



Universität Rostock
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften



Leibniz-Institut für Ostseeforschung
Warnemünde

Stickstoff-Fixierung und Abgabe des fixierten Stickstoffs unter erhöhten CO₂-Konzentrationen

Diplomarbeit

Eingereicht von
Andreas Weiss
16. November 2009

Gutachter:
Dr. habil. Maren Voß
Dr. Monika Nausch

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die anthropogene Klimaveränderung	9
1.1.1	Auswirkungen erhöhter CO ₂ -Konzentrationen auf das Karbonatsystem	10
1.1.2	Auswirkungen der Temperaturerhöhung auf die Hydrographie der Meere	12
1.1.3	Auswirkungen der anthropogenen Klimaveränderung auf das marine Ökosystem	12
2	Material und Methoden	16
2.1	Algenkulturen und Medium	16
2.2	Versuchsaufbau	16
2.2.1	Langzeit-Adaptations-Experiment (LAX)	18
2.2.2	Kurzzeit-Inkubations-Experiment (KIX)	19
2.3	Analytische Methoden	20
2.3.1	Bestimmung des Karbonatsystems	20
2.3.2	Chlorophyll <i>a</i> Bestimmung	22
2.3.3	Zellzahlbestimmung	23
2.3.4	anorganische Nährstoffe	24
2.3.5	Totaler Phosphor, gelöster organischer Phosphor	24
2.3.6	gelöster organischer Kohlenstoff, totaler gelöster Stickstoff	25
2.3.7	Partikuläres organisches Material	26
2.3.8	Fixierungs- und Aufnahmeraten	26
2.3.9	Phosphataufnahme und DIP Turnover	29
2.3.10	Mikrobielle Parameter	29
2.3.11	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Wachstum	31
3.2	Kohlenstoff- und Stickstoffaufnahmeraten	32
3.3	Phosphat Aufnahme	36
3.4	Stöchiometrie	37
3.5	DON/DOC Dynamik	39
3.6	Bakterielle Aktivität	40
4	Diskussion	41

Inhaltsverzeichnis

4.1	Fehlerbetrachtung	41
4.1.1	Der Einfluss erhöhter CO ₂ -Konzentrationen auf Fixierungsraten und Wachstum filamentöser Cyanobakterien	41
4.1.2	Einfluss auf die Stöchiometrie der Cyanobakteriengemeinschaft	48
4.1.3	Einfluss erhöhter CO ₂ -Konzentrationen auf die Picoplanktongemeinschaft	50
4.2	Schlussbetrachtung	52
4.2.1	Bedeutung für die Ostsee	52
4.2.2	Zusammenfassung	56
5	Anhang	68
6	Danksagung	70
7	Selbstständigkeitserklärung	71

Abbildungsverzeichnis

1.1	Variationen der Temperatur, der atmosphärischen CO ₂ - und CH ₄ -Konzentration innerhalb der letzten 420000 Jahre. Die Daten sind aus Eisbohrkernen der Antarktis gewonnen worden. Aus Boer et al. (2001).	10
1.2	Konzentrationen der Kohlenstoffspezies (CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , in μmol kg ⁻¹), pH-Werte (Seawater Scale) und der Aragonit- und Kalzit-Sättigungszustand (Ω) im Oberflächenwasser unter glazialen, vorindustriellen und zwei zukünftigen atmosphärischen pCO ₂ (in μatm). Aus Fabry et al. (2008).	11
1.3	Angenommene Veränderungen der Oberflächentemperatur der Ozeane (SST) als Folge der globalen Erwärmung und die Auswirkungen auf Stratifizierung, Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit. Aus Rost et al. (2008).	12
1.4	Stark schematisierter Verlauf des durch diazotrophe Cyanobakterien (grün) fixierten Stickstoffes (grau) in andere trophische Ebenen des pelagischen Nahrungsnetzes. Die Pfeile zeigen die Weitergabe des Stickstoffs in eine andere trophische Ebene an. DON: gelöster organischer Stickstoff. Erklärung siehe Text.	15
2.1	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des LAX. Für eine genaue Beschreibung des Ablaufes siehe Abschnitt 2.2.1.	18
2.2	Verlauf des Zellwachstums über fünf Tage zur Bestimmung des Inkubationszeitraumes der LAX. Fehlerbalken repräsentieren den Fehler der Methode (10%).	19
2.3	Schematischer Ablauf der Fraktionierung im KIX. Grüne Symbole: > 3 μm Fraktion, orange Symbole: < 3 μm Fraktion.	20
3.1	POC spezifische Wachstumsrate des LAX. Die Regressionsgerade lautet: $f = 0,0025 + 0,0002 * x$, $R^2 = 0,89$, $P = 0,0016$. Für LAX I konnten keine Wachstumsraten berechnet werden, da sie Zuordnung der Proben bei der Messung verloren ging.	31

Abbildungsverzeichnis

- 3.2 Zellspezifische Wachstumsrate μ für LAX I (A) und LAX II (B). Es bestand kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen $p\text{CO}_2$ und Bakterienzahl ($P = 0,0642$, bzw. $P = 0,4364$). 32
- 3.3 POC normierte CO_2 - und N_2 -Fixierungsraten des LAX in Abhängigkeit des $p\text{CO}_2$. Die Messpunkte stellen den Mittelwert aus 2 Messungen \pm Standardabweichung dar. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt (A) CO_2 -Fixierungsraten. Die Regressionsgleichung lautet: $f = 0,0023 + 7,5930 \cdot 10^{-6} * x$, $R^2 = 0,73$, $P = 0,0001$. (B) N_2 -Fixierungsraten. Die Regressionsgleichung lautet: $f = -0,0188 + 0,0001 * x$, $R^2 = 0,79$, $P < 0,0001$ 33
- 3.4 POC normierte CO_2 -Fixierungsraten der $> 3 \mu\text{m}$ Fraktion beider KIX Versuche. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. (A) KIX I. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,0429 + 0,0027 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$. (B) KIX II. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,6362 + 0,0038 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$ 33
- 3.5 POC normierte N_2 -Fixierungsraten und $^{15}\text{NO}_3^-$ -Aufnahmeraten der $> 3 \mu\text{m}$ Fraktion des KIX. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. (A) NO_3^- -Aufnahmeraten. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,0429 + 0,0027 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$. (B) N_2 -Fixierungsraten. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,6362 + 0,0038 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$ 34
- 3.6 POC normierte CO_2 -Fixierungsraten der $< 3 \mu\text{m}$ Fraktion beider KIX Versuche. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. Die Funktionen beschreiben den logarithmischen Anstieg (Logarithm, 2 Parameter I, Sigmaplot 10.0).(A) KIX I. Der Wert des $950 \mu\text{atm}$ Ansatzes fehlt, da er unterhalb des Messbereiches des Massenspektrometers. Die Regressionsgleichung lautet: $f = -2,3884 + 0,5210 * \ln(x)$, $R^2 = 0,83$, $P = 0,0111$. (B) KIX II. Die Regressionsgerade lautet: $f = -1,0445 + 0,2201 * \ln(x)$, $R^2 = 0,86$, $P = 0,0028$ 35
- 3.7 Mittlere DIP Turnoverzeiten beider LAX Versuche in Abhängigkeit des $p\text{CO}_2$. Die Funktion beschreibt die exponentielle Abnahme der Turnoverzeit (Exponential Decay, Single, 2 Parameters, Sigma Plot 10.0). Die Regressionsgleichung lautet: $f = 67,9879 * e^{-0,0044*x}$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,0001$ 37

Abbildungsverzeichnis

3.8	<p>$\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$ und $\Delta\text{PON}/\Delta\text{POP}$ Verhältnisse des LAX II. (○, --) $\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$. Die Regressionsgleichung lautet: $f = 9,8226 + 0,1085 * x$, $R^2 = 0,88$, $P = 0,0016$. (◆, -) Die Regressionsgleichung lautet: $f = 2,9720 + 0,0133 * x$, $R^2 = 0,87$, $P = 0,0020$.</p>	38
3.9	<p>Gemittelte C/N Fixierungsverhältnisse beider LAX Versuche und C/NO₃ Fixierungsverhältnis der > 3 µm Fraktion des KIX I. (A) C/N Fixierungsverhältnisse. Die Regressionsgerade lautet: $f = 342,7170 - 0,3510 * x$, $R^2 = 0,63$, $P = 0,0342$. (B) C/NO₃ Fixierungsverhältnis. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zum pCO₂ ($P = 0,6865$). Der Wert des 910 µatm Ansatz fehlt, da er unterhalb der Messgrenze des Massenspektrometers lag.</p>	39
3.10	<p>Differenzen Ende-Start der DOC und DON Konzentrationen beider LAX Versuche (○) LAX I, (●) LAX II. Werte oberhalb der Nulllinie stellen Abgabe, Werte unterhalb Aufnahme dar. (A) ΔDOC. (B) ΔDON.</p>	40
4.1	<p>Schematische Übersicht über die Komponenten der CCM in α- und β-Cyanobakterien. Rosa: Carboxysomen; orange: DIC Transportsysteme; türkis: CO₂ Aufnahmesysteme; CA: Carboanhydrase. Verändert nach Price et al. (2008).</p>	43
4.2	<p>Schematische Darstellung der Funktion der bisher identifizierten DIC Transporter (BCT1, SbtA, BicA) und CO₂-Aufnahmesysteme (NDH-1₃, NDH-1₄). Fd = reduziertes Ferredoxin. Erklärung siehe Text. Abgeändert nach Price et al. (2008).</p>	44
4.3	<p>Vergleich der CO₂-Jahresgänge im Golf von Finnland unter heutigen atmosphärischen CO₂-Konzentrationen (orange) und unter für das Jahr 2100 vorhergesagten (rot). Das grüne Rechteck stellt die Zeitspanne dar, in der typischerweise Cyanbakterienblüten in der Ostsee auftreten. Erklärung siehe Text.</p>	55
5.1	<p>Leucin- und Thymidin Aufnahme am Ende der vierstündigen Inkubation beider KIX Versuche in Abhängigkeit des pCO₂. Die Messwerte stellen Mittelwerte \pmStandardabweichung dar. (A) Leucin Aufnahme (Zellwachstum). (B) Thymidin Aufnahme (Zellteilung).</p>	68

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der Mineralienkonzentrationen des BA ⁻ Mediums.	17
2.2	Übersicht der Parameter, die im LAX und im KIX gemessen worden sind. Die fett gedruckten Parameter wurden auch am Anfang der Inkubation genommen. Die <i>kursiv</i> gedruckten Parameter wurden nur im KIX bestimmt.	17
2.3	Startbedingungen des Karbonatsystems des LAX und des KIX. Die TA betrug in allen Experimenten 1730 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (siehe Text).	22
2.4	Übersicht der eingesetzten Tracermengen aller Versuche. In Klammern ist die Konzentration der Stammlösung und des Gases angegeben.	27
2.5	Übersicht über IAEA und internen Laborstandards, die für die Bestimmung der $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{13}\text{C}$ Werte genutzt wurden. Nach (Coplen et al., 2002).	28
3.1	POC normierte NO_3^- -Aufnahmeraten aus KIX I und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte aus KIX II.	35
3.2	POC normierte P-Aufnahmeraten beider LAX Versuche. Werte in Klammern sind Standardabweichungen zweier Messungen. * nur ein Messwert.	36
3.3	C/N/P Verhältnisse am Ende der LAX Inkubation. Werte in Klammern sind Standardabweichungen.	38
4.1	Vergleich der relativen Steigerung der CO_2 - und N_2 - Fixierungsraten aus dem LAX Versuch mit den Raten aus Studien über <i>Trichodesmium</i> sp. Die Faktoren beziehen sich auf Chl <i>a</i> normierte Raten, um die Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu gewährleisten.	45
4.2	Ausstattung an DIC Transportern und CO_2 Aufnahmesystemen von <i>N. spu-</i> <i>migena</i> und <i>T. erythraeum</i> . - = nicht vorhanden, + = vorhanden. Nach (Price et al., 2008).	45
5.1	Enzymeffizienzen (V_{max}/K_m) der Leucinamino-Peptidase (Leu), Phosphatase (Phos) und β -Glucosidase (Gluc) am Ende von KIX I und KIX II.	68

Tabellenverzeichnis

5.2	Gelöste und partikuläre Nährstoffkonzentrationen am Beginn und am Ende der LAX Inkubation. Werte in Klammern () sind Standardabweichungen. * Fehler während der Messung. †Startwerte des LAX I können nicht den pCO ₂ zugeordnet werden, da sie während der Messung durcheinander gerieten. §nur ein Messwert.	69
-----	---	----

1 Einleitung

1.1 Die anthropogene Klimaveränderung

Klima im engeren Sinne wird definiert als die statistische Beschreibung der räumlich-zeitlichen Mittelwerte und Variationen relevanter Parameter, die das Wetter bestimmen. Dazu gehören Temperatur, Niederschlag und Wind. Aus diesen Klimadaten kann der Zustand des globalen Klimasystems beschrieben werden. Dies ist ein hoch komplexes System, das aus fünf Hauptkomponenten besteht: der Atmosphäre, der Hydrosphäre, der Kryosphäre und der Landoberfläche sowie der Biosphäre.

Vor rund 420000 Jahren pendelte sich das Klimasystem der Erde in eine Abfolge von Glazial- und Interglazialperioden ein, die durch Temperaturschwankungen bedingt waren (Abb. 1.1). Diese Schwankungen scheinen eng an die atmosphärischen Konzentration der Treibhausgase Kohlendioxid (CO₂) und Methan (CH₄) gekoppelt zu sein (Petit et al., 1999), wobei die CO₂ Konzentration zwischen 180 und 280 µatm lag. Diese Variabilität kann eine Temperaturveränderungen von bis zu 10 °C hervorrufen. Innerhalb der letzten 200 Jahre stieg sie, als Folge der industriellen Revolution und der damit einhergehenden Nutzung fossiler Brennstoffe und der veränderten Landnutzung, um 100 µatm auf ~380 µatm an (Forster et al., 2007). Damit übersteigt die heutige Konzentration die der letzten 420000 Jahre und höchstwahrscheinlich auch die der letzten 20 Millionen Jahre um ~100 µatm (Berner, 1990). Die Zuwachsrate im letzten Jahrhundert ist, zumindest während der letzten 20000 Jahre, beispiellos (Prentice et al., 2001).

Modellrechnungen zeigen, dass die CO₂ Konzentration der Atmosphäre bei zum Jahr 2100 bis auf über 750 µatm ansteigen könnte, sollte die anthropogenen Emissionen nicht drastisch zurückgehen („Business as usual“-Szenario IS92a, Boer et al. (2001)). Eine unmittelbare Folge des Anstiegs der atmosphärischen CO₂-Konzentration ist die globale Temperaturerhöhung von 2-6 °C in den nächsten 100 Jahren (Boer et al., 2001).

Messungen und Rekonstruktionen der atmosphärischen CO₂ Konzentrationen zeigen, dass weniger als die Hälfte der anthropogenen CO₂ Emissionen in die Atmosphäre gelangen

1 Einleitung

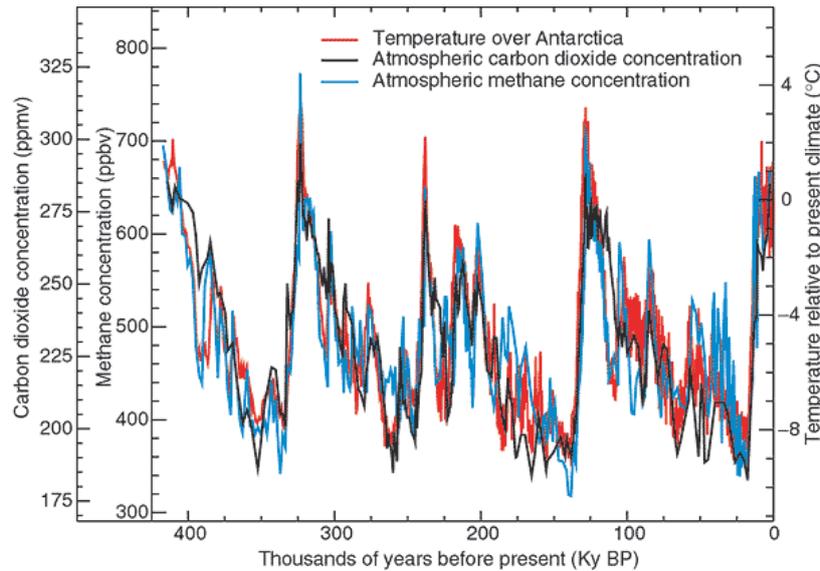


Abbildung 1.1. Variationen der Temperatur, der atmosphärischen CO₂- und CH₄-Konzentration innerhalb der letzten 420000 Jahre. Die Daten sind aus Eisbohrkernen der Antarktis gewonnen worden. Aus Boer et al. (2001).

(Prentice et al., 2001). Von 1800 bis 1994 wurden ~48% des ausgestoßenen CO₂ aufgenommen (118±19 von 244±20 Pg) und potenziell könnten die Ozeane ~90% des anthropogenen CO₂ aufnehmen, nachdem sie komplett durchmischt worden sind (Sabine et al., 2004).

1.1.1 Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen auf das Karbonatsystem

Löst sich CO₂ im Wasser, reagiert ein großer Teil mit den H₂O Molekülen nach Formel 1.1.



Die Summe dieser Kohlenstoffspezies wird gelöster anorganischer Kohlenstoff (DIC) genannt. Die Lösung von CO₂ führt zum einen zur Erhöhung der DIC Konzentration und zum anderen zur Entstehung von Protonen. Im Meerwasser reagieren diese Protonen mit vorhandenen Anionen, so dass eine pH-Wert-Änderung abgepuffert wird. Bei den Anionen handelt es sich größtenteils um HCO₃⁻, CO₃²⁻, B(OH)₄⁻, OH⁻ und andere, in geringen Konzentrationen vorliegende, wie z.B. die Anionen der Phosphorsäure (HPO₄²⁻, PO₄³⁻) oder die der Kieselsäure (H₃SiO₄⁻) (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). Die Summe dieser Anionen

1 Einleitung

wird Totale Alkalinität (TA) genannt (Formel 1.2),

$$TA = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] - [H^+] + \text{andere Komponenten} \quad (1.2)$$

wobei H^+ die Konzentration freier Wasserstoffionen darstellt (vereinfacht nach Dickson (1981)).

Trotz der Pufferkapazität des Meerwassers führte die Erhöhung der atmosphärischen CO_2 -Konzentration von 280 auf 380 μatm dazu, dass sich der pH-Wert der Ozeanoberfläche um 0,1 Einheiten verringert hat (Abb. 1.2). Er könnte bis zum Jahr 2100 um weitere 0,3 oder 0,4 Einheiten sinken (Meehl et al., 2007).

Die Versauerung verursacht eine Verschiebung im pH-abhängigen Gleichgewicht des Karbonatsystems, was dazu führt, dass der Anteil des CO_2 an der totalen DIC Konzentration steigt, während der von CO_3^{2-} sinkt. So hat sich die CO_2 -Konzentration von 9 auf 13 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ erhöht, was eine Steigerung von ~44% darstellt. Die Verdopplung der heutigen atmosphärischen CO_2 -Konzentration würde die CO_2 -Konzentration im Wasser auf 25 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ anheben. Gleichzeitig ist die CO_3^{2-} -Konzentration um ~16% von 222 auf 186 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ gesunken und könnte um weitere 81 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ sinken (Fabry et al., 2008). Die pH-Erniedrigung ändert auch den Kalzit- und Aragonit- Sättigungszustand, was die Löslichkeit dieser beiden Karbonate erleichtern wird (Fabry, 2008).

	Glacial	Pre-industrial	Present	2XCO ₂	3XCO ₂	Change from pre-industrial to 3XCO ₂
CO ₂ (g)						
pCO ₂	180	280	380	560	840	200%
Gas exchange						
CO ₂ (aq) + H ₂ O ⇌ H ₂ CO ₃ Carbonic acid	7	9	13	18	25	178%
H ₂ CO ₃ ⇌ H ⁺ + HCO ₃ ⁻ Bicarbonate	1666	1739	1827	1925	2004	15%
HCO ₃ ⁻ ⇌ H ⁺ + CO ₃ ²⁻ Carbonate	279	222	186	146	115	-48%
DIC	1952	1970	2026	2090	2144	8.8%
pH _(sws)	8.32	8.16	8.05	7.91	7.76	-0.4
Ω _{calcite}	6.63	5.32	4.46	3.52	2.77	-48%
Ω _{aragonite}	4.26	3.44	2.90	2.29	1.81	-47%

Abbildung 1.2. Konzentrationen der Kohlenstoffspezies (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , in $\mu\text{mol kg}^{-1}$), pH-Werte (Seawater Scale) und der Aragonit- und Kalzit-Sättigungszustand (Ω) im Oberflächenwasser unter glazialen, vorindustriellen und zwei zukünftigen atmosphärischen pCO_2 (in μatm). Aus Fabry et al. (2008).

1.1.2 Auswirkungen der Temperaturerhöhung auf die Hydrographie der Meere

Die angenommene Temperaturerhöhung von 2-6 °C bis zum Jahr 2100 wird die hydrographischen Bedingungen der Ozeane verändern. Steigenden Wassertemperaturen werden die Schichtung der ozeanischen Oberflächenschicht verstärken, was die Durchmischung des warmen Oberflächenwassers mit kälterm Tiefenwasser abschwächen und nach und nach zu einer Verflachung der Thermokline führt. Eine Folge davon könnte verringerte Nährstoffzufuhr aus Wasserkörpern unterhalb der Thermokline sein (Rost et al., 2008), da die Nährstoffkonzentration im Tiefenwasser um ein vielfaches höher ist als im Oberflächenwasser.

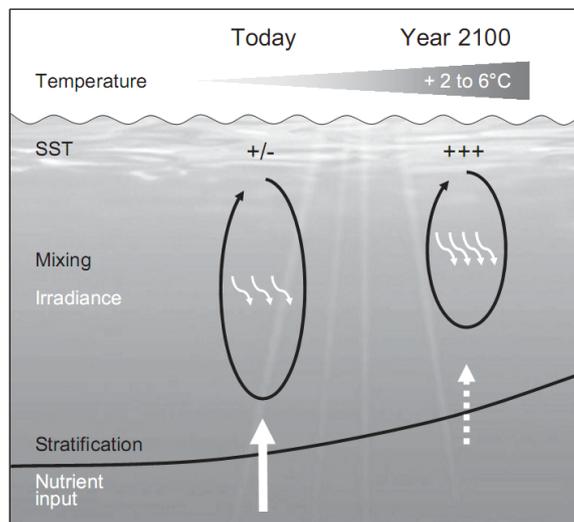


Abbildung 1.3. Angenommene Veränderungen der Oberflächentemperatur der Ozeane (SST) als Folge der globalen Erwärmung und die Auswirkungen auf Stratifizierung, Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit. Aus Rost et al. (2008).

1.1.3 Auswirkungen der anthropogenen Klimaveränderung auf das marine Ökosystem

In veröffentlichten Experimenten wurden mögliche Konsequenzen der, in Abschnitt 1.1.1 und 1.1.2 beschriebenen, Veränderungen der chemischen und physikalischen Prozesse im Ozean für Zoo- und Phytoplanktonorganismen analysiert. Die temperaturbedingten Veränderungen üben signifikanten Einfluss auf die Artenzusammensetzung mariner Ökosysteme aus (Sommer et al., 2007; De Senerpont Domis et al., 2007; Rose et al., 2009). Mit der struktu-

1 Einleitung

rellen Änderungen der Artgemeinschaft, gehen zusätzlich physiologische Veränderungen mancher Arten einher. So erschwert die Verringerung der CO_3^{2-} -Konzentration kalkbildenden Organismen, z.B. Mollusken, Echinodermaten, Crustaceen und Korallen, den Aufbau ihrer kalkhaltigen Strukturen, was zur Verringerung ihrer Fitness und damit Überlebenschance führen kann (Fabry, 2008). Auch in der Gruppe der kalkbildenden Coccolithophoriden (marine Mikroalgen), wurde der negative Effekt, den die Senkung der CO_3^{2-} -Verfügbarkeit auf die Bildung biogenen Kalks hat, nachgewiesen (Zondervan et al., 2002).

Marine photoautotrophe Organismen scheinen jedoch häufig von der Erhöhung der CO_2 -Konzentration zu profitieren und zeigen gesteigerte Photosyntheseraten (Riebesell, 2004). Während der Photosynthese wird CO_2 vom Enzym RUBISCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat Karboxylase/Oxygenase) fixiert. Die Effektivität dieses Enzyms CO_2 zu binden weist eine hohe interspezifische Variabilität auf (Badger et al., 1998). Die Spanne der Halbsättigungskonstanten (K_m) von RUBISCO reicht von $\sim 7\text{-}20 \mu\text{M CO}_2$ in Rotalgen über $30\text{-}60 \mu\text{M CO}_2$ in der Gruppe der Chrysophyta bis hin zu Werten $>100 \mu\text{M CO}_2$, die typisch sind für Cyanobakterien (Badger et al., 1998). Typische marine CO_2 -Konzentrationen liegen heutzutage zwischen 10 und $25 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ entspricht $\sim 1 \mu\text{mol kg}^{-1}$) und somit häufig unter dem K_m Wert von RUBISCO (Riebesell, 2004).

Um die Untersättigung des Enzyms auszugleichen, besitzen die Algen ein System zur Anreicherung des internen CO_2 Pools, die so genannten Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismen (englisch: Carbon Concentrating Mechanisms, CCM) (Badger et al., 1998). Sie bestehen aus einer Vielzahl von Komponenten, deren Synthese und Aufrechterhaltung ihrer Funktion Energie verbraucht. Da einige Phytoplanktongruppen unter heutigen CO_2 -Konzentrationen Kohlenstoff-limitiert sind (siehe oben), hat die Erhöhung der $p\text{CO}_2$ in der Atmosphäre zur Folge, dass die energieaufwendigen CCM teilweise deaktiviert werden können und somit Energie frei wird, die in andere Stoffwechselprozesse geleitet werden kann (Raven, 1991). Untersuchungen haben gezeigt, dass manche Makroalgen (Gao et al., 1993), Diatomeen (Riebesell et al., 1993), sowie ganze Phytoplanktongemeinschaften (Riebesell et al., 2007) ihrer Photosyntheseleistung unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen steigern, was jedoch nicht von allen Studien bestätigt werden konnte (Kim et al., 2006; Egge et al., 2007). Der Effekt erhöhter CO_2 -Konzentrationen beschränkt sich nicht nur auf die CO_2 -Fixierung, sondern betrifft auch die Fixierung molekularen Stickstoffes (N_2), wie Untersuchungen der Cyanobakteriengattung *Trichodesmium* sp. gezeigt haben. Diese Organismen steigerten ihre Stickstoff-Fixierungsraten in Abhängigkeit von der CO_2 -Konzentration (Levitan et al., 2007; Hutchins et al., 2007; Barcelos e Ramos et al., 2007; Fu et al., 2008, 2007; Kranz et al., 2009).

Stickstoff Fixierung und ihre Bedeutung im marinen Nahrungsnetz

Die Primärproduktion mariner Ökosystemen ist im Wesentlichen Stickstoff limitiert (Howarth, 1988) und somit auf den Eintrag stickstoffhaltiger Verbindungen angewiesen. Ein Großteil dieser Nährstoffe gelangt über die Flüsse oder die Atmosphäre (Niederschläge) in die Ozeane, ein weiterer Teil durch Diffusion oder Auftrieb über die Sprungschicht, welche nährstoffreiches Tiefenwasser vom nährstoffarmen Oberflächenwasser trennt (s.h. Abschnitt 1.1.2). Zusammengenommen machen diese Quellen 50% des globalen Gesamteintrags aus (Gruber and Galloway, 2008). Die anderen 50% gelangen über die Stickstoff Fixierung in die Ozeane. (Gruber and Galloway, 2008).

Der Stickstoff wird von diazotrophen Cyanobakterien fixiert, welche durch den Besitz des Enzymkomplexes der Nitrogenase in der Lage sind, den molekularen Stickstoff in organischen umzuwandeln. Somit können sie in stickstofflimitierten Gebieten zu wachsen, da sie nicht, wie andere Phytoplankter, von den gelösten Stickstoffverbindungen abhängig sind. Die am besten untersuchte Gattung ist *Trichodesmium* sp., die in tropischen und subtropischen Meeren vorkommt (Capone et al., 1997) und dort für bis zu 50% der totalen Stickstoff-Fixierung verantwortlich sein kann (Karl et al., 1997). Auch in der Ostsee treten Cyanobakterien als wichtige Stickstofflieferanten auf, wobei *Nodularia* sp., *Aphanizomenon* sp. und *Anabaena* sp. die wichtigsten Gattungen sind. Der Stickstoffeintrag dieser drei Gattungen kann in der Ostsee im Sommer bis zu 50% des Gesamteintrags (434000 t a^{-1}) ausmachen (HELCOM, 2009).

Der fixierte Stickstoff gelangt über drei Wege in das Nahrungsnetz: durch Fraß ("sloppy feeding"), Lyse absterbender Zellen (Hewson et al., 2004) oder Exudation gelöster Stickstoffverbindungen (z.B. NH_4^+ , Aminosäuren) (Mulholland et al., 2004; Gilbert and Bronk, 1994; Wannicke et al., 2009). Der Anteil exudierten Stickstoffs an der totalen Stickstoff Fixierung kann zwischen 50 und 89% betragen (Gilbert and Bronk, 1994; Wannicke et al., 2009). Sowohl die Primärproduktion nicht Stickstoff fixierender Algen als auch die Produktion von Picoplanktonorganismen (heterotropher Bakterien und Protisten) wird hierdurch unterstützt. Freilandstudien haben gezeigt, dass 5-15% des fixierten Stickstoffs zum Picoplankton transferiert werden (Ohlendieck et al., 2000, 2007). In einer Mesokosmos Studie gelangten 2-24% des fixierten Stickstoffs durch den Fraß von Picoplanktern in das Mesozooplankton (Sommer et al., 2006), von wo es in höhere trophische Ebenen gelangen kann (Abb. 1.4). Durch den Eintrag neuen Stickstoffs in das Nahrungsnetz nehmen diazotrophe Cyanobakterien eine wichtige Funktion bei Regulation der Produktivität des von ihnen besiedelten Lebensraums ein (Capone et al., 1997). Änderungen in den Stickstoff-Fixierungsraten die auf

1 Einleitung

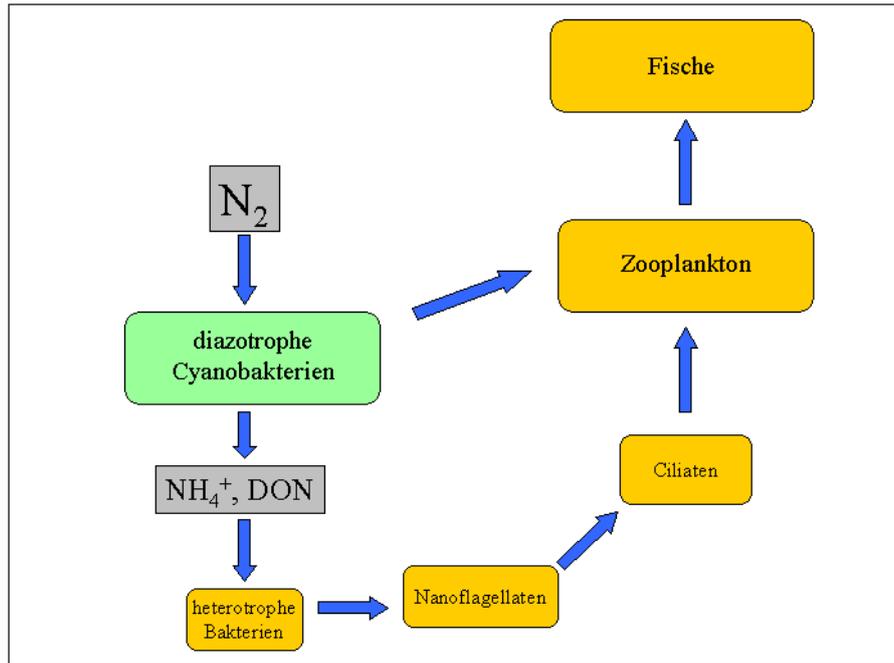


Abbildung 1.4. Stark schematisierter Verlauf des durch diazotrophe Cyanobakterien (grün) fixierten Stickstoffes (grau) in andere trophische Ebenen des pelagischen Nahrungsnetzes. Die Pfeile zeigen die Weitergabe des Stickstoffes in eine andere trophische Ebene an. DON: gelöster organischer Stickstoff. Erklärung siehe Text.

die anthropogene Erhöhung der CO_2 -Konzentration zurückgehen, könnten für weitreichende Veränderungen in einem solchen Ökosystem führen (Hutchins et al., 2007; Barcelos e Ramos et al., 2007). Daher ist es erstrebenswert, eine Mögliche Veränderung der Stickstoff-Fixierungsraten aufgrund steigender CO_2 -Konzentrationen zu quantifizieren.

Die vorliegende Diplomarbeit untersucht den Effekt erhöhter CO_2 -Konzentrationen auf eine artifiziale Cyanobakteriengemeinschaft, bestehend aus *Nodularia spumigena* und *Aphanizomenon* sp., sowie Picoplanktonorganismen (heterotrophe Bakterien, *Synechococcus* sp., Picoeukaryoten). Dabei sollen beantwortet werden, ob 1.) die Stickstoff-Fixierungsraten dieser Gemeinschaft mit erhöhten CO_2 -Konzentrationen steigen werden, 2.) ob die Abgabe des fixierten Stickstoffes von der Erhöhung der CO_2 -Konzentration beeinflusst wird und 3.) in wieweit die Weitergabe des fixierten Stickstoffes in die Picoplanktonfraktion verändert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Algenkulturen und Medium

In dieser Arbeit wurden zwei typische Cyanobakterienarten der Ostsee verwendet: *Nodularia spumigena* Mertens Stamm 9414 und *Aphanizomenon* sp. Kützing. Sie wurden der Algenkultur des IOW entnommen. Beide Arten wurden in nitratfreiem BA⁻ Medium bei einer Salinität von 9 herangezogen, um genügend Biomasse für die Experimente zu erhalten. Das BA⁻ Medium stellte eine Mischung aus $\frac{1}{3}$ ASN-III und $\frac{2}{3}$ BG-11 Medium dar (für die Mineralienkonzentrationen siehe Tabelle 2.1).

Das Versuchswasser stammte aus der Ostsee (Küstenstation Heiligendamm, Beprobung Januar 2009). Es wurde mittels Peristaltikpumpe über GF/C Filter (Whatmann, nominelle Porengröße 1,2 µm) filtriert. Diese Filtration schloss Grazer und Mikrophytoplankton aus, so dass nur noch Bakterien und Picoeukaryoten zurückblieben. Die Nährstoffkonzentrationen des Wassers lagen bei 0,6 µmol Phosphat L⁻¹ und 4,1 µmol Nitrat L⁻¹. Der Salzgehalt betrug 10,7. Zwei Tage vor Beginn eines Experiments wurden die Algen in Versuchswasser umgesetzt, um Adaptation an dieses zu gewährleisten. Dazu wurden sie vorsichtig über 10 µm Gaze gegeben und anschließend in die neuen Kulturgefäße gespült.

2.2 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Experimente durchgeführt. Zum einen das Langzeit-Adaptations-Experiment (LAX), zu anderen das Kurzzeit-Inkubations-Experiment (KIX). Ziel des LAX war es, den Effekt erhöhter pCO₂ auf die N₂- und C-Fixierungs- und die Phosphataufnahmeraten der Cyanobakterien zu untersuchen. Es wurden zwei unabhängige Wiederholungen durchgeführt (LAX I und LAX II).

Das KIX hatte zum Ziel den Einfluss erhöhter CO₂ Konzentrationen auf die heterotrophe Bakterienfraktion zu studieren.

Die Experimente wurden in einer Klimakammer bei 18 °C durchgeführt. Die Batchkultu-

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1. Übersicht der Mineralienkonzentrationen des BA⁻ Mediums.

Mineral	Konzentration [g L ⁻¹]
NaCl	8,3
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,6
KCl	0,16
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	0,032
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,21
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,184
Na ₃ – Citrat	0,005
Fe–NH ₄ –Citrat (17% Fe)	0,005
Na–EDTA	0,00076
Na ₂ CO ₃	0,026
Trace Metal Mix A5 + Co	1,2 ml
Vitamin B12	0,000026

ren wurden mit Tageslicht Leuchtstoffröhren (Philips LUMILUX DELUXE DAYLIGHT L18W/954) mit einer durchschnittlichen Einstrahlungsintensität von 100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ beleuchtet. Der Tag/Nacht Rhythmus war ein Wechsel von 16 Stunden Tag und 8 Stunden Nacht. Die Licht-, Temperatur- und Salzgehaltsverhältnisse entsprachen denen, die typischerweise im Juli/August herrschen, wenn Cyanobakterienblüten in der Ostsee auftreten (Wasmund, 1997; Sivonen et al., 1989).

Tabelle 2.2. Übersicht der Parameter, die im LAX und im KIX gemessen worden sind. Die **fett** gedruckten Parameter wurden auch am Anfang der Inkubation genommen. Die *kursiv* gedruckten Parameter wurden nur im KIX bestimmt.

Parameter	
pH, Temperatur	N ₂ /CO ₂ Fixierung
Zellzahlen Cyanobakterien	Phosphataufnahme
Zellzahlen Bakterien	<i>NO₃ Aufnahme</i>
Zellzahlen Picoalgen	<i>Thymidin/Leucin Aufnahme</i>
Chlorophyll a	<i>Phosphatase Aktivität</i>
Totaler Phosphor (TP)	<i>Glucosidase Aktivität</i>
partikuläres organisches Material (POC, PON)	<i>Peptidase Aktivität</i>
gelöstes organisches Material (DOC, DON, DOP)	
Nährstoffe (NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻)	

2.2.1 Langzeit-Adaptations-Experiment (LAX)

Sieben 2,3 L Glasflaschen (Schott) wurden zur Hälfte mit belüftetem, GF/C filtriertem Seewasser gefüllt. Die im Seewasser präadaptierten Algen wurden gemischt und in die Flaschen gefüllt, so dass eine Endkonzentration von $5 \mu\text{g Chl a L}^{-1}$ (LAX I) bzw. $10 \mu\text{g Chl a L}^{-1}$ (LAX II) erreicht wurde. Anschließend sind der Phosphatgehalt auf $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ gebracht und die Flaschen bis zum Rand mit Versuchswasser aufgefüllt worden.

Es wurden die Startparameter zur Bestimmung des Anfangszustandes jeder Flasche im Gradienten genommen (Tab. 2.2). Dafür wurden 450 ml jeder 2 L Flasche in eine 1 L Flasche gefüllt. Aus dieser wurden die Unterproben für die Messungen genommen (Abb. ??). Nach Abschluss der Probenahme wurden die Flaschen mit einem Teflon beschichtetem

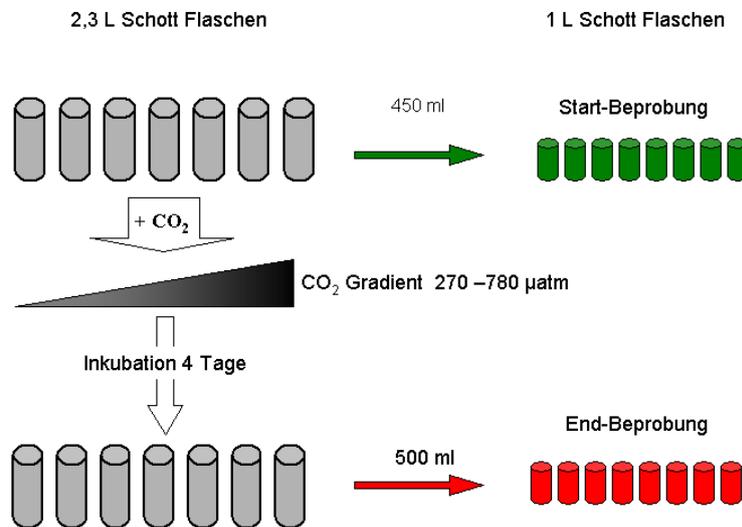


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des LAX. Für eine genaue Beschreibung des Ablaufes siehe Abschnitt 2.2.1.

Butylseptum und dem Schraubverschluss der Flasche gasdicht verschlossen. Der CO₂ Gradient wurde erzeugt, in dem man durch eine Bohrung im Deckel CO₂ (99%) mit einer gasdichten Spritze in die Flaschen injizierte. Die CO₂ Partialdrücke im Gradienten betragen 270, 280, 380, 480, 580, 680 und 780 µatm.

Nach der Injektion des CO₂ Gases wurden die Flaschen vier Tage bei 18 °C inkubiert. Die optimale Inkubationszeit wurde durch einen Vorversuch bestimmt (Abb. 2.2). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Flaschen nacheinander geöffnet und wiederum

2 Material und Methoden

Proben für alle, in Tabelle 2.2 aufgelisteten Parameter genommen. Im Anschluss wurden die Inkubationen für die N+C-Fixierungs- und P-Aufnahmeraten angesetzt.

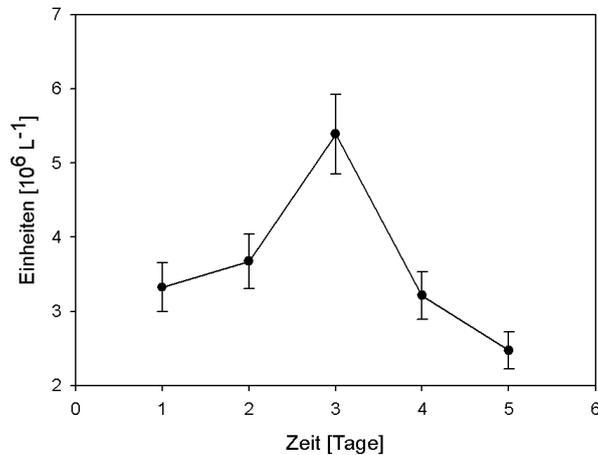


Abbildung 2.2. Verlauf des Zellwachstums über fünf Tage zur Bestimmung des Inkubationszeitraumes der LAX. Fehlerbalken repräsentieren den Fehler der Methode (10%).

2.2.2 Kurzzeit-Inkubations-Experiment (KIX)

Das KIX wurde mit den verbliebenen Cyanobakterien aus LAX II durchgeführt. Eine Hälfte der Algen wurde im KIX I, die andere im KIX II verwendet. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen des LAX. Einzig der CO_2 Gradient wies eine Abweichung. Er erstreckte sich von 300–950 (Nitrataufnahme Experiment) und 250–930 μatm (Stickstoff-Fixierungs Experiment).

$^{15}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme-Experiment (KIX I)

Die Algen aus jeder Flasche wurden in 2,8 L Versuchswasser umgesetzt. Es wurden 500 ml für die Bestimmung der Startbedingungen abgenommen (Tab. 2.2). Mit den übrigen 2,3 L wurden die Flaschen blasenfrei befüllt. Vor der CO_2 Injektion wurden ^{13}C - NaHCO_3 und ^{15}N - NaNO_3 Tracer dazugegeben (Details siehe Abschnitt 2.3.8). Die Inkubation fand für vier Stunden im Klimaraum (18 °C) statt.

Um die fädigen Cyanobakterien ($> 3 \mu\text{m}$) von der einzelligen mikrobiellen Gemeinschaft ($< 3 \mu\text{m}$) zu trennen, wurden die Proben fraktioniert. Für die POM Filter, die zur Bestimmung

der Aufnahmeraten dienten, wurde 1 L Wasser über den Polykarbonatfilter (3 μm Porengröße) filtriert und der Rückstand mit 0,2 μm filtriertem Versuchswasser auf einen GF/F Filter (nominelle Porengröße 0,8 μm) gespült. Das Filtrat wurde aufgefangen und über GF/F Filter filtriert. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

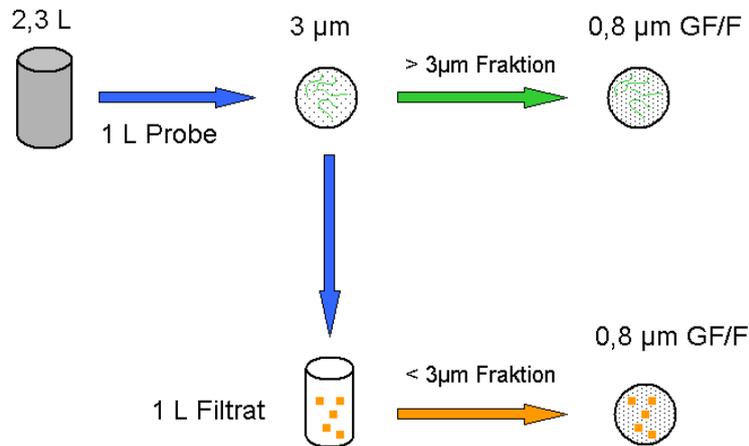


Abbildung 2.3. Schematischer Ablauf der Fraktionierung im KIX. Grüne Symbole: > 3 μm Fraktion, orange Symbole: < 3 μm Fraktion.

$^{15}\text{N}_2$ -Fixierungs-Experiment

Der Aufbau sowie die Fraktionierung entsprachen dem des Nitrat-Aufnahme-Experiments. Vor der CO_2 Zugabe wurden die Flaschen mit ^{13}C - NaHCO_3 Tracer versetzt und gasdicht verschlossen, um den pCO_2 Gradienten einzustellen. Nach der CO_2 Zugabe wurde in jede Flasche $^{15}\text{N}_2$ Tracer injiziert.

Der weitere Ablauf entsprach dem des Nitrataufnahme-Experiments (Abschnitt 2.2.2).

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung des Karbonatsystems

Für das Versuchswasser erfolgte eine exakte Bestimmung des Karbonatsystems durch Herrn Schneider (Institut für Ostseeforschung, Warnemünde). Dazu wurde der CO_2 Partialdruck

2 Material und Methoden

mit einem nichtdispersiven Infrarot CO₂ / H₂O Gas Analyser (LI 6262, LI-COR) bestimmt. Die genaue Beschreibung der Methode ist in Krötzinger et al. (1996) zu finden. Die DIC Konzentration wurde coulombmetrisch nach Johnson et al. (1993) bestimmt. Mit dem pCO₂ und der DIC Konzentration wurde die totale Alkalinität (TA) errechnet (1730 μmol kg⁻¹) und diente in allen Versuchen als Wert für die Berechnung der CO₂ Zugabe.

Der pH wurde vor der Zugabe des CO₂ gemessen (Knick Mikroprozessor pH Meter 761 mit Typ SE 100 Glaselektrode).

Aus TA und pH wurden mit dem Programm "CO₂Sys" (Lewis and Wallace, 1998) die Parameter pCO₂ und DIC für das unbehandelte Versuchswasser und errechnet. Folgenden Einstellungen wurden benutzt:

1. Single input mode
2. Constants by Roy et. al
3. pCO₂
4. The K_{KSO₄} by Dickson
5. pH on the total scale

Mit den pCO₂, die im Gradienten erreicht werden sollten und der TA berechnete man den DIC (gelöster anorganischer Kohlenstoff) Gehalt des Wassers. Die Differenz zwischen der DIC Konzentration des unbehandelten Wassers und der DIC Konzentration im Gradienten stellte den ersten Teil der benötigten CO₂ Stoffmenge dar.

$$\Delta DIC = DIC_{\text{Grad.}} - DIC_{\text{unbeh.}} \quad (2.1)$$

Der zweite Teil war die Berechnung der CO₂ Konzentration im Headspace der Flaschen. Die Beziehung lautet,

$$n_{\text{Head}} = \frac{pCO_2 * Vol_{\text{Head}}}{R * T} \quad (2.2)$$

wobei n_{Head} = CO₂ Konzentration im Headspace in L, pCO₂ = CO₂ Partialdruck in atm, Vol_{Head} = Volumen des Headspace in L, T = Temperatur in Kelvin, R = universelle Gaskonstante 8,314 $\frac{\text{atm} * \text{L}}{\text{K} * \text{mol}}$. Diese Berechnung wurde für unbehandeltes Wasser und für alle Punkte im Gradienten ausgeführt. Aus der Differenz

$$\Delta n = n_{\text{behandelt}} - n_{\text{unbehandelt}} \quad (2.3)$$

2 Material und Methoden

ergab sich die CO₂ Stoffmenge im Headspace. Die Summe aus Δn und ΔDIC war die benötigte CO₂ Stoffmenge, die zum Erreichen des gewünschten pCO₂ nötig war. Eine Übersicht der Anfangsbedingungen der Versuche findet sich in Tabelle ??).

Tabelle 2.3. Startbedingungen des Karbonatsystems des LAX und des KIX. Die TA betrug in allen Experimenten 1730 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (siehe Text).

LAX Startbedingungen					
pCO ₂ [μatm]	pH	DIC[$\mu\text{mol kg}^{-1}$]			
270	8,23	1609			
280	8,20	1616			
380	8,08	1647			
480	7,99	1668			
580	7,91	1684			
680	7,85	1696			
780	7,79	1707			

KIX I Startbedingungen			KIX II Startbedingungen		
pCO ₂ [μatm]	pH	DIC[$\mu\text{mol kg}^{-1}$]	pCO ₂ [μatm]	pH	DIC[$\mu\text{mol kg}^{-1}$]
300	8,18	1623	250	8,24	1606
310	8,16	1627	290	8,19	1620
420	8,04	1656	410	8,05	1654
560	7,92	1681	520	7,95	1675
710	7,83	1700	650	7,86	1693
820	7,77	1711	780	7,79	1707
950	7,71	1722	930	7,72	1720

2.3.2 Chlorophyll *a* Bestimmung

Für die Bestimmung des Chlorophyll *a* (Chl *a*) Gehalts wurden die Proben GF/F filtriert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die Extraktion erfolgte mit 10 ml 96% Ethanol für mindestens drei Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Die Extrakte wurden mit einem Turner 10-AU-005 Fluorometer (Gamma Analyse Technik GmbH, Bremerhafen) gemessen, mit 100 μl 1n Salzsäure angesäuert und nach 30 Sekunden wieder gemessen (Anregungswellenlänge 450 nm, Messwellenlänge 670 nm), um den Phaeopigmentgehalt zu errechnen zu können (Edler, 1979; JGOFS, 1993). Das Fluorometer wurde mit reinem Chl *a* Standard (Sigma) kalibriert. Der Chlorophyll *a*- und

der Phaeopigment–Gehalt wurden nach Formel 2.4 und 2.5 berechnet,

$$\text{Chl } a \text{ } [\mu\text{g L}^{-1}] = \frac{F_m}{F_m - 1} (F_o - F_a) K_x V_E \frac{1}{V_p} \quad (2.4)$$

$$\text{Phaeo } [\mu\text{g L}^{-1}] = \frac{F_m}{F_m - 1} [(F_m F_a) - F_o] K_x \frac{V_E}{V_P} \quad (2.5)$$

wobei F_m den Ansäuerungskoeffizient (1,8902), F_o die Fluoreszenz vor und F_a die nach Ansäuerung darstellt. K_x bezeichnet den linearen Kalibrierungsfaktor (1,2321), V_E das Volumen des Extraktionsmittels in ml und V_p das Probenvolumen in ml.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Cyanobakterien

Für die Zählung der Cyanobakterien wurden 30 ml der Probe in Falcontubes gefüllt und mit ca. 1 ml Lugolscher Lösung fixiert. Bis zur Zählung lagerten die Proben im Dunkeln bei Raumtemperatur. Für die Zählung wurden 10 ml (LAX) oder 25 ml (KIX) Sedimentationskammern über Nacht angesetzt. Die Zählung erfolgte an einem inversen Mikroskop (ZEISS Axiovert 100) bei 400–facher Vergrößerung. Eine Einheit entsprach 25 μm Filamentlänge. Die Zellcounts wurden mit der Formel

$$\text{Anzahl [Einheiten L}^{-1}] = \left(\frac{A_{\text{Kammer}}}{A_{\text{Streifen}}} \right) \left(\frac{\frac{1000}{\text{Vol}}}{\sum \text{Streifen}} \right) \quad (2.6)$$

berechnet, wobei A_{Kammer} die Zählkammerfläche, A_{Streifen} die Fläche eines Zählstreifens, Vol das Volumen des Sedimentationsturmes und $\sum \text{Streifen}$ die Summe der gezählten streifen bezeichnet. Die Methode weist einen Fehler von 10% auf, wenn mindesten 400 Einheiten gezählt worden sind (HELCOM, 1988).

Bakterien und Picoalgen

Die Bakterien- und Picoalgenabundanz wurden am Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickison) nach Gasol et al. (2004) bestimmt. Die Messungen wurden von Kirsten Isensee durchgeführt (Institut für Ostseeforschung, Warnemünde). Je 4 ml wurden mit 16 μl (Bakterien) bzw. 160 μl (Picoalgen) Glutardialdehyd (GDA) (4% v/v Endkonzentration) fixiert. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20°C (Bakterien) und -80°C (Picoalgen) gelagert.

2 Material und Methoden

0,4 ml der Bakterienprobe wurde mit SYBRGreenI (Molecular Probes) gefärbt und mit 10 μl 1 μm Beads versetzt (interner Standard). Die Messung erfolgte bei 19 $\mu\text{l min}^{-1}$ für 2 min. Das Signal des Side Scatters (SSC) und der Grünfluoreszenz (FL1) wurde verwendet, um die Bakterien zu detektieren.

Für die Bestimmung der Algenzellzahl wurden 1 ml Probe mit 10 μl 1 μm Beads versetzt. Die Messung erfolgte für 10 min bei 49 $\mu\text{l min}^{-1}$. Rot (F2) und orange (F3) Fluoreszenz dienten als Signal für Picoalgen.

Die gespeicherten Daten wurden mit der Software Win MDI ausgewertet.

2.3.4 anorganische Nährstoffe

Für die Bestimmung der Nährstoffe wurden 100 ml Wasser des POM Filtrats (geglühte GF/F Filter) in Polyethylenflaschen bei -20°C gelagert. Die Bestimmungen der Nährstoffkonzentrationen erfolgten mit Standardmethoden beschrieben in Grasshoff et al. (1983). Die Nitrat/Nitrit-Messungen erfolgten an einem Autoanalyser (Evolution III, Alliance Instruments). die Genauigkeit der Messung beträgt 0,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$ für Nitrit und 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ für Nitrat. Es können Konzentrationen von 0–10 $\mu\text{mol Nitrit L}^{-1}$ und 0–40 $\mu\text{mol Nitrat L}^{-1}$ sicher nachgewiesen werden.

Ammonium wurde mit der Indopheholblau Methode, bestimmt. Dafür wurden 2 x 10 ml unfiltriertes Probenwasser in 20 ml Schnappdeckelgläschen pipettiert, die Reagenzien dazu gegeben und die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln maximal 16 Stunden gelagert. Die Messung erfolgte an einem Photospektrometer (PCSpectrometer, Lovibond) bei 630 nm. Die Messgenauigkeit beträgt 0,1 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{L}^{-1}$. Die Messung ist in einem Bereich von 0–40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ linear.

Für die Phosphatbestimmung (gelöstes anorganisches Phosphat, DIP) wurden 2 x 50 ml in Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 1 ml Mischreagenz (Molybdat–Antimon–Schwefelsäure–Reagenz) und 0,5 ml Ascorbinsäure (8g auf 100ml) versetzt. Nach 20 Minuten erfolgte die Messung mit einer 5 cm Küvette am Spektrometer bei 885 nm (PCSpectrometer, Lovibond). Die Messgenauigkeit der Methode beträgt $\pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ in einem Bereich von 0–28 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.3.5 Totaler Phosphor, gelöster organischer Phosphor

Die Bestimmung des totalen Phosphors (TP) und des gelösten organischen Phosphors (DOP) wurden von Kirsten Isensee (Institut für Ostseeforschung, Warnemünde) durchgeführt. Für

die und Bestimmung des totalen und gelösten Phosphors wurden je Parameter 2 x 20 ml (TP unfiltriert, DOP 0,2 µm filtriert) in Rollrandgläser abgefüllt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Beide Proben wurden in der Mikrowelle (MWS Typ µprep-A) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte nach Zugabe von Peroxodisulfat bei schrittweiser Temperaturerhöhung auf 180°C. Dabei wurde alle Phosphorkomponenten zu Phosphat oxidiert. Anschließend wurde die Phosphatkonzentration im Autoanalyser (Alliance Instruments, Evolution III) bestimmt (Grasshoff et al., 1983). Die partikuläre organische Phosphatkonzentration wurde wie folgt berechnet,

$$POP = TP - (DOP + DIP) \quad (2.7)$$

wobei TP die totale Phosphatkonzentration, DOP die gelöste organische Phosphatkonzentration und DIN die gelöste inorganische Phosphatkonzentration darstellen. Die im IOW ermittelte Methodenpräzision liegt bei 0,1 µmol L⁻¹.

2.3.6 gelöster organischer Kohlenstoff, totaler gelöster Stickstoff

Die Bestimmung der gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und der totalen gelösten Stickstoff (TDN) Konzentrationen wurden von Boris Koch (Alfred Wegener Institut, Bremerhafen) durchgeführt. Zwei Unterproben von 10 ml GF/F (geglüht) filtriertem Wasser wurden in geglähte Glasampullen gefüllt, verschweißt und bei -20°C gelagert. Die DOC und TDN Konzentrationen wurden simultan mit der "high temperature catalytic oxidation" (HTCO) Methode auf einem Shimadzu TOC-VCPN Analyser bestimmt. 6 ml Probe wurden im Autosampler mit 0,12 ml HCL (2 M) angesäuert und für fünf Minuten mit Sauerstoff begast (100 ml min⁻¹), um anorganischen Kohlenstoff zu entfernen. 50 µl Probe ist direkt auf den Katalysator gegeben worden (aufgeheizt auf 680 °C). Das entstandene CO₂ wurde mit einem Infrarotdetektor gemessen. Das Detektionslimit lag bei 7 ± 2 µM C. Es wurde mit Wasser niedriger Kohlenstoffkonzentrationen und Seewasser Referenz Material (DOC-CRM, Hansell Research Lab, University of Miami, US) bestimmt. Totaler gelöster Stickstoff wurde mit einem Chemilumineszenz Detektor (Gasfluss O₂: 0,6 L min⁻¹) gemessen. Nach jeder sechsten Probe wurde ein Blank (MilliQ) und zwei Standards (Natriumhydrogenphthalat/Natriumnitrat) gemessen, um die Qualität der Messung zu kontrollieren. Aus der TDN Konzentration wurde die DON Konzentration errechnet (Formel 2.8)

$$DON = TDN - DIN \quad (2.8)$$

2.3.7 Partikuläres organisches Material

Für die Bestimmung des Kohlen- und Stickstoffgehalts (POC, PON) wurden 250 ml Probe GF/F (geglüht) filtriert. Die Filter wurden bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt. Die Messung erfolgte an einem Elementaranalyser (Carlo Erba Flash EA 1118), der mit einem IRMS (isotope ratio mass spectrometer, Delta +, Fa. Thermo Finnigan) über ein Conflo II Interface gekoppelt war. Der Messvorgang ist detailliert Abschnitt 2.3.8 beschrieben.

2.3.8 Fixierungs- und Aufnahmearten

Kohlenstoff- und Stickstoffaufnahme

Tabelle 2.4 fasst die verwendeten Mengen, Konzentrationen der Stammlösungen und die verwendeten Flaschenvolumina für die einzelnen Untersuchungen zusammen.

Die Inkubation für die Ratenmessung erfolgte in 320 ml Polykarbonatflaschen (LAX) oder in 2,3 L Glasflaschen (KIX). Sobald die Inkubationsgefäße luftblasenfrei bis zum Rand gefüllt waren, wurde der ^{13}C - NaCO_3 Tracer dazu gegeben. Die Endkonzentration lag bei ca. 1% des DIC Gehalts. Im Nitrataufnahme-Experiment des KIX wurde zusätzlich noch ^{15}N - NaNO_3 hineinpipettiert (ca. 10% der NO_3^- Konzentration).

Beide Tracerlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt, um einen Dichteunterschied zwischen dem Versuchswasser und der Lösung herzustellen. Der Tracer sank nach Zugabe aufgrund des Dichteunterschieds auf den Flaschenboden ab. Dies sollte verhindern, dass beim Schließen der Flasche, Tracer verloren ging, da immer ein wenig überstehendes Wasser durch das Auflegen des Septums verdrängt wurde.

Im Anschluss wurden die Flaschen luftdicht verschlossen und das $^{15}\text{N}_2$ Gas eingespritzt (LAX, KIX II). Zur Beschleunigung der Einstellung des Gleichgewichts zwischen Tracer-gas und gelöstem Stickstoff, wurden die Inkubationsflaschen ca. 30 Sekunden vorsichtig geschwenkt. Die Gleiche Prozedur wurde verwendet, das CO_2 Gas einzuspritzen.

Die Inkubation fand für vier Stunden in einem Klimaschrank (18 °C, 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) statt. Sie wurde durch Filtration über GF/F Filter beendet. Die Filter wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Bestimmung der POC/PON-Gehalte und der $\delta^{13}\text{C}$ / $\delta^{15}\text{N}$ -Werte

Vor der Analyse wurden die Filter über Nacht getrocknet und in Zinnschiffchen verpackt. Die verpackten Proben werden zu Pellets gepresst und im Elementaranalyser verbrannt. Sie fallen aus dem Autosampler, wo sie mit dem Trägergas Helium umspült werden,

2 Material und Methoden

Tabelle 2.4. Übersicht der eingesetzten Tracermengen aller Versuche. In Klammern ist die Konzentration der Stammlösung und des Gases angegeben.

Tracer	Experiment	Tracer [μ l]	Flaschen [ml]
$^{15}\text{N}_2$ (98%)	LAX	275	320
	KIX II	1950	2300
$^{13}\text{C-NaHCO}_3$ (100 mM, 99%)	LAX	51,2	320
	KIX I+II	357	2300
$^{15}\text{N-NaNO}_3$ (10 mM, 99%)	KIX I	69,7	2300
		3	100

in das Verbrennungsrohr. In diesem Moment wird das Heliumgas mit einem Puls Sauerstoff angereichert, was, zusammen mit dem Zinn, die vorherrschende Temperatur von 1020°C kurzzeitig auf 1800°C erhöht (flash combustion).

Die organischen Verbindungen werden zu Gasen (CO_2 , NO_x , CO , H_2O , SO_2 , im weiteren werden nur noch die C- und N- Verbindungen erwähnt) verbrannt im Reduktionsofen (elementares Kupfer) bei 650°C quantitativ zu CO_2 und N_2 umgewandelt. Die Gase strömen durch eine Wasserfalle (Phosphorpentoxid, P_2O_5) und weiter in die beheizte (85 °C) Gaschromatographiesäule (60cm, Fa. Hekatech), wo sie voneinander getrennt werden. Im Conflo II Interface wird eine Unterprobe (ca. 1%) zusammen mit den Referenzgasen in die Ionenquelle eingeleitet, wo sie ionisiert und beschleunigt werden. Im Magnetfeld werden die Gase nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und treffen auf einen Detektor. Die Umrechnung vom elektrischen Signal des Detektors in die δ -Werte und die C/N-Gehalte der Proben erfolgt im angeschlossenen Computer.

Um das Signal der Proben quantifizieren zu können, wird eine Substanz, deren C- und N-Gehalt genau bekannt ist, für eine Mehrpunktkalibrierung verwendet. In diesem Fall wird Acetanilid ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$, 71,09% C und 10,36% N) verwendet. Leere, geglühte Filter, die in Zinnschiffchen verpackt wurden, dienten als Blindwerte. Ihre C- und N-Gehalte werden von denen der Proben abgezogen. Nach jeder fünften Probe wird ein interner Laborstandard (Pepton) gemessen. Die mittleren δ -Werte dieser Substanz betragen -22,12 ‰ für Kohlenstoff und 5,75 ‰ für Stickstoff. Anhand der Abweichungen vom Mittelwert wird ein Korrekturfaktor berechnet, mit dem die gemessenen δ -Werte der Proben korrigiert werden. Aus diesen Messungen ergibt sich eine mittlere Standardabweichung von 0,2 ‰ für diese Messungen.

2 Material und Methoden

Die Referenzgase und internen Laborstandards werden mit Standardsubstanzen der International Atomic Energy Agency (IAEA) kalibriert (Tab. 2.5). Für die Stickstoffisotopmessung

Tabelle 2.5. Übersicht über IAEA und internen Laborstandards, die für die Bestimmung der $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{13}\text{C}$ Werte genutzt wurden. Nach (Coplen et al., 2002).

Standard	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]
Internationale Standards		
IAEA N1 (Ammonium Sulfat)	$0,43 \pm 0,07$	
IAEA N2 (Ammonium Sulfat)	$20,32 \pm 0,09$	
IAEA N3 (Kalium Nitrat)	$4,69 \pm 0,09$	
IAEA C6 (Saccharose)		$-10,43 \pm 0,13$
NBS22 (Öl)		$-29,74 \pm 0,12$
Interne Laborstandards		
Pepton	$5,75 \pm 0,2$	$-22,12 \pm 0,17$
Acetanilid	$-1,7 \pm 0,2$	$-29,81 \pm 0,19$

sind es die Standards IAEA N1, N2 und N3. Für die Kohlenstoffisotopmessung wird IAEA C6 und NBS22 verwendet. Die IAEA Standards werden mit Substanzen kalibriert, deren δ -Werte per Konvention auf 0 ‰ festgelegt worden sind. Die Referenzsubstanz für N_2 ist Luft (Mariotti, 1983), die für Kohlenstoff ist "Pee-Dee-Belemnit", ein marines Kalksteinfossil (Craig, 1957).

Berechnung der Fixierungs- und Aufnahmeraten

Zur Bestimmung der Stickstofffixierung und der Primärproduktion wurde die Berechnung von Montoya et al. (1996), eingesetzt. Der Gesamtfehler für die Stickstofffixierung liegt bei $\pm 6\%$ (CV) für Proben hoher Fixierungsraten (Anreicherung $> 10\%$). Für Proben niedriger Fixierungsraten (Anreicherung $< 10\%$) steigt er auf $9,3\%$ (CV) an.

Das für die Berechnung der Primärproduktion genutzte Excelexport, wurde für diesen Versuch abgewandelt. Die Formel, die standardmäßig den DIC Gehalt des Wassers in Abhängigkeit des Salzgehaltes berechnet,

$$DIC = ((0,067 * S) - 0,05) * 0,96 \quad (2.9)$$

wobei S die Salinität darstellt, wurde durch die DIC mit dem Programm CO_2Sys errechneten Gehalte ersetzt. Die Nitrataufnahme wurde nach den Formeln (4) und (8) aus Dugdale and Wilkerson (1986) errechnet. Alle Raten wurden auf den POC Gehalt normiert.

2.3.9 Phosphataufnahme und DIP Turnover

Alle Messungen und Berechnungen dieses Abschnitts wurden von Kirsten Isensee (Institut für Ostseeforschung, Warnemünde) durchgeführt.

Für die Messung der Phosphataufnahme wurden [^{33}P]PO₄ (Hartmann Analytics) mit einer spezifischen Aktivität von 111TBq mmol⁻¹ in einer Endkonzentration von 50pM zu 60 ml Proben (in Duplikaten) gegeben. Für die Blanks wurde die Probe vor Zugabe des Tracers mit 500µl Formaldehyd versetzt.

Während der zweistündigen Inkubation wurden in bestimmten Zeitabständen (5, 15, 30, 60, 120 Minuten) 5 ml Unterproben genommen. Die Inkorporation des Tracers wurde durch die Filtration über 0,2 µm Polykarbonatfilter gestoppt. Die Filter waren mit trägerfreiem KH₂PO₄ gewässert (Thingstad et al., 1993). Zusätzlich wurde mit einem 3 µm Polykarbonatfilter größenfraktioniert.

Alle Filter wurden mit einem Flüssigkeits-Scintillisations-Zähler (TriCarb 1600 TR) gemessen. Als Scintillisationscocktail wurde Lumasafe Plus (Packard) benutzt.

Aus der Steigung des Radioaktivitätseinbaus in partikuläres Material als Funktion der Inkubationszeit, wurde die [^{33}P]PO₄ Aufnahme errechnet (Ammermann, 1993). Die Phosphataufnahme wurde aus der [^{33}P]PO₄ Aufnahme und der DIP Konzentration in jedem Ansatz errechnet. DIP Turnoverzeiten wurden mit der Formel

$$T = \frac{t}{\ln(1 - r)} \quad (2.10)$$

berechnet. Es ist T die Turnoverzeit, t die Inkubationszeit und r die verbrauchte Fraktion des zugefügten [^{33}P]PO₄ (Thingstad et al., 1993).

2.3.10 Mikrobielle Parameter

Alle Messungen und Berechnungen dieses Abschnitts wurden von Mirko Lunau (Alfred Wegener Institut, Bremerhafen) durchgeführt.

Hydrolytische Enzym Aktivitäten

Es wurden die Enzymaktivitäten von β -Glucosidase, Phosphatase und Leucinaminopeptidase untersucht. Dies geschah mit Hilfe von 4-Methylumbelliferyl (MUF) und 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) gelabelten Substratanaloga (MUF- α -D-Glucosid, MUF-Phosphat

2 Material und Methoden

und L–Leucin–AMC, SIGMA).

Für jedes Substratanalogon wurde eine Zeit– und Konzentrationskinetik gemessen (Dauer: 30 min, Frequenz 3 min; Konzentrationen: 0,8, 1,5, 3,0, 7,5, 15,0, 30,0, 112,5, 225,0 μM final; Anregungswellenlänge 335 nm, Emissionswellenlänge 460 nm). Der Fluoreszenzhintergrund jeder Probe wurde über einen Blank ermittelt und abgezogen. Die Berechnung der Umsatzraten erfolgte über eine Standardkonzentrationsreihe (Konzentrationen siehe oben) von reinem MUF und AMC, welches in der Probe gelöst und simultan gemessen wurde. Die Aufnahme­raten wurden als Funktion der Zeit aufgetragen. Ein hyperbolischer Fit wurde an diese Daten angelegt (Hyperbola, Single Rectangular, 2 Parameter, Sigma Plot 10.0). Aus der Regressionsgleichung wurden K_m und V_{\max} bestimmt und daraus die Enzymeffizienzen V_{\max}/K_m berechnet.

Bakterielle Aktivität

Leucin und Thymidin Aufnahme­raten wurden aus $^3\text{[H]}$ –Leucin–, sowie $^3\text{[H]}$ –Thymidin–Einbau bestimmt. Es wurde dem Protokoll aus Simon and Azam (1989) und Fuhrman and Azam (1982) gefolgt. Proben wurden in Triplikaten zu je 1,5 ml angelegt und zusammen mit einem Blank bei 18°C für eine Stunde lang inkubiert. Die Endkonzentration der Isotopen betrug jeweils 20 nM.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von Borsäure gepuffertem Formaldehyd (final 4% w/v) gestoppt. Nach 15 Minuten Fixierung wurden die Proben zentrifugiert (15.000 U/min, Rotor­durchmesser 16 cm) und die Pellets in 5% eiskalter Trichloressigsäure resuspendiert. Danach wurden die Proben abermals zentrifugiert. Die $^3\text{[H]}$ –Leucin Proben wurden dann mit 1,5 ml 80% Ethanol gewaschen und abermals zentrifugiert. Zum Schluss wurden alle Proben in 1,5 ml Scintillisations­flüssigkeit (UltimaGold) gelöst und mit einem Flüssigscintillations­zähler (TYP) gemessen.

2.3.11 Statistische Auswertung

Um die Signifikanz des CO_2 -Effektes auf die abhängigen Parameter festzustellen, wurden Regressions­analysen durchgeführt. Dabei wurde auf die Regressions­analyse­funktion von Sigma Plot 10.0 zurückgegriffen. Die jeweilige angewandte Regression ist im Ergebnisteil vermerkt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum

Cyanobakterien Die POC spezifischen Wachstumsraten ($\mu_{(POC)}$) des LAX I zeigten eine hoch signifikante lineare Beziehung zum pCO_2 ($P = 0,0016$). Zwischen 270 und 780 μatm erhöhte sich μ_{POC} im Mittel von $0,06 d^{-1}$ auf $0,16 d^{-1}$ (3.1). Dies stellte eine Steigerung um den Faktor 2,6 dar.

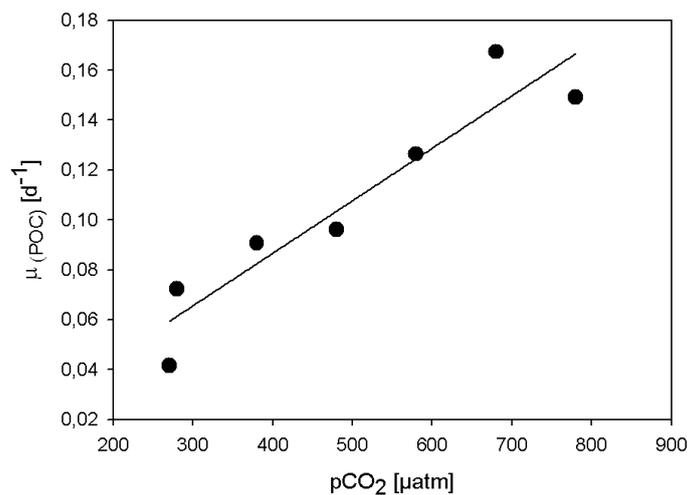


Abbildung 3.1. POC spezifische Wachstumsrate des LAX. Die Regressionsgerade lautet: $f = 0,0025 + 0,0002 * x$, $R^2 = 0,89$, $P = 0,0016$. Für LAX I konnten keine Wachstumsraten berechnet werden, da sie Zuordnung der Proben bei der Messung verloren ging.

heterotrophe Bakterien Die zellspezifische Wachstumsrate des LAX I stand in keinem Zusammenhang zum pCO_2 ($P > 0,05$) und war immer negativ (=Sterberate). Die höchste Sterberate wurde in den niedrigsten pCO_2 Ansätzen gemessen (zwischen $-0,27$ und $0,3 d^{-1}$. Abb. 3.2, A). Im $680 \mu atm$ Ansatz wurde die niedrigste Sterberate des Gradienten gemessen ($-0,14 d^{-1}$).

3 Ergebnisse

In LAX II waren die Wachstumsraten, im Gegensatz zu LAX I, positiv. Es konnte aber auch keine Abhängigkeit vom $p\text{CO}_2$ festgestellt werden ($P = 0,4364$). Die Spanne reichte von $0,51 \text{ d}^{-1}$ im $270 \mu\text{atm}$ Ansatz bis $0,67 \text{ d}^{-1}$ im $280 \mu\text{atm}$ Ansatz. Außer in $380 \mu\text{atm}$, lagen alle anderen Wachstumsraten über $0,6 \text{ d}^{-1}$ (Abb. 3.2, B).

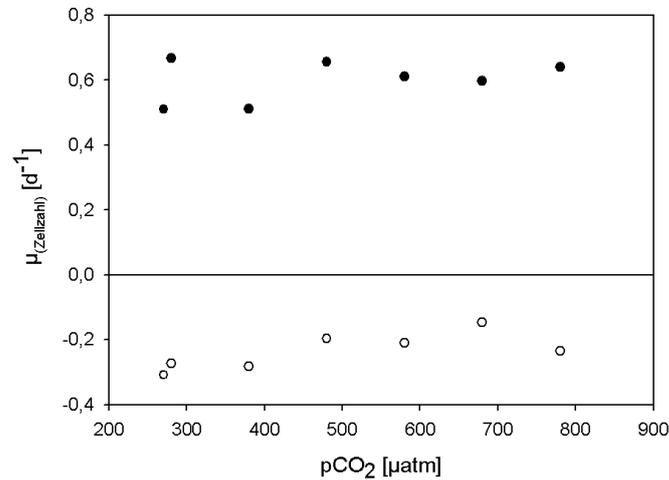


Abbildung 3.2. Zellspezifische Wachstumsrate μ für LAX I (A) und LAX II (B). Es bestand kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen $p\text{CO}_2$ und Bakterienzahl ($P = 0,0642$, bzw. $P = 0,4364$).

3.2 Kohlenstoff- und Stickstoffaufnahme

LAX Im LAX konnte ein hoch signifikanter positiver Effekt erhöhter $p\text{CO}_2$ sowohl auf die CO_2 -Fixierung als auch auf die N_2 -Fixierung nachgewiesen werden. Abbildung 3.3 zeigt die auf POC normierten Kohlenstoff- und Stickstoff-Fixierungsraten des LAX. Die CO_2 -Fixierungsraten des $780 \mu\text{atm}$ erfuhren eine 1,9-fache Steigerung im Vergleich zum $270 \mu\text{atm}$ Ansatz. Die aus der Regression errechneten mittleren Werte erhöhten sich von $0,0043$ auf $0,0082 \mu\text{mol C pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$. Die Stickstoff Fixierung wurde stärker stimuliert und erhöhte sich zwischen 270 und $780 \mu\text{atm}$ um den Faktor $7,2$. Die mittleren absoluten Raten stiegen von $0,0082$ auf $0,0592 \text{ nmol N pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$.

KIX > 3μm Die CO_2 -Fixierungsraten des KIX zeigten eine signifikante Abhängigkeit vom $p\text{CO}_2$. Zwischen 270 und $780 \mu\text{atm}$ erhöhten sich die Raten im KIX I um das 3-fache, im KIX II um das 6-fache (Abb. 3.4, A und B). Die absoluten Raten betragen zwischen $0,69$

3 Ergebnisse

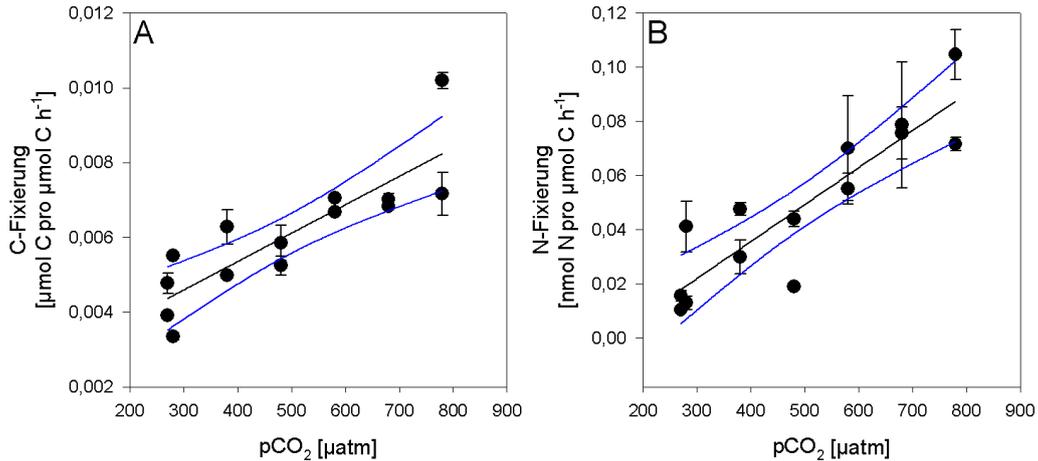


Abbildung 3.3. POC normierte CO₂- und N₂-Fixierungsraten des LAX in Abhängigkeit des pCO₂. Die Messpunkte stellen den Mittelwert aus 2 Messungen ± Standardabweichung dar. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt (A) CO₂-Fixierungsraten. Die Regressionsgleichung lautet: $f = 0,0023 + 7,5930 \cdot 10^{-6} * x$, $R^2 = 0,73$, $P = 0,0001$. (B) N₂-Fixierungsraten. Die Regressionsgleichung lautet: $f = -0,0188 + 0,0001 * x$, $R^2 = 0,79$, $P < 0,0001$.

und 2,06 nmol C pro µmol C h⁻¹ im KIX I. Im KIX II stiegen die Fixierungsraten von 0,39 auf 2,33 nmol C pro µmol C h⁻¹ an (Abb. 3.4, B).

Die N₂-Fixierung und NO₃⁻-Aufnahme wurden unterschiedlich stark stimuliert. Letztere

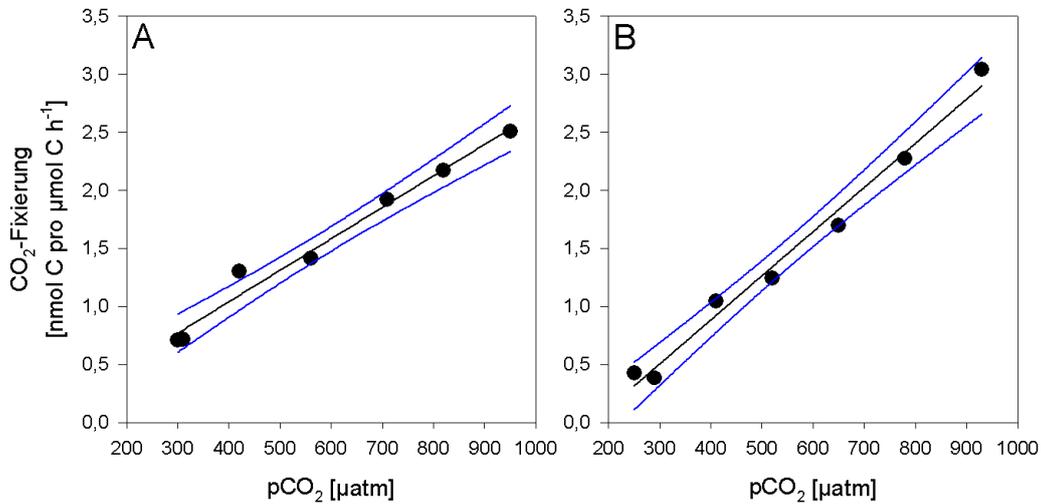


Abbildung 3.4. POC normierte CO₂-Fixierungsraten der > 3 µm Fraktion beider KIX Versuche. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. (A) KIX I. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,0429 + 0,0027 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$. (B) KIX II. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,6362 + 0,0038 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$.

3 Ergebnisse

verfünffachte sich zwischen 270 und 780 μatm von 8,4 auf 42,1 $\text{pmol N pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$ (Abb. 3.5, A). Die N_2 -Fixierung dagegen stieg im gleichen Bereich, von 2,3 auf 42,5 $\text{pmol N pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$ um das 18-fache an (Abb. 3.5, B). Die Raten der Nitrat Aufnahme und N_2 Fixierung lagen in der gleichen Größenordnung.

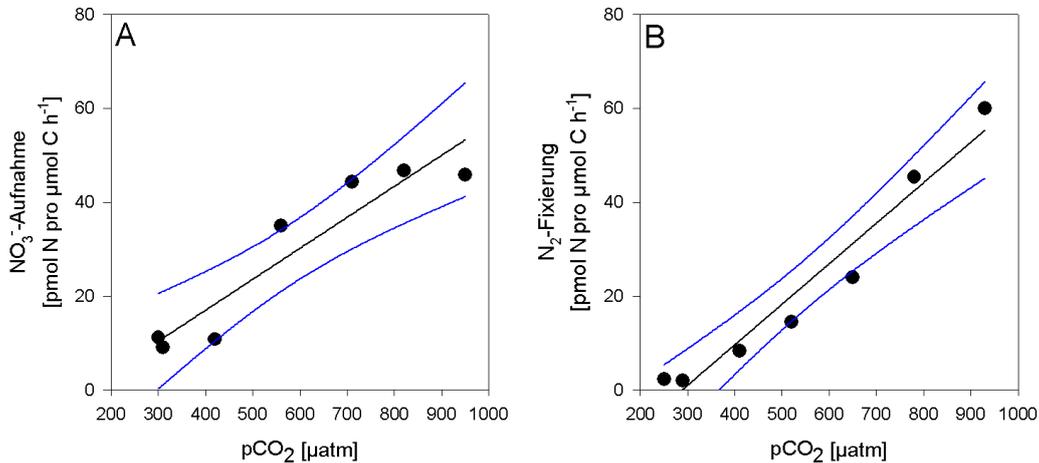


Abbildung 3.5. POC normierte N_2 -Fixierungsraten und $^{15}\text{NO}_3^-$ -Aufnahmeraten der $> 3 \mu\text{m}$ Fraktion des KIX. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. (A) NO_3^- -Aufnahmeraten. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,0429 + 0,0027 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$. (B) N_2 -Fixierungsraten. Die Regressionsgerade lautet: $f = -0,6362 + 0,0038 * x$, $R^2 = 0,98$, $P < 0,0001$.

KIX $< 3 \mu\text{m}$ In der $< 3 \mu\text{m}$ Fraktion der KIX Versuche konnte die Steigerung der Raten am besten mit einer logarithmischen Wachstumsfunktion beschrieben werden. In KIX I stiegen die Fixierungsraten zwischen 270 und 780 μatm im Mittel um das 2-fache an (von 0,53 auf 1,08 $\text{nmol C pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$, Abb. 3.6, A). Die Steigerung des KIX II war fast identisch; sie betrug das 2,2-fache. Die absoluten Werte besaßen nur $\frac{1}{3}$ der Höhe der KIX I Raten (Abb. 3.6, B).

Die Nitrat Aufnahmeraten der $< 3 \mu\text{m}$ Fraktion In der lagen zwischen 25 und 30 $\text{pmol pro } \mu\text{mol C h}^{-1}$ (Tab. 3.1). Einzig der 420 μatm Ansatz wies niedrigere Aufnahmeraten auf (13 $\text{pmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pro $\mu\text{mol C}$). Anders als in der $> 3 \mu\text{m}$ Fraktion, wurde die Nitrat Aufnahme nicht von pCO_2 beeinflusst ($P \gg 0,05$, lineare Regression).

Die $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der $< 3 \mu\text{m}$ Fraktion des KIX II, dienten als Messwert für die Aufnahme von angereicherten Stickstoffkomponenten, die von der $> 3 \mu\text{m}$ Fraktion abgegeben worden sind. Wie im Falle der NO_3^- -Aufnahme, konnte kein signifikanter Zusammenhang zum

3 Ergebnisse

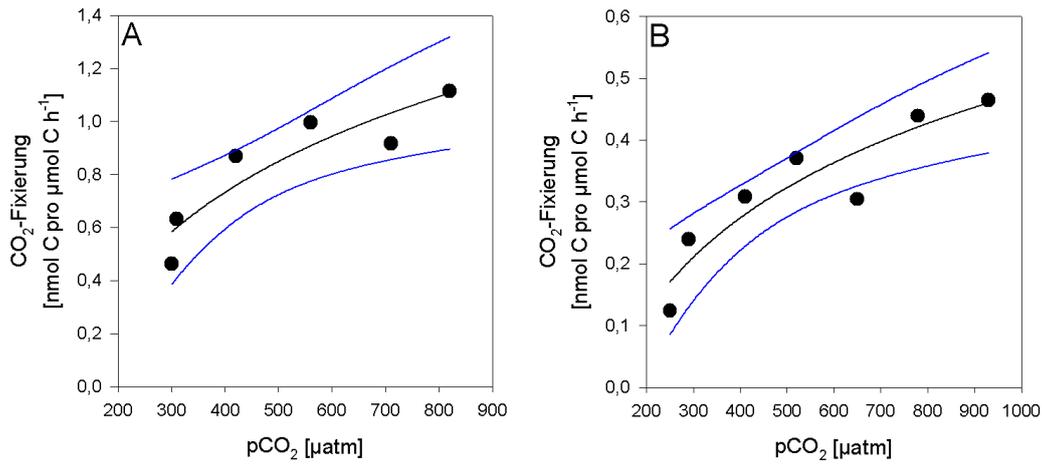


Abbildung 3.6. POC normierte CO₂-Fixierungsraten der < 3 µm Fraktion beider KIX Versuche. Die Regressionsgerade (schwarz) und die 95% Konfidenzintervalle (blau) werden gezeigt. Die Funktionen beschreiben den logarithmischen Anstieg (Logarithm, 2 Parameter I, Sigmaplot 10.0). (A) KIX I. Der Wert des 950 µatm Ansatzes fehlt, da er unterhalb des Messbereiches des Massenspektrometers. Die Regressionsgleichung lautet: $f = -2,3884 + 0,5210 * \ln(x)$, $R^2 = 0,83$, $P = 0,0111$. (B) KIX II. Die Regressionsgerade lautet: $f = -1,0445 + 0,2201 * \ln(x)$, $R^2 = 0,86$, $P = 0,0028$.

pCO₂ festgestellt werden. Die δ¹⁵N-Werte betragen im Mittel 5,34±1,83 ‰. Die höchste Anreicherung wurde im 930 µatm Ansatz gemessen (8,69 ‰), die niedrigste im 290 (4,08 ‰) (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1. POC normierte NO₃⁻-Aufnahmeraten aus KIX I und δ¹⁵N-Werte aus KIX II.

KIX I		KIX II	
pCO ₂ (µatm)	NO ₃ ⁻ -Aufnahmerate (pmol N pro µmol C h ⁻¹)	pCO ₂ (µatm)	δ ¹⁵ N Anreicherung (‰)
300	24,9	250	5,57
310	27,5	290	4,08
420	13,6	410	4,37
560	25,1	520	4,54
710	28,1	650	8,00
820	29,9	780	5,48
950	n.b.	930	8,69

3.3 Phosphat Aufnahme

Aufnahmeraten Die POC normierten Phosphataufnahmeraten waren nicht vom $p\text{CO}_2$ Abhängig ($P > 0,05$, lineare Regression). Die des LAX I lagen in allen Ansätzen unter denen des LAX II. Im Mittel betragen sie $0,115 \pm 0,033$ nmol P pro $\mu\text{mol C h}^{-1}$. Die mittlere Aufnahmerate des LAX II lag bei $0,157 \pm 0,027$ nmol P pro $\mu\text{mol C h}^{-1}$ (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2. POC normierte P-Aufnahmeraten beider LAX Versuche. Werte in Klammern sind Standardabweichungen zweier Messungen. * nur ein Messwert.

	LAX I	LAX II
$p\text{CO}_2$ (μatm)	P-Aufnahme (nmol P pro $\mu\text{mol C h}^{-1}$)	
270	0,147 (0,004)	0,177 (0,006)
280	0,123 (0,022)	0,146 (0,029)
380	0,132*	0,152 (0,001)
480	0,109 (0,014)	0,129 (0,004)
580	0,154 (0,009)	0,204 (0,046)
680	0,076 (0,006)	0,162 (0,004)
780	0,067 (0,011)	0,127 (0,018)
Mittelwert:	0,115 (0,033)	0,157 (0,027)

Turnover Der mittlere DIP Turnover der Planktongemeinschaft des LAX lag in $270 \mu\text{atm}$ bei 21,3 h und fiel auf 2,5 h im $780 \mu\text{atm}$ Ansatz ab (Abb. 3.7). Innerhalb dieser $p\text{CO}_2$ -Spanne wurde die DIP Umsatzzeit um den Faktor 9,4 beschleunigt.

3 Ergebnisse

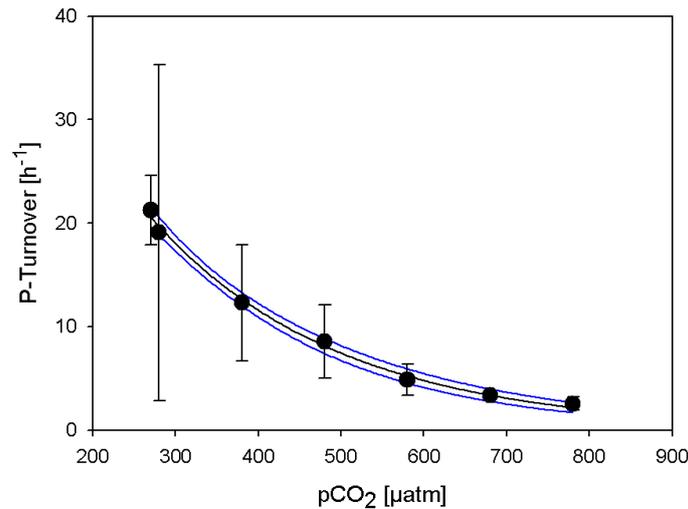


Abbildung 3.7. Mittlere DIP Turnoverzeiten beider LAX Versuche in Abhängigkeit des pCO₂. Die Funktion beschreibt die exponentielle Abnahme der Turnoverzeit (Exponential Decay, Single, 2 Parameters, Sigma Plot 10.0). Die Regressionsgleichung lautet: $f = 67,9879 * e^{-0,0044*x}$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,0001$.

3.4 Stöchiometrie

C/N/P Verhältnisse Die C/N Verhältnisse beider LAX Versuche zeigten keine große Variabilität im pCO₂ Gradienten. Im Mittel lagen sie bei $5,9 \pm 0,1$ (LAX I) und $7,0 \pm 0,2$ (LAX II). Innerhalb des Gradienten war ein leichter positiver Trend zu beobachten, der jedoch nicht signifikant war. In LAX II stiegen die Verhältnisse zwischen 270 und 680 µatm auch an, fielen aber im 780 µatm Ansatz wieder ab (Tab. 3.3).

Die N/P und C/P Verhältnisse stiegen innerhalb eines Versuchs proportional an. In LAX I betrugen die mittleren Verhältnisse ohne den 480 und 580 µatm Ansatz $92,9 \pm 2,3$ (C/P) und $15,8 \pm 0,4$ (N/P), wobei die Werte der 480 und 580 µatm Ansätze darüber lagen (103,1 und 101,5; sowie 17,3 in beiden Fällen)(Tab. 3.3). Es bestand kein signifikanter Zusammenhang mit dem pCO₂.

Die C/P und N/P Verhältnisse des LAX II lagen zwischen 270 bis 480 µatm im Mittel bei $88,2 \pm 4,0$ bzw. $12,6 \pm 0,6$ und stiegen auf $105,4 \pm 2,7$ bzw. $15,0 \pm 0,6$ (Tab. 3.3). Das Verhältnis von POC oder PON Zuwachs zu POP Zuwachs ($\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$, $\Delta\text{PON}/\Delta\text{POP}$) stieg im LAX II signifikant an. Im Mittel wurde in 780 µatm doppelt so viel PON wie POP gebildet, wie in 270 µatm (Abb. 3.8). Das $\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$ Verhältnis stieg in der gleichen pCO₂ Spanne um den Faktor 2,4 von (Abb. 3.8). Die $\Delta\text{POC}/\Delta\text{PON}$ Verhältnisse zeigten keine Korrelation mit dem pCO₂ (Daten nicht gezeigt).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3. C/N/P Verhältnisse am Ende der LAX Inkubation. Werte in Klammern sind Standardabweichungen.

pCO ₂ (µatm)	LAX I			LAX II		
	C/N	C/P	N/P	C/N	C/P	N/P
270	5,8	95,5	16,4	6,8	91,1	13,4
280	5,7	91,4	16,0	7,3	92,2	12,7
380	5,9	91,3	15,6	6,9	86,0	12,5
480	5,9	103,1	17,3	7,1	83,7	11,8
580	5,9	101,5	17,3	7,1	102,8	14,5
680	5,9	91,0	15,5	7,2	106,8	14,9
780	6,1	95,5	15,7	6,9	107,9	15,6

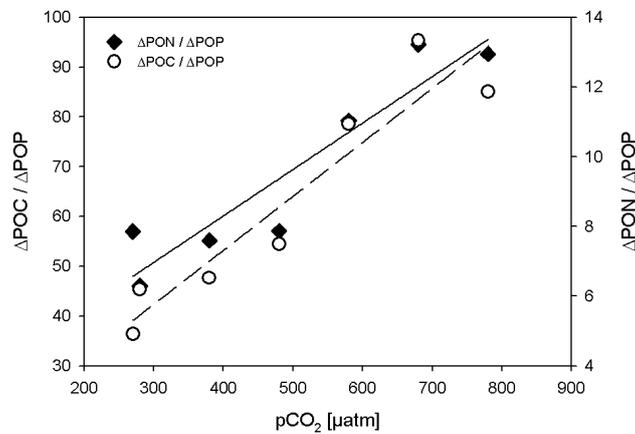


Abbildung 3.8. $\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$ und $\Delta\text{PON}/\Delta\text{POP}$ Verhältnisse des LAX II. (○, - -) $\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$. Die Regressionsgleichung lautet: $f = 9,8226 + 0,1085 * x$, $R^2 = 0,88$, $P = 0,0016$. (◆, -) Die Regressionsgleichung lautet: $f = 2,9720 + 0,0133 * x$, $R^2 = 0,87$, $P = 0,0020$.

C/N Fixierungsverhältnisse Die Verhältnisse der C/N Fixierungsraten der LAX Versuche fielen im Mittel von 248 im 270 µatm Ansatz auf 69 im 780 µatm Ansatz (Abb. ??, A). Dieser Trend ist schwach signifikant ($P = 0,0342$). Die C/NO₃ Fixierungsverhältnisse der > 3 µm Fraktion des KIX I zeigen dagegen keine signifikante Abhängigkeit vom pCO₂ (Abb. 3.9, B) ($P \gg 0,05$). Die niedrigsten Werte liegen bei ~2 (300 und 310 µatm), der höchste bei 6,4 (420 µatm). Die übrigen Werte schwanken zwischen 3 und 4 (560, 710, 820 µatm).

3 Ergebnisse

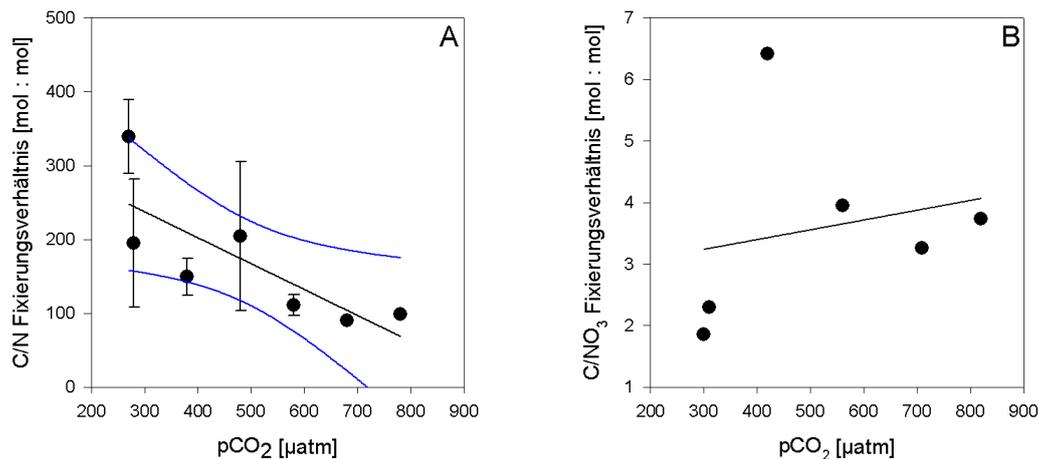


Abbildung 3.9. Gemittelte C/N Fixierungsverhältnisse beider LAX Versuche und C/NO₃ Fixierungsverhältnis der > 3 µm Fraktion des KIX I. (A) C/N Fixierungsverhältnisse. Die Regressionsgerade lautet: $f = 342,7170 - 0,3510 * x$, $R^2 = 0,63$, $P = 0,0342$. (B) C/NO₃ Fixierungsverhältnis. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zum pCO₂ ($P = 0,6865$). Der Wert des 910 µatm Ansatz fehlt, da er unterhalb der Messgrenze des Massenspektrometers lag.

3.5 DON/DOC Dynamik

Im CO₂ Gradienten des ersten Durchlaufs stieg die DON Konzentration in den letzten drei und im 280 µatm Ansatz an (Abb. 3.10, A). Von 580 bis 780 µatm stiegen die Konzentrationen leicht an. Der Zuwachs dort betrug $1,77 \pm 0,89$, $2,28 \pm 0,07$ und $3,30 \pm 1,08$ µM.

Im LAX II erhöhte sich die DON Konzentration in 280 und 380 µatm um $2,99 \pm 0,23$ µM, bzw. $1,39 \pm 0,28$ µM (Abb. 3.10, B). Die übrigen Anfangs- und Endwerte liegen innerhalb ihrer Standardabweichungen.

Die DOC Werte folgen grob dem Verlauf der DON Werte. Der größte Zuwachs in LAX I wurde ebenfalls im 780 µatm Ansatz gemessen ($+595,2 \pm 186,0$ µM) (Abb. 3.10, A). In den übrigen pCO₂ Ansätzen - Ausnahmen sind der 270 und 580 µatm Ansatz - schwankten die Konzentrationen am Ende der Inkubation um 600 µM. Der Zuwachs betrug im Mittel ca. 200 µM (Abb. 3.10, A).

In der zweiten Wiederholung wurden nur in 280 und 380 µatm eine deutliche Erhöhung der DON Konzentration gemessen ($+4,06 \pm 0,40$ und $+1,34 \pm 0,34$ µM). Eine Abnahme der DON Konzentration wurde in 580 und 780 µatm festgestellt. Dort sanken die Konzentrationen um $3,36 \pm 2,67$ und $5,52 \pm 1,27$ µM.

Die DOC Konzentrationen erfuhren in LAX II keine nennenswerten Veränderungen. Sie schwanken um 635 µM und nur im 780 µatm Ansatz konnte eine Abnahme festgestellt

3 Ergebnisse

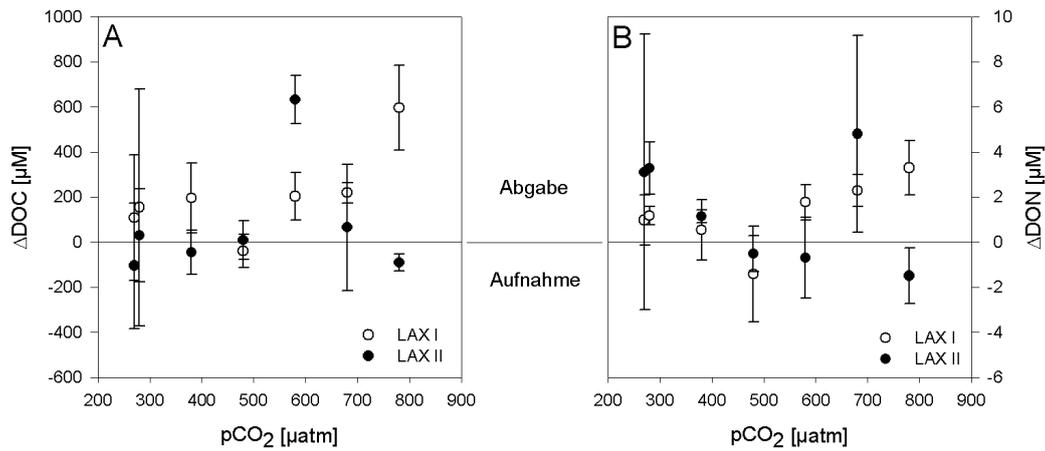


Abbildung 3.10. Differenzen Ende-Start der DOC und DON Konzentrationen beider LAX Versuche (○) LAX I, (●) LAX II. Werte oberhalb der Nulllinie stellen Abgabe, Werte unterhalb Aufnahme dar. (A) ΔDOC. (B) ΔDON.

werden. Sie betrug $-90,5 \pm 36,06 \mu\text{M}$ (Abb. 3.10, B).

3.6 Bakterielle Aktivität

Die Werte Leucinaufnahme (bakterielle Proteinproduktion, BPP) und der Thymidinaufnahme (Zellteilung) waren durch hohe Standardabweichungen gekennzeichnet. In beiden KIX-Versuchen veränderte sich weder die BPP noch die Zellteilung innerhalb des Gradienten (Abb. 5.1 im Anhang). Auch zeigten sie keine Korrelation mit anderen Messwerten (Daten nicht gezeigt). Auch die Messung der Enzymeffizienzen ergab keinen pCO₂-abhängigen Trend (Abb. 5.1 im Anhang) und korrelierten ebenfalls nicht mit anderen Parametern.

4 Diskussion

4.1 Fehlerbetrachtung

Während der Experimente kam es zu keinen Problemen, die die Aussagekraft der Daten eingeschränkt hätten. Während der Messung der Parameter kam es jedoch zu Unregelmäßigkeiten.

Die DON/DOC Konzentrationen wurden am Alfred Wegener Institut in Bremerhafen bestimmt. Trotz stoßsicherer Verpackung brachen einige Spitzen der Glasampullen ab, was laut Boris Koch (AWI) eine potenzielle Kontaminationsquelle darstellte. Trotz der Beschädigungen wurden alle Proben gemessen, aber die beschädigten Proben nicht gekennzeichnet. Die Aussagekraft ist somit für diese Parameter eingeschränkt.

Die Aggregation der Cyanobakterien erschwerte die mikroskopische Auszählung, was sich in den Ergebnissen widerspiegelt hat. Da sie bei der Dateninterpretation in keiner Weise hilfreich waren, wurden sie nicht mit in die Ergebnisse aufgenommen.

Des Weiteren kam es während der Messung der POC/PON Startwerte des LAX I zum Verlust der Reihenfolge, so dass Daten, die auf Berechnungen der POC/PON Differenz zwischen Start und Ende der Inkubation beruhen, nur mit den POC/PON-Werten aus LAX II errechnet wurden.

4.1.1 Der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen auf Fixierungsraten und Wachstum filamentöser Cyanobakterien

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den positiven Effekt erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die N₂- und CO₂-Fixierung, die auch in neueren Studien für *Trichodesmium* sp. nachgewiesen worden sind. Des Weiteren konnte eine Stimulierung der NO₃⁻-Aufnahme und eine Beschleunigung des PO₄³⁻-Umsatzes nachgewiesen werden. Picoplankton und heterotrophe Bakterien veränderten unter hohen pCO₂ die Aufnahmeraten von Nitrat und gelösten Stickstoff Verbindungen nicht. Ein direkter Einfluss erhöhter pCO₂ auf die Enzymaktivität und das Wachstum heterotropher Bakterien konnte nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Erhöhte N₂- und CO₂-Fixierungsraten konnten für eine typische Ostsee Cyanobakteriengemeinschaft nachgewiesen werden. Sie sind für *Trichodesmium* sp. bereits beschrieben worden (Levitan et al., 2007; Hutchins et al., 2007; Barcelos e Ramos et al., 2007; Kranz et al., 2009).

Die Ursache gesteigerter N₂-Fixierungsraten wurde von Levitan et al. (2007) in der Umverteilung der zellinternen Energie erklärt. Die Autoren vermuteten, dass die Energie für die Stickstoff-Fixierung (die Reduktion eines Mols N₂ zu NH₄⁺ erfordern 16 Mol ATP), aus Einsparungen bei anderen Stoffwechselprozessen stammt. Barcelos e Ramos et al. (2007) erweiterte diese Hypothese mit dem Vorschlag, dass der Energieüberschuss, der für die Stickstoff-Fixierung verwendet wird, aus Einsparungen bei der Synthese von Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismen stammt. Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismen mariner Algen (englisch für: Carbon Concentrating Mechanisms, im Folgenden als CCM abgekürzt) erhöhen die zellinterne DIC Konzentration und den pCO₂ in der Nähe des RUBISCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxigenase) Reaktionszentrums (Badger et al., 1998). Dies ist notwendig, da typische CO₂ Konzentrationen im Meerwasser zwischen 10 und 25 µmol kg⁻¹ (Riebesell, 2004) betragen, was deutlich unter den Halbsättigungskonstanten von RUBISCO fast aller Phytoplanktonarten liegt. Diese bewegen sich zwischen 20 und > 150 µmol kg⁻¹ (Badger et al., 1998).

Die niedrige Affinität der RUBISCO, die besonders in Cyanobakterien (K_m > 100 µmol kg⁻¹, Badger et al. (1998)) vorherrscht, wird durch die CCMs ausgeglichen. CCMs bestehen aus einer Vielzahl von Komponenten, deren Synthese und Funktion Energie verbraucht. Abbildung 4.1 gibt eine Übersicht über die am CO₂-Konzentrationsprozess beteiligten Bausteine in α- und β-Cyanobakterien. Die Einteilung in α- und β-Cyanobakterien beruht auf strukturellen Unterschieden der RUBISCO (Badger et al., 2002). Die hauptsächlich in Süß- und Brackwasser vorkommenden β-Cyanobakterien, zu denen auch *Nodularia spumigena* und *Trichodesmium erythraeum* gehören, besitzen jeweils ein DIC Transportsystem und ein CO₂ Aufnahmesystem mehr, als α-Cyanobakterien (Abb. 4.1).

CCMs bestehen aus drei Hauptkomponenten. Dazu gehören DIC Transporter, CO₂ Aufnahmesysteme und Carboxysomen. Die Versorgung der Zelle mit DIC übernehmen Transporter, die in der inneren Zellmembran oder in der Thylakoidmembran lokalisiert sind. Bisher lassen sich drei HCO₃⁻ Transporter, BCT1, SbtA, BicA und zwei CO₂ Aufnahmesysteme, NDH-1₃ und NDH-1₄, unterscheiden (Abb. 4.2). Sie übernehmen unterschiedliche Funktionen innerhalb des Kohlenstoff-Konzentrations-Vorganges.

4 Diskussion

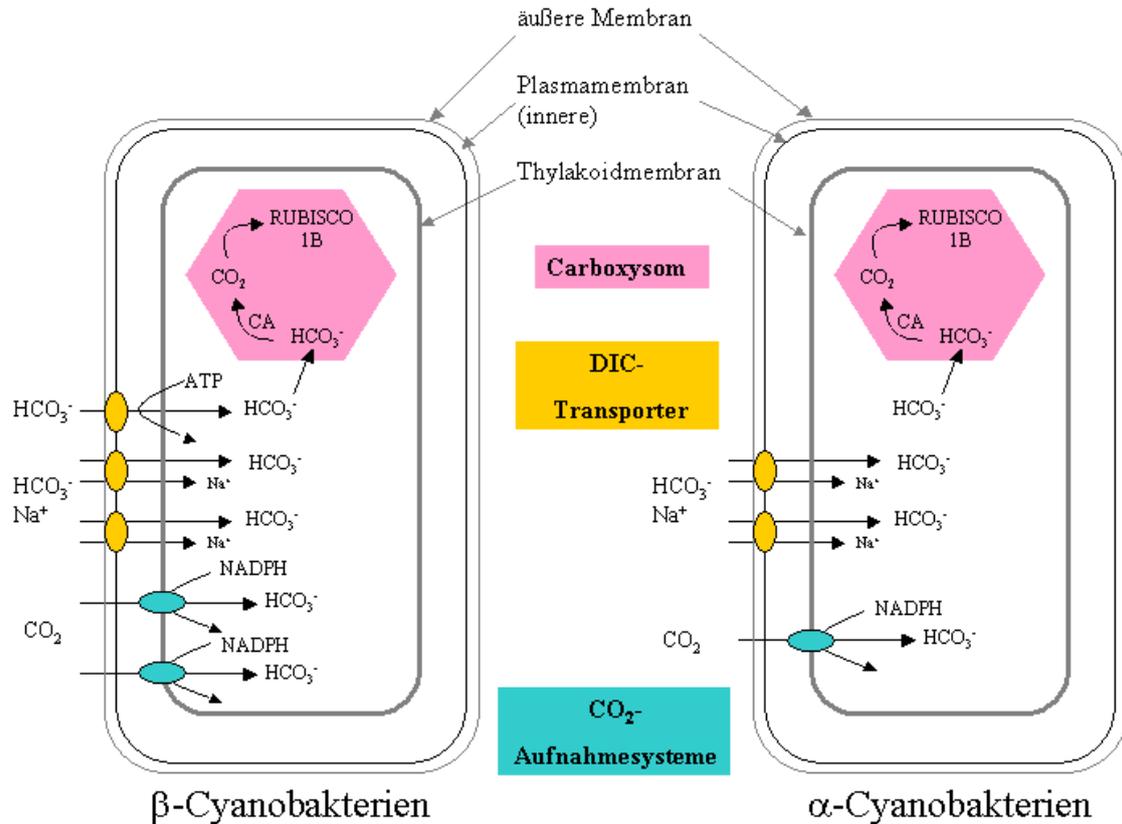


Abbildung 4.1. Schematische Übersicht über die Komponenten der CCM in α - und β -Cyanobakterien. Rosa: Carboxysomen; orange: DIC Transportsysteme; türkis: CO_2 Aufnahmesysteme; CA: Carboanhydrase. Verändert nach Price et al. (2008).

Bikarbonat und CO_2 gelangen durch die äußere Zellmembran in die Peptidoglykanschicht. CO_2 diffundiert weiter bis in das Zytosol, wo es vom NHD-1₃ und NDH-1₄ Aufnahmesystem unter Verbrauch von NADPH oder Ferredoxin zu HCO_3^- umgesetzt wird (Abb. 4.2). Die Umwandlung des CO_2 in HCO_3^- verhindert die Diffusion des CO_2 aus der Zelle heraus, da so die CO_2 -Konzentration unter der Gleichgewichtskonzentration des externen Mediums gehalten wird (Abb. 4.2).

Die geladenen HCO_3^- Moleküle werden von den Bikarbonattransportern über die innere Plasma Membran geschleust. Dies geschieht entweder unter ATP Verbrauch (BCT1) oder unter der Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten von Na^+ Ionen (StbA, BicA) (Abb. 4.2). Man vermutet, dass diese Transporter von einem energiebedürftigen Na^+/H^+ Antiport System abhängen (Badger et al., 2006). So werden HCO_3^- Anreicherungsfaktoren von bis zu 1000 im Vergleich zum umgebenden Medium erreicht (Price et al., 2008). Das im Zytosol gespeicherte HCO_3^- gelangt wahrscheinlich durch Diffusion in die Carboxysomen, wo der

4 Diskussion

Großteil der cyanobakteriellen RUBISCO lokalisiert ist (Price et al., 2008). Eine Carboanhydrase (CA) im inneren des Carboxysoms wandelt HCO_3^- zu CO_2 um, der einzigen Form des Kohlenstoffs, die RUBISCO als Substrat annimmt.

Erhöhte pCO_2 würden dieses hochkomplexe CCM System an vielen Stellen energetisch entlasten. Zum einen würden die Energiekosten für die Proteinsynthese mancher DIC Transport wegfallen, da die Diffusion von CO_2 in die Zelle steigen würde und somit weniger HCO_3^- aktiv in die Zelle geschleust werden müsste. Zum anderen würden die geringeren Transporterdichten zusätzlich die Energie einsparen, die für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion nötig wäre.

Zusätzlich zu der Aussage, dass die N_2 - und CO_2 -Fixierungsraten der Cyanobakteriengemeinschaft durch Erhöhung des pCO_2 stimuliert werden, zeigt der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Studien über *Trichodesmium* sp., dass die *N. spumige-*

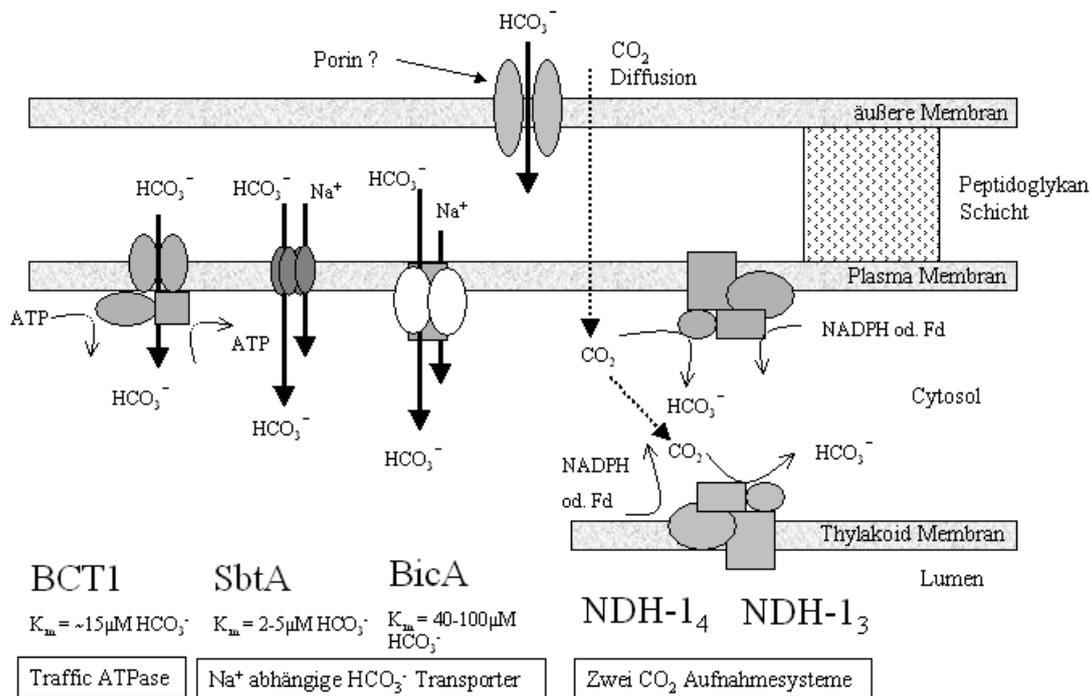


Abbildung 4.2. Schematische Darstellung der Funktion der bisher identifizierten DIC Transporter (BCT1, SbtA, BicA) und CO_2 -Aufnahmesysteme (NDH-1₃, NDH-1₄). Fd = reduziertem Ferredoxin. Erklärung siehe Text. Abgeändert nach Price et al. (2008).

4 Diskussion

na/Aphanizomenon Gemeinschaft stärker von der pCO₂ Erhöhung profitiert (Tab. 4.1). Die N₂ Fixierungsraten von *Trichodesmium* erhöhten sich um den Faktor 1,35 bis 3, die der *N. spumigena/Aphanizomenon* sp. Gemeinschaft um 4,2 (Tab. 4.1).

Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Brackwasserarten eine andere CCM Ausstattung besitzen als *Trichodesmium* und deshalb die Energieeinsparung für *N. spumigena* und *Aphanizomenon* sp. größer ist. So fehlt *T. erythraeum* das StbA Transport- und das Ndh-1₃ Aufnahmesystem (Tab. 4.2, Abb. 4.2 zur Orientierung). Diese Variation ist

Tabelle 4.1. Vergleich der relativen Steigerung der CO₂- und N₂- Fixierungsraten aus dem LAX Versuch mit den Raten aus Studien über *Trichodesmium* sp. Die Faktoren beziehen sich auf Chl *a* normierte Raten, um die Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu gewährleisten.

pCO ₂ Bereich (µatm)	Steigerungsfaktor		Spezies	Quelle
	N ₂ -Fix.	CO ₂ -Fix.		
380-850	3	-	<i>Trichodesmium</i>	(Barcelos e Ramos et al., 2007)
400-900	3	-	<i>Trichodesmium</i>	(Levitan et al., 2007)
380-750	1,35-2	1,3-1,4	<i>Trichodesmium</i>	(Hutchins et al., 2007)
150-1000	1,4	1,4	<i>Trichodesmium</i>	(Kranz et al., 2009)
270-780	4,2	1,6	<i>N. spumigena</i> und <i>Aphanizomenon</i> sp.	diese Arbeit

möglicherweise auf die unterschiedliche DIC Verfügbarkeit innerhalb der typischen Habitate dieser Spezies zurückzuführen (Badger et al., 2006). Ozeanische Habitate weisen höhere DIC Konzentrationen und geringere Schwankungen der Konzentrationen auf, als Süß- oder Brackwasserhabitate. Dies könnte in *Trichodesmium* zum Verlust des StbA Transportsystems und des Ndh-1₃ Aufnahmesystems geführt haben, da diese Energie verbrauchen, welche im stickstofflimitierten tropischen Ozean für die Stickstoff-Fixierung benötigt wird.

Zusätzlich zur unterschiedlichen CCM Ausstattung, könnte ein anderer Faktor bei *N.*

Tabelle 4.2. Ausstattung an DIC Transportern und CO₂ Aufnahmesystemen von *N. spumigena* und *T. erythraeum*. - = nicht vorhanden, + = vorhanden. Nach (Price et al., 2008).

Spezies	DIC Transporter				
	Bicarbonat			CO ₂	
	BCT1	SbtA	BicA	Ndh-1 ₄	Ndh-1 ₃
<i>Nodularia spumigena</i>	-	+	+	+	+
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	-	-	+	+	-

spumigena zur, im Vergleich mit *Trichodesmium* sp., stärkeren Stimulierung der Stickstoff-Fixierung beitragen. *N. spumigena* besitzt, im Gegensatz zu *Trichodesmium* sp. spezielle

4 Diskussion

Zellen, in denen die Enzyme für die Stickstoff Fixierung (Nitrogenase) lokalisiert sind, die sogenannten Heterozysten. Diese Zellen zeichnen sich durch eine verdickte Zellwand und das Fehlen des Photosystem II aus. Diese Differenzierungen dienen dem Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff, der das Enzym irreversibel schädigt (Haselkorn and Buikema, 1992). Da beide Arten die Stickstoff-Fixierung nicht zeitlich von der Photosynthese trennen, sind die Stickstoff fixierenden Zellen dem Sauerstoff, der bei der Photosynthese entsteht, ausgesetzt. Von *Trichodesmium* ist bekannt, dass die CO₂-Fixierung am Zeitpunkt optimaler N₂-Fixierung herunter reguliert wird (Berman-Frank et al., 2001; Wannicke et al., 2009), um so den O₂-Partialdruck in der Nähe der N₂ fixierenden Zellen gering zu halten, dahingegen nimmt *N. spumigena* keine solche Regulierung der Photosynthese vor (Wannicke et al., 2009). Die Stickstoff Aufnahme (N₂-Fixierung und NO₃⁻-Aufnahme) bei Cyanobakterien ist eng mit der CO₂-Fixierung gekoppelt (Haselkorn and Buikema, 1992; Flores et al., 2005). Eine Herabregulierung der CO₂-Fixierung in *Trichodesmium* könnten die N₂-Fixierungs beeinträchtigen und so teilweise die unterschiedliche starke Stimulation der CO₂- und N₂-Fixierungsraten erklären.

Da es bisher keine vergleichbaren Studien über Cyanobaktiengemeinschaften gibt, können nur die Raten der unbehandelten Ansätze mit bestehenden *in situ* Daten verglichen werden. Ohlendieck et al. (2000) maßen in zwei aufeinanderfolgenden Jahren N₂-Fixierungsraten zwischen 0,53 und 6,48 µmol N pro µg diazotrophen Chl *a*. Die Chl *a* normierten Raten dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt) lagen zwischen 0,077 und 0,113 µmol N pro µg Chl *a* und somit eine Größenordnung niedriger als die der natürlichen Planktongemeinschaft. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich gelöste N-Verbindungen im Wasser befanden (NO₃⁻, NH₄⁺). Die hohen CO₂- zu N₂-Fixierungsverhältnisse (mittlere Spanne im Gradienten zwischen 248 und 68, Abb. 3.9, A) sind ein Anzeichen dafür, dass die Cyanobakterien andere Stickstoff Komponenten (NH₄⁺, NO₃⁻, organische Stickstoffverbindungen) aufgenommen haben, um ihren Stickstoffbedarf zu decken (Sörensson and Sahlsten, 1987). Bestätigt wird die Annahme durch das CO₂ zu NO₃⁻ Fixierungsverhältnis der > 3 µm Fraktion des KIX I. Es lag zwischen ~2 und 6,4 (Abb. 3.9, B) und damit unterhalb des C/N Verhältnisses der Algen, welches im Durchschnitt 7,5 betrug.

Innerhalb der viertägigen Inkubation wurde im LAX I in höheren CO₂-Ansätzen mehr DIP aufgenommen als in niedrigen. Das bedeutet, dass die Phosphataufnahme durch erhöhte CO₂-Konzentrationen stimuliert wird. Da die POC normierten Phosphataufnahmeraten am Ende der Inkubation keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen zeigten, muss die verstärkte Aufnahme in den ersten Tagen der Inkubation stattgefunden haben, was aufgrund des Versuchsaufbaus aber nicht gezeigt werden konnte. Der DIP-

4 Diskussion

Umsatz beider LAX Versuche beschleunigte sich zwischen 270 und 780 μatm im Mittel um den Faktor 9,4. Die Steigerung der Fixierungsraten und Nährstoffaufnahme resultierten in erhöhten Wachstumsraten der Gemeinschaft. Die aus dem POC Zuwachs errechneten Wachstumsraten des LAX I stiegen von $0,05 \text{ d}^{-1}$ in 270 μatm um das knapp 3-fache auf $0,14 \text{ d}^{-1}$ in 780 μatm . Frühere Studien erzielten ähnliche Ergebnisse. Levitan et al. (2007) konnte eine 2-fache Erhöhung beobachten, während sie bei Barcelos e Ramos et al. (2007) um das 3-fache anstiegen. Geringere Anstiege wurden von Hutchins et al. (2007) beobachtet (Faktor 1,27-1,38). Kranz et al. (2009) fand keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumsraten zwischen verschiedenen pCO_2 .

Zusätzlich zur Beschleunigung der Wachstumsrate stieg auch das $\Delta\text{POC}/\Delta\text{POP}$ sowie das $\Delta\text{PON}/\Delta\text{POP}$ Verhältnis im CO_2 -Gradienten an. Das bedeutet, dass unter hohen CO_2 -Konzentrationen mehr Kohlenstoff pro Mol Phosphat in die Zelle eingebaut wird. Sollten sich die Ergebnisse des LAX I generalisieren lassen, wäre die Cyanobakteriengemeinschaft bei gleichbleibender Phosphatkonzentration in kürzerer Zeit in der Lage, die gleiche Biomasse zu bilden, wie unter heutigen CO_2 -Konzentrationen.

Die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in die der bestehenden Studien ist schwierig, da sich der Versuchsaufbau völlig von dem der anderen Studien unterscheidet. Levitan et al. (2007), Hutchins et al. (2007), Barcelos e Ramos et al. (2007) und Kranz et al. (2009) verwendeten *Trichodesmium* sp. aus dem Atlantik oder Pazifik als Untersuchungsobjekt und benutzten axenische Monokulturen, während hier nichtaxenische Co-Kulturen zweier Brackwasserarten untersucht worden sind. Es ist bekannt, dass natürliche Bakterienpopulationen das Wachstum der Diatomee *Thalassiosira rotula*, im Vergleich zu axenischen Kulturen, stimulieren (Grossart and Simon, 2007). Ähnliche Interaktionen wären auch zwischen Cyanobakterien und heterotrophen Bakterien möglich. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass in den nichtaxenischen Kulturen, zusätzliche zum CO_2 -Effekt, auch die interspezifischen Prozesse zu der Erhöhung der Fixierungsraten beigetragen haben könnten.

Die einzige Studie über *N. spumigena* (Czerny et al., 2009) beobachteten einen gegenteiligen Effekt auf die N_2 -Fixierungs- und die Wachstumsraten einzelner, in Suspension gehaltener *N. spumigena* Filamente. Sowohl die Wachstumsrate als auch die N_2 -Fixierungsrate verringerten sich in hohen CO_2 -Konzentrationen. Die Autoren führen dieses Ergebnis auf einen gestörten Stickstofftransport zwischen Heterozysten und vegetativen Zellen zurück. Der fixierte Stickstoff gelangt hauptsächlich durch Diffusion in den extrazellulären Raum zwischen Heterozysten und vegetativen Zellen. Von dort nehmen ihn die vegetativen Zellen aktiv oder passiv auf (in Czerny et al. (2009)). Bei *N. spumigena* werden die basische Aminosäure Arginin und die saure Glutaminsäure von den Heterozysten abgegeben. Die

Aufnahme der beiden Aminosäuren durch die vegetativen Zelle ist pH-abhängig, da nur die Transporter nur ungeladene Moleküle aufnehmen können. Infolgedessen muss Arginin in seiner deprotonierten und Glutaminsäure in seiner protonierten Form vorliegen, um aufgenommen werden zu können. Die Versauerung des Wassers durch den Anstieg der CO₂-Konzentration würde dazu führen, dass die Aufnahme der basischen Aminosäure Arginin erschwert wird und die Abgabe der Glutaminsäure ebenfalls negativ beeinflusst wird (Czerny et al., 2009). Insgesamt führt der niedrige pH-Wert zu einem Ungleichgewicht des Heterozystenmetabolismus und damit auch zur Störung der Stickstoffversorgung der vegetativen Zellen. Das Resultat sind sinkende N₂-Fixierungs- und Wachstumsraten, was die Entwicklung einer Cyanobakterienblüte verzögern könnte (Czerny et al., 2009). Aggregation der Cyanobakterien, wie sie in dieser Diplomarbeit zu beobachten war, könnte, durch die Bildung eines Mikroklimas (niedrige pH-Werte) inner- und außerhalb der Aggregate, die oben beschriebenen Effekte aufheben (Czerny et al., 2009). Die Steigerung der Fixierungs- und Wachstumsraten unterstützen diese Hypothese. Die Resultate von Czerny et al. (2009) müssen folglich bei der Betrachtung der Konsequenzen, die steigenden CO₂-Konzentrationen für die Ostsee haben könnten, berücksichtigt werden (s.h. Abschnitt 4.2.1).

Da diese Arbeit meines Wissens die einzige ist, die den CO₂-Effekt auf eine Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee untersucht hat, müssen Vergleiche mit zukünftigen Arbeiten zeigen, ob die hier beobachteten Effekte erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Fixierungsraten und das Wachstum generellen Charakter haben.

4.1.2 Einfluss auf die Stöchiometrie der Cyanobakteriengemeinschaft

Aus den C/N/P Verhältnissen lässt sich der Zustand einer Cyanobakterienblüte ablesen. Typische C/N Verhältnisse am Anfang einer Blüte betragen ~6, die mit Erreichen des Biomassemaximums auf 6,5 bis 7 ansteigen (Larsson et al., 2001; Walve and Larsson, 2007). Nach dem Zusammenbruch der Blüte sinken sie wieder auf Werte unter 6 ab. Auch die C/P und N/P Verhältnisse folgen einer solchen Optimumkurve, die den zellinternen Phosphatmangel widerspiegeln, der am Höhepunkt einer auftritt (Larsson et al., 2001; Walve and Larsson, 2007). Am Anfang der Blüte sind die C/P Verhältnisse < 100, die N/P Verhältnisse betragen < 20 (Walve and Larsson, 2007). Unter Phosphatlimitierung am Ende der Blüte erreichen die C/P Verhältnisse Werte > 400, die N/P Verhältnisse Werte > 50 (Walve and Larsson, 2007).

4 Diskussion

Die Stöchiometrie der Cyanobakteriengemeinschaft wurde durch die Erhöhung der CO₂-Partialdrücke in beiden LAX Versuchen unterschiedlich beeinflusst. Die C/N Verhältnisse blieben in beiden LAX Wiederholungen über den Gradienten hinweg sehr konstant (LAX I 5,9±0,1; LAX II 7,0±0,2), wohingegen die C/P und N/P Verhältnisse eine größere Variabilität aufweisen.

Stabile C/N Verhältnisse bei wurden *Trichodesmium* sp. beobachtet und auf eine proportionale Stimulierung von CO₂- und N₂-Fixierung zurückgeführt (Hutchins et al., 2007; Barcelos e Ramos et al., 2007; Kranz et al., 2009). Da im LAX der Hauptteil des Stickstoffbedarfs aus der NO₃⁻-Aufnahme und nicht aus der Stickstoff Fixierung gedeckt wurde (s.h oben), ist es notwendig, diesen Parameter zu Erklärung heranzuziehen und nicht die N₂-Fixierungsraten. Das Verhältnis von CO₂-Fixierung zu NO₃⁻-Aufnahme der totalen Fraktion aus KIX I zeigte keinen signifikanten Anstieg im CO₂ Gradienten, sondern blieb mehr oder weniger Konstant. Im Durchschnitt war das CO₂/NO₃⁻-Fixierungsverhältnis niedriger als das C/N Verhältnis, was auf die Abgabe von Stickstoffkomponenten durch die Cyanobakterien hindeutet (Erklärung s.h. Abschnitt 4.1.3). Nimmt man an, dass sich die Ergebnisse aus der Kurzzeitinkubation auch auf die Langzeitinkubation übertragen lassen, würde es die konstanten C/N Verhältnisse erklären.

Der Anstieg der C/P und N/P Verhältnisse des LAX II im 580 und 780 µatm Ansatz gegenüber den anderen Ansätze, könnte das beschleunigte Wachstum der Cyanobakteriengemeinschaft widerspiegeln. Die DIP Konzentration dieser beiden Ansätze liegt unter 0,1 µmol L⁻¹, typische Werte einer fortgeschrittenen Blüte, bei der auch die C/P und N/P Verhältnisse zu steigen beginnen(Larsson et al., 2001; Walve and Larsson, 2007). Im Widerspruch dazu stehen die erhöhten C/P und N/P Verhältnisse der 480 und 580 µatm Ansätze des LAX I, die höhere Werte aufwiesen als die der 680 und 780 µatm Ansätze. Eine mögliche, wenn auch sehr spekulative, Erklärung wäre, dass trotz der niedrigeren CO₂-Konzentrationen in diesen Flaschen die Entwicklung aufgrund von unbekanntem Faktoren schneller ablief als in den Flaschen höherer CO₂-Partialdrücke.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verhältnisse von ΔPOC/ΔPOP und ΔPON/ΔPOP des LAX II mit erhöhten CO₂ Konzentrationen anstiegen. Das bedeutet, dass unter hohen CO₂-Konzentrationen mehr Kohlenstoff pro Mol Phosphat in die Zelle eingebaut wird. Nimmt man an, dass das Wachstum diazotropher Cyanobakterien nicht durch Spurenelemente, wie z.B. Eisen (Fe), limitiert ist, so ist die Höhe ihrer Produktivität einzig vom Phosphatgehalt abhängig. Sollten sich die Ergebnisse des LAX I generalisieren lassen, wären sie in der Lage, bei gleichbleibender Phosphatkonzentration, unter erhöhten CO₂-Bedingungen mehr Biomasse zu bilden.

4.1.3 Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Picoplanktongemeinschaft

Nicht nur die Photosynthese filamentöser Cyanobakterien wird positiv von hohen CO₂-Konzentrationen beeinflusst, da auch in der < 3 µm Fraktion beider KIX Versuche die CO₂-Fixierungsraten anstiegen. Die Daten konnten am besten mit einer logarithmischen (natürlicher Logarithmus ln) Sättigungsfunktion beschrieben werden. Das deutet an, dass sich die CO₂-Konzentrationen der Sättigungskonzentration näherten, die unter den gegebenen Bedingungen für die maximale Photosyntheserate der Picoplanktonfraktion notwendig war. Bestätigt werden die Ergebnisse von Fu et al. (2007) und Fu et al. (2008), die für einzellige Cyanobakterien, wie z.B. *Synechococcus* oder *Crocospaera* die Stimulation der CO₂-Fixierungsraten unter erhöhten CO₂-Konzentrationen nachweisen konnte. *Synechococcus* war auch in dieser Arbeit in der < 3 µm Fraktion, zusammen mit unbestimmten Picoeukaryoten, präsent. Wie in Abschnitt 4.1.1 dargelegt, besitzen auch einzellige Cyanobakterien CCMs und profitieren somit von erhöhten CO₂-Bedingungen.

Die NO₃⁻-Aufnahme der < 3 µm Fraktion war nicht vom CO₂ Partialdruck abhängig. Dies steht im Gegensatz zur Stimulierung der NO₃⁻-Aufnahme in der > 3 µm Fraktion, da die CO₂- und NO₃⁻-Assimilation einzelliger und filamentöser Cyanobakterien nach den gleichen Prinzipien abläuft (Flores et al., 2005). Auch eukaryotische Algen nehmen nach ähnlichen Prinzipien NO₃⁻ auf (Fernandez and Galvan, 2007), so dass auch hier die gleichzeitige Stimulierung der CO₂-Fixierung und der NO₃⁻-Aufnahme zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte das im Wasser vorhandene NH₄⁺ liefern. Algen (Fernandez and Galvan, 2007), Cyanobakterien (Flores et al., 2005) und Bakterien Magasanik (1982) können sowohl NO₃⁻ als auch NH₄⁺ aufnehmen. Im Gegensatz zu NH₄⁺, muss NO₃⁻ reduziert werden, damit es in den zellinternen Stickstoffkreislauf eingehen kann. Diese Reduktion erfordert Energie, so dass bevorzugt NH₄⁺ aufgenommen wird. Wenn der Großteil des Stickstoffbedarfs über die NH₄⁺-Aufnahme gedeckt worden ist, so ist wahrscheinlich, dass die NH₄⁺-Aufnahmerate unter erhöhten CO₂-Konzentrationen anstieg, um den Stickstoffbedarf der Organismen zu decken. Die Ergebnisse der NO₃⁻-Aufnahmeraten könnten somit die untergeordnete Rolle von NO₃⁻ bei der Stickstoffversorgung der < 3 µm Fraktion widerspiegeln. Aufgrund fehlender Messungen der NH₄⁺-Aufnahmeraten bleibt dieser Erklärung rein spekulativ.

Ein Charakteristikum filamentöser Cyanobakterien ist die Fähigkeit, fixierten Stickstoff und Kohlenstoff in Form von organischen Verbindungen (DON: z.B. NH₄⁺, Aminosäuren. DOC: z.B. Aminosäuren, Polysaccharide) abzugeben (Gilbert and Bronk, 1994; Mulholland et al.,

4 Diskussion

2004; Wannicke et al., 2009). Diese organischen Nährstoffe werden von Picoplanktonorganismen aufgenommen. Zu diesen Nutznießern gehören heterotrophe Bakterien (Amon and Benner, 1996), die mit Phytoplankton um dieselben Verbindungen konkurrieren (Bronk et al., 2007). Über den „Microbial Loop“ gelangen die Nährstoffe in höhere trophische Ebenen, wo sie die Sekundärproduktion antreiben (Pomeroy et al., 2007).

Bis zu 50% des fixierten Stickstoffes können in die Picoplanktonfraktion gelangen (Garcia et al., 2007), jedoch betragen typische Werte ~10% (Ohlendieck et al., 2000, 2007; Garcia et al., 2007). Die Untersuchung der trophischen Weitergabe des fixierten Stickstoff (KIX II) in die < 3 µm Fraktion, ergab keinen Zusammenhang zwischen pCO₂ und Aufnahme der angereicherten Stickstoff-Exsudate der > 3 µm Fraktion.

Die Ergebnisse des Langzeit-Adaptations-Experiment zeigten gradientenunabhängige Schwankungen der DOC und DON Konzentration, deren Aussagekraft jedoch von den hohen Standardabweichungen der Messungen beeinträchtigt ist. Engel et al. (2004) untersuchten in Mesokosmen die DOC Dynamik einer *Emiliana huxleyi* Blüte und konnten ebenfalls keine Korrelation zwischen DOC Konzentration und CO₂-Partialdruck feststellen. Sie beobachteten eine hohe zeitliche Variabilität der Konzentrationen, welche sie auf eine enge Kopplung zwischen DOC Abgabe und Aufnahme zurückführten. Die in LAX I beobachtete DOC Akkumulation deutet an dass die Aktivität der heterotrophen Bakterien stark eingeschränkt war. Die negativen bakteriellen Wachstumsraten unterstützen diese Hypothese. Auch Engel et al. (2004) führte Akkumulation von DOC in einigen Mesokosmen auf die Limitation der heterotrophen Bakterienaktivität zurück.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass auf kurzen Zeitskalen (4h) kein messbarer CO₂ Effekt in der Gemeinschaft der heterotrophen Bakterien auftritt. Weder die Effizienz der untersuchten Exoenzyme, noch die bakterielle Proteinproduktion (BPP; Leucinaufnahme) oder die Zellteilung (Thymidinaufnahme) änderten sich in Abhängigkeit der CO₂ Partialdrucks. In Bezug auf die Exoenzyme besteht die Möglichkeit einer pH- und somit auch pCO₂-abhängigen Veränderung der Effizienz, da jedes Enzym ein charakteristisches und eng begrenztes pH-Optimum besitzt. Liegt der pH-Wert der Reaktion außerhalb dieses pH-Optimums, so verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit. Der Grund dafür liegt in einer pH-bedingten Veränderung der Raumstruktur des Enzyms und in der pH-bedingten Veränderung der elektrischen Ladung der Seitengruppen der Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms. Der pH-Wert kann in der Nähe eines Phytoplanktonaggregats in Abhängigkeit der Lichtintensität (160µmol Photonen m² s⁻¹, Dunkelheit) in 30 Minuten um bis zu 1,5 Einheiten schwanken (Ploug, 2008). Diese pH-Schwankung übersteigt den pH-Gradienten der KIX Versuche um mehr als das 3-fache. Da die Methode die mittlere Aktivität aller

vorhandenen Exoenzyme einer Klasse (hier: Leucinaminopeptidase, β -Glucosidase, Phosphatase) misst, deuten die Ergebnisse an, dass die „Enzympopulation“ im Mittel an solche Schwankungen anpasst ist und eine Erhöhung der CO_2 Konzentration keinen Einfluss auf ihr Funktion nehmen wird. Bestätigt wird diese Annahme durch Arbeiten von Grossart et al. (2006) und Allgaier et al. (2008). Auch sie konnten keinen direkten CO_2 Effekt auf die bakterielle Enzymaktivität messen. Auch die bakterielle Proteinproduktion und die Zellteilung waren nicht direkt von der CO_2 Konzentration abhängig, was ebenfalls den Ergebnissen von Grossart et al. (2006); Allgaier et al. (2008) bestätigt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Erhöhung der CO_2 -Konzentrationen starken Einfluss auf die Fixierungsraten einer ostseesytischen Cyanobakteriengemeinschaft ausgewirkt hat. Die N_2 -Fixierungs- und NO_3^- -Aufnahmeraten, sowie die CO_2 -Fixierungsrate der filamentösen Cyanobakterien stiegen unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen signifikant an. Die Ergebnisse deuten zudem an, dass sich die Phosphat-Umsatzzeit unter zukünftigen CO_2 -Partialdrücken stark beschleunigen wird und die Phosphatnutzung effektiver wird. Im Gegensatz zu den filamentösen Cyanobakterien scheinen die Prozesse in der Picoplanktonfraktion nicht stark von der CO_2 -Konzentration abhängig zu sein. Im Folgenden werden die Ergebnisse in Zusammenhang mit dem Klimawandel der Ostsee gebracht.

4.2 Schlussbetrachtung

4.2.1 Bedeutung für die Ostsee

In diesem Abschnitt werden die Laborergebnisse auf das Ökosystem der Ostsee übertragen und eine Mögliche zukünftige Entwicklung diskutiert. Die Aussagekraft des Gedankenexperiments unterliegt starken Einschränkungen, da die Ergebnisse der Experimente und des BALTEX Projektes, das den Klimawandel in der Ostsee untersuchte, starke Unsicherheiten aufweisen. Diese Unsicherheiten resultieren aus dem mangelnden Verständnis der Interaktionen zwischen den physikalisch-chemischen und biologischen Komponenten eines Ökosystems. Der folgende Abschnitt ist deshalb rein spekulativ.

Der CO_2 -Partialdruck der Ostsee weist eine hohe Variabilität im Jahresgang auf. Im Winter stehen die CO_2 -Konzentrationen der Wassersäule mit den atmosphärischen im Gleichgewicht oder sind leicht erhöht (Übersättigung), da die Durchmischung des Wasserkörpers durch den Wellengang gewährleistet und biologische Aktivität minimal ist. Niedrige Temperaturen und Einstrahlungsintensitäten limitieren die biologische Prozesse (CO_2 -Fixierung,

4 Diskussion

Remineralisierung), die den CO_2 -Partialdruck beeinflussen. Der Partialdruck im Golf von Finnland und dem Gotlandbecken kann aufgrund der Übersättigung zwischen 100-150 μatm über dem der Atmosphäre liegen. Das entspricht einer Übersättigung von 30%. Im Frühjahr heben steigenden Einstrahlungsintensitäten die Lichtlimitierung des Phytoplanktons auf und erhöhen die Wassertemperatur. Die steigende photosynthetische Aktivität dieser Organismen und die Erwärmung des Wasserkörpers senkt den CO_2 -Partialdruck. Der CO_2 Partialdruck fällt bis Mai, im Gotlandbecken und im Golf von Finnland, um 300–350 μatm auf ~150 μatm ab (Schneider et al., 2006). Dies entspricht ~60% des Ausgangswertes. Im Juli steigt er leicht auf etwa 200 μatm an. Tritt eine Cyanobakterienblüte auf, so wird der CO_2 -Partialdruck nochmals um einige 10 μatm erniedrigt (es können Werte von 100 μatm auftreten (Schneider et al., 2006). Ab September beginnt der CO_2 -Partialdruck aufgrund fallender Wassertemperatur und verringerter Photosynthese wieder an zu steigen, bis ein Gleichgewicht mit der Atmosphäre erreicht ist.

Die Höhe des im Sommer vorherrschenden CO_2 -Partialdrucks im Wasser ist stark von der Kohlenstoff-Fixierung der Frühjahrsblüte abhängig. Wie oben dargestellt fällt der CO_2 -Partialdruck aufgrund der Kohlenstoff-Fixierung der Frühjahrsblüte auf 60% seines Ausgangswertes. Studien, die den Effekt erhöhter CO_2 -Konzentrationen auf die Photosynthese natürlicher Phytoplanktongemeinschaften untersucht haben, konnten in manchen Fällen (Riebesell et al., 2007; Tortell et al., 2000; Kim et al., 2006; Rose et al., 2009) eine Steigerung der Kohlenstoff-Fixierung um ~40% beobachten. In andere Studien änderte sich die Kohlenstoff-Aufnahme durch das Phytoplankton nicht (Egge et al., 2007; Tortell et al., 2002). Dies zeigt, dass neben der CO_2 -Konzentration andere Faktoren den tatsächlichen Effekt auf die Steigerung der netto Kohlenstoffaufnahme einer Phytoplanktongemeinschaft bestimmen. Ein solcher Faktor ist die Zusammensetzung der Phytoplanktongemeinschaft. Rost et al. (2003) untersuchten die Effizienz und die Fähigkeit zur Regulation der Kohlenstoffaufnahme blütenformender Phytoplanktonarten in Relation zur CO_2 -Verfügbarkeit. Die untersuchten Organismen waren Vertreter drei wichtiger mariner Phytoplanktongruppen: Diatomeen (*Skeletonema costatum*), Flagellaten (*Phaeocystis globosa*) und Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*). *S. costatum* zeigte ein hocheffizientes und regulierbares Kohlenstoffaufnahmesystem, während es bei *P. globosa* hoch effizient aber nicht regulierbar war. Das Kohlenstoffaufnahmesystem von *E. huxleyi* war ineffizient und nicht regulierbar. Die Autoren schlossen daraus, dass die Erhöhung der CO_2 -Konzentration zu Veränderungen in der Phytoplanktonsukzession und -Verteilung führen könnte. Ob und in welcher Höhe der zukünftige CO_2 -Partialdruck durch die Frühjahrsblüte gesenkt wird, hängt also davon ab, welche Spezies die dominante

ist.

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration allein könnte somit die Zusammensetzung der Phytoplanktongemeinschaft ändern. Ein weiterer regulierender Faktor ist die Temperatur. Die Autoren des „Assessment of Climate Change for the Baltic Sea Basin“ (Graham et al., 2008) gehen für die Ostsee von einer durchschnittlichen Temperaturerhöhung um 3-5°C aus. Mildere Winter hätten Einfluss auf die Spezieskomposition der Frühjahrsblüte. Diatomeen würden ihre Dominanz verlieren und durch Dinoflagellaten ersetzt werden (Dippner et al., 2008). Rose et al. (2009) untersuchten die nordatlantische Frühjahrsblüte und konnten eine Zunahme der Biomasse um ~40% unter Treibhausbedingungen (16°C, 690 µatm) beobachten. Nimmt man für dieses Gedankenexperiment an, dass sich die Ergebnisse dieser Studie auf die Ostsee übertragen lassen, kann ein Jahresgang des CO₂-Partialdrucks des Jahr 2100 simuliert werden. In der Betrachtung wird angenommen, dass die Nährstoffverfügbarkeit nicht beeinflusst wird. Veränderungen der hydrographischen Bedingungen, die die Nährstoffverfügbarkeit der euphotischen Zone verschlechtern würden, werden auch für die Ostsee angenommen (Graham et al. (2008)). Andere Faktoren, wie z.B. erhöhte Niederschläge und der damit verbundenen erhöhte Flusseintrag, könnten diesen Effekt ausgleichen. Da der absolute Effekt aber noch nicht quantifiziert werden kann, wird er in der folgenden Betrachtung nicht berücksichtigt. Als Beispiel soll der Golf von Finnland dienen. Die Daten sind Schneider et al. (2006) (S. 241, Abb. 2 Western Gulf of Finland) entnommen worden. Der CO₂-Partialdruck wird durch die Temperaturerhöhung und die CO₂-Assimilation des Phytoplanktons um ~60% verringert. Für die Regionen des westlichen Golf von Finnland würde es ein Abfall von ~975 µatm (750 µatm atmosphärische CO₂-Konzentration + 30% Übersättigung. s.h. oben) auf 590 µatm bedeuten. Da die Primärproduktion der Frühjahrsblüte aber um ~40% erhöht ist, würde es zu einer weiteren Senkung des pCO₂ von 590 auf ~420 µatm kommen. Cyanobakterienblüten wären diesem CO₂-Partialdruck und nicht dem atmosphärischen ausgesetzt (Abb. 4.3). Laut den Ergebnissen dieser Arbeit würde sich die Stickstoff Fixierung unter diesen Bedingungen fast verdreifachen (2,8-fache Steigerung). Aufgrund der verringerten P-Umsatzzeiten (Verdopplung unter 420µatm) würde die Entwicklungszeit einer Blüte beschleunigt. Der erhöhte Stickstoffeintrag und die Beschleunigung der Blüte beeinflusst auch die Zusammensetzung und Produktivität der Picoplanktonorganismen. So profitiert z.B. *Synechococcus* sp. von den organischen Nährstoffausscheidungen in Cyanobakterienblüten (Ohlendieck et al., 2000). Sollte die DON Abgabe der Cyanobakterien im Zuge des Klimawandels steigen, was in der vorliegenden Arbeit nicht bewiesen werden konnte, so wird es strukturelle Veränderungen in der Gemeinschaft des “Microbial Loop“ geben, die denen der Phytoplanktongemeinschaft ähnlich sind (Allgaier et al., 2008).

4 Diskussion

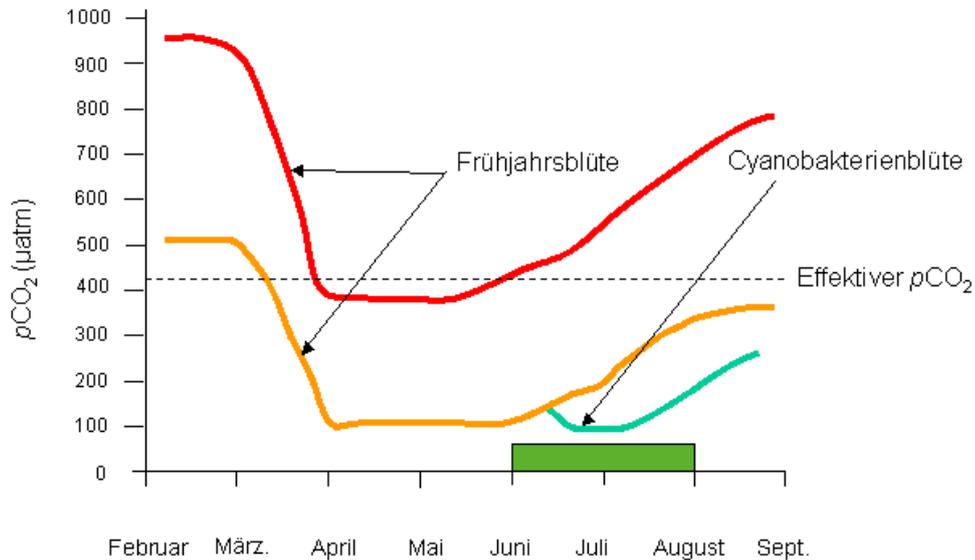


Abbildung 4.3. Vergleich der CO_2 -Jahresgänge im Golf von Finnland unter heutigen atmosphärischen CO_2 -Konzentrationen (orange) und unter für das Jahr 2100 vorhergesagten (rot). Das grüne Rechteck stellt die Zeitspanne dar, in der typischerweise Cyanobakterienblüten in der Ostsee auftreten. Erklärung siehe Text.

Ob sich der erhöhte Eintrag des fixierten Stickstoffs auch auf das DIN/DIP Verhältnis der Ostsee auswirken könnte, ist ungewiss, da die Nährstoffkonzentrationen in der Ostsee von mehreren Faktoren (z.B. Wassertemperatur, Höhe der Flusseinträge, Denitrifizierungsraten, Höhe der Exportproduktion) bestimmt wird, die in einem komplexen Zusammenhang miteinander stehen und deren Veränderungen aufgrund des Klimawandel noch nicht absehbar sind.

Die Ergebnisse von Czerny et al. (2009) (Abschnitt 4.1.1) würden eine andere Entwicklung bedingen. Die verzögerte Entwicklung von Cyanobakterienblüte oder die Verdrängung durch andere, nicht Stickstoff fixierenden Spezies, könnten die Folge sein. Damit würde sich der Stickstoffeintrag der Cyanobakterien, der heutzutage ~50% des Gesamteintrages ausmacht (HELCOM, 2009), stark verringern. Mögliche Folgen wären erhöhte DIN/DIP Verhältnisse, die das Wachstum anderer Phytoplanktongruppen favorisieren würden. Gleichzeitig würde

die Menge an verfügbarem Stickstoff sinken, was die jährliche Primärproduktion der Ostsee senken würde.

Nicht nur anthropogene Einflüsse auf das Ökosystem haben das Potential, die CO_2 -Konzentration im Wasser zu erhöhen. Ein natürlicher Prozess ist der Auftrieb von Tiefenwasser. Auftriebswasser kommt aus Tiefen unterhalb der durchmischten Schicht und ist gegenüber dem Oberflächenwasser mit CO_2 angereichert, da Remineralisierungsprozesse unterhalb der euphotischen Zone das fixierte CO_2 wieder in gasförmiges CO_2 umwandeln und so die DIC Konzentrationen erhöhen. In der Ostsee können die CO_2 -Partialdrücke im Tiefenwasser zwischen ~ 380 und $500 \mu\text{atm}$ liegen (Schneider et al., 2002). Weiter Charakteristika dieses Wassers sind die erhöhten Nährstoffkonzentrationen und die niedrige Temperatur, wobei für die Ostsee meist nur die Phosphatkonzentration erhöht ist (Vahtera et al., 2005; Nausch et al., 2009), da Nitrat durch Denitrifizierung aus dem Tiefenwasser entfernt wird. Der Phosphatbeitrag und die Erhöhung der CO_2 -Konzentration könnten besonders Cyanobakterien zu Gute kommen, da sie nicht auf gelöste anorganische Stickstoffverbindungen angewiesen sind. Untersuchungen zeigten jedoch, dass Cyanobakterien erst nach mehreren Tagen vom Auftrieb profitieren (Vahtera et al., 2005; Nausch et al., 2009), weil das Ereignis ungünstige Bedingungen für diese Organismen schafft (Temperatursenkung, Durchmischung des Wasserkörpers). Nach fünf Tagen wurde eine leichte Erhöhung der Primärproduktion in der Auftriebszone festgestellt. Dieser Zeitraum ist lang genug, um den CO_2 Partialdruck auf atmosphärisches Niveau zu bringen. Somit ist die Erhöhung der CO_2 -Konzentration durch Auftriebsereignisse wahrscheinlich minimal und die Steigerung der Primärproduktion hauptsächlich auf die gesteigerte Phosphatverfügbarkeit zurückzuführen.

4.2.2 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den Effekt, den die zukünftige Erhöhung der atmosphärischen CO_2 -Konzentration auf die N_2 -Fixierungsraten einer typischen Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee haben könnte, zu quantifizieren. Zusätzlich wurde die Weitergabe des fixierten molekularen Stickstoffes im mikrobiellen Nahrungsnetz untersucht.

Die Untersuchung basierte auf zwei Laborexperimenten, in denen die Aufnahme von N_2 , NO_3^- , CO_2 und PO_4^- mit Hilfe stabiler und radioaktiver Isotope gemessen wurden. Die POC normierten N_2 - und die CO_2 -Fixierungsraten der filamentösen Cyanobakterien wurden durch die Erhöhung der CO_2 -Konzentration von 270 auf $780 \mu\text{atm}$ um das 7,2 bzw. 1,9-fache gesteigert. Auch die Phosphat-Umsatzzeit fiel unter hohen CO_2 -Konzentrationen ab, so dass

4 Diskussion

es, zwischen 270 und 780 μatm , im Mittel zu einer 9,4-fachen Beschleunigung kam.

Im Gegensatz zu den Fixierungsraten, konnte kein CO_2 -Effekt auf die Abgabe gelöster organischer N- und C-Verbindungen beobachtet werden.

Die Picoplanktonfraktion blieb von der Erhöhung der CO_2 Konzentration im Wesentlichen unberührt. So wurde zwar die Aufnahme organischer Stickstoffverbindungen durch Picoplankter ($< 3 \mu\text{m}$) mit der Steigerung der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte nachgewiesen, sie war jedoch nicht an den CO_2 -Partialdruck gekoppelt. Einzig die CO_2 -Fixierung der $< 3 \mu\text{m}$ Fraktion zeigte eine positive Korrelation zum CO_2 -Partialdruck und verdoppelte sich unter den gegebenen Bedingungen.

Innerhalb der Picoplanktonfraktion wurden die hydrolytischen Enzymaktivitäten drei wichtiger Exoenzyme gemessen, sowie die bakterielle Protein Produktion und die Zellteilung. Alle Parameter zeigten keine Reaktion auf die Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks.

Um die Auswirkung erhöhter CO_2 -Konzentrationen besser einschätzen zu können, sind neben weiteren Laborversuchen insbesondere *in situ* Studien notwendig, die Reaktionsbreite der Phytoplanktongemeinschaft besser erfassen können, als Laborversuche es vermögen.

Literaturverzeichnis

- Allgaier, M., Riebesell, U., Vogt, M., Thyrraug, R., and Grossart, H.-P. (2008). Coupling of heterotrophic bacteria to phytoplankton bloom development at different pCO₂ levels: a mesocosm study. *Biogeosciences*, 5:1007–1022.
- Ammermann, J. W. (1993). Microbial cycling of inorganic and organic phosphorus in the water column. In Kemp, P., Sherr, B., and Cole, J. J., editors, *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, pages 649–660. Lewis Publishers.
- Amon, R. M. W. and Benner, R. (1996). Bacterial Utilization of Different Size Classes of Dissolved Organic Matter. *Limnology and Oceanography*, 41(1):41–51.
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W., and Price, G. D. (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany*, 76(6):1052–1071.
- Badger, M. R., Hanson, D. T., and Price, G. D. (2002). Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology*, 29:161–173.
- Badger, M. R., Price, G. D., Long, B. M., and Woodger, F. J. (2006). The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 57(2):249–265.
- Barcelos e Ramos, J., Biswas, H., Schulz, K., La Roche, J., and U., R. (2007). Effect of rising atmospheric carbon dioxide on the marine nitrogen fixer *Trichodesmium*. *Global Biogeochemical Cycles*, 21.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Chen, Y., Küpper, H., Kolber, Z., Bergman, B., and Falkowski, P. (2001). Segregation of Nitrogen Fixation and Oxygenic Photosynthesis in the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science*, 294:1534.

- Berner, R. A. (1990). Atmospheric carbon dioxide levels over phanerozoic time. *Science*, 249(4975):1382–1386.
- Boer, G., Stouffer, R., Dix, M., Noda, A., Senior, C., Raper, S., and Yap, K. (2001). *Climate Change 2001: The Scientific Basis (Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the IPCC)*, chapter Projections of Future Climate Change, page 881. Cambridge University Press, New York.
- Bronk, D. A., See, J. H., Bradley, P., and Killberg, L. (2007). DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences*, 4:283–296.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergamn, B., and Carpenter, E. J. (1997). *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, 23:1221–1229.
- Coplen, T. B., Hoppole, J. A., Böhlke, J. K., Peiser, H. S., Rieder, S. E., Krouse, H. R., Rosman, K. J. R., Ding, T., Vocke Jr., R. D., Révész, K. M., Lamerty, A., Tylor, P., and De Brièvre, P. (2002). Compilation of Minimum and Maximum Isotope Ratios of Selected Elements in Naturally Occurring Terrestrial Materials and Reagents. Water–Resources Investigations Report 01–4222, U.S. Department of the Interior, U. S. Geological Survey.
- Craig, H. (1957). Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass–spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12:133–149.
- Czerny, J., Barcelos e Ramos, J., and Riebesell, U. (2009). Influence of elevated CO₂ concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences*, 6(9):1865–1875.
- De Senerpont Domis, L. N., Mooi, W. M. j., and Huisman, J. (2007). Climate-induced shifts in an experimental phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hydrobiologia*, 584:403–413.
- Dickson, A. G. (1981). An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data. *Deep Sea Research*, 28A(6):609–623.
- Dippner, W. J., Vuorinen, I., Daunys, D., Flinkman, J., Halkka, A., Köster, F. W., Lehikoinen, E., MacKenzie, B. R., Mägilman, C., Mohlenberg, F., Olenin, S., Schiedek, D., Skov, H.,

- and Wasmund, N. (2008). *Assessment of Climate Change for the Baltic Sea Basin*, chapter Climate-related Marine Ecosystem Change, pages 379–473. Springer Berlin Heidelberg.
- Dugdale, R. C. and Wilkerson, F. P. (1986). The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations. *Limnology and Oceanography*, 31(4):673–689.
- Edler, L. (1979). Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. *Baltic Marine Biology*, 5:1–38.
- EGGE, J. K., THINGSTAD, T. F., ENGEL, A., BERLLERBY, R. G. J., and RIEBESELL, U. (2007). Primary production during nutrient-induced blooms at elevated CO_2 concentrations. *Biogeosciences Discussions*, 4:4385–4410.
- ENGEL, A., DELILLE, B., JACQUET, S., RIEBESELL, U., ROCHELLE-NEWALL, E., TERBRÜGGEN, A., and ZONDERVAN, I. (2004). Transparent exopolymer particles and dissolved organic carbon production by *Emiliania huxleyi* exposed to different CO_2 concentrations: a mesocosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology*, 34:93–104.
- FABRY, V. J. (2008). Marine Calcifiers in a High- CO_2 Ocean. *Scienceexpress*.
- FABRY, V. J., SEIBEL, B. A., FEELY, R. A., and ORR, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65:414–432.
- FERNANDEZ, E. and GALVAN, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, Advance Access:1–9.
- FLORES, E., FRÍAS, J. E., RUBIO, L. M., and HERRERO, A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83:117–133.
- FORSTER, P., RAMASWAMY, V., ARTAXO, P., BERNTSEN, T., BETTS, R., FAHEY, D. W., HAYWOOD, J., LEAN, J., LOEW, D. C., MYHRE, G., NGANGA, J., PRINN, R., RAGA, G., SCHULZ, M., and VAN DORLAND, R. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, chapter Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- FU, F.-X., MULHOLLAND, M. R., GARCIA, N. S., BECK, A., BERNHARDT, P. W., WARNER, M. E., SANUDO-WILHELMY, S. A., and HUTCHINS, D. A. (2008). Interactions between changing

- pCO₂, N₂ fixation, and Fe limitation in the marine unicellular cyanobacterium *Crocosphaera*. *Limnology and Oceanography*, 53(6):2472–2484.
- Fu, F.-X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y., and Hutchins, D. A. (2007). Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 43:485–496.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1982). Thymidine Incorporation as a Measure of Heterotrophic Bacterioplankton Produktion in Marine Surface Waters – Evaluation and Field Results. *Marine Biology*, 66:109–120.
- Gao, K., Aruga, Y., Asada, K., and Kiyohara, M. (1993). Influence of Enhanced CO₂ on Growth and Photosynthesis of the Red Algal *Gracilaria* sp. and *G. chilensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5:563–571.
- Garcia, N., Raimbault, P., and Sandroni, V. (2007). Seasonal nitrogen fixation and primary production in the Southwest Pacific: nanoplankton diazotrophy and transfer of nitrogen to picoplankton organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 343:25–33.
- Gasol, J. M., Casamayor, E. O., Joint, I., Garde, K., Gustavson, J., Benlloch, S., Diez, B., Schauer, M., Massana, R., and Pedros-Alio, C. (2004). Control of heterotrophic prokaryotic abundance and growth rate in hypersaline planktonic environments. *Aquatic Microbial Ecology*, 34:193–206.
- Gilbert, P. M. and Bronk, D. A. (1994). Release of dissolved organic nitrogen by marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11):3996–4000.
- Graham, L. P., Chen, D., Christensen, O. B., Kjellström, E., Krysanova, V., Meier, H. E. M., Radziejewski, M., Räisänen, J., Rockel, B., and Ruosteenoja, K. (2008). *Assessment of Climate Change for the Baltic Sea Basin*, chapter Projections of Future Anthropogenic Climate Change, pages 133–219. Springer Berlin Heidelberg.
- Grasshoff, K., Erhardt, M., and Kremling, K., editors (1983). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie.
- Grossart, H. P., Allgaier, M., Passow, U., and Riebesell, U. (2006). Testing the effect of CO₂ concentration on the dynamics of marine heterotrophic bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 51(1):1–11.

- Grossart, H.-P. and Simon, M. (2007). Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology*, 47:163–176.
- Gruber, N. and Galloway, J. N. (2008). An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451:293–296.
- Haselkorn, R. and Buikema, W. J. (1992). *Biological Nitrogen Fixation*, chapter Nitrogen Fixation in Cyanobacteria, pages 166–190. Chapman and Hall.
- HELCOM (1988). Guidelines for the Baltic Monitoring Programme for the third stage; Part D. Biological determinands. *Baltic Sea Environmental Proceedings*, 27 D.
- HELCOM (2009). Eutrophication in the baltic sea – an integrated thematic assessment of the effects of nutrient enrichment and eutrophication in the baltic sea region. *Baltic Sea Environment Proceedings*, 115B.
- Hewson, I., Govil, S. R., Capone, D. G., Carpenter, E. J., and Fuhrman, J. A. (2004). Evidence of *Trichodesmium* viral lysis and potential significance for biogeochemical cycling in the oligotrophic ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 36:1–8.
- Howarth, R. W. (1988). Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19:89–110.
- Hutchins, D. A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P. W., and Mulholland, M. R. (2007). CO₂ control of *Trichodesmium* N₂ fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and Oceanography*, 52(4):1293–1304.
- JGOFS (1993). Core measurement protocols. *JGOFS Report*, 6.
- Johnson, K. M., Wills, K., Butler, D., Johnson, W., and Wong, C. (1993). Coulometric total carbon dioxide analysis for marine studies: maximizing the performance of an automated gas extraction system and coulometric detector. *Marine Chemistry*, 44:167–187.
- Karl, D., Letelier, R., Tupas, L., Dore, J., Christian, J., and Hebel, D. (1997). The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, 388:533–538.
- Kim, J.-M., Lee, K., Shin, K., Kang, J.-H., Lee, H.-W., Kim, M., Jang, P.-G., and Jang, M.-C. (2006). The effect of seawater CO₂ concentration on growth of a natural phytoplankton

- adssemblage in a controlled mesocosm experiment. *Limnology and Oceanography*, 51(4):1629–1636.
- Kranz, S. A., Sültemeyer, D., Richter, K.-U., and Rost, B. (2009). Carbon acquisition by *Trichodesmium*: The effect of pCO₂ and diurnal changes. *Limnology and Oceanography*, 54(2):548–559.
- Krötzinger, A., Thomas, H., Schneider, B., Gronau, N., Mintrop, L., and Duinker, J. C. (1996). At-sea intercomparison of two newly designed underway pCO₂ systems – encouraging results. *Marine Chemistry*, 52:133–145.
- Larsson, U., Hajdu, S., Walve, J., and Elmgren, R. (2001). Baltic sea nitrogen fixation estimated from the summer increase in upper mixed layer total nitrogen. *Limnology and Oceanography*, 46(4):811–820.
- Levitan, O., Rosenberg, G., Setlink, I., Setlikova, E., Grigel, J., Klepetar, J., Prasil, O., and Berman-Frank, I. (2007). Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Global Change Biology*, 13:531–538.
- Lewis, E. and Wallace, D. W. R. (1998). Program developed for CO₂ system calculations. *ORNL/CDIAC-105 Carbon Dioxide Information Center, Oak Ridge National Laboratory*.
- Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 16:135–168.
- Mariotti, A. (1983). Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. *Nature*, 303:685–687.
- Meehl, G., Stocker, T., Collins, W., Friedlingstein, P., Gaye, A., Gregory, J., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J., Noda, A., Raper, S., Watterson, I., Weaver, d. A., and Zhao, Z.-C. (2007). Global Climate Projections. In Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M., and Miller, H., editors, *Climate Change 2007: the Physical Science Basis. contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Montoya, Joseph, P., Voss, M., Kähler, P., and Douglas G., C. (1996). A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3):986–993.

- Mulholland, M. R., Bronk, D. A., and Capone, D. G. (2004). Dinitrogen fixation and release of ammonium and dissolved organic nitrogen by *Trichodesmium* IMS101. *Aquatic Microbial Ecology*, 37:85–94.
- Nausch, M., Nausch, G., Lass, H. U., Mohrholz, V., Nagel, K., Siegel, H., and Wasmund, N. (2009). Phosphorus input by upwelling in the eastern gotland basin (Baltic Sea) in summer and its effects on filamentous cyanobacteria. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 83:434–442.
- Ohlendieck, U., Gundersen, K., Meyerhöfer, M., Fritsche, P., Nachtigall, K., and Bergmann, B. (2007). The significance of nitrogen fixation to new production during early summer in the Baltic Sea. *Biogeosciences*, 4:63–73.
- Ohlendieck, U., Stuhr, A., and Siegmund, H. (2000). Nitrogen fixation by diazotrophic cyanobacteria in the Baltic Sea and transfer of the newly fixed nitrogen to picoplankton organisms. *Journal of Marine Systems*, 25:213–219.
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., Pépin, L., Ritz, C., Saltzman, E., and Stievenard, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarktika. *Nature*, 399:429–436.
- Ploug, H. (2008). Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon* sp. and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: Small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnology and Oceanography*, 53(3):914–921.
- Pomeroy, L. R., Williams, P. J., Azam, F., and Hobbie, J. E. (2007). The Microbial Loop. In *Oceanography*, volume 20. The Oceanography Society.
- Prentice, C., Farquhar, G. D., Fasham, M. J. R., Goulden, M. L., Heimann, M., Jaramillo, V. J., Kheshgi, H. S., Le Quééré, C., Scholes, R. J., and Wallace, D. W. R. (2001). *Climate Change 2001: The Scientific Basis (Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the IPCC)*, chapter The Carbon Cycle and Atmospheric Carbon Dioxide. Cambridge University Press, New York.
- Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J., and Long, B. M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components,

- Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(7):1441–1461.
- Raven, J. A. (1991). Physiology of inorganic C acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: relation to increased CO₂ and temperature. *Plant, Cell and Environment*, 14:774–779.
- Riebesell, U. (2004). Effects of CO₂ Enrichment on Marine Phytoplankton. *Journal of Oceanography*, 60:719–729.
- Riebesell, U., Schulz, K. G., Bellerby, R. G. J., Botros, M., Fritsche, P., Meyerhöfer, M., Neill, C., Nondal, G., Oschlies, A., Wohlers, J., and Zöllner, E. (2007). Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature*, 450:545–548.
- Riebesell, U., Wolf-Gladrow, D. A., and Smetacek, V. (1993). Carbon Dioxide Limitation of Marine-Phytoplankton Growth-Rates. *Nature*, 361:249–251.
- Rose, J. M., Feng, Y., Gobler, C. J., Gitierrez, R., Hare, C. E., Leblanc, K., and Hutchins, D. A. (2009). Effects of increased pCO₂ and temperature on the North Atlantic spring bloom. II. Microzooplankton abundance and grazing. *Marine Ecology Progress Series*, 388:27–40.
- Rost, B., Riebesell, U., Burkhardt, S., and Sültemeyer, D. (2003). Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 48(1):55–67.
- Rost, B., Zondervan, I., and Wolf-Gladrow, D. (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine Ecology Progress Series*, 373:227–237.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., and Rios, A. F. (2004). The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂. *Science*, 305:367–371.
- Schneider, B., Kaitala, S., and Maunula, P. (2006). Identification and quantification of plankton bloom events in the Baltic Sea by continuous pCO₂ and chlorophyll a measurements on a cargo ship. *Journal of Marine Systems*, 59:238–248.

Literaturverzeichnis

- Schneider, B., Nausch, G., Kubsch, H., and Peterson, I. (2002). Accumulation of total CO₂ during stagnation in the Baltic Sea deep water and its relationship to nutrient and oxygen concentrations. *Marine Chemistry*, 77:277–291.
- Simon, M. and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51:210–213.
- Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W., Dahlem, A., Rinehart, K., Kiviranta, J., and Niemelä, I. (1989). Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *nodularia spumigena* in the baltic sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8):1990–1995.
- Sommer, F., Hansen, T., and Sommer, U. (2006). Transfer of diazotrophic nitrogen to mesozooplankton in Kiel Fjord, Western Baltic Sea: a mesocosm study. *Marine Ecology Progress Series*, 324:105–112.
- Sommer, U., Aberle, N., Engel, A., Hansen, T., Lengfeller, K., Sandow, M., Wholers, J., Zöllner, E., and Riebesell, U. (2007). An indoor mesocosm system to study the effect of climate change on the late winter and spring succession of Baltic Sea phyto- and zooplankton. *Oecologia*, 150:655–667.
- Sörensson, F. and Sahlsten, E. (1987). Nitrogen dynamics of a cyanobacteria bloom in the Baltic Sea: new versus regenerated production. *Marine Ecology Progress Series*, 37:277–284.
- Thingstad, T. F., Skjoldad, E. F., and Böhne, R. A. (1993). Phosphorus cycling and algal–bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Marine Ecology Progress Series*, 99:239–259.
- Tortell, P. D., DiTullio, G. R., Sigman, D. M., and 3, F. M. M. M. (2002). CO₂ effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Marine Ecology Progress Series*, 236:37–43.
- Tortell, P. D., Rau, G. H., and Morel, F. M. M. (2000). Inorganic carbon acquisition in coastal pacific phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography*, 45(7):1485–1500.
- Vahtera, E., Laanemets, J., Pavelson, J., Huttunen, M., and Kononen, K. (2005). Effect of upwelling on the pelagic environment and bloom-forming cyanobacteria in the western Gulf of Finland, Baltic Sea. *Journal of Marine Systems*, 58:67–82.

Literaturverzeichnis

- Walve, J. and Larsson, U. (2007). Blooms of Baltic Sea *Aphanizomenon* sp. (Cyanobacteria) collapse after internal phosphorus depletion. *Aquatic Microbial Ecology*, 49:57–69.
- Wannicke, N., Koch, B. P., and Voss, M. (2009). Factors influencing the release of fixed N₂ and C as TDN and DOC by *Trichodesmium erythreum* and *Nodularia spumigena*. *Aquatic Microbial Ecology*, 57:175–189.
- Wasmund, N. (1997). Occurrence of Cyanobacterial Blooms in the Baltic Sea in Relation to Environmental Conditions. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 82:169–184.
- Zeebe, R. E. and Wolf-Gladrow, D. A. (2001). *CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Zondervan, I., Rost, B., and Riebesell, U. (2002). Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272:55–70.

5 Anhang

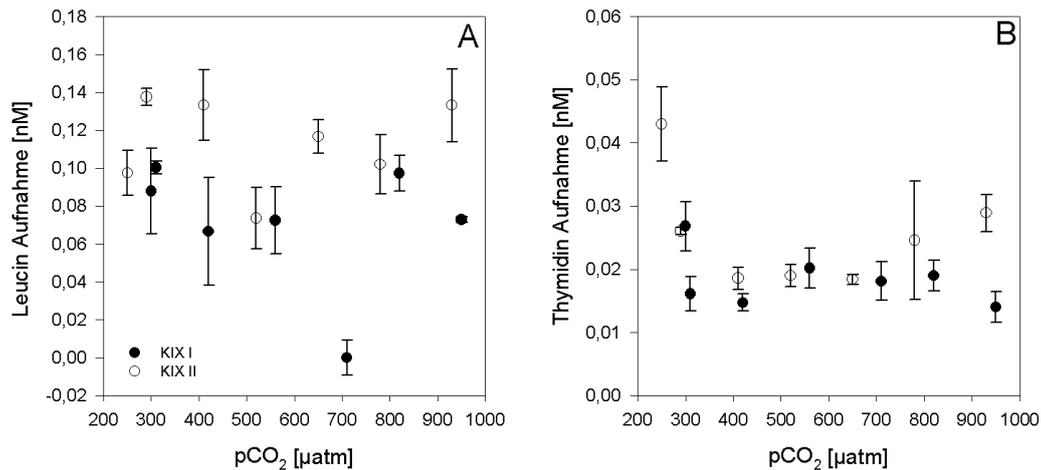


Abbildung 5.1. Leucin- und Thymidin Aufnahme am Ende der vierstündigen Inkubation beider KIX Versuche in Abhängigkeit des pCO₂. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± Standardabweichung dar. (A) Leucin Aufnahme (Zellwachstum). (B) Thymidin Aufnahme (Zellteilung).

Tabelle 5.1. Enzymeffizienzen (V_{\max}/K_m) der Leucinamino-Peptidase (Leu), Phosphatase (Phos) und β -Glucosidase (Gluc) am Ende von KIX I und KIX II.

pCO ₂	KIX I			pCO ₂	KIX II		
	Leu	Phos	Gluc		Leu	Phos	Gluc
300	0,0390	0,0143	0,00090	250	0,0363	0,0108	0,00076
310	0,0404	0,0141	0,00108	290	0,0371	0,0117	0,00094
420	0,0424	0,0124	0,00111	410	0,0371	0,0113	0,00079
560	0,0394	0,0136	0,00109	520	0,0366	0,0106	0,00078
710	0,0380	0,0144	0,00115	650	0,0342	0,0119	0,00083
820	0,0347	0,0149	0,00097	780	0,0408	0,0101	0,00079
950	0,0368	0,0142	0,00115	930	0,0358	0,0132	0,00092

Tabelle 5.2. Gelöste und partikuläre Nährstoffkonzentrationen am Beginn und am Ende der LAX Inkubation. Werte in Klammern () sind Standardabweichungen. * Fehler während der Messung. †Startwerte des LAX I können nicht den pCO₂ zugeordnet werden, da sie während der Messung durcheinandergerielen. § nur ein Messwert.

LAX I										
	pCO ₂	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻³	PO ₄ ³⁻	NH ₄ ⁺	DOC [µM]	TDN [µM]	PON [µM]†	POC [µM]†	POP [µM]
START	270	0,77	4,30	1,32	0,95	414,65 (86,34)	25,89 (0,82)	35,95	200,99	1,10
	280	0,74	4,06	1,04	0,99	476,85 (161,57)	26,07 (0,32)	34,71	199,95	0,55
	380	0,77	4,47	1,09	0,60	469,80 (81,88)	26,24 (0,38)	36,32	209,03	1,56
	480	0,77	4,17	1,03	0,60	640,65 (63,14)	27,00 (2,00)	34,68	194,92	1,03
	580	0,77	4,33	1,04	0,92	361,85 (4,45)	25,90 (0,11)	33,64	188,50	0,89
	680	0,77	4,18	1,01	0,99	394,95 (43,77)	25,91 (0,46)	35,93	202,13	1,41
	780	0,77	4,43	1,04	0,88	392,85 (31,32)	26,97 (1,20)	34,61	196,59	1,19
ENDE	270	0,52	2,09	0,36	1,23	522,75 (179,53)	24,68 (0,76)	31,99	185,94	1,95
	280	0,52	1,52	0,15	1,62	631,45 (338,21)	25,11 (0,26)	32,84	187,57	2,05
	380	0,51	1,62	0,13	1,93	700,80 §	25,89 §	33,36	195,67	2,14
	480	0,48	1,39	0,14	1,55	651,50 (29,27)	23,52 (0,81)	31,26	185,89	1,80
	580	0,54	1,13	0,12	1,30	586,95 (78,84)	24,01 (0,10)	34,77	203,55	2,01
	680	*	*	0,04	1,69	530,85 (61,16)	25,47 (0,40)	34,14	200,11	2,20
	780	*	*	0,02	1,37	766,05 (159,31)	25,93 (1,32)	33,34	203,37	2,13
LAX I										
START	270	0,78	4,95	1,55	2,84	795,05 (210,79)	30,67 (5,94)	15,56	115,41	0,93
	280	0,74	4,20	1,55	2,24	612,45 (1,63)	26,60 (0,70)	15,59	113,73	0,83
	380	0,82	4,15	1,57	2,28	545,00 (83,72)	25,13 (0,00)	14,67	105,62	0,82
	480	0,77	4,58	1,57	2,35	600,35 (59,89)	26,26 (0,47)	15,65	111,76	1,02
	580	0,82	4,65	1,57	2,17	569,10 (80,47)	27,33 (1,78)	14,96	106,07	0,84
	680	0,80	4,20	1,58	2,24	710,20 (7,21)	24,55 (0,42)	14,96	107,01	0,90
	780	0,84	4,21	1,57	2,56	670,60 (8,77)	26,44 (0,56)	16,17	116,46	0,86
ENDE	270	0,31	1,25	0,44	0,81	690,20 (30,12)	27,59 (1,42)	19,98	135,89	1,49
	280	0,28	2,49	0,45	0,85	642,95 (207,82)	25,34 (0,04)	20,65	150,30	1,63
	380	0,24	1,10	0,34	0,92	500,40 (133,64)	21,08 (0,28)	21,66	149,47	1,74
	480	0,22	1,02	0,25	0,81	608,30 (0,85)	20,12 (0,66)	22,81	161,30	1,93
	580	0,24	1,04	0,15	0,71	632,60 (9,62)	20,98 (0,01)	24,04	170,75	1,66
	680	0,23	1,08	0,11	0,81	775,60 (272,24)	24,21 (4,33)	27,68	198,76	1,86
	780	0,18	0,72	0,04	0,64	580,10 (27,29)	18,87 (1,10)	29,34	203,03	1,88

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Maren Voss dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Weiterer Dank gebührt ihr, weil ich durch meine Arbeit als HiWi in der Arbeitsgruppe die Möglichkeit hatte an zahlreichen Ausfahrten teilzunehmen und so unvergessliche und unschätzbare Erfahrung für meine weitere Forschungslaufbahn sammeln konnte.

In diesem Zusammenhang darf der Name Iris Liskow nicht fehlen. Ihr danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft, wenn im Labor nicht alles so klappte, wie es klappen sollte und für viele pragmatische Tipps, die das Laborleben erleichtern können. Auch Nicola Wannicke und Deniz Bombar sein gedankt, dass sie in der Endphase meiner Diplomarbeit dazu bereit waren, ihre Zeit für das Korrekturlesen oder die Diskussionen meiner Ergebnisse zu opfern. Dem Rest der Arbeitsgruppe „Stabile Isotopen“ danke ich für die angenehme Zusammenarbeit während meiner Zeit am IOW.

Meinem besonderen Dank gilt Kirsten Isensee, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an ihrem Experiment teilzuhaben und mir trotz mancher Reibereien, immer wieder die Gelegenheit gegeben hat, auf sie zuzugehen.

Herrn Schneider möchte ich dafür danken, dass er immer Zeit dafür gefunden hat, meine Fragen zum Karbonatsystem zu beantworten.

Joachim Dippner sei gedankt, dass er versucht hat, mir eine Tür zur Statistik zu öffnen. Dass sie nicht sehr weit aufgegangen ist, liegt nicht an ihm.

Monika Nausch danke ich für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu Begutachten.

7 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen (siehe § 25, Abs. 7 der Diplomprüfungsordnung Biologie 2000) und Hilfsmittel verwendet habe. Mir ist bekannt, dass gemäß § 8, Abs. 3 der Diplomprüfungsordnung Biologie 2000 die Prüfung wegen einer Pflichtwidrigkeit (Täuschung u.ä.) für nicht bestanden erklärt werden kann.

Rostock, November 2009

Andreas Weiss