10].

Semiquantitative Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung einzelner Blattzellen

Einzelne Zellen ohne Zellwand („Protoplasten“; Fig. 7) können aus pflanzlichem Gewebe mit Hilfe Zellwand-abbauender Enzyme isoliert werden. Sie haben sich als wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung physiologischer, biochemischer oder genetischer Fragestellungen erwiesen. Da sinnvolle Ergebnisse nur mit physiologisch intakten Protoplasten zu erhalten sind, kommt einem Nachweis der Vitalität dieser Zellen eine wichtige Bedeutung zu.

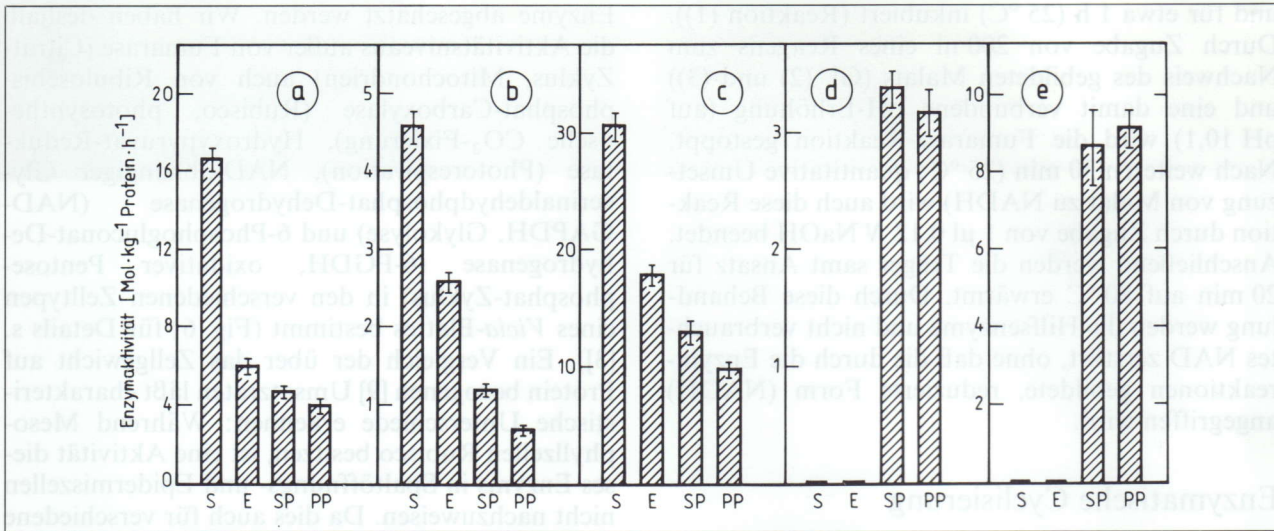


Fig. 6. Auf Protein bezogene Umsatzraten von Fumarase (a), 6-P-Gluconat-Dehydrogenase (b), NAD-abhängiger Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (c), Hydroxypyruvat-Reduktase (d) und Ribulosebisphosphat-Carboxylase (e) in Spaltöffnungs- (S), Epidermis- (E), Schwammparenchym- (SP) und Palisadenparenchym-Zellen (PP). Das Gewicht der Zellen wurde nach [9] in Protein umgerechnet. Die Balken geben den Standard-Irrtum an; $n=20$ (a-d), 6 (e) (aus [3])

Die allgemein angewandten Vitalitätsfärbungen [1] haben sich für unsere Fragestellung (Nachweis der Vitalität durch Elektrofusion erhaltener Hybrid-Protoplasten [12]) als nicht ausreichend verlässlich erwiesen. Wir haben deshalb nach einem Weg gesucht, eine sehr komplexe Stoffwechsellistung wie die Photosynthese intakter Zellen an einzelnen

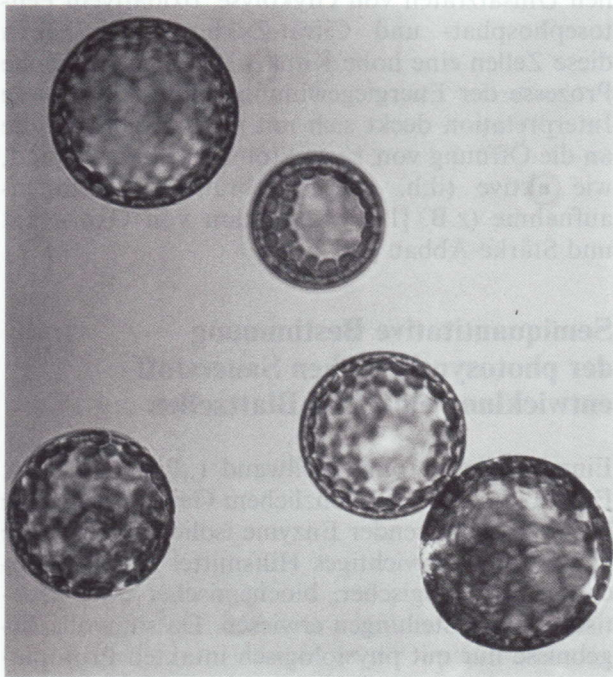


Fig. 7. Suspension enzymatisch aus Blattgewebe freigesetzter Protoplasten; innere Struktur: Chloroplasten

Blattgewebe-Protoplasten zu messen, und haben dabei an Experimente von Engelmann [2] angeknüpft.

Protoplasten, die photosynthetisch aktiv sind, entwickeln im Licht Sauerstoff. Mischt man nun zu einer derartigen Suspension von Protoplasten auf Sauerstoff positiv reagierende (= aerotaktische) Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*), so verteilen sich diese entsprechend einem Gradienten im O_2 -Gehalt. In Fig. 8 ist dieses Verhalten in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer dargestellt. Während im Umfeld des dunkel inkubierten Protoplasten die Bakterien statistisch verteilt sind (Fig. 8a), nimmt ihre Populationsdichte nach Belichtungsbeginn deutlich zu (Fig. 8b, c). Führt man derartige Untersuchungen im Dunkelfeld durch (nur von Partikeln gestreutes Licht gelangt in das Mikroskop-Objektiv), dann läßt sich die Erhöhung der Bakteriendichte als intensive Helligkeitszunahme beobachten (Fig. 9a, b) und mit einem Mikroskop-Photometer [4] messen (Fig. 9c).

Die in Fig. 9c dargestellte Kinetik der lichtabhängigen Zunahme der Dichte der Bakterien-Population um einen Protoplasten läßt Aussagen zum Ablauf photosynthetischer Anfangsreaktionen zu. Der Verlauf deutet an, daß zwei Phasen intensiver O_2 -Entwicklung (0-1 und 1,5-2,5 min) von einer kurzen Periode ohne wesentliche Veränderungen unterbrochen werden. Dieses Phänomen ist offensichtlich eine Folge der sog. „photosynthetischen Induktion“: Die lichtabhängige und an die O_2 -Entwicklung gekoppelte Bildung der Energie- und

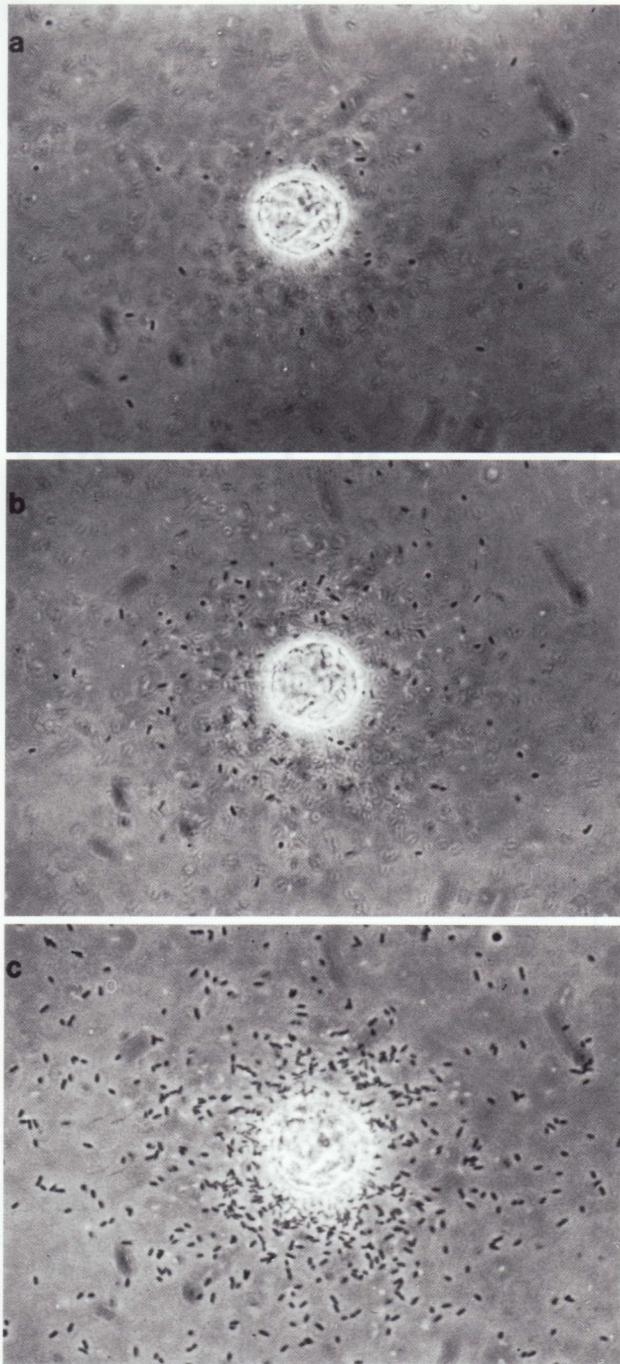


Fig. 8. Mikrophotographische Blitzlichtaufnahmen eines Protoplasten in einer Suspension von Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*). Die Bakterien reagieren chemotaktisch positiv auf Sauerstoff. a) Dunkelkontrolle, b) derselbe Protoplast nach 30 s und c) nach 3 min Belichtung durch die Mikroskop-Beleuchtung: Die Dichte der Bakterien-Population ist um den photosynthetisch aktiven Protoplasten deutlich erhöht. Zur Vermeidung eines O₂-Austauschs mit der umgebenden Luft wurde die Suspension mit einem Deckglas abgedeckt, dessen Kanten mit Vaseline versehen waren (aus [4])

Reduktions-Äquivalente läuft schneller an als die Enzym-Reaktionen, die diese Produkte für die CO₂-Reduktion verbrauchen. Der dadurch bewirkte vorübergehende Stau bringt die O₂-Entwicklung zum Erliegen, die Bakterien-Dichte stagniert. Erst mit dem Einsetzen der CO₂-Fixierung (ab etwa 1,5 min) wird dieser Stau beseitigt, und die O₂-Bildung setzt wieder voll ein. Wenn die Photosynthese eine konstante Rate erreicht, stellt sich auch ein relativ konstanter O₂-Gradient ein; die Dichte der Bakterienpopulation, und damit die Lichtstreuung, strebt einem Gleichgewichtszustand zu (ab etwa 5 min). Mit dem Ende der Belichtung endet natürlich auch die photosynthetische O₂-Entwicklung, und der Protoplast ist für die Bakterien nicht mehr attraktiv: Mit dem Abbau des O₂-Gradienten ist auch eine Abnahme der Bakterien-Zahl zu beobachten.

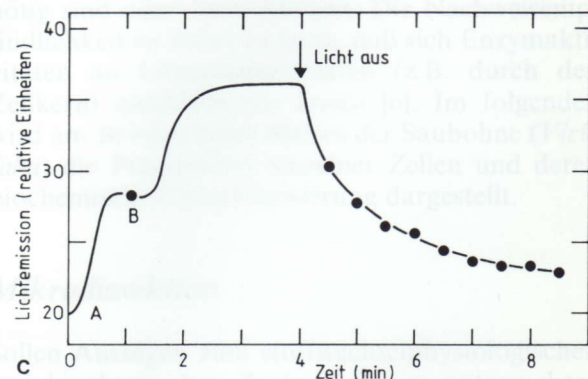
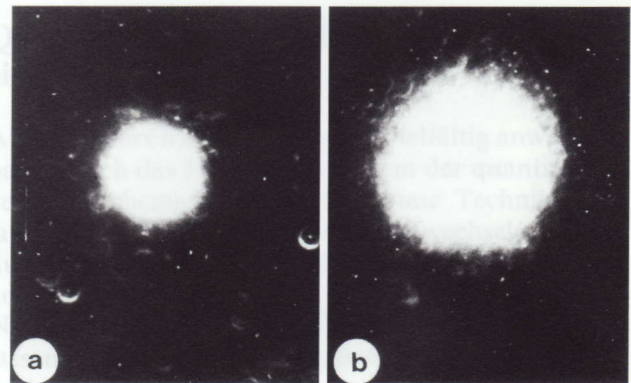


Fig. 9. Dunkelfeld-Mikroskopie eines Protoplasten in Gegenwart von *Pseudomonas*-Bakterien. a) Dunkel-inkubierter Protoplast, b) derselbe Protoplast nach 5 min Belichtung, Corona: von den Bakterien gestreutes Licht. c) Mikrophotometrische Messung des gestreuten Lichts bei Dunkelfeldbeleuchtung (Versuch entsprechend a), b); Kurvenanfang = Belichtungsbeginn). A Lichtstreuung durch den Protoplasten zu Beginn der Belichtung (Hintergrund), B intermediärer Stopp der lichtabhängigen O₂-Entwicklung während der Phase der „photosynthetischen Induktion“ (vgl. Text)

