

modellieren, immer wieder die Frage auf, wie das phosphatlimitierte Algenwachstum von der vorliegenden Konzentration an Orthophosphat abhängt. Eine wichtige Etappe auf dem Weg zur Klärung dieses – wie man inzwischen weiß – recht schwierigen Problems ist die Aufklärung des Mechanismus der Inkorporation von Phosphat, da man erwarten kann, daß dieser Prozeß das phosphatlimitierte Wachstum ganz entscheidend reguliert.

Es ist jedoch nicht nur dieser eine Aspekt der limnologischen Praxis, der die Phosphatinkorporation so interessant macht. Versuche mit kontinuierlichen Kulturen haben gezeigt, daß das phosphatlimitierte Algenwachstum besonders deutlich jene Charakteristika aufweist, die bei diesen Organismen ganz allgemein beim nährstofflimitierten Wachstum beobachtet werden. Algenphysiologen haben daher den Zusammenhang zwischen Phosphataufnahme und Algenwachstum studiert, um Einblicke in das komplexe Problem der Nährstoffregulation dieser Vorgänge zu erhalten. Auch war die Frage interessant, welche molekularen Abläufe bei der Verwertung geringster Phosphatmengen für das Wachstum beteiligt sind.

Obwohl hier Aspekte ein und desselben biochemischen Prozesses von den zwei Disziplinen Limnologie und Algenphysiologie studiert wurden, war der interdisziplinäre Informationsaustausch zwischen den beiden Forschungsrichtungen erstaunlich gering, ein Umstand, auf den mehrere Autoren bei der Diskussion der noch ungeklärten Probleme hingewiesen haben (NALEWAJKO und LEAN, 1978; BROWN et al., 1978). Parallel nebeneinander haben sowohl die limnologischen als auch die physiologischen Untersuchungen letzten Endes zu einem Ergebnis geführt, das weitere Einblicke in die Abhängigkeit des phosphatlimitierten Algenwachstums von der externen Phosphatkonzentration verwehrte; es stellte sich nämlich heraus, daß es eine bestimmte minimale Phosphatkonzentration gibt, bei der die Nettoaufnahme und daher das Algenwachstum zum Erliegen kommt. Wird diese Konzentration jedoch geringfügig überschritten, so setzt das Wachstum ein. Es konnte nicht geklärt werden, wovon diese Minimalkonzentration abhängt und welche Gesetzmäßigkeiten die Phosphataufnahme beim Überschreiten dieser Konzentration bestimmen.

Mit der vorliegenden Beschreibung der Phosphataufnahme wird versucht, dieses Phänomen im Spiegel der beiden Disziplinen Limnologie und Physiologie zu beleuchten. Dabei soll im ersten Teil mit der Schilderung der Freilandbeobachtungen in Gewässern auf die physiologisch interessanten Fragestellungen hingewiesen werden, die diese Beobachtungen aufgeworfen haben.

Der zweite Teil ist den wachstumsphysiologischen Untersuchungen gewidmet, die, wenn schon keine Beantwortung, so doch eine Präzisierung dieser Fragestellungen erlauben. Die beiden ersten Teile sollen somit einleitend die verschiedenen Facetten der Phosphataufnahme vorstellen.

Der dritte Teil soll nun zeigen, welche Wege beschritten wurden, um diesen Prozeß auf molekularer Basis zu verstehen.

Im vierten und letzten Teil soll schließlich demonstriert werden, auf welche Weise die Ergebnisse dieser biochemischen Untersuchungen verwendet werden können, um eine Aussage über das Auftreten von Algenblüten im Gewässer zu ermöglichen.

1. Die Phosphatinkorporation durch Phytoplankton in Gewässern

Die Messung der Photosyntheseraten in Freilandproben, die dem See unmittelbar entnommen worden waren, erlaubt die Quantifizierung eines wichtigen Teiles des „Kohlenstoffkreislaufs“. Es ist daher nicht verwunderlich, daß Limnologen versuchten, in ähnlicher Weise durch eine Messung der Phosphataufnahme bei Algen Einblicke in die Dynamik des Phosphorkreislaufs zu gewinnen.

Schon die ersten Freilandbeobachtungen der Phosphataufnahme führten zu der Schlussfolgerung, daß Algen unter natürlichen Bedingungen in der Lage sind, angebotenes Phosphat rasch aufnehmen und in großen Mengen speichern zu können. So zeigte ein im Jahr 1941 von EINSELE durchgeführtes Experiment, bei dem er in zwei Portionen 94 kg Phosphat in den Schleinsee einbrachte, daß das zugesetzte Orthophosphat nach wenigen Tagen praktisch nicht mehr nachweisbar war. Gleichzeitig änderte sich das Verhältnis des Gehaltes der Phosphor- zu den Stickstoffverbindungen in den Algen von 1:20 auf 1:3. Offenbar hatten die Algen im Freiland ein Vielfaches ihres ursprünglichen Phosphatgehaltes inkorporiert, eine Eigenschaft, die man bei Mikroorganismen immer dann findet, wenn deren Wachstum vorher durch den Nährstoff Phosphat limitiert worden war, wie physiologische Untersuchungen sehr bald ergaben; diese Untersuchungen zeigten auch, daß das über die augenblicklich benötigte Menge hinaus gespeicherte Phosphat in Form von Polyphosphaten vorliegt und bei Bedarf wieder abgebaut werden kann (SMITH et al., 1954; WILKINSON und DUGUID, 1960; HAROLD, 1964). LISS und LANGEN(1962) nannten dieses Phänomen „Phosphatüberkompensation“. Damit war klar, daß kein einfacher Zusammenhang zwischen Phosphatinkorporation und Wachstum existieren kann.

EINSELES Freilandexperiment im Schleinsee folgten noch in den fünfziger Jahren eine Reihe weiterer Untersuchungen, mit denen die Phosphataufnahme von Algen unter natürlichen Bedingungen studiert wurde. Sie sollen hier kurz beschrieben werden, weil sie einerseits sehr informativ sind und andererseits in dieser Form wohl nicht mehr durchgeführt werden können, da hier zu Meßzwecken kleine Seen mehr oder weniger homogen radioaktiv mit ^{32}P -Phosphat markiert worden waren. HUTCHINSON und BOWEN schütteten in den Linsley Pond 1947 10 mCi und 1950 70 mCi ^{32}P -Phosphat und bestimmten die Änderung der spezifischen Aktivität im Seston und im Filtrat in einer Reihe vertikal entnommener Proben. Auf diese Weise konnten sie das Schicksal des von

den Algen aufgenommenen Phosphats verfolgen und gelangten so zu lehrreichen Einblicken in die Austauschvorgänge zwischen dem Littoral, Epilimnion und Hypolimnion. Auch hier zeigte sich, daß das Phosphat sehr rasch in die Algen einfloß. Es wurde erst nach Sedimentation der Organismen vom Epilimnion ins Hypolimnion wieder freigesetzt. Nach der schnellen Aufnahme des ^{32}P -Phosphates durch die Algen wurden dann die im See gelösten organischen Phosphorverbindungen wesentlich langsamer radioaktiv markiert, wohl ein erster Hinweis darauf, daß die Zellmembran der Algen für organische Phosphorverbindungen weitgehend impermeabel ist.

Auch HAYES et al. (1952) kontaminierten noch einen ganzen See mit ^{32}P -Phosphat und untersuchten die Bewegung des eingebrachten Radiophosphors. Aus der Abnahme der Radioaktivität im Wasser und einem nicht weiter definierten „festen Material“ (vermutlich hauptsächlich aus Phytoplankton bestehend) wurde die „Turnoverzeit“ abgeschätzt, also die Zeit, die nötig ist, um das vorhandene Phosphat umzusetzen. Sie betrug für das in Wasser gelöste Phosphat 5,4 Tage, für den „partikulären Phosphor“ 39 Tage.

Eine wichtige Tracerstudie führte H. F. RIEGLER (1956) an einem ganzen See durch. Auch er fand zunächst eine rasche ^{32}P -Phosphataufnahme während der ersten drei Tage nach Zugabe der radioaktiven Verbindung. In der weiteren Folge blieb jedoch das prozentuale Verhältnis zwischen dem gelösten und inkorporierten ^{32}P -Phosphat relativ konstant. RIEGLER schloß daraus auf eine rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Phosphorfraktionen. Er untersuchte die Nettoaufnahme von zugegebenem Phosphat durch Algen in Seewasserproben und kam zu dem wichtigen Befund, daß die Phosphatkonzentration im Wasser nach der Zugabe auf Grund des schnell einsetzenden Aufnahmeprozesses wieder auf den Wert absank, der vor der Zugabe schon vorlag. Er schloß: „It appears that under natural conditions the concentration of inorganic phosphate is maintained at a level where the rate of uptake by plankton is balanced by the rate of loss from plankton and that no increase of plankton phosphorus is possible unless the water receives in increment of phosphate from the inflowing water or from the littoral region.“ Offenbar existiert eine Gleichgewichtskonzentration, bei der – wie bei allen chemischen Gleichgewichten – die Hin- und Rückreaktion gleich schnell abläuft und daher keine Nettophosphatabsorption möglich ist. Untersuchungen im Laboratorium zeigten, daß diese Gleichgewichtskonzentration ausgesprochen gering ist. KUENZLER und KETCHUM (1962) bestimmten einen Minimalwert von etwa 1 nM, bei dem die Nettoaufnahme zum Erliegen kommt. Setzt man in dieser Gleichgewichtssituation ^{32}P -Phosphat trägerfrei zu, dann mißt man zunächst nur die Hinreaktion, die freilich nichts darüber aussagt, wie rasch die Algen höhere Phosphatkonzentrationen für die Nettoneubildung von Phosphorverbindungen verwerten können. Die hier gemessene „Turnoverzeit“ ist der Reziprokwert der Geschwindigkeitskonstanten der Isotopenaustauschreaktion, die ohne biologische Relevanz ist. RIEGLER fand daher in

Wasserproben eine Turnoverzeit von nur wenigen Minuten, im Gegensatz zu HAYES et al. (1952), die eine Zeitdauer von mehreren Tagen abschätzten. Der Unterschied läßt sich, von natürlichen Schwankungen einmal abgesehen, auf die Tatsache zurückführen, daß HAYES et al. bei ihren Experimenten, bei denen der ganze See radioaktiv markiert worden war, im wesentlichen den irreversiblen Nettofluß von Phosphat in die Algenbiomasse verfolgen konnten, während RIEGLER in Seewasserproben mit dem Tracer den reversiblen Isotopenaustausch bestimmte.

ODUM et al. (1958) folgerten daher, nachdem sie den Austausch von ^{32}P -Phosphat mit der Primärproduktion von marinen Algen verglichen hatten, daß keine unmittelbare Beziehung zwischen den beiden Prozessen bestand. Sie fanden, daß die Inkorporation von ^{32}P -Phosphat im Licht und im Dunkeln gleich schnell vor sich ging und eher in einer gewissen Relation zum Oberfläche-Volumen-Verhältnis der verschiedenen Spezies stand als zu deren Wachstum. Diese Beobachtung war durchaus richtig im Lichte des jetzigen Wissens, wonach der Austausch von Tracer im Gleichgewicht ohne Energieverbrauch vom Phosphatcarrier in der Zellmembran katalysiert wird (FALKNER et al., 1984 a).

Trotzdem wurde später von einigen Autoren immer wieder die sogenannte „Turnoverzeit“ mit Hilfe von ^{32}P -Phosphat gemessen (RIEGLER, 1964; LEAN, 1973; HALMANN und STILLER, 1974; LEAN und NALEWAJKO, 1976; NALEWAJKO et al., 1981; PETERS, 1975), obwohl die so bestimmte reziproke Geschwindigkeitskonstante des Isotopenaustausches nichts über den viel interessanteren irreversiblen Phosphorfluß durch das Ökosystem See aussagt (d. h. die Geschwindigkeit der Nettophosphatinkorporation in die Algenbiomasse in Kombination mit der darauf folgenden Freisetzung auf Grund von Konsumation und Abbau durch Sekundärproduzenten). In ihrem Bemühen, den gemessenen „Turnoverzeiten“ trotzdem eine limnologische Bedeutung zu unterlegen, sei der Kuriosität halber eine Arbeit von LEAN und NALEWAJKO (1979) erwähnt, in der die Autoren versuchen, eine Beziehung zwischen der Turnoverzeit und der Größe des Sees herzustellen.

Die Isotopenaustauschmessungen mit ^{32}P -Phosphat führten jedoch, gleichsam als Nebenprodukt, zu der wichtigen Beobachtung, daß die Bestimmung der Konzentration an gelöstem Orthophosphat im See mit Hilfe der Molybdatmethode ausgesprochen unzuverlässig ist. Ein Vergleich mit den auf der Basis von Tracerstudien gemessenen Orthophosphatwerten im Freiland ergab, daß die möglichen Fehlerabweichungen in der Größenordnung von ein bis zwei Zehnerpotenzen liegen können (RIEGLER, 1968). Diese Beobachtung führte zu der Entwicklung einer enzymatischen Orthophosphatbestimmung für limnologische Zwecke, die zumindest die Abschätzung der Größenordnung der vorliegenden Orthophosphatkonzentration gestattet (PETERSSON, 1979).

Die Schwierigkeiten bei der Interpretation von ^{32}P -Phosphataufnahmedaten auf Grund der beiden gleichzeitig ablaufenden Prozesse von

Nettophosphatinkorporation und Isotopenaustausch haben verhindert, daß ^{32}P -Phosphat ähnlich häufig wie ^{14}C -Carbonat eingesetzt wurde, um die Primärproduktion der Algenbiomasse zu studieren. Zwar konnte gezeigt werden, daß bei Anwendung höherer Konzentrationen mit Hilfe des Tracers praktisch Nettoflüsse gemessen werden können (FALKNER et al., 1974; LEAN und NALEWAJKO, 1976). Diese Tatsache wurde jedoch selten ausgenützt, um das Phosphataufnahmesystem einer natürlichen Algenpopulation zu charakterisieren und auf diese Weise Einblicke in den physiologischen Zustand des Phytoplanktons in Hinblick auf das Ausmaß seiner Phosphatlimitierung zu gewinnen (NALEWAJKO et al., 1981). STILLER et al. (1978) schreiben: „The ^{32}P -phosphate technique is very appealing by its simplicity. However, we believe that the interpretation of kinetic experiments still lacks an interdisciplinary insight.“ Ganz offensichtlich beruhte die Zurückhaltung bei der Verwendung von ^{32}P -Phosphat für Freilanduntersuchungen auf dem mangelnden Einblick in den Mechanismus der Phosphatinkorporation. Aus diesem Grund konnten die gemessenen Daten nicht eindeutig interpretiert werden, und es blieb unklar, unter welchen Bedingungen der Tracer sinnvoll im Freiland verwendet werden kann.

2. Die Beziehung zwischen der Phosphataufnahme, dem Polyphosphatgehalt und der Wachstumsrate unter phosphatlimitierten Wachstumsbedingungen

2.1 Die Abhängigkeit des Polyphosphatgehaltes von der Wachstumsrate

Die frühen Aufnahmestudien im Gewässer und im Laboratorium hatten ergeben, daß phosphatlimitierte Algen bei einer momentanen Erhöhung der Phosphatkonzentration die erstaunliche Fähigkeit besitzen, das angebotene Phosphat rasch in die Zelle gleichsam hineinsaugen zu können, wo es zunächst in größeren Mengen als Polyphosphat gespeichert wird. Auch zeigten diese Untersuchungen, daß sich der Polyphosphatgehalt der Zelle nicht nur auf Grund einer derartigen „nutrient imbalance“, sondern auch in Abhängigkeit vom Vermehrungsrhythmus und dem Tageszyklus ändert (OVERBECK, 1963). Damit war die Frage zu beantworten, ob der durchschnittliche Polyphosphatgehalt der Zelle von der Wachstumsrate beeinflusst wird, mit anderen Worten, ob im steady state des phosphatlimitierten Wachstums die Geschwindigkeit der Phosphatinkorporation mit der Wachstumsrate gekoppelt ist.

Dieser ungeklärte Zusammenhang zwischen Phosphataufnahme und Algenwachstum konnte zunächst am einfachsten mit Hilfe von kontinuierlichen Zellkulturen in „Chemostaten“ untersucht werden. Dabei handelt es sich um eine experimentelle Anordnung, die im wesentlichen aus einem Zuchtgefäß besteht, in das kontinuierlich ein Nährmedium einfließt, das nur eine geringe Phosphatmenge enthält. Das zufließende Phosphat wird nun fast quantitativ von den Algen ver-

braucht. Ein Abfluß in einer bestimmten Höhe sorgt dafür, daß im Zuchtgefäß ein konstantes Flüssigkeitsvolumen V erhalten bleibt. Es ist nun wichtig, die Zuflußrate f (ml h^{-1}) des Nährmediums so zu regulieren, daß die Algen in der Kultur immer in der Lage sind, den ständigen Verlust durch den Abfluß mit ihrer natürlichen Vermehrung auszugleichen. In diesem Fall wird das kontinuierliche Auswaschen der Algen auf Grund der Verdünnung $D = f/V$ so durch das Wachstum kompensiert, daß die Algendichte im Zuchtgefäß konstant bleibt.

Folgt das exponentielle Zellwachstum der Beziehung

$$\frac{dx}{dt} = \mu x,$$

wobei μ die spezifische Wachstumsrate und x die Zellzahl ist, und wird die Kultur kontinuierlich verdünnt, wobei die Zellzahl gemäß der Gleichung

$$-\frac{dx}{dt} = Dx$$

ständig abnimmt, so setzt sich die Änderung der Zellzahl der Kultur aus der Summe beider Prozesse zusammen (HERBERT et al., 1956):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx.$$

Hat sich dann eine konstante Zellzahl im steady state eingestellt, so ist $dx/dt = 0$ und daher die Verdünnung gleich der Wachstumsrate $D = \mu$.

MONOD (1942) verknüpft nun die Wachstumsrate dx/dt mit der Geschwindigkeit der Aufnahme des limitierenden Substrats, ds/dt :

$$Q \cdot \frac{dx}{dt} = - \frac{ds}{dt}. \quad (1)$$

Der Proportionalitätsfaktor Q gibt an, wieviel Substrat pro Zelle inkorporiert wird (die sogenannte Zellquote [cell quota]: DROOP, 1968). Q setzt sich im Fall des Phosphats aus dem Gehalt an cytoplasmatischem Orthophosphat, organischen Phosphorverbindungen und Polyphosphaten pro Zellzahl zusammen. Man erkennt unschwer, daß zwischen der geringen, im Chemostat verbleibenden steady-state-Phosphatkonzentration \bar{s}_p , der Reservoirkonzentration im zufließenden Medium s_R und der konstanten Biomasse \bar{x} die einfache Beziehung

$$Q = \frac{(s_R - \bar{s}_p)}{\bar{x}}$$

besteht. Es wurde zunächst allgemein angenommen, daß die steady-state-Phosphatkonzentration \bar{s}_p mit der Wachstumsrate nach der von MONOD 1942 vorgeschlagenen Gleichung verknüpft werden kann:

$$D = \mu = \mu_{\max} \left(\frac{\bar{s}_p}{\bar{s}_p + K_s} \right) \quad (2)$$

wobei μ_{\max} die maximale Wachstumsrate und K_s eine Sättigungskonstante sind (MÜLLER, 1970; GOLDMANN, 1977; BURMASTER, 1979). Demnach verlief die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der externen Substratkonzentration nach der in Abb. 1 dargestellten Weise.

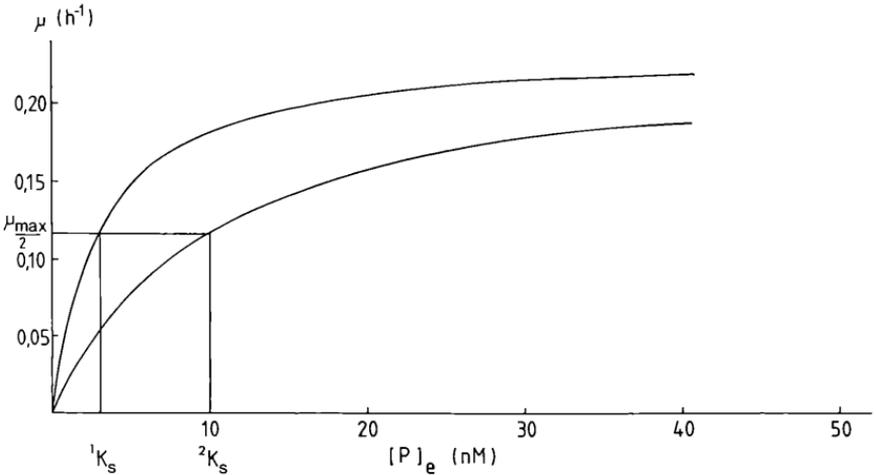


Abb. 1: Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der externen Phosphatkonzentration, nach der MONODSchen Gleichung für zwei verschiedene Sättigungskonstanten berechnet ($^1K_s = 3 \text{ nM}$; $^2K_s = 10 \text{ nM}$).

Die Sättigungskonzentration K_s ist numerisch gleich der Substratkonzentration, bei der die Algen mit „halbmaximaler“ Geschwindigkeit wachsen. Je kleiner K_s ist, desto besser können die Algen geringe Substratkonzentrationen für ihr Wachstum verwerten. TITMAN (1976) postulierte daher, daß das Verhältnis der verschiedenen Sättigungskonstanten für die einzelnen limitierenden Nährstoffe (z. B. Phosphat und Silikat bei Diatomeen) eine entscheidende Rolle bei der ökologischen Konkurrenz zwischen den Algenarten spielt. Leider konnte nicht in befriedigender Weise experimentell bewiesen werden, daß Gleichung (2) das phosphatlimitierte Wachstum tatsächlich beschreibt und somit der in Abb. 1 dargestellte Kurvenverlauf der Realität entspricht, da die im Chemostat verbleibenden Phosphatkonzentrationen \bar{s}_p meist zu gering sind, um mit kolorimetrischen Methoden noch gemessen werden zu können. Es gab jedoch Hinweise auf Abweichungen im unteren Konzentrationsbereich (MÜLLER, 1970). Erst mit Hilfe von ^{32}P -Phosphat konnte viel später der Nachweis erbracht werden, daß Gleichung (2) in dieser Form für das Phosphat nicht gültig ist (BROWN und BUTTON, 1979). Die Experimente mit kontinuierlichen Kulturen haben jedoch sofort zu dem wichtigen Ergebnis geführt, daß die aufgenommene Phosphatmenge pro gebildeter Zellzahl nicht konstant ist, sondern von der Wachstumsrate abhängt. Die Phosphataufnahmegeschwindigkeit ist somit im steady state nicht streng mit der Wachstumsrate gekoppelt. Es zeigte sich, daß

der Polyphosphatgehalt umso größer ist, je schneller die Algen wachsen (FUHS, 1969).

Nach Gleichung (1) existiert zwischen der Phosphataufnahmegeschwindigkeit pro Zellzahl

$$J_P = \frac{1}{x} \frac{ds_P}{dt},$$

der Wachstumsrate μ und der „Zellquote“ Q , d. h. der Phosphatmenge pro Zelle die einfache Proportionalität:

$$J_P = \mu Q.$$

DROOP (1968) untersuchte nun die Beziehung zwischen μ und Q genauer. Er begann seine Untersuchungen mit kontinuierlichen Kulturen, bei denen das Wachstum der *Xanthophyceae Monochrysis Lutheri* durch das Vitamin B₁₂ limitiert war. Der dabei beobachtete Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Zellquote war dann aber auch für einige andere Nährstoffe (Eisen, Nitrat) und besonders ausgeprägt für Phosphat gültig (DROOP, 1973). Er fand heraus, daß bei einer Auftragung der steady-state-Phosphataufnahmeraten bei verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten $J_P = \mu Q$ gegen den Zellphosphorgehalt eine lineare Beziehung $\mu Q = a(Q - b)$ erkennbar war (Abb. 2). Man sieht unmittelbar, daß der Achsenabschnitt b auf der Q -Achse dem Phosphorgehalt der nicht mehr wachsenden Algen entspricht. DROOP nannte diesen Minimalsubstratgehalt Q_0 der nicht mehr wachsenden Zelle „Subsistenz-

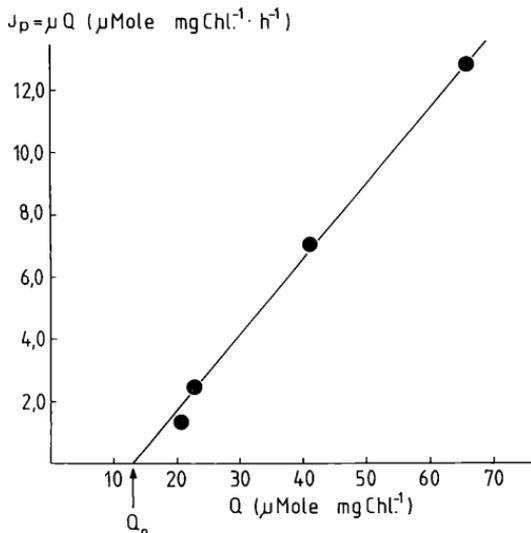


Abb. 2: Die Beziehung zwischen der steady-state-Inkorporationsrate bei verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten und dem Gesamtphosphorgehalt bei *Anacystis nidulans* (GRAFFIUS und FALKNER, unveröffentlicht). $Q_0 = 13 \mu\text{Mole (mg Chl.)}^{-1}$, $\mu_{\max} = 0,263 \text{ h}^{-1}$

quote“ (subsistence quota). Da bei maximaler Wachstumsrate $\mu_{\max}, Q \gg Q_0$ ist, ergibt sich wegen $\mu_{\max} Q = a(Q - Q_0) \cong a Q$ für $a = \mu_{\max}$. Auf diese Weise erhielt die empirisch gefundene Beziehung zwischen μ und Q die Form:

$$\mu Q = \mu_{\max} (Q - Q_0).$$

Die variable Differenz $(Q - Q_0)$ zwischen dem Gesamtphosphor- und dem Minimalphosphorgehalt pro Zelle entspricht den Polyphosphaten (RHEE, 1978). DROOP führte noch eine einfache Transformation der obigen Gleichung durch:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{Q - Q_0}{Q} = \frac{(Q - Q_0)}{(Q - Q_0) + Q_0} \quad (3)$$

und endete somit bei einer Formel, die in ähnlicher Weise versucht, eine Relation zwischen μ und μ_{\max} herzustellen wie die Monodsche Gleichung (2). Es wurde nur, basierend auf einigen einfachen Operationen, die externe Substratkonzentration s_p gegen den endogenen Polyphosphatpool „vertauscht“

Gleichung (3), die im wesentlichen aussagt, daß die Algen umso mehr Polyphosphate bilden, je schneller sie wachsen (wobei die Abhängigkeit der Wachstumsrate vom Polyphosphatgehalt eine hyperbolische Kurve ergibt), wurde nun von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich verwendet, um die Relation zwischen μ und μ_{\max} in Verbindung mit dem Polyphosphatgehalt zu beschreiben, zumal sie viel einfacher zu testen war als die Monodsche Gleichung (2) (RHEE, 1973; TILMAN und KILHAM, 1976; GOLDMANN, 1977; BROWN und HARRIS, 1978; jedoch siehe GOLDMANN, 1979). Da die experimentellen Daten vieler Wachstumsmessungen offenbar obiger Gleichung gehorchen, erscheint die Schlußfolgerung gerechtfertigt, daß der Polyphosphatgehalt der Zelle keine konstante Größe ist, sondern die Wachstumsrate widerspiegelt. Eine Erklärung für diese Tatsache liefert Gleichung (3) nicht, da sie nicht aus dem Wesen des zu beschreibenden Phänomens hergeleitet ist. (Sie besteht nur durch eine gewisse Eleganz.) Es sind aus diesem Grund andere Funktionen denkbar, die genauso gut mit den Daten in Einklang stehen. FUHS (1969) z. B. verwendet in Erinnerung an die BAULE-MITSCHERLICH-Gleichung (BAULE, 1918) die Formel:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = 1 - 2^{-(Q - Q_0)/Q_0}$$

die ebenfalls der Beobachtung gerecht wird, daß der Polyphosphatgehalt mit zunehmender Wachstumsrate steigt.

Dieser merkwürdige Zusammenhang zwischen μ und Q stimulierte eine ganze Reihe von weiteren Untersuchungen, die sich besonders mit zwei Fragestellungen beschäftigten:

1. Wie sind die Aufnahmesysteme von verschieden rasch wachsenden Algen mit unterschiedlichem Polyphosphatgehalt reguliert? Hier

erwartete man, daß eine enzymkinetische Analyse des Phosphataufnahmesystems einen Einblick liefern könnte.

2. Wie hängt die Wachstumsrate in einem unperturbierten, phosphatlimitierten Chemostaten von der externen Phosphatkonzentration ab?

2.2 Die Auswirkung der Wachstumsgeschwindigkeit auf die Eigenschaften des Phosphataufnahmesystems

Nachdem offenbar ein Zusammenhang zwischen den phosphatlimitierten Wachstumsraten und der gespeicherten Polyphosphatmenge besteht – ein Zusammenhang, der sogar zu der Vermutung führte, daß das Algenwachstum unter diesen Bedingungen nicht von der Phosphataußenkonzentration, sondern vom Gehalt an Polyphosphaten reguliert wird (RHEE, 1973) –, stellte man sich die Frage, ob sich die unterschiedliche Polyphosphatbildung aus den Eigenschaften des Phosphataufnahmesystems erklären läßt.

RHEE (1973 und 1974) unterzog die Phosphataufnahme von Algen, die er in phosphatlimitierten Chemostaten verschieden schnell wachsen ließ, einer kinetischen Analyse, wobei er untersuchte, wie sich die Wachstumsgeschwindigkeit auf die Phosphataufnahme auswirkt. Eine doppelt reziproke Auftragung der mit Hilfe von ^{32}P -Phosphat gemessenen Konzentrationsabhängigkeiten der Aufnahme rate, bezogen auf die Zellzahl, ergab eine Schar von Geraden, die alle die gleiche Michaelis-Konstante hatten und sich nur in der Maximalgeschwindigkeit unterschieden: Je langsamer die Algen wuchsen, umso größer war paradoxerweise die meßbare Maximalgeschwindigkeit, mit der die Algen Phosphat inkorporieren konnten. Eine Auftragung der so bestimmten Werte für $1/V_{\max}$ gegen die zugehörigen Wachstumsraten ergab eine lineare Beziehung, die eine Extrapolation auf den größtmöglichen Wert der Phosphataufnahmegeschwindigkeit bei der nicht mehr wachsenden Alge erlaubte. Da die schnellstwachsenden Algen mit der niedrigsten Maximalgeschwindigkeit die meisten Polyphosphate aufwiesen, die unendlich langsam wachsenden Algen mit der höchsten Maximalgeschwindigkeit hingegen keine Polyphosphate besaßen, folgerte RHEE, daß das Phosphataufnahmesystem durch die Polyphosphate gehemmt wird. Besonders die niedermolekularen Polyphosphate kamen seiner Meinung nach als Inhibitoren des Phosphataufnahmesystems in Frage (RHEE, 1974). Er ging dabei freilich von zwei unbewiesenen Postulaten aus: Zunächst nahm er an, daß die Anzahl der Phosphatcarrier pro Zelle bei allen Wachstumsraten gleich ist. Dann postulierte er einen Inhibitor, der in steigendem Maße mit zunehmender Wachstumsrate diesen Carrier hemmt. Einfacher wäre gleich die Annahme gewesen, daß die Anzahl der Carrier pro Zelle mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit abnimmt. Außerdem ist schwer einzusehen, warum es nach diesem Modell überhaupt zu einer unterschiedlichen Polyphosphatbil-

dung kommen kann, zumal ja nach diesem Konzept die Polyphosphate ihre eigene Bildung hemmen.

Die von RHEE gemachten Beobachtungen, daß die Maximalgeschwindigkeit des Aufnahmesystems mit steigender Wachstumsrate abnimmt, wobei jedoch die Polyphosphatbildung zunimmt, wurden später von mehreren Autoren auch bei anderen Algen gemacht, konnten jedoch nirgends befriedigend erklärt werden, offenbar, weil das Wesen des mikrobiellen Wachstums bis heute noch nicht begriffen wurde.

Diese ersten Versuche, die zur Charakterisierung des Phosphataufnahmesystems vorgenommen wurden, haben jedoch gezeigt, daß erst nach einer Aufklärung des molekularen und energetischen Zusammenhangs zwischen Phosphataufnahme und Polyphosphatbildung Einblicke in die völlig ungeklärte Regulation des Phosphataufnahmesystems zu erwarten waren. Für die von einigen Autoren vorgeschlagene Erweiterung der Michaelis-Menten-Gleichung um einen zusätzlichen Term, bei der die beobachtete Beziehung zwischen der Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme und dem Polyphosphatgehalt berücksichtigt wird (LEHMAN et al., 1975; RHEE, 1973 und 1974), gibt es daher keine Rechtfertigung auf molekularer Basis.

2.3 Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der externen Phosphatkonzentration in einer kontinuierlichen Kultur

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um die Wachstumsrate als Funktion der externen Phosphatkonzentration zu bestimmen. Es konnte jedoch die externe Phosphatkonzentration im Chemostaten nicht mit genügender Genauigkeit gemessen werden, und man war daher angewiesen, diese Beziehung auf indirekte Weise zu errechnen. Zu diesem Zweck wurde auf der Basis der Relation zwischen der steady-state-Inkorporationsrate v , der Wachstumsgeschwindigkeit μ und der Zellquote Q die Inkorporationsrate v abgeschätzt und mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung $s = v K_m / (V_{max} - v)$ diejenige Substratkonzentration berechnet, die die jeweilige steady-state-Aufnahmerate hervorrufen müßte (FUHS et al., 1972; RHEE, 1973). Die so ermittelten Substratkonzentrationen sind freilich nur richtig, wenn die Konzentrationsabhängigkeit der Nettoaufnahmerate tatsächlich der Michaelis-Menten-Gleichung gehorcht. Dies wurde jedoch sehr bald bezweifelt, da direkte Messungen mancher Autoren Hinweise erbrachten, daß – ähnlich wie bei der Aufnahme von Nitrat, Ammonium und Silikat (CAPERON und MEYER, 1972; TILMAN und KILHAM, 1976) – im unteren Konzentrationsbereich Abweichungen von der Monodschen Gleichung auftreten. Besonders die Studien von BROWN und BUTTON (1979) zeigten, daß bei *Selenastrum capricornutum* unterhalb einer bestimmten Phosphatkonzentration (10 nM) die Nettoaufnahme zum Erliegen kommt. Es waren damit diese Autoren im Jahre 1980 zu dem Ergebnis gekommen, das RIEGLER schon im Jahre 1956 publiziert hatte und das zunächst von vielen Algologen bei ihren Überlegungen ignoriert worden war. Da unter dieser Minimalkon-

zentration s_0 keine Nettosphataufnahme – und damit kein Wachstum – möglich ist, kann die Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumsrate nicht der Monodschen Gleichung folgen, nach der die Aufnahmerate ja erst Null sein darf, wenn kein Phosphat mehr vorhanden ist. Dieses Erkenntnis, daß das Wachstum erst bei Konzentrationen möglich ist, die einen definierten Minimalwert von s_0 übersteigen, führte zu einer Modifizierung der Michaelis-Menten-Gleichung und der Monod-Gleichung für die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme- bzw. Wachstumsrate (CAPERON und MEYER, 1972; DROOP, 1974). Die zu diesem Zweck eingeführte Substitution von s durch $s - s_0$, die schließlich die Gleichung

$$J_P = \frac{V_{\max} (s - s_0)}{K_s + (s - s_0)}$$

ergab, „though from a practical point of view the obvious thing to do, knocks away any theoretical foundation the equation may have had“, wie DROOP anmerkte. Er hätte noch darauf hinweisen sollen, daß im Fall der Phosphataufnahme Daten, die man nicht genau messen kann, mit einer Gleichung modelliert werden, die keine theoretische Begründung hat.

3. Physiologische Untersuchungen des Phosphataufnahmesystems bei Blaualgen

Cyanophyceen zeigen im Phosphataufnahmeverhalten die gleichen äußeren Erscheinungsformen wie eukaryontische Algen. Es war daher sinnvoll, den Mechanismus der Phosphataufnahme bei Algen zunächst mit Blaualgen zu studieren, da es bei einem prokaryontischen Organismus viel einfacher ist, die mit der Aufnahme zusammenhängenden molekularen Abläufe zu untersuchen als bei einer eukaryontischen Alge. Schließlich haben Blaualgen keine Mitochondrien und Chloroplasten – die Thylakoide liegen frei im Cytoplasma – und die Interpretation der Aufnahmeprozesse wird nicht durch die Anwesenheit großer, mit Flüssigkeit gefüllter Vakuolen erschwert.

Die physiologischen Untersuchungen werden üblicherweise mit Algenmaterial vorgenommen, das in statischer Kultur gezüchtet worden ist. In diesem Fall erhält man einen Organismus, der eine minimale Aktivität des Aufnahmesystems und einen hohen Polyphosphat Spiegel aufweist. Durch geeignete Wahl der weiteren Zuchtbedingungen lassen sich die Algen dann in die unterschiedlichsten physiologischen Zustände bringen. So kann man durch nachfolgendes Kultivieren auf phosphatfreiem Medium den Polyphosphatgehalt verringern (HEALEY, 1973) und gleichzeitig das Aufnahmesystem aktivieren, oder man kann den Polyphosphatgehalt noch zusätzlich erhöhen, indem man die Algen auf sulfatfreiem Medium weiterzüchtet (LAWRY und JENSEN, 1979).

Die Phosphataufnahme verfolgt man üblicherweise unter Verwendung von radioaktivem Phosphor, der in der gewünschten Aktivität und Konzentration den phosphatfrei gewaschenen Algen zugegeben wird. Die Waschprozedur erfolgt durch mehrmaliges Zentrifugieren und

Resuspendieren in phosphatfreiem, gepuffertem Medium. Beendet wird der Aufnahme-prozeß, indem die Algen entweder durch Filtration oder durch Zentrifugation durch ein Silikonöl rasch aus dem Inkubationsmedium entfernt werden (FALKNER et al., 1980). Durch geeignete Variation in den experimentellen Bedingungen (Licht, Zusammensetzung des Inkubationsmediums usw.) kann so der Effekt äußerer und innerer Faktoren auf die Phosphataufnahme studiert werden.

Da die Algen immer eine bestimmte Menge endogen gespeicherten Phosphats enthalten, muß bei der Verwendung von ^{32}P -Phosphat damit gerechnet werden, daß der Tracerflux nicht die Nettoaufnahme-raten repräsentiert, da ein gemessener Influx von Radioaktivität von einem gewissen Efflux begleitet sein kann. Tatsächlich wurde ein signifikanter Efflux beobachtet, wenn die externe Phosphatkonzentration im nanomolaren Bereich lag (NALEWAJKO und LEAN, 1978). Bei den üblicherweise verwendeten mikromolaren Phosphatkonzentrationen war jedoch ein Efflux nicht nachweisbar. Will man bei niedrigen Konzentrationen mit Tracer nicht die Aufnahmegeschwindigkeiten des Phosphatfluxes, sondern die Nettoaufnahme-raten messen, so muß man die Algen so lange mit ^{32}P -Phosphat inkubieren, bis der austauschbare, endogene Pool mit der gleichen spezifischen Aktivität radioaktiv markiert vorliegt wie das externe Phosphat. Die Nettoinfluxrate kann dann aus der Differenz der inkorporierten ^{32}P -Phosphatmenge bei zwei Zeiten bestimmt werden. Ein derartiges Verfahren wurde bei Freilanduntersuchungen angewendet (FALKNER et al., 1984, a, b). Die ersten physiologischen Untersuchungen erfolgten allerdings nicht mit radioaktivem Phosphat (BATTERTON und VAN BAALEN, 1968). Hier wurde die Aufnahme auf Grund der Abnahme der Phosphatkonzentration im Medium verfolgt, die mit Hilfe herkömmlicher Methoden bestimmt wurde. Dabei wurde die Nettoaufnahme gemessen.

Bevor nun detailliert auf die Charakteristika der Phosphataufnahme eingegangen wird, seien noch einige Anmerkungen grundsätzlicher Art erlaubt. Alle hier präsentierten Messungen wurden an einem lebenden Objekt vorgenommen. Bei einer lebenden Zelle kann ein bestimmter intrazellulärer Ablauf nicht so studiert werden, daß man alle übrigen Vorgänge konstant hält und nur den interessierenden Einen einer experimentellen Analyse unterzieht. Jede Manipulation von außen, die einen Prozeß primär – etwa über einen Inhibitor – beeinflusst, verändert über die Auswirkungen dieses Prozesses auf den gesamten Stoffwechsel auch noch sekundär in zusätzlicher Weise diesen Prozeß, der ja schließlich selbst mit dem übrigen Stoffwechsel verknüpft ist. Dies macht jedoch eine endgültige kausale Interpretation experimenteller Daten in den meisten Fällen unmöglich. Es wurde daher hier so vorgegangen, daß auf der Basis des einfachsten molekularen Modells zur Beschreibung der Phosphatinkorporation gefragt wurde, welche charakteristischen Erscheinungsformen der lebenden Zelle in ihrem Phosphataufnahmeverhalten bei Gültigkeit dieses Mechanismus zu erwarten wären. Dieses Modell wurde pragmatisch so lange akzeptiert, solange mit seiner Hilfe

die mit der Phosphataufnahme zusammenhängenden algenphysiologischen Phänomene interpretiert und vorhergesagt werden konnten. Dabei wurde darauf verzichtet, seine Richtigkeit mit den klassischen biochemischen Methoden (Enzymkinetik usw.) zu beweisen, die – wie eben ausgeführt – ohnehin nur auf einen isoliert ablaufenden Prozeß unter kontrollierten Bedingungen anwendbar sind.

Das hier vorgelegte Konzept beruht auf einem *mixtum compositum* von Beobachtungen, die bei den Blaualgen *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum*, *Oscillatoria rubescens* und *Nostoc symbioticum* gemacht wurden. Der *Nostoc symbioticum* wurde von Dr. D. MOLLENHAUER aus dem Phycomyeten *Geosiphon pyriforme* isoliert, mit dem er in intrazellulärer Symbiose lebt. *Oscillatoria rubescens* wurde im Freiland während einer Algenblüte studiert, und der *Nostoc muscorum* wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. E. KUSEL-FETZMANN dem Autor zur Verfügung gestellt. Die thermophile Blaualge *Anacystis nidulans* stammt aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen. Die Messungen wurden aus zwei Gründen mit mehreren Organismen gemacht. Zunächst wurde versucht, die beobachteten, teilweise unterschiedlichen Erscheinungsbilder, unter Umständen sogar hervorgerufen durch morphologische Unterschiede, auf der Basis eines einzigen, möglichst einfachen Konzepts zu erklären, das somit für alle Blaualgen verbindlich sein sollte. Weiters ließen sich bestimmte Fragestellungen aus meßtechnischen Gründen besser mit der einen Alge als mit den anderen bearbeiten. So war die Zucht bei *Anacystis nidulans* am einfachsten, was bei Doppelmarkierungsexperimenten sehr erwünscht war; sie konnte auf Grund ihrer geringen Größe jedoch nicht so rasch durch ein Silikonöl zentrifugiert werden, wie etwa *Nostoc muscorum*, was bei jener Alge extrem kurze Inkubationszeiten mit ^{32}P -Phosphat unmöglich machte.

3.1 Die Regulation der Phosphataufnahme durch intrazelluläre Vorgänge

Bevor das aufgenommene Phosphation im Cytoplasma metabolisiert werden kann, muß es durch die Zellmembran transportiert werden (Abb. 3). Die Chemostatuntersuchungen haben nun gezeigt, daß selbst nanomolare Phosphatkonzentrationen verwertet werden können. Somit wirft schon der erste Schritt der Phosphatinkorporation in die Algenzelle eine Reihe interessanter Fragen auf:

1. Wie geht die Translokation des geladenen Phosphatmoleküls durch die lipophile Zellmembran vor sich?
2. Auf welche Weise wird die Energie umgesetzt, die aufgebracht werden muß, um geringste, externe Phosphatkonzentrationen in „millimolare“ cytoplasmatisches ATP umzuwandeln?

Beide Problemstellungen hängen eng miteinander zusammen und berechtigen zur Annahme, daß die Gesamtinkorporation von Phosphat in die Zelle energieabhängig ist. Wird nämlich das Phosphation aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert, dann muß

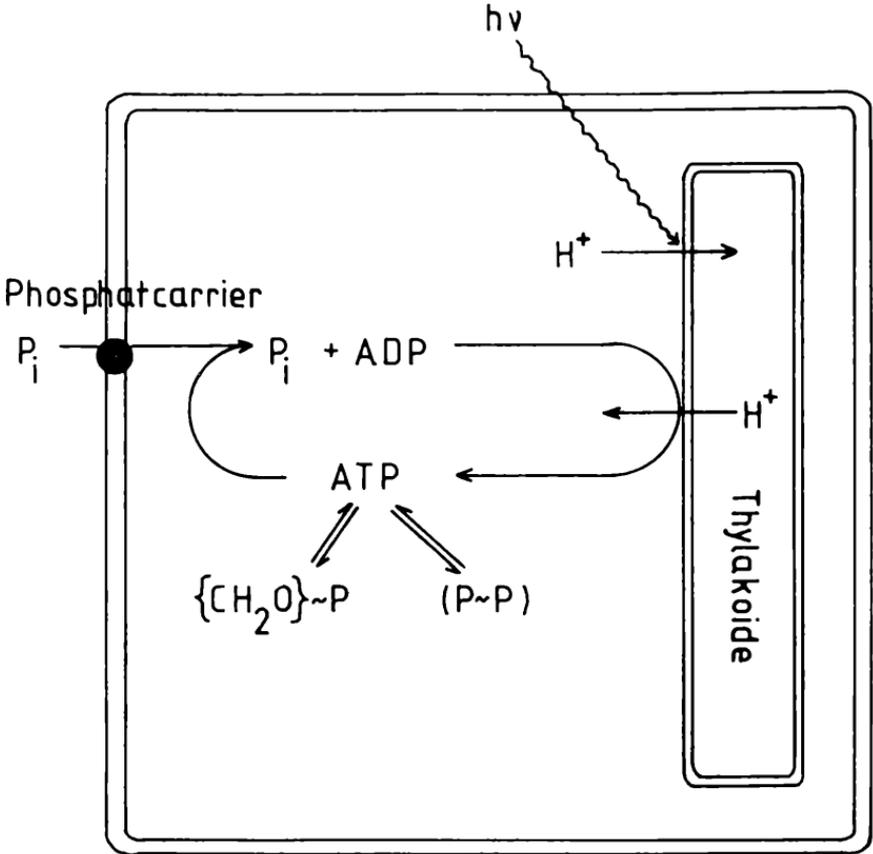


Abb. 3: Schematische Darstellung der wesentlichen Prozesse bei der Phosphatinkorporation: Nach der Translokation durch die Zellmembran wird das Phosphatmolekül in der Photophosphorylierung an der Thylakoidmembran in ATP übergeführt. Von hier kann es entweder in den Polyphosphatpool fließen oder organische Phosphorverbindungen $\{CH_2O\}P$ synthetisieren. Der größte Teil der an der Thylakoidmembran gebildeten ATP-Menge wird jedoch bei den energieverbrauchenden Prozessen in ADP und Phosphat gespalten und muß via Photophosphorylierung sofort wieder aufgebaut werden.

schon beim ersten Schritt durch die Membran Energie aufgebracht werden. In diesem Fall hängt der Translokationsschritt von einer Energiequelle ab, die vom Stoffwechsel auf die eine oder andere Weise gespeist werden muß.

Diffundiert jedoch das Phosphatmolekül durch die Zellmembran, indem es einem Konzentrationsgradienten folgt, dann muß die Photophosphorylierung an der Thylakoidmembran den nötigen Konzentrationsgradienten aufrechterhalten, der auf diese Weise den Diffusionsprozeß treibt.

Es ist daher offensichtlich, daß die Phosphattranslokation durch die Zellmembran nicht unabhängig von der nachfolgenden photosyntheti-

schen Energieumsetzung an der Thylakoidmembran untersucht werden kann. Teilweise wurde daher von einigen Autoren sogar die Photophosphorylierung mit Hilfe der Phosphatinkorporation studiert (als Review siehe SIMONIS und URBACH, 1973; GIMMLER, 1976).

Die erwartete Energieabhängigkeit der Phosphataufnahme zeigte sich schon bei den ersten Messungen, bei denen die Inkorporation im Licht und im Dunkeln bestimmt worden war (Tab. 1). Ganz offen-

Tabelle 1: Effekt von Entkopplern auf die Inkorporation von ^{32}P -Phosphat bei *Anacystis nidulans* im Licht und im Dunkeln. Phosphatkonzentration: $50 \mu\text{M}$. Temperatur: 20°C .

		Gesamtphosphor	Orthophosphat
		nMole (mg Chl. min) $^{-1}$	
Licht:	Kontrolle	21,3	6,4
	+ $30 \mu\text{M}$ CCCP	0,9	0,2
	+ $50 \mu\text{M}$ Atebrin	0,5	0,2
Dunkel:	Kontrolle	1,2	0,8
	+ $30 \mu\text{M}$ CCCP	0,4	0,2
	+ $50 \mu\text{M}$ Atebrin	0,5	0,4

sichtlich wirken sich die Vorgänge an der Thylakoidmembran entscheidend auf die Phosphatinkorporation aus. Die Wechselwirkung zwischen der Photophosphorylierung und der Phosphatinkorporation konnte auf mannigfache Weise demonstriert werden:

Die Entkoppler CCCP und Atebrin riefen eine auffallende Hemmung der Aufnahme bei niedrigen Phosphatkonzentrationen hervor (SIMONIS et al., 1974; FALKNER et al., 1974). Auch DCMU, ein Inhibitor des Photosystems II, verminderte die Phosphatinkorporation. Interessanterweise blieb der ATP-Spiegel selbst jedoch bei beträchtlich hohen DCMU-Konzentrationen relativ unverändert (SIMONIS et al., 1974). Die Autoren schlossen daraus, daß der ATP-Spiegel per se nicht ein limitierender Faktor für die Phosphataufnahme sein kann. Das Inhibierungsmuster hing aber von der Phosphatkonzentration als solcher ab. Bei einer externen Phosphatkonzentration von $700 \mu\text{M}$ beobachteten SIMONIS et al. (1974) sogar eine Stimulierung der Aufnahme durch CCCP und DCMU. Die Autoren vermuteten, daß bei höheren Phosphatkonzentrationen das Aufnahmegeschehen möglicherweise eine passive Komponente hat, die durch den Inhibitor stimuliert wird.

Messungen bei Licht verschiedener Wellenlänge zeigten weiters, daß die Phosphataufnahme nicht nur unter Bedingungen des azyklischen, sondern auch während des zyklischen Elektronentransports vor sich geht. So war die Phosphatauf-

nahme bei 717 nm, also einer Wellenlänge, bei der es zu keiner photosynthetischen Sauerstoffproduktion mehr kam, noch immer höher als die Aufnahme im Dunkeln (SIMONIS et al., 1974).

Alle diese Ergebnisse sprachen für eine Verknüpfung des Membrantranslokationsprozesses an der Cytoplasmamembran mit den energieliefernden Prozessen an der Thylakoidmembran. Ganz allgemein wurde daher zunächst vermutet, daß die Energieabhängigkeit der Aufnahme dadurch hervorgerufen wird, daß das Phosphation gegen einen Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch aktiv in die Zelle gepumpt wird (SIMONIS et al., 1974; FALKNER et al., 1974). Es mußte daher geklärt werden, ob der Translokationsschritt von Phosphat durch die Zellmembran Energie verbraucht oder ob die nachfolgende Photophosphorylierung allein die Energieabhängigkeit verursacht. Zu diesem Zweck war es nötig, die Anfangsgeschwindigkeit des Tracerinfluxes aufzulösen und in Beziehung zu den energieumsetzenden Prozessen zu setzen.

3.2 Die Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat in die Blaualgenzelle

Abbildung 4 zeigt die Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat bei der Blaualge *Nostoc muscorum*. Man erkennt, daß der Tracer im Licht zunächst mit größerer Geschwindigkeit in die Zelle einfließt. Diese Anfangsgeschwindigkeit nimmt kontinuierlich ab und geht schließlich in eine zweite, konstante Inkorporationsrate über ($\sim 30 \text{ nmole/mg Chlorophyll min}$). Ein Vergleich mit der Biosynthese-

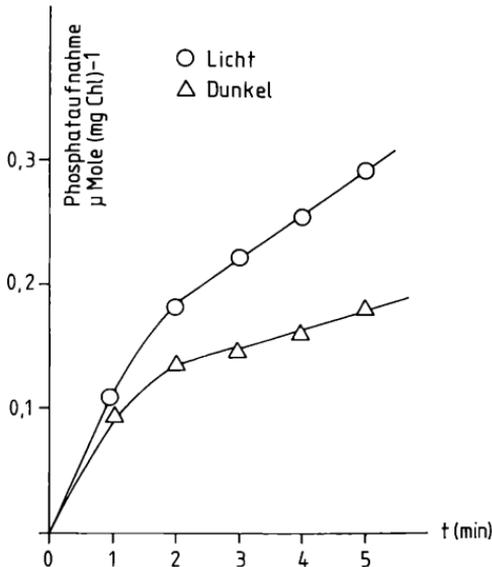


Abb. 4: Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat im Licht und im Dunkeln bei *Nostoc muscorum*. Temperatur: 25° C. 300 μM Phosphat.

rate der Phosphorbiomasse unter den Wachstumsbedingungen dieser Alge ($t_d = 10$ h, Gesamtphosphor: $24 \mu\text{mole/mg}$ Chlorophyll) zeigt, daß die zweite Inkorporationsrate praktisch genauso groß ist wie die Geschwindigkeit des Aufbaues der Phosphorbiomasse. Dieser Kurvenverlauf läßt sich am einfachsten damit erklären, daß in diesem Experiment der Influx an Phosphat von einem signifikanten Efflux begleitet wird. Inkubiert man nun die Algen mit ^{32}P -Phosphat, so mißt man mit dem Tracer zunächst nur die Geschwindigkeit des Influxes (100 nmole/mg Chlorophyll min). Mit zunehmender Inkorporationsdauer wird jedoch der endogene Phosphatpool, der an einem raschen Isotopenaustausch teilnimmt, mehr und mehr radioaktiv markiert, bis er in der gleichen spezifischen Aktivität wie die externe Phosphatlösung vorliegt. Nach wenigen Minuten ist dieser Prozeß offenbar beendet, und die weitere Inkorporation des Tracers spiegelt nun praktisch die Differenz zwischen dem Influx und dem Efflux, d. h. die Nettoaufnahme wider. Dies erklärt die Übereinstimmung dieser Rate mit der Geschwindigkeit des Aufbaues der Phosphorbiomasse.

Die Anfangsgeschwindigkeit des Tracerinfluxes ist wesentlich kleiner als die Geschwindigkeit der Umsetzung von Phosphat im Verlauf der Photosynthese. Die Kohlendioxydfixierungsrate bei *Nostoc muscorum* betrug $500 \mu\text{mole/mg}$ Chlorophyll h ; dabei wird mindestens das Dreifache an Phosphat in ATP übergeführt und wieder gespalten. Die Influxrate in Abbildung 4 war jedoch nicht größer als $6 \mu\text{mole/mg}$

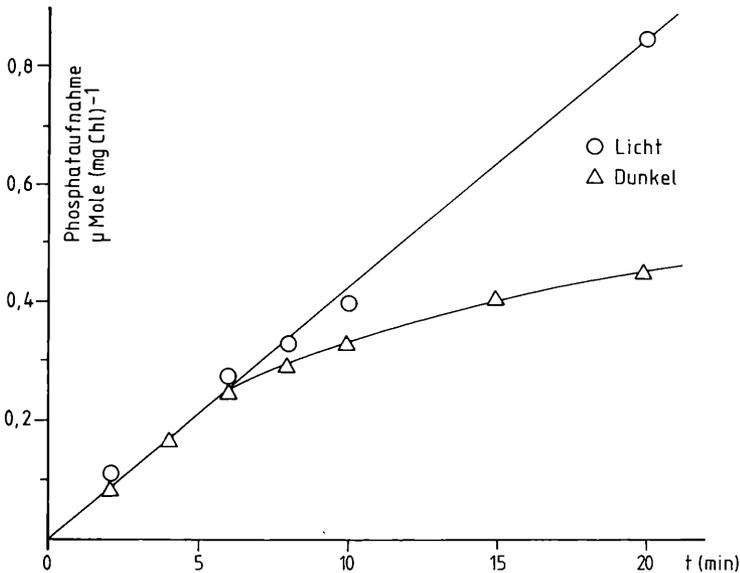


Abb. 5: Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat im Licht und im Dunkeln bei *Nostoc symbioticum*. Temperatur: 25°C . $20 \mu\text{M}$ Phosphat.

Chlorophyll h. Bei phosphatdefizienten Algen kommt es zwar zu einer Aktivierung des Phosphataufnahmesystems. Doch sind auch hier – von Extremfällen abgesehen – die Raten noch immer kleiner als die Geschwindigkeit des Einbaues von Phosphat in den ATP-Pool während der Photosynthese. Es ist daher ganz offensichtlich, daß mit dem Tracer der Schritt durch die Membran und nicht die nachfolgende Photophosphorylierung gemessen wird. Wäre dies der Fall, so würde der Tracer wesentlich schneller den endogenen ATP-Pool markieren, und der Unterschied zwischen dem Tracerinflux und der Nettophosphataufnahme wäre im steady state des Wachstums in einer statischen Kultur sehr groß.

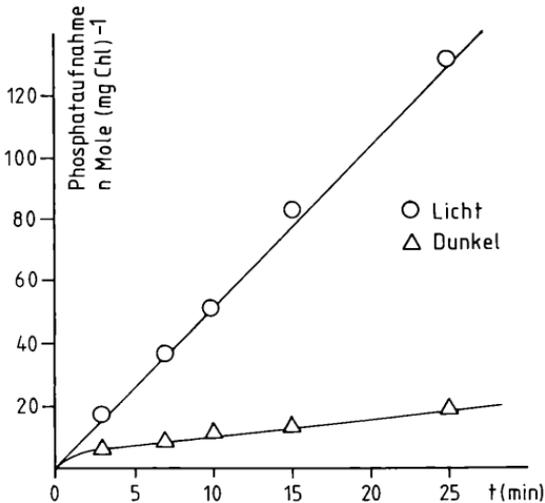


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat im Licht und im Dunkeln bei *Anacystis nidulans*. Temperatur: 25° C. 100 μM Phosphat.

Ein derartiges Bild mit zwei ineinander übergehenden Aufnahme-raten wie in Abbildung 4 konnte jedoch nicht immer beobachtet werden. In vielen Fällen ging bei *Nostoc muscorum* im Licht der ^{32}P -Phosphatinflux von Anfang an mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit vor sich, die der Nettoinkorporation entsprach. Dann ergab sich ein Bild wie beim symbiontischen Nostoc und bei *Ancystis nidulans* (Abb. 5 und 6), bei denen Gegentauchexperimente mit vormarkierten Algen gezeigt hatten, daß kein signifikanter Efflux den Phosphatinflux begleitete (Tab. 2). Hier sind zwei Erklärungen möglich:

1. Der endogene austauschbare Phosphatpool ist im Licht so klein, daß er nach wenigen Sekunden radioaktiv vorliegt: es ist daher nicht möglich, die Anfangsgeschwindigkeit ^{32}P -Phosphataufnahme zu bestimmen.
2. Die endogene Phosphatkonzentration ist viel niedriger als die im Experiment vorgegebene Außenkonzentration und daher der Influx viel größer als der Efflux. Dann wäre unter diesen Bedingungen der

Tabelle 2: Gleichzeitige Messung des Ein- und Austransportes von Phosphat bei *Anacystis nidulans*. Phosphatkonzentration: 100 μM . Temperatur: 20° C. Beleuchtung.

	nMole (mg Chl. 10 min) ⁻¹
Phosphataufnahme	76,8
Phosphatabgabe	0,1

Influx praktisch genauso groß wie die Nettoaufnahme. In diesem Fall müßten jedoch bei niedrigen externen Konzentrationen Unterschiede zwischen der Nettoaufnahme und dem Tracerinflux auftreten. Untersuchungen unter Zuhilfenahme von Chemostaten haben hier gezeigt, daß Nettoaufnahme und Influxrate tatsächlich sehr verschieden sind, wenn die externe Phosphatkonzentration sehr klein ist (GRAFFIUS, 1984). Gibt man jedoch den Tracer zu einer statischen Kultur von *Anacystis nidulans*, in der die Algen auf einer hohen Phosphatkonzentration wachsen, so kann man beobachten, daß der Tracerinflux mit konstanter Geschwindigkeit vor sich geht: die mit dem Tracer errechnete Phosphataufnahme entspricht auch hier der Biosynthese der metabolisierten Phosphorverbindungen.

Im Dunkeln ist die Anfangsgeschwindigkeit des Tracerinfluxes bei den beiden Nostoc-Arten so groß wie im Licht. Licht-Dunkel-Unterschiede lassen sich erst ab dem Zeitpunkt beobachten, ab dem im Licht die Nettoinkorporation gemessen wird. Da Experimente mit vorkmarkierten Algen gezeigt haben, daß im Dunkeln keine Nettophosphataufnahme stattfindet (FALKNER, unveröffentlicht), muß geschlossen werden, daß mit dem Tracer im Dunkeln der Isotopenaustausch verfolgt wird, der erst zum Erliegen kommt, wenn der endogene Pool markiert ist.

Ein abweichendes Erscheinungsbild zeigt sich jedoch bei *Anacystis nidulans*, das im dargestellten Fall besonders ausgeprägt ist. Hier werden sofort nach Tracerzugabe große Licht-Dunkel-Unterschiede in den Influxraten festgestellt. Dies könnte darauf hinweisen, daß der austauschbare Phosphatpool im Dunkeln bei *Anacystis nidulans* viel kleiner ist als bei den Nostoc-Arten, möglicherweise sogar hervorgerufen durch morphologische Unterschiede: Bei *Anacystis nidulans* liegen die Thylakoide sehr eng an der cytoplasmatischen Membran an, was den Isotopenaustausch mit dem Cytoplasma verzögern könnte. Dies würde erklären, warum bei dieser Alge mit ³²P-Phosphat im Licht und im Dunkeln praktisch Nettoaufnahme gemessen werden können.

Interessant ist auch die Zeitabhängigkeit der Aufnahme bei *Anacystis nidulans* bei niederen Temperaturen, bei denen bei dieser thermophilen Blaualge die Photophosphorylierung gehemmt ist. Abbildung 7 zeigt die Phosphataufnahme aus einer 100 μM Phosphatlösung, hier bezogen auf das Cytoplasmavolumen. Man sieht, daß die Aufnahme zum Erliegen

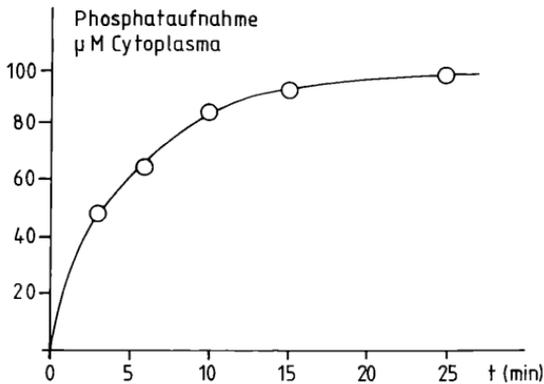


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der ^{32}P -Phosphataufnahme bei *Anacystis nidulans* bei 4°C . Phosphatkonzentration: $100\ \mu\text{M}$.

kommt, wenn die Innenkonzentration der Außenkonzentration entspricht. Offensichtlich hat das Membranpotential von -50 mV (DEWAR and BARBER, 1973) keine Auswirkung auf die Verteilung der negativ geladenen Phosphationen. Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn die Algen mit einem TRIS- H_2SO_4 -Puffer völlig kationenfrei gewaschen worden waren und die Aufnahme in diesem Medium gemessen wurde. Der Phosphattransport in die Zelle dürfte daher unter diesen Bedingungen wie bei Bakterien (HAMILTON, 1975) mit der Aufnahme von Protonen gekoppelt sein und elektroneutral vor sich gehen. Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß offenbar der Schritt durch die Membran die Neubildung der „Phosphorbiomasse“ während des Wachstums reguliert. Es erschien daher lohnend – gerade in Hinblick auf die ökologische Bedeutung dieses Prozesses für das phosphatlimitierte Wachstum –, sich mit seiner Regulation zu beschäftigen. Die Analyse dieses Prozesses beginnt mit einer Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeit dieses Membrantransportschrittes.

3.3 Die Konzentrationsabhängigkeit der Phosphataufnahmerate

3.3.1 Der Phosphatcarrier

Trägt man die Phosphattransportrate durch die Zellmembran gegen die externe Phosphatkonzentration auf, so erhält man einen Kurvenverlauf, der einer Michaelis-Menten-Hyperbel gleicht, oder sich bisweilen scheinbar aus deren mehreren zusammensetzt (SIMONIS et al., 1974). Eine doppelt reziproke Auftragung liefert daher mindestens eine Gerade, mit deren Hilfe man eine Maximalgeschwindigkeit und eine Michaelis-Konstante für den sie repräsentierenden Konzentrationsbereich errechnen kann.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Phosphataufnahme hängt von der Phosphatdefizienz der Alge ab: Kultivierung von *Anacystis nidulans*

auf phosphatfreiem Medium bewirkt eine Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und eine Verringerung der Michaelis-Konstante K_m . Die dabei beobachtete Veränderung dieser beiden Größen ist gewaltig. So kann die Michaelis-Konstante in einer statischen Kultur von *Anacystis nidulans* größer als $100 \mu\text{M}$ sein (GRAFFIUS, 1984); sie sinkt nach einem mehrmaligen Waschvorgang durch Zentrifugation und Resuspension in phosphatfreiem Medium zunächst auf $5\text{--}7 \mu\text{M}$ ab (FALKNER et al., 1974) und wird bei weiterer Kultivierung auf phosphatfreiem Medium immer kleiner (FALKNER et al., 1980), wobei schließlich Werte unter $0,10 \mu\text{M}$ erreicht werden können. (Genauere Messungen der Minimalwerte liegen noch nicht vor, da die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM sehr schwierig ist.) Bei *Nostoc muscorum* waren die Verhältnisse ähnlich. Offensichtlich vermag die Blaualge die Michaelis-Konstante an die Außenkonzentration anzupassen, was eine effiziente Phosphataufnahme über einen sehr großen Konzentrationsbereich ermöglicht.

Auch die Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme hängt in entscheidender Weise von der Phosphatversorgung und damit von der Wachstumsrate ab. Darauf soll später noch detailliert eingegangen werden. Unabhängig von dieser enormen Variabilität der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und der Michaelis-Konstante K_m kann jedoch für die Phosphataufnahme unter bestimmten experimentellen Bedingungen eine dafür charakteristische Michaelis-Konstante und Maximalgeschwindigkeit angegeben werden. Diese Analogie zu enzymatischen Prozessen wurde so interpretiert, daß das Phosphatmolekül mit Hilfe eines speziellen Proteins in der Zellmembran (eines Carriers) in die Zelle hineingeschleust wird. Dabei ist noch ungeklärt, ob hier mehrere Carrier existieren (SIMONIS et al., 1974) oder ob die apparente Michaelis-Konstante eines vorhandenen Carriers auf Grund der cytoplasmatischen Veränderungen, die mit der Phosphataufnahme einhergehen, verringert wird (FALKNER et al., 1980).

Ein „Carrier“ wird im allgemeinen dann postuliert, wenn ein Aufnahme-prozeß in gewisser Weise ein „abnormes“ Verhalten zeigt. Dabei handelt es sich im wesentlichen um drei Erscheinungsformen, die für die Existenz eines derartigen „Carriers“ sprechen:

1. Die Konzentrationsabhängigkeit des Transportes folgt nicht in einer linearen Beziehung dem Fickschen Gesetz, sondern zeigt Sättigung bei höheren Konzentrationen.
2. Die Aufnahme-rate ist höher, als auf Grund der niedrigen Löslichkeit der (meist) geladenen Verbindungen in der lipidhaltigen Membran zu erwarten ist.
3. Die Translokation durch die Membran ist hoch selektiv und kann durch strukturanaloge Verbindungen gehemmt werden.

Die drei Eigenschaften können am einfachsten damit erklärt werden, daß sich in der Membran Proteine befinden, die die Diffusion der aufzunehmenden Verbindung erleichtern und die eine bestimmte Anzahl

von Bindungsstellen besitzen. Liegt die transportierte Verbindung im Medium in hohen Konzentrationen vor, so werden diese Bindungsstellen abgesättigt, was die beobachtete Sättigungskinetik erklärt. Von den drei oben beschriebenen Kriterien sind beim Phosphattransport alle erfüllt. Die Sättigungskinetik und die Aktivierung der Aufnahme durch Inkubation auf phosphatfreiem Medium wurden schon erwähnt. Inzwischen konnte auch bewiesen werden, daß Arsenat, von dem schon seit längerer Zeit bekannt ist, daß es die Phosphatinkorporation hemmt, tatsächlich nur auf die Translokation von Phosphat, nicht aber auf die nachfolgende Photophosphorylierung einwirkt (GRAFFIUS, 1984), etwa auf Grund der Bildung instabiler arsenylierter Intermediate.

3.3.2 Die cytoplasmatische Orthophosphatkonzentration

Viele Untersuchungen über den Mechanismus der Phosphatinkorporation beschäftigen sich mit der Frage, ob der Phosphattransport durch die Membran aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten vor sich geht oder passiv einem Konzentrationsgefälle folgt. Wenn die intrazelluläre Phosphatkonzentration höher ist als die äußere im Inkubationsmedium, ist eine Aufnahme nur unter Energieaufwand möglich. Eine Auftrennung des von den Algen absorbierten ^{32}P -Phosphates in den anorganischen und den metabolisierten Anteil (durch Extraktion mit Isobutanol-Benzol in Gegenwart von schwefelsaurem Molybdat) zeigte, daß von Anfang an Tracer in einen anorganischen Orthophosphatpool eingebaut wurde (Tab. 1). Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um die Größe dieses „Phosphatpools“ bei *Anacystis nidulans* zu bestimmen.

Die kolorimetrische Bestimmung des Orthophosphatgehaltes eines mit 10%iger Trichloressigsäure extrahierten Algenmaterials, das auf hohen Phosphatkonzentrationen in statischer Kultur gezüchtet worden war, ergab für die intrazelluläre Phosphatkonzentration umgerechnet Werte zwischen 1 und 30 „mM“. Nun ist aber nicht einzusehen, warum eine Methode, die für die Orthophosphatbestimmung in Gewässern ungeeignet ist (RIEGLER, 1968), für die Messung des intrazellulären Phosphatgehaltes weniger problematisch sein soll. Schließlich sind es die hauptsächlich von Algen stammenden, leicht hydrolysierbaren, organischen Phosphorverbindungen, die bei limnochemischen Orthophosphatbestimmungen die bekanntesten Probleme verursachen. Auch besteht die Möglichkeit, daß das Orthophosphat wie bei Mitochondrien intrazellulär als Hydroxylapatit ausfällt oder extrazellulär an der Zellwand während eines Calcifizierungsprozesses gleichzeitig mit Calciumkarbonat gebunden wird. Tatsächlich übersteigt in Gegenwart von EDTA bei Inkorporationsmessungen mit ^{32}P -Phosphat die „cytoplasmatische Konzentration“ nicht mehr die extrazelluläre (Tab. 3).

BORNEFELD und WEIS (1981) versuchten daher, den Orthophosphatgehalt zu bestimmen, indem sie beleuchtete Algen rasch mit flüssigem Stickstoff abtöteten und – nach einem Lyophilisierungsschritt – die Phosphormetabolite mit einem Tris- H_2SO_4 -Puffer extrahierten. Eine

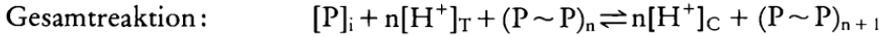
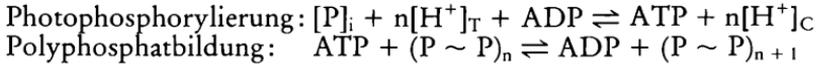
Tabelle 3: Inkorporation von Phosphat aus drei verschiedenen Konzentrationen im Medium in Abwesenheit von bivalenten Kationen bei *Anacystis nidulans*. Für die experimentellen Bedingungen siehe: FALKNER et al., 1976b.

Phosphatkonzentration im Medium (μM)	Phosphataufnahme (μM im Cytoplasma)	
	Gesamtphosphat	Orthophosphat
10	92	11
50	185	52
100	288	80

darauf folgende dünn-schicht-chromatographische Abtrennung des Orthophosphates von den organischen Phosphorverbindungen sollte dann die erwähnten Probleme vermeiden. Bei dieser Methode kann freilich nicht ausgeschlossen werden, daß vorhandene Phosphatasen die extrahierten organischen Phosphorverbindungen teilweise hydrolysieren und auf diese Weise einen höheren cytoplasmatischen Orthophosphatpool vortäuschen. Die von den Autoren angegebenen Werte in der Größenordnung von 15 mM erscheinen tatsächlich etwas hoch.

KALLAS und DAHLQUIST (1981) haben mit einer ^{31}P -kernmagnetischen Resonanzanalyse (NMR) den intrazellulären pH-Wert bei *Anacystis nidulans* bestimmt, wobei sie sich der pH-abhängigen Verschiebung der Orthophosphatbande bedienten. Aus den Spektren läßt sich eine Phosphatkonzentration im Cytoplasma von etwa 1,3 mM abschätzen. Dieser Wert ist zwar schon wesentlich niedriger als der von BORNEFELD und WEIS angegebene; er ist jedoch mit Sicherheit nicht der minimal mögliche Wert, da für die NMR-Messungen sehr dicht gepackte Zellsuspensionen von *Anacystis nidulans* benötigt werden. Unter diesen Bedingungen, bei denen die Lichtintensität und daher auch die Photosyntheserate sehr verringert ist, ist auch der pH-Gradient zwischen beiden Seiten der Thylakoidmembran viel kleiner als bei hohen Lichtintensitäten. Nun dürfte gerade die cytoplasmatische Orthophosphatkonzentration bei Blaualgen ganz entscheidend von diesem pH-Gradienten abhängen, wie unten ausgeführt werden soll. Außerdem waren KALLAS und DAHLQUIST gezwungen, die Algen während der NMR-Messungen mit hohen EDTA-Konzentrationen mindestens zwei Stunden lang zu inkubieren, was vermutlich das cytoplasmatische Orthophosphat-ATP-Polyphosphat-Gleichgewicht und damit den steady state der Phosphatinkorporation perturbierte, der von bivalenten Kationen abhängt. Die Meinungen über die cytoplasmatischen Phosphatkonzentrationen bleiben daher beim gegenwärtigen Wissensstand kontroversiell, und es erscheint zielführender, auf der Basis einer einfachen Berechnung über diese Größe zu spekulieren. Zu diesem Zweck muß man davon ausgehen, daß das Orthophosphat in der Blaualgenzelle einerseits via Photophosphorylierung im Gleichgewicht mit dem ATP steht, wobei der pH-Gradient an der Thylakoidmembran die Energie für diesen Prozeß

liefert. Andererseits steht auf Grund einer Reaktion, die von dem Enzym Polyphosphatkinase (HOFFMANN-OSTENHOF, 1957) katalysiert wird, das ATP auch im Gleichgewicht mit den Polyphosphaten. Die beiden intrazellulären Gleichgewichtsreaktionen lassen sich demnach wie folgt formulieren:



(Eine etwaige Wirkung von Phosphatasen wurde in diesem einfachen Schema nicht berücksichtigt. Sie würde in der Gesamtreaktion die Anzahl der translozierten Protonen pro geknüpfter Polyphosphatbindung scheinbar verringern.)

Da $(P \sim P)_n$ und $(P \sim P)_{n+1}$ thermodynamisch gesehen die gleiche Aktivität besitzen, hängt die cytoplasmatische Phosphatkonzentration $[P]_i$ im Gleichgewicht nur ab vom pH-Gradienten über die Thylakoidmembran, der Anzahl n der Protonen, die pro inkorporiertem Phosphat durch die Thylakoidmembran transloziert werden, und der Gleichgewichtskonstanten der Polyphosphatbildung aus Phosphat, die so groß ist wie jene der ATP-Bildung ($[H^+]_C$ und $[H^+]_T$ sind die Protonenkonzentrationen im Cytoplasma und im Thylakoidraum). Die cytoplasmatische Phosphatkonzentration läßt sich daher (unter Vernachlässigung des elektrischen Terms in der „proton motive force“) vereinfacht mit der Beziehung abschätzen:

$$[P]_i = \frac{1}{K} \left(\frac{[H^+]_C}{[H^+]_T} \right)^n \quad (4)$$

Sie ist daher für einen gegebenen pH-Gradienten bei einer bestimmten Lichtintensität konstant.

Die Gleichgewichtseinstellung wird durch externe Phosphatkonzentrationen und durch die Aufnahme nicht beeinflusst, da ja der Schritt durch die Membran viel langsamer ist als die nachfolgende Photophosphorylierung. Alles aufgenommene Phosphat wird sofort metabolisiert, wobei sich sowohl organische Phosphorverbindungen als auch Polyphosphate bilden. Dabei hängt das jeweilige Ausmaß der Polyphosphatbiosynthese von der Aktivität des Phosphatcarriers ab: Transportiert er mehr Phosphat, als die Zelle zum Aufbau der organischen Phosphorverbindungen braucht, dann wandert der Überschuß sofort in den Polyphosphatpool, der ja mit dem ATP im Gleichgewicht steht. Die Polyphosphate fungieren dabei als Puffer, der die cytoplasmatische Phosphatkonzentration bei einer gegebenen Lichtintensität konstant hält.

Interessant ist nun die Größenordnung der cytoplasmatischen Phosphatkonzentration, die sich nach Gleichung (4) für verschiedene pH-Gradienten und n -Werte berechnen läßt. Die Anzahl der translozierten Protonen pro gebildetem ATP dürfte bei Spinatchloroplasten

drei sein (TREBST, 1974). Geht man nun davon aus, daß die Anzahl der Protonen, die pro gebildeter Polyphosphatbindung durch die Thylakoidmembran transloziert werden muß, gemäß dem oben beschriebenen Schema weitgehend von dieser H^+ /ATP-Stöchiometrie bestimmt wird, so errechnet sich für einen pH-Gradienten von 4,0 mit $\log K = -5,28$ bei einem $n = 3$ eine cytoplasmatische Phosphatkonzentration von $0,19 \mu M$. Man kann weiters leicht ausrechnen, daß bei niedrigeren Lichtintensitäten und pH-Gradienten die Phosphatkonzentration bis in den millimolaren Bereich ansteigt.

Das oben durchgeführte Rechenbeispiel zeigt, daß es theoretisch möglich ist, daß die cytoplasmatische Orthophosphatkonzentration sehr geringe Werte annehmen kann, wobei man im Extremfall fast auf Konzentrationen kommen kann, die in Algenkulturen überschritten werden müssen, damit Phosphat in die Zelle einströmt und somit eine Nettoaufnahme möglich ist. In diesem Fall wäre ein aktiver Transport nicht nötig. Wenn man von der einfachsten Arbeitshypothese ausgehen will, muß man daher zunächst versuchen, die Phosphataufnahme bei Blaualgen mit Hilfe des Konzepts einer erleichterten Diffusion zu beschreiben. In diesem Fall ist weiters die Annahme eines Carriers, der in beide Richtungen mit gleicher Maximalgeschwindigkeit transportiert, das einfachste Modell.

Es erscheint daher sinnvoll, zunächst dieses Modell einer Prüfung zu unterziehen. Dabei soll jedoch besonders die „steady-state-Nettoinkorporation“ berücksichtigt werden, die für limnochemische Fragestellungen wesentlich interessanter ist als die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme.

3.3.3 Die Nettosphosphataufnahme

Die Nettosphosphataufnahme bei Blaualgen müßte im einfachsten Fall eines elektroneutralen Phosphat-Protonen-Kotransports der Gleichung

$$J_P = V_{\max} \left(\frac{[P]_e}{K_e + [P]_e} - \frac{[P]_i}{K_i + [P]_i} \right) \quad (5)$$

folgen, in der K_e und K_i die jeweiligen Michaelis-Konstanten für den Influx und den Efflux sind (WILLBRANDT und ROSENBERG, 1961). Man muß sich jedoch darüber im klaren sein, daß diese Beziehung aus drei Gründen nur eine idealisierte Beschreibung der tatsächlich ablaufenden Vorgänge ermöglicht; sie berücksichtigt nicht

1. einen möglichen Leakage von organischen Phosphorverbindungen (KUENZLER, 1970),
2. die mögliche Funktion zusätzlicher Carrier bei höheren externen Phosphatkonzentrationen sowie
3. mögliche Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik, die auf Grund der Assoziation des Carriers mit Membranstrukturen auftreten (VINCENT und THELLIER, 1983).

Aus Gleichung (5) läßt sich das Phosphatkonzentrationsverhältnis B zwischen dem Cytoplasma und dem Medium im Gleichgewicht ($J_P = 0$) berechnen: $B = [P]_i/[P]_e = K_i/K_e$. Weiters ist $B = 10^{m \cdot \text{pH}_{\text{cyt}}}$, wobei m die Anzahl der kotransportierten Protonen ist. Demnach können sowohl K_i als auch $[P]_i$ (unter Verwendung von Gleichung (4)) in Gleichung (5) substituiert werden, und man erhält nach einer einfachen Umformung für die Nettophosphatinkorporation:

$$J_P = V_{\max} \left(\frac{[P]_e}{K_e + [P]_e} - \frac{1}{K_e K 10^{(n \cdot \text{pH}_{\text{thyl}} + m \cdot \text{pH}_{\text{cyt}}) + 1}} \right) \quad (6)$$

Damit wird unmittelbar ersichtlich, daß bei einer konstanten externen Phosphatkonzentration im Fall der Gültigkeit dieser Gleichung die Nettophosphatinkorporation in erster Näherung nur von den pH-Gradienten als Variablen abhängt, wobei besonders der Gradient an der Thylakoidmembran eine wichtige Rolle spielen sollte, der unter den üblichen Versuchsbedingungen viel größer ist als jener an der Cytoplasmamembran. Dies würde die Energieabhängigkeit der Phosphatinkorporation auf einfache Weise erklären; dabei sollte sich jede Manipulation am pH-Gradienten an der Thylakoidmembran so auf diese Energieabhängigkeit auswirken, daß die durch Gleichung (6) beschriebene Relation zwischen V_{\max} , K_e , $[P]_e$ und n gewahrt bleibt. Damit ergab sich eine erste Möglichkeit, dieses Modell zu testen, und man stand vor der Notwendigkeit, diesen Gradienten zu bestimmen und in Beziehung zur Phosphataufnahme zu setzen. Welche Wege dabei beschritten wurden, soll im folgenden kurz geschildert werden.

3.4 Die Messung des pH-Gradienten

Nach der chemiosmotischen Hypothese (MITCHELL, 1966) ist beim photosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran ein Wasserstoffcarrier (z. B. Plastochinon) beteiligt, der einen Protonentransfer in den Thylakoidraum ermöglicht. Zu diesem Zweck reagiert er mit dem Elektron und einem Proton an der Cytoplasmaseite der Thylakoidmembran und überträgt das Elektron auf einen Reaktionspartner, der sich an der Innenseite der Thylakoide befindet. Gleichzeitig wird an dieser Stelle das Proton wieder abgegeben und wandert somit in den Thylakoidraum. Auf diese Weise entsteht ein pH-Gradient zwischen dem Cytoplasma und dem Thylakoidraum. Die auf diese Weise gebildete elektrochemische Potentialdifferenz zwischen den beiden Seiten der Thylakoidmembran liefert die Energie für die ATP-Synthese, die durch einen Proteinkomplex katalysiert wird, der ebenfalls mit der Thylakoidmembran assoziiert ist und der aus einem hydrophoben Membransektor CF_0 und einem an der Außenseite der Membran befindlichen Kopplungsfaktor CF_1 besteht. Durch diesen Proteinkomplex fließen die Protonen, dem Gradienten folgend, wieder aus dem Thylakoidraum heraus und treiben dabei die ATP-Bildung voran.

Nach MITCHELL setzt sich die auf Grund des Protonenflusses in den Thylakoidraum entstandene elektrochemische Potentialdifferenz $\Delta \bar{\mu}_H$ (die sogenannte „proton motive force“) aus zwei Gliedern zusammen, aus einem chemischen und einem elektrischen:

$$\Delta \bar{\mu}_H = RT \ln \frac{[H^+]_T}{[H^+]_C} + F\Delta\psi.$$

$\Delta\psi$ ist die elektrische Potentialdifferenz zwischen der inneren und der äußeren Phase (ein $\Delta\psi$ von 59 mV entspricht einem Protonenverhältnis $[H^+]_T/[H^+]_C$ von 10).

Um nun einen Zusammenhang zwischen der Phosphataufnahme und der proton motive force studieren zu können, müßte man die Abhängigkeit der Phosphataufnahme von $\Delta \bar{\mu}_H$ messen. Leider läßt sich nicht die gesamte proton motive force, sondern nur der pH-Gradient auf einfache Weise bei lebenden Blaualgen bestimmen. Nun ist bei Chloroplasten $2,3 RT\Delta pH \gg F\Delta\psi$, und auch bei Blaualgen wird angenommen (BINDER, 1982), daß der elektrische Term gegenüber dem chemischen vernachlässigt werden kann. Man kann daher davon ausgehen, daß der pH-Gradient zwischen beiden Seiten der Thylakoidmembran in befriedigender Weise ein Maß für die „Energetisierung“ an der Thylakoidmembran darstellt und für die gewünschten Untersuchungen herangezogen werden kann.

Zur Messung des pH-Gradienten in Blaualgen wurde eine Methode adaptiert, die von HELDT et al. (1973) erfolgreich bei Chloroplasten verwendet worden war. Diese Methode beruht auf Befunden, die mit isolierten Thylakoiden gewonnen worden waren. Hier konnte man beobachten, daß die oben beschriebene Ansäuerung im Licht zu einer ungleichen Verteilung der schwachen Base Methylamin innerhalb und außerhalb der Thylakoide führte, und zwar aus folgendem Grund: Die ungeladene Form des Amins wandert so lange durch die Membran, bis sich auf beiden Seiten der Membran die gleiche Konzentration eingestellt hat. Ist nun der pH-Wert auf beiden Seiten der Membran gleich groß, so wird sich am Konzentrationsverhältnis nichts ändern, da das Amin in beiden Fällen im gleichen Ausmaß protoniert wird. Liegt aber ein pH-Gradient vor, so assoziiert das Amin Protonen in unterschiedlicher Weise an den Orten mit verschiedenen pH-Werten, bis im steady state folgende Gleichgewichtsbedingung erfüllt ist:

$$\frac{[H^+]_{\text{innen}}}{[H^+]_{\text{außen}}} = \frac{[RNH_3^+]_{\text{innen}}}{[RNH_3^+]_{\text{außen}}}.$$

Der pH-Gradient läßt sich daher aus der Verteilung der Base abschätzen: Je niedriger der pH-Wert in den Thylakoiden ist, desto stärker wird das Amin akkumuliert. Die gleichen Überlegungen gelten auch für schwache Säuren (z. B. DMO), deren Einsatz sich jedoch empfiehlt, wenn der pH-Gradient in einer Organelle gemessen wird, die alkalischer als das Inkubationsmedium ist. Auch hier gilt:

$$\frac{[\text{H}^+]_{\text{innen}}}{[\text{H}^+]_{\text{außen}}} = \frac{[\text{DMO}^-]_{\text{außen}}}{[\text{DMO}^-]_{\text{innen}}}$$

Bei Blaualgen ist die Situation komplizierter, da nicht nur ein, sondern zwei Reaktionsräume vorliegen: ein Cytoplasma- und ein Thylakoidraum. Es war jedoch zu erwarten, daß der Protonenfluß vom Cytoplasma in den Thylakoidraum die pH-Werte beider Räume in entgegengesetzter Weise verändert, wie dies auch bei Chloroplasten beobachtet worden war. Hier konnte der Protonenfluß vom Stroma in den Thylakoidraum in ein und demselben Experiment verfolgt werden, indem die Alkalisierung des Stromes mit DMO und die Acidifizierung des Thylakoidraumes mit Methylamin gemessen wurde (HELDT et al., 1973).

Diese Methode konnte nun im großen und ganzen übernommen werden. (Die Details einer vereinfachten Berechnung, bei der zunächst der pH-Wert im Cytoplasma mit DMO bestimmt wird, worauf die Methylaminmenge, die sich bei diesem pH-Wert in dem Cytoplasma befindet, abgeschätzt werden kann und nach Subtraktion von der gesamten aufgenommenen Methylaminmenge den Anteil ergibt, der sich im Thylakoidraum befindet und mit dem dann auch für diesen der pH-Wert kalkuliert wird, werden auf Anfrage vom Autor zugesandt.)

Es stellte sich heraus, daß bei *Anacystis nidulans* (FALKNER et al., 1976a) und *Nostoc muscorum* (GRAFFIUS, unveröffentlicht) Beleuchtung tatsächlich die erwarteten Effekte auf die pH-Werte im Cytoplasma und im Thylakoidraum ausübt (Tab. 4). Man sieht, daß es im Licht wie bei Chloroplasten tatsächlich zu einer Alkalisierung des Cytoplasmas und einer Ansäuerung des Thylakoidraumes kommt.

Tabelle 4: pH-Werte im Cytoplasma- und Thylakoidraum im Licht und im Dunkeln bei *Anacystis nidulans*.

	pH _{Cyt}	pH _{Thyl}	ΔpH
Licht	7,7	4,5	3,2
Dunkel	7,4	5,2	2,2

Abbildung 8 veranschaulicht den Effekt von CCCP auf den pH-Gradienten, der in Gegenwart des Entkopplers praktisch völlig zusammenbricht. Diese Messungen, mit denen übrigens zum ersten Mal innerhalb einer lebenden Zelle ein pH-Gradient bestimmt worden war, zeigen nicht nur in der photosynthetischen Energieumsetzung eine enge Verwandtschaft zwischen Blaualgen und Chloroplasten. Sie erlauben auch bei Blaualgen die Abschätzung der cytoplasmatischen Phosphatkonzentration bei verschiedenen Lichtintensitäten und damit unmittelbar die Überprüfung der Gleichung (5).

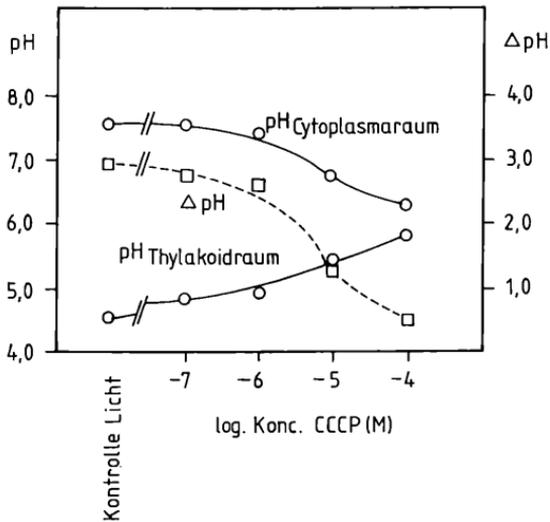


Abb. 8: Effekt von CCCP auf die pH-Werte des Cytoplasma- und Thylakoidraumes bei *Anacystis nidulans* im Licht. Für die Inkubationsbedingungen siehe: FALKNER et al. (1974).

3.5 Die Abhängigkeit der Phosphataufnahme vom pH-Gradienten zwischen beiden Seiten der Thylakoidmembran

Wird die Phosphataufnahme bei einem pH-Wert im Medium gemessen, der etwa so groß ist wie jener im Cytoplasma, dann läßt sich die Nettophosphatinkorporationsrate vereinfacht mit Hilfe der Beziehung

$$J_P = V_{\max} \left(\frac{[P]_e}{K_e + [P]_e} - \frac{1}{K_e K 10^{n \cdot \text{pH}_{\text{thyl}} + 1}} \right)$$

beschreiben, die sich unmittelbar aus Gleichung (6) ergibt, wenn der Term $m\Delta\text{pH}_{\text{cyt}}$ gegenüber dem Term $n\Delta\text{pH}_{\text{thyl}}$ vernachlässigt wird. Die Gültigkeit dieser Gleichung kann nun einem ersten Test unterzogen werden, indem die Phosphataufnahme in Abhängigkeit vom pH-Gradienten gemessen und mit dem Kurvenverlauf verglichen wird, der sich aus obiger Gleichung mit der K_e und der V_{\max} errechnen läßt, die für die Phosphatkonzentration unter den experimentellen Bedingungen charakteristisch sind. Für die Anzahl n der translozierten Protonen pro inkorporiertem Phosphat können Werte erwartet werden, die nahe bei drei liegen. Eine mögliche Variabilität von n läßt sich nun so berücksichtigen, daß die obige Kurve für verschiedene n -Werte berechnet wird. Stimmt eine der so gewonnenen Kurven mit den experimentellen Daten überein, so kann dies als erster Hinweis für die Brauchbarkeit des vorgeschlagenen Konzepts betrachtet werden.

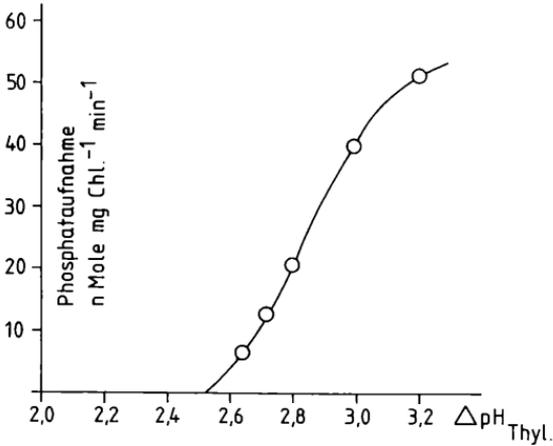


Abb. 9: Abhängigkeit der Phosphatinkorporation vom pH-Gradienten an der Thylakoidmembran bei *Anacystis nidulans*. Phosphatkonzentration: 900 μM . Die Kurve wurde mit Gleichung (6), unter Verwendung von $V_{\text{max}} = 60$ nMole (mg Chl. min), $K_c = 100$ μM und einem n -Wert von 3,3, berechnet. Der pH-Wert des Mediums war 7,6.

Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der Phosphataufnahme vom pH-Gradienten an der Thylakoidmembran. Dabei wurden die Aufnahmeraten mit phosphatunverarmten Algen bei einer hohen Phosphat- außenkonzentration im Medium gemessen. Die Variation des pH-Gradienten erfolgte mit Hilfe der Lichtintensität. In dem vorliegenden Experiment ergab sich, daß die Meßwerte tatsächlich auf der Kurve liegen, die sich mit Hilfe der obigen Gleichung berechnen läßt, wenn für n ein Wert von 3,3 eingesetzt wird und für die K_c und die V_{max} diejenigen Größen verwendet werden, die für diesen physiologischen Zustand repräsentativ sind. Man sieht, daß der auf diese Weise erhaltene Wert für $n = 3,3$ der theoretisch zu erwartenden Stöchiometrie recht nahe kommt. Darüber hinaus kann auf der Basis der hier entwickelten Vorstellungen die Energieabhängigkeit der Nettophosphatinkorporation erklärt werden.

Diese erste Übereinstimmung der experimentellen Daten mit der vorgeschlagenen Funktion ermutigte zu einer weiteren Verwendung dieses Modells, wobei einige Eigenschaften des hier beschriebenen Mechanismus ausgenutzt werden konnten, auf die in der Folge eingegangen werden soll. Dabei kann man sich die Tatsache zunutze machen, daß dieses Konzept nicht nur für einen Phosphat-Protonen-Kotransport, sondern ganz allgemein für jeden Transport gilt, bei dem das Phosphatmolekül entweder mit einem Kation – der Differenz der chemischen Potentiale beider Ionen folgend – passiv in die Zelle einfließt oder gegen ein Anion ausgetauscht wird. Auch in diesem allgemeinen Fall entspricht nämlich B dem Verhältnis der Phosphatkonzentrationen im Cytoplasma und Medium im Gleichgewicht. Kommt es dabei unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu einem Kotransport mit einem Kation, dessen

Außenkonzentration weit über der Innenkonzentration liegt, oder zu einem Austausch mit einem Anion, dessen Innenkonzentration höher als die Außenkonzentration ist, so kann die externe Phosphatkonzentration im Gleichgewicht beträchtlich unter die cytoplasmatische absinken.

3.6 Die Analyse der Konzentrationsabhängigkeit der Nettophosphataufnahmerate unter besonderer Berücksichtigung linearer Fluß-Kraft-Beziehungen

Die Triebkraft X , die den Nettophosphattransport durch die Zellmembran bewirkt, ist ganz allgemein

$$X = 2,3 RT \log \frac{[P]_e}{[P]_i} B,$$

wobei $B = K_i/K_e$, wie oben ausgeführt, die Verteilung der Phosphatmoleküle zwischen Cytoplasma und Medium im Gleichgewicht widerspiegelt. Für Limnologen ist naturgemäß besonders der Konzentrationsbereich in der Nähe des Gleichgewichts interessant, bei dem die externe Phosphatkonzentration gleich $[P]_i/B$ ist und daher die Triebkraft der Aufnahme Null wird. Denn erst wenn diese Gleichgewichtskonzentration überschritten wird, kann die Nettophosphataufnahme ablaufen, und sie wird umso stärker ablaufen, je höher die externe Phosphatkonzentration den Wert $[P]_i/B$ übersteigt. Nach den Gesetzmäßigkeiten der Nichtgleichgewichtsthermodynamik ist in unmittelbarer Nähe des Gleichgewichts die Nettoaufnahmerate J_P der Triebkraft X proportional und daher

$$J_P = 2,3 L_P RT \log \frac{[P]_e}{[P]_i} B.$$

Der Proportionalitätsfaktor L_P ist ein phänomenologischer Koeffizient, der angibt, auf welche Weise sich Änderungen der Triebkraft auf den Phosphatfluß in die Zelle auswirken. Da bei einer gegebenen Lichtintensität die Innenkonzentration $[P]_i$ auf Grund der Gleichgewichtsreaktion mit den Polyphosphaten konstant ist und auch nicht von Änderungen der externen Phosphatkonzentration beeinflusst werden kann und auch B für einen bestimmten pH-Wert (bzw. eine gegebene Ionenzusammensetzung) im Medium konstant ist, hängt in der Nähe des Gleichgewichts die Nettoaufnahmerate nur mehr vom Logarithmus der externen Phosphatkonzentration als Variablen ab. Eine Auftragung der bei den verschiedenen externen Phosphatkonzentrationen gemessenen Aufnahmeraten gegen den Logarithmus dieser Konzentrationen müßte daher in Gleichgewichtsnähe eine Gerade ergeben, deren Neigung $2,3 RT L_P$ ist und die die $\log-[P]_e$ -Achse bei dem Wert schneidet, bei dem die Nettoaufnahme Null ist. Der Achsenabschnitt auf der $\log-[P]_e$ -Achse stellt demnach einen Schwellenkonzentrationswert dar, den die externe Phosphatkonzentration überschreiten muß, damit eine Nettoaufnahme eintritt. Mit einer derartigen Auftragung einer Messung der Konzen-

trationsabhängigkeit der Aufnahme rate müßte es daher theoretisch möglich sein, die für das Ausmaß des Algenwachstums so entscheidende Gleichgewichtskonzentration zu ermitteln. In der Praxis läßt sich die lineare Beziehung zwischen der Aufnahme rate und dem Logarithmus der externen Phosphatkonzentration jedoch nur dann anwenden, wenn sie sich bis in einen Konzentrationsbereich erstreckt, in dem die Bestimmung von Nettoaufnahme rates meßtechnisch möglich ist, d. h. wenn lange genug ohne Änderung der externen Phosphatkonzentration inkubiert werden kann.

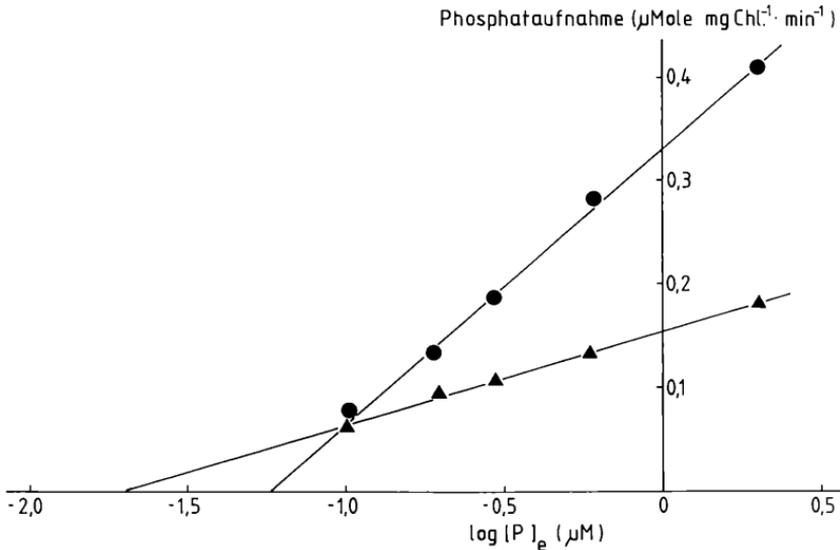


Abb. 10: Semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Phosphatinkorporation bei *Nostoc muscorum* in Abhängigkeit der Kultivierung auf phosphatfreiem Medium (▲ 9 Stunden, ● 26 Stunden). Temperatur: 25° C. Beleuchtung.

Abbildung 10 zeigt eine semilogarithmische Auftragung der Phosphataufnahme bei *Nostoc muscorum*. Die Messungen wurden vorgenommen, nachdem die Algen unterschiedlich lange unter phosphatfreien Bedingungen gezüchtet worden waren. Bei *Anacystis nidulans* ergab sich ein ähnliches Bild (FALKNER et al., 1984b). Auffallend ist, daß die Phosphataufnahme bei diesen morphologisch doch sehr unterschiedlichen Blaualgen vom Logarithmus der externen Phosphatkonzentration über einen wesentlich weiteren Konzentrationsbereich linear abhängt, als dies üblicherweise bei Enzymreaktionen nach den Regeln der Nichtgleichgewichtsthermodynamik der Fall ist. Danach hätte sich nur für eine logarithmische Konzentrationsdifferenz von $2,3(\log [P]_e - \log ([P]_i/B)) \ll 1$ Linearität zeigen dürfen. Es war daher zu untersuchen, ob der mit Hilfe der logarithmischen Auftragung extrapolierte Konzentrationswert, der im folgenden als „A-Wert“ bezeichnet werden soll, tatsächlich identisch

ist mit der Schwellenphosphatkonzentration, die überschritten werden muß, damit es zu einer Aufnahme kommen kann. Dies testeten FALKNER et al. (1984a) auf folgende Weise: *Anacystis nidulans* wurde in statischer Kultur gezüchtet, wobei jedoch die vorgegebene Phosphatkonzentration im Verhältnis zu den übrigen Nährstoffen nicht allzu hoch war. Nachdem alles verfügbare Phosphat aufgenommen worden und somit das Wachstum auf Grund der Phosphatlimitierung zum Erliegen gekommen war, wurde mit Hilfe einer kinetischen Messung der A-Wert bestimmt und mit der im Medium verbliebenen Phosphatkonzentration verglichen. (Diese geringe Restkonzentration wurde mit Hilfe einer Parallelkultur ermittelt, in der Algen unter identischen Bedingungen, jedoch auf ^{32}P -Phosphat wuchsen.) In beiden Fällen ergab sich praktisch die gleiche Größe: Das Aufnahmeexperiment erbrachte einen A-Wert von 20 nM, im Medium ließen sich 19 nM nachweisen. Diese weitgehende Übereinstimmung erlaubt die Schlußfolgerung, daß die Aufnahme der linearen logarithmischen Beziehung über einen weiten Konzentrationsbereich folgt.

Es mußte nun auf der Basis des hier diskutierten Mechanismus der Nachweis erbracht werden, daß ein derartiges, von den Gesetzmäßigkeiten der Nichtgleichgewichtsthermodynamik abweichendes Verhalten theoretisch möglich ist. Dies soll wieder mit Hilfe der Grundgleichung (5) geschehen, die (nach Multiplikation des Zählers und Nenners des zweiten Terms mit $K_e/K_i = 1/B$) in die folgende modifizierte Form übergeführt werden kann:

$$J_P = V_{\max} \left(\frac{[P]_e}{[P]_e + K_e} - \frac{[P]_i/B}{[P]_i/B + K_e} \right).$$

Dabei wird in diesem Rechenbeispiel der Wert für $[P]_i/B$ konstant gesetzt und die Außenkonzentration variiert ($[P]_i/B$ sei $0,05 \mu\text{M}$). Als Michaeliskonstante K_e und Maximalgeschwindigkeit V_{\max} mögen Werte verwendet werden, die für phosphatlimitiert wachsende Algen repräsentativ sind. Die mit diesen Größen errechneten Raten sollen dann gleich gegen den Logarithmus der jeweiligen, in Gleichung (5) verwendeten Phosphatkonzentration aufgetragen werden.

Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, daß sich bei dieser Vorgangsweise ein Kurvenlauf errechnen läßt, der tatsächlich durch einen langen linearen Bereich ausgezeichnet ist, wobei auch hier der Achsenabschnitt dem Logarithmus von $[P]_i/B$ entspricht. Auf einen prinzipiell ähnlichen Sachverhalt hat schon ROTTENBERG (1978) in einer theoretischen Arbeit über die Behandlung der energetischen Kopplung in Mitochondrien und Chloroplasten mit Hilfe der irreversiblen Thermodynamik hingewiesen: Folgt die Substrataufnahme einer erleichterten Diffusion und liegt eine konstante Innenkonzentration in der Größenordnung der Michaelis-Konstante unabhängig von Variationen der Außenkonzentration vor, dann zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Nettoinkorporationsrate und der Transportaffinität bis zu einem mindestens 20fachen Konzentrationsverhältnis. Bei Berücksichtigung einer Abweichung von

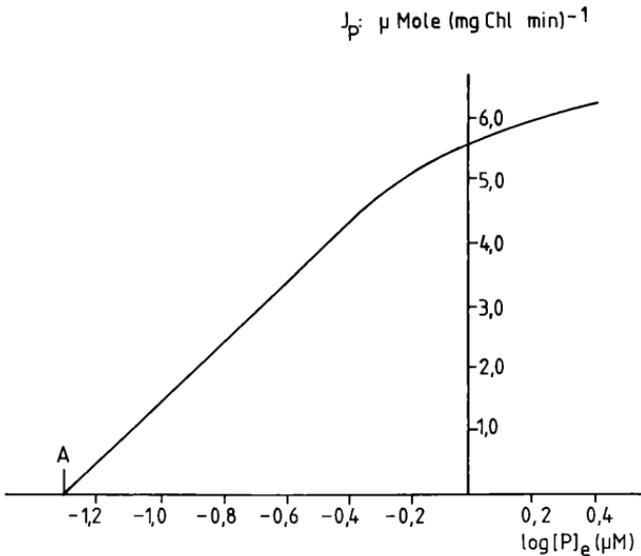


Abb. 11: Semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme-rate, nach Gleichung (5) mit $P_i/B = 0,05 \mu\text{M}$, $K_c = 0,15 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 9 \mu\text{Mole (mg Chl. min)}^{-1}$ berechnet.

15 % errechnet sich die Linearität sogar für 80 % des gesamten Geschwindigkeitsbereiches. Lange vor der theoretischen Behandlung dieses Phänomens durch ROTTENBERG (1978) und VAN DER MEER et al. (1980) hat übrigens THELLIER schon 1970 vorgeschlagen, die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme-rate generell mit Hilfe einer semilogarithmischen Auftragung zu analysieren. FALKNER et al. (1984a) haben aus diesem Grund diese Art der Auftragung „Thellier-plot“ genannt. THELLIER hat freilich die semilogarithmische Auftragung auch bei Prozessen verwendet, bei denen die theoretische Rechtfertigung nicht so einsichtig ist wie bei der Phosphataufnahme (z. B. der Aufnahme von Kationen).

Für den hier diskutierten Fall läßt sich auch ableiten, wie die Proportionalitätskonstante L_p von der Aktivität des Phosphatcarriers abhängt. Folgt man der Prozedur ROTTENBERGS (1978) und setzt in Gleichung (5) nach Division des Zählers und Nenners durch K_c bzw. K_i die Brüche $[P]_e/K_c$ und $[P]_i/K_i$ gleich P' und P'' , dann ist

$$J_p = V_{\max} \left(\frac{P'}{P' + 1} - \frac{P''}{P'' + 1} \right).$$

Für Werte von $[P]_e$ und $[P]_i$ nahe an K_c und K_i kann man unter Verwendung einer logarithmischen Reihe, die in diesem Fall nach dem ersten Glied abgebrochen werden kann, die beiden Brüche durch logarithmische Ausdrücke ersetzen, wobei man sich der Approximation:

$$\frac{P}{P+1} \approx \frac{1}{2} + \frac{\ln P}{4}$$

bedienen kann. Dieses Verfahren ergibt die Funktion:

$$J_P \approx \frac{V_{\max}}{4} \ln \frac{[P]_e K_i}{[P]_i K_e} \approx 2,3 \frac{V_{\max}}{4} \log \frac{[P]_e}{[P]_i} B.$$

Wenn die Triebkraft der Aufnahme $X = RT \ln [P]_e B/[P]_i$ ist, errechnet sich unmittelbar auf Grund von:

$$J_P = \frac{V_{\max} X}{4 RT} = L_P X,$$

für $RTL_P = V_{\max}/4$ und für 2,3 RTL_P ungefähr $V_{\max}/2$. Die Neigung 2,3 RTL_P soll im folgenden der Einfachheit halber mit L_K bezeichnet werden. Diese kleine Umformung zeigt unmittelbar, wie die Neigung der Geraden in der semilogarithmischen Auftragung die Maximalgeschwindigkeit des Carriers widerspiegelt. Da die Maximalgeschwindigkeit von der Phosphatverarmung abhängt, nimmt die Neigung in Abbildung 10 mit zunehmender Kultivierungsdauer auf phosphatfreiem Medium zu.

Man kann mit Hilfe der oben beschriebenen Prozedur, bei der die Nettophosphataufnahme nach Gleichung (5) berechnet und gegen den Logarithmus der Phosphatkonzentration aufgetragen wird, leicht zeigen, daß der Achsenabschnitt auf der $\log-[P]_e$ -Achse praktisch die Gleichgewichtskonzentration liefert, solange die Michaelis-Konstante nicht mehr als fünfmal so groß wie der Wert für $[P]_i/B$ ist. Dies scheint bei phosphatlimitiert wachsenden Algen, bei denen die Michaelis-Konstante nahe bei $0,1 \mu\text{M}$ liegt, ganz offensichtlich der Fall zu sein.

Übersteigt die Michaelis-Konstante K_e den Wert für $[P]_i/B$ um mehr als das Zehnfache, dann zeigt die semilogarithmische Auftragung der Gleichung (5) noch immer einen langen linearen Bereich. Der extrapolierte Achsenabschnitt auf der $\log-[P]_e$ -Achse beginnt jedoch mehr und mehr von der tatsächlichen Gleichgewichtskonzentration abzuweichen (in Abbildung 12 wurde der Kurvenverlauf mit einem K_e zu $[P]_i/B$ -Verhältnis von 100 berechnet). Für limnologische Untersuchungen ist diese Einschränkung der Anwendung der logarithmischen Auftragung jedoch ohne Relevanz: Die Michaelis-Konstante kann die cytoplasmatische Phosphatkonzentration nur dann um das 100- bis 1000fache übersteigen, wenn die externe Phosphatkonzentration sehr hoch ist, da ja Blaualgen ganz offensichtlich die Michaelis-Konstante auf die externe Phosphatkonzentration einstellen. Dann aber ist das Algenwachstum nicht mehr phosphatlimitiert und eine Analyse des Phosphataufnahmesystems uninteressant. In der Praxis tritt ein derartiger Fall, bei dem die externe Orthophosphatkonzentration im mikromolaren Bereich vorliegen muß (d. h. mehr als $30 \mu\text{g/l}$) außerdem meist nur kurzzeitig auf (z. B. nach der Frühjahrsdurchmischung) und geht sehr rasch in einen

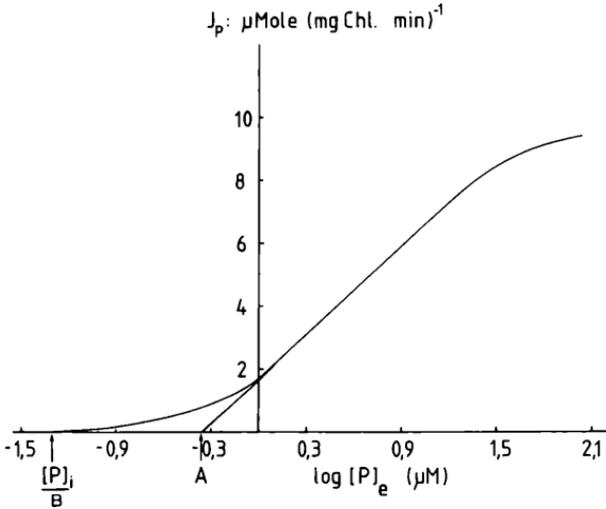


Abb. 12: Semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme-rate, nach Gleichung (5) mit $P_i/B = 0,05 \mu\text{M}$, $K_c = 5 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 10 \mu\text{Mole (mg Chl. min)}^{-1}$ berechnet.

Zustand über, in dem die externe Phosphatkonzentration sehr gering ist. Dies führt unmittelbar zu einem Absinken der Michaelis-Konstanten und damit zu Bedingungen, unter denen die Voraussetzungen für eine sinnvolle Anwendung der Fluß-Kraft-Beziehung erfüllt sind.

Auffallend ist die offensichtliche Tendenz bei phosphatlimitierten Algen, die Michaelis-Konstante und die cytoplasmatische Phosphatkonzentration so aufeinander abzustimmen, daß eine lineare Beziehung zwischen der Absorptionskraft und dem Aufnahmefluß noch weit entfernt vom Gleichgewicht beobachtet werden kann. Dieses Phänomen, das noch weitere Untersuchungen verdient, erinnert an STUCKIS bioenergetisches Optimierungsprinzip bei Mitochondrien, das er „Optimierung durch Linearität“ nannte (STUCKI, 1983). Er postulierte, daß die Evolution der oxydativen Phosphorylierung hin zur Linearität durch dieses Prinzip dominiert gewesen sein könnte, da beim linearen Operationsmodus die Energie wesentlich effizienter umgesetzt wird. Eine ähnliche Situation könnte auch bei der Phosphatinkorporation vorliegen. Auch hier war die lineare Beziehung noch weit entfernt vom Gleichgewicht gültig. In der Tat gewährleisten die beiden Voraussetzungen, die zu diesem Zweck erfüllt werden müssen, die ökonomisch günstigste Ausnützung des Carrierproteins und des phosphorylierenden pH-Gradienten an der Thylakoidmembran:

1. Die externe Phosphatkonzentration liegt nicht allzuweit über dem Wert für $[P]_i/B$.
2. Die Michaelis-Konstante des Carriers ist nicht mehr als fünfmal so groß wie die extrazelluläre Phosphatkonzentration.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die semilogarithmische Auftragung der Aufnahme­rate gegen die zugesetzte Phosphat­konzentration bei phosphatlimitierten Algen einen Kurvenverlauf ergibt, der in erster Näherung durch einen langen linearen Bereich ausgezeichnet ist. Die Neigung der resultierenden Geraden spiegelt die Maximal­geschwindigkeit des Phosphat­carriers wider. Der Abschnitt auf der $\log-[P]_e$ -Achse, der als A-Wert bezeichnet wurde, gibt für den Fall, daß $K_e \leq 5 [P]_i/B$ ist, eine „Schwellenkonzentration“ an, die überschritten werden muß, damit eine Nettoaufnahme möglich ist. Der A-Wert ist nur dann identisch mit der cytoplasmatischen Phosphatkonzentration, wenn ein Protonen-Phosphat-Kotransport vorliegt und zwischen Cytoplasma und Wachstumsmedium kein pH-Gradient existiert.

Es war jedoch auffallend, daß die A-Werte, die bei phosphatlimitiert wachsenden Algen bestimmt worden waren, unter den theoretisch zu erwartenden cytoplasmatischen Gleichgewichtskonzentrationen lagen. Offensichtlich findet bei phosphatlimitierten Algen – anders als bei Algen, die in einer statischen Kultur gezüchtet worden waren – nicht ein einfacher Kotransport mit einem Proton statt. Hier könnte entweder ein Kotransport mit einem Kation oder ein Austausch mit einem Anion vorliegen, wobei im ersten Fall die externe Konzentration des Kations größer als die cytoplasmatische und im zweiten Fall die interne Konzentration des Anions größer als die externe sein müßte.

3.7 Analyse des phosphatlimitierten Algenwachstums mit Hilfe der Fluß-Kraft-Beziehung

Wie schon in Kapitel 2 ausgeführt wurde, hatten Chemostatversuche mit den verschiedensten Algenarten ergeben, daß sich die Wachstumsrate in den Eigenschaften des Aufnahmesystems widerspiegelt: Die Maximal­geschwindigkeit der Phosphataufnahme, mit Hilfe einer doppelt reziproken Auftragung ermittelt, ist umso kleiner, je schneller die Algen wachsen. Die Veränderung der Wachstumsrate sollte sich daher bei einer semilogarithmischen Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit auf die Neigung der resultierenden Geraden auswirken. Dies ist ganz deutlich ersichtlich in einem Aufnahmeexperiment mit *Anacystis nidulans*, bei dem die Alge vorher mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in einem phosphatlimitierten Chemostaten kultiviert worden war (Abb. 13). Hier nahm die Neigung der Geraden mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit ab. Hingegen hatte die Wachstumsrate, wie erwartet, keinen Einfluß auf den A-Wert, da alle Kulturen in diesem Experiment der gleichen Lichtintensität ausgesetzt waren und offenbar bei allen Wachstumsgeschwindigkeiten der gleiche pH-Gradient über der Thylakoidmembran aufgebaut wird. Da in einer kontinuierlichen Kultur die steady-state-Inkorporationsrate von Phosphat leicht bestimmt werden kann, ist es möglich, auf der Basis der hier verwendeten Fluß-Kraft-Beziehung die Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumsrate im Chemostat neu zu berechnen: Unter Verwendung der

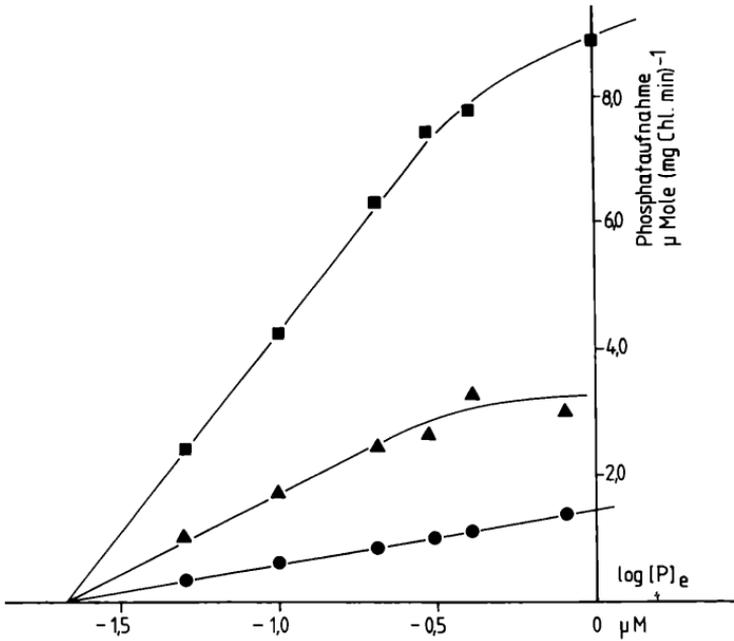


Abb. 13: Semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit von der Phosphatinkorporation bei *Anacystis nidulans* in einer kontinuierlichen Kultur bei 38° C. Wachstumsraten: \bullet 0,168 h^{-1} ; \blacktriangle 0,103 h^{-1} ; \blacksquare 0,063 h^{-1} (aus: GRAFFIUS, 1984).

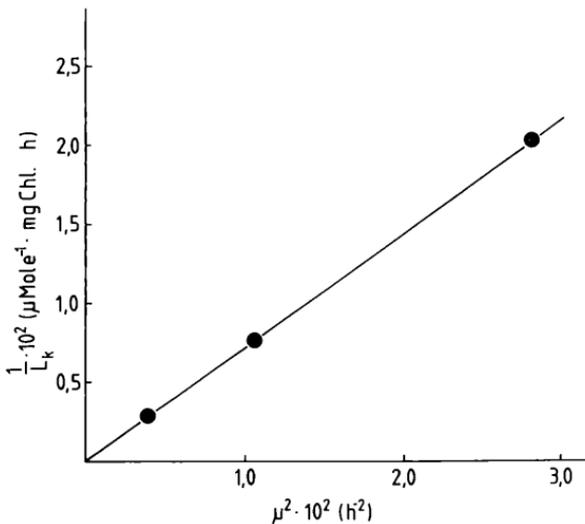


Abb. 14: Darstellung der linearen Beziehung zwischen $(L_k)^{-1}$ und μ^2 bei *Anacystis nidulans*.

Beziehung zwischen der Wachstumsrate und der steady-state-Aufnahmegeschwindigkeit $J_P = \mu P_{\text{tot}}$ kann mit $J_P = L_k \log [P]_e / A$ die externe Phosphatkonzentration als Funktion von μ ausgedrückt werden:

$$[P]_e = A 10^{n P_{\text{tot}} / k} \quad (7)$$

Die Abhängigkeit der Gesamtphosphormenge P_{tot} von der Wachstumsrate μ läßt sich nach der DROOPSchen Gleichung (3):

$$P_{\text{tot}} = P_o \frac{\mu_{\text{max}}}{\mu_{\text{max}} - \mu}$$

berechnet, wobei P_o die Subsistenzquote (subsistence quota) für Phosphor ist. Zwischen L_k und μ existiert eine einfache quadratische Beziehung (Abb. 14):

$$\frac{1}{L_k} = a\mu^2$$

Oben eingesetzt, erhält die Gleichung (7) somit die endgültige Form:

$$[P]_e = A 10^{a P_o n \mu_{\text{max}} / (\mu_{\text{max}} - \mu)}$$

Der so berechnete Kurvenverlauf ist in Abbildung 15 dargestellt, wobei zu Vergleichszwecken auch die Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumsrate eingezeichnet wurde, die sich ergibt, wenn die Aufnahmeraten in ähnlicher Weise mit Gleichung (5) kalkuliert werden. Naturgemäß unterscheidet sich die mit Gleichung (5) gewonnene Kurve von der mit Hilfe der logarithmischen Beziehung bestimmten umso mehr, je weiter die Michaelis-Konstante den A-Wert übersteigt. Man sieht jedoch, daß in dem hier dargestellten Fall ein Konzentrationsunterschied von nur wenigen Nanomolen pro Liter darüber entscheidet, ob die Algen wachsen können oder nicht. Die vorliegenden Phosphatkonzentrationen lie-

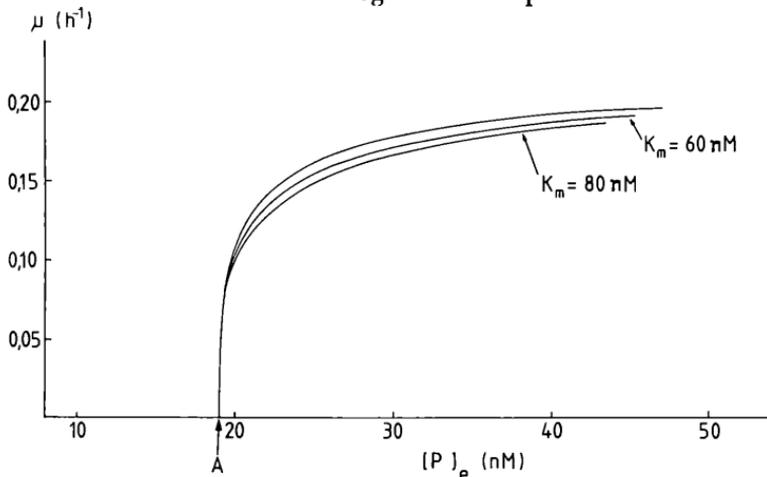


Abb. 15: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der externen Phosphatkonzentration: Die Berechnung der Kurven erfolgte nach der bioenergetischen Beziehung (oberste Kurve) und Gleichung (5) (die beiden unteren Kurven) mit den in der Abbildung angegebenen K_m -Werten, unter Verwendung der Daten aus Abb. 2 und 13.

gen weit unter der Nachweisgrenze der Molybdatmethode. Messungen mit Chemostatkulturen, in denen die Algen auf ^{32}P -Phosphat gezüchtet worden waren, zeigten, daß bei den drei verschiedenen Wachstumsraten in Abbildung 13 praktisch die gleiche externe Phosphatkonzentration von $20 \text{ nM} \pm 3$ vorlag. Ganz offensichtlich waren die Unterschiede in der Phosphatkonzentration im Medium so gering, daß sie mit dieser Methode nicht erfaßt werden konnten, was zumindest den in Abbildung 15 präsentierten Daten nicht widerspricht.

Bei Gültigkeit des hier beschriebenen Mechanismus der Phosphataufnahme kann die Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumsrate unter phosphatlimitierten Bedingungen auf keinen Fall mit der MONOD-schen Gleichung beschrieben werden (siehe Abschnitt 2.1). Bekanntlich beruht die MONODsche Gleichung (2) auf der Annahme, daß die Nettoaufnahme des limitierenden Nährstoffes der Michaelis-Menten-Gleichung folgt und daß eine direkte Kopplung zwischen der Nährstoffaufnahme und dem Wachstum existiert. Nun läuft die Phosphataufnahme im Chemostaten unter Bedingungen ab, bei denen das externe Phosphat praktisch im Gleichgewicht mit dem cytoplasmatischen steht. In der Nähe des Gleichgewichts verliert jedoch die Michaelis-Menten-Gleichung ihre Gültigkeit. Die Nettoaufnahme – und damit zusammenhängend das Wachstum – kommt demnach nicht erst zum Erliegen, wenn die Phosphatkonzentration im Medium Null ist, sondern schon, wenn die Gleichgewichtskonzentration geringfügig unterschritten wird.

Für Limnologen wäre nun die Beantwortung der Frage interessant, ob das hier beschriebene Modell auch auf andere Algen anwendbar ist. BROWN and BUTTON (1979) haben bei *Selenastrum capricornutum* beobachtet, daß die Algen unter einer Schwellenkonzentration von 10 nM Phosphat nicht mehr wuchsen. Es ist nun durchaus möglich, daß die Algen bei dieser Konzentration zu wachsen aufhörten, weil auch hier in ähnlicher Weise eine Gleichgewichtskonzentration erreicht wurde und nicht, weil bei dieser Konzentration der Phosphatcarrier ein- und ausgeschaltet wird, wie die Autoren vermuteten.

Bevor jedoch die Charakterisierung des Aufnahmesystems eukaryontischer Algen in Angriff genommen wird, erscheint es aus limnologischer Sicht sinnvoll, das Phosphataufnahmeverhalten von Freilandalgen zu testen und zu den vorliegenden Phosphatkonzentrationen in Beziehung zu setzen. Dabei interessiert besonders die Länge des linearen Bereiches in der hier verwendeten semilogarithmischen Auftragung und ein Vergleich der extrapolierten A-Werte mit der im See vorliegenden Phosphatkonzentration.

4. Das Phosphataufnahmeverhalten von Freilandalgen

4.1 Die Phosphataufnahme während einer Algenblüte im Obertrumer See

Der Obertrumer See war für einen Test der Fluß-Kraft-Beziehung besonders geeignet. Hier bewirkte die Frühjahrsdurchmischung zunächst

ein signifikantes Ansteigen der Phosphatkonzentration, deren Änderung selbst mit den herkömmlichen analytischen Methoden gut verfolgt werden konnte. Diese Erhöhung der Phosphatkonzentration verursachte eine Blüte von *Oscillatoria rubescens*, deren massenhafte Vermehrung abbrach, nachdem alles verfügbare Orthophosphat aufgebraucht worden war. In der weiteren Folge blieb ein Teil der Blaualgenpopulation erhalten, die praktisch ausschließlich aus *Oscillatoria* bestand, wobei offenbar das Algenwachstum auf Grund des diffusen Nährstoffeintrages den Verlust durch Sedimentation über einen langen Zeitraum zu kompensieren vermochte. Hier war dann die Orthophosphatkonzentration sehr niedrig. Man konnte daher mit Einschränkungen die Situation im Frühjahr mit einer statischen Kultur und später mit einer kontinuierlichen Kultur vergleichen.

Die Messungen wurden im Jahre 1977 mit experimentellen Vorarbeiten begonnen und in den folgenden drei Jahren fortgesetzt. Folgende Methode hat sich dabei als brauchbar erwiesen. Eine genau abgemessene Menge von Seewasser wurde in Inkubationsgefäße gefüllt, in denen sich schon eine ^{32}P -Phosphatlösung der gewünschten Konzentration befand. Dann wurde nach einer halben Minute ein Aliquot entnommen und durch ein Glasfaserfilter filtriert. Diese kurze Zeitdauer reichte bei den hohen Aufnahmearten der Freilandpopulation aus, um den endogenen austauschbaren Phosphatpool zu markieren. Nach der Inkubation des verschlossenen Reaktionsgefäßes im See wurde der Aufnahme-prozeß nach der gewünschten Zeit durch eine zweite Filtration eines weiteren Aliquots beendet. Aus der Differenz zwischen den beiden Aufnahmewerten konnte, nach Division durch die Zeitdifferenz zwischen der ersten und zweiten Filtration, die Nettoinkorporationsrate berechnet werden, die über eine lange Zeitdauer konstant blieb. Abbildung 16 zeigt die Zeitabhängigkeit der Aufnahme durch *Oscillatoria*

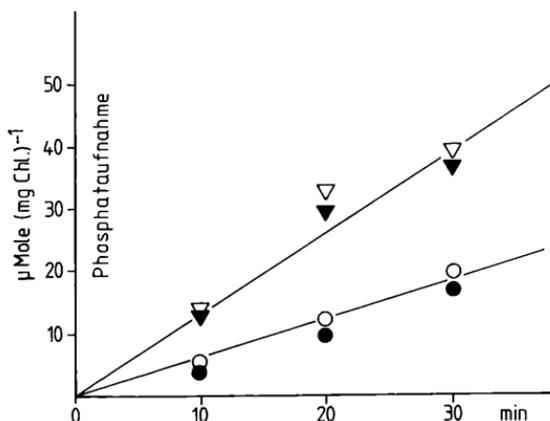


Abb. 16: Zeitabhängigkeit der Inkorporation von ^{32}P -Phosphat durch *Oscillatoria rubescens* aus einer Konzentration von 0,1 μM (Kreise) und 10 μM (Dreiecke). Leere Symbole: Gesamtphosphat. Volle Symbole: Metabolisiertes Phosphat. Für die experimentellen Bedingungen siehe: STRASSER, 1982.

rubescens. Man sieht, daß das Phosphat auch hier mit konstanter Geschwindigkeit in die Algen einfließt, wie dies bei kultivierten Algen im Laboratorium der Fall ist. Die Auftrennung des inkorporierten Phosphats in den metabolisierten und den nichtmetabolisierten Anteil durch Ausschütteln des Phosphormolybdatkomplexes mit Isobutanol-Benzol erbrachte keinen Hinweis auf einen Einbau von Tracer in einen großen cytoplasmatischen Orthophosphatpool, in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus, nach dem das aufgenommene Phosphat sofort metabolisiert wird.

Die semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahmezeit zeigte eine Schar von Geraden, die auch bei Freilandalgen durch einen langen linearen Bereich ausgezeichnet waren (Abb. 17). Es war somit auch unter diesen Bedingungen möglich, mit Hilfe einer solchen graphischen Auftragung aus dem Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden einen A-Wert und aus ihrer Neigung die Maximalgeschwindigkeit der Phosphataufnahme abzuschätzen. Interessant war nun die Beantwortung der Frage, ob eine Beziehung zwischen dem so bestimmten A-Wert, der Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme und der im See vorliegenden Phosphatkonzentration erkennbar ist. Tabelle 5

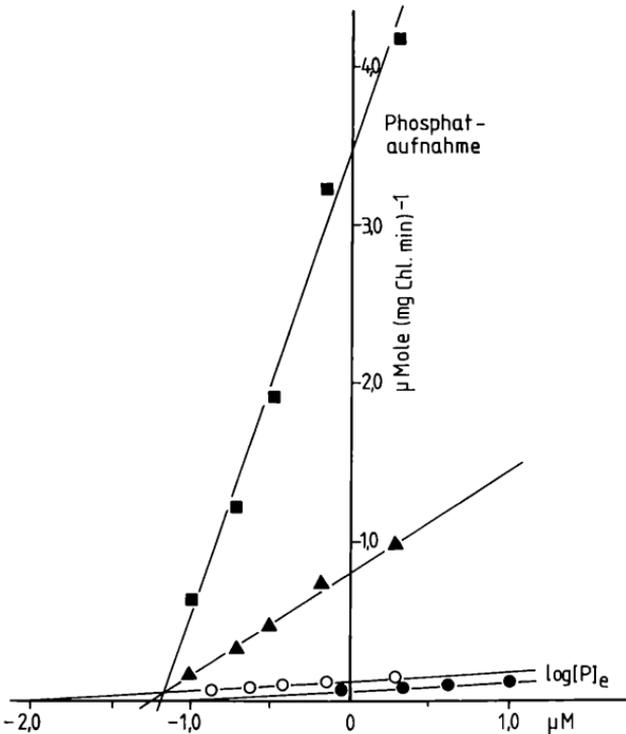


Abb. 17: Semilogarithmische Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Inkorporation von Phosphat durch *Oscillatoria* am Obertrumer See, gemessen im Jahr 1980.

● 9. 4., ○ 15. 4., ▲ 26. 5., ■ 2. 6 (aus: STRASSER, 1982).

Tabelle 5: Charakterisierung des Phosphataufnahmesystems von Algenpopulationen im Obertrumer See und Attersee (Aus: FALKNER et al., 1984b).

Datum	A-Wert (nM)	Phosphat- konzentration im See (nM)	L_k	Mittlerer Chlorophyll- gehalt ($\mu\text{g/l}$)
Obertrumer See				
1979: 20. 7.	55	56	1500	
24. 7.	64	90	450	
31. 8.	50	60	500	
3. 10.	100	34	2280	
1980: 13. 5.	5	15	37	
13. 6.	60	10	925	
7. 7.	70	15	1360	
7. 8.	35	10	960	
1981: 4. 4.	182	740	43	12
9. 4.	140	250	63	17
15. 4.	12	30	65	18
7. 5.	8	< 10	25	16
26. 5.	56	< 10	635	11
2. 7.	70	< 10	2915	6
Attersee				
1979: 26. 7.	65	67	852	

erlaubt einen Vergleich von repräsentativen Daten, die während eines Zeitraums von drei Jahren gewonnen worden waren. Im Jahr 1979, als mit den Messungen zu einem Zeitpunkt begonnen worden war, bei dem die Algen unter „chemostatähnlichen“ Bedingungen vorlagen, fluktuierete die externe Phosphatkonzentration in einem relativ engen Konzentrationsbereich um den extrapolierten A-Wert. Dabei fiel auf, daß die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} des Carriers abnahm, wenn die externe Phosphatkonzentration über den A-Wert anstieg und zunahm, wenn sie unter den A-Wert abfiel.

Ein ähnliches Bild zeigte sich im Jahr 1980, wobei ein abweichendes Verhalten nur am 13. 5. auftrat. Hier waren die Maximalgeschwindigkeit der Phosphataufnahme, der A-Wert und die Orthophosphatkonzentration sehr klein. Möglicherweise lagen die Algen einerseits auf Grund der vorhergehenden Frühjahrsdurchmischung und dem damit verbundenen Anstieg der Phosphatkonzentration im See noch im phosphatunverarmten Zustand vor, hatten aber andererseits zum Zeitpunkt der Messung gerade das gesamte verfügbare Orthophosphat aufgenommen. Um diese Hypothese zu testen, wurde im Jahr 1981 noch früher mit den Messungen begonnen. Tatsächlich ließen sich im Monat April noch sehr hohe Phosphatkonzentrationen nachweisen, während die Maximalgeschwindigkeit

sehr geringe Werte annahm. Dabei war auch der extrapolierte „A-Wert“ zunächst ebenfalls auffallend hoch (4. 4. 1981), wobei freilich nicht ausgeschlossen werden kann, daß hier der oben diskutierte Fall vorliegt, bei dem der A-Wert die Gleichgewichtskonzentration nicht mehr widerspiegelt, weil die Michaelis-Konstante des Phosphatcarriers sehr groß ist.

Zur Klärung dieser Frage können nur vergleichende Studien im Laboratorium weiterhelfen, bei denen der Übergang der Algen vom phosphatunverarmten zum phosphatlimitierten Zustand simuliert wird. Es ist jedoch klar ersichtlich, daß die Algen im See innerhalb eines großen Konzentrationsbereiches in der Lage waren, das Absinken der Phosphatkonzentration durch eine entsprechende Verringerung des A-Wertes zu kompensieren. Auf diese Weise können sie über längere Zeit eine ausreichende Phosphataufnahme in Gang halten.

Informativ sind daher die gleichzeitig vorgenommenen Messungen der Chlorophyllwerte, die jeweils einen Mittelwert aus einer Reihe vertikal entnommener Proben darstellen. Solange die externen Phosphatkonzentrationen über dem A-Wert lagen, nahm der Gesamtchlorophyllgehalt im Epilimnion zu. Als jedoch die Orthophosphatkonzentration unter den A-Wert abfiel, kam es zu einer Verringerung der Algenbiomasse, die mit einer Abnahme der Chlorophyllwerte einherging. Offensichtlich konnte das Algenwachstum ab diesem Zeitpunkt die Verluste durch Sedimentation nicht mehr kompensieren. In der darauf folgenden Periode der immer größer werdenden Phosphatlimitierung nahm die Maximalgeschwindigkeit wieder wie in den vorhergehenden Jahren dramatisch zu, und die Phosphatkonzentration im See war entweder nicht nachweisbar oder schwankte um den A-Wert.

Es ist daher klar ersichtlich, daß sich das trophische Niveau, soweit es vom Orthophosphatangebot bestimmt ist, in den Eigenschaften des Aufnahmesystems widerspiegelt. Ein eutrophes Gewässer dürfte demnach dadurch charakterisiert sein, daß wenigstens einmal im Verlauf eines Jahres die externe Phosphatkonzentration weit über den A-Wert ansteigt. Dies führt zu einem massiven Einstrom von Phosphat und damit zur Polyphosphatbildung, was die weitere Vermehrung derjenigen Algen begünstigt, die die meisten Polyphosphate speichern können. Dann ist ein verstärktes Wachstum dieser Algen selbst dann noch gewährleistet, wenn die externe Phosphatkonzentration auf geringste Werte abgesunken ist. Man kann sich leicht vorstellen, daß unter diesen Bedingungen diejenigen Algen, die die meisten Polyphosphate speichern konnten, andere Algen überwuchern können, die eine geringere Speicherkapazität besitzen.

4.2 Abschließende Bemerkungen über offene Probleme

Man kann nun von der Arbeitshypothese ausgehen, daß bei eukaryontischen Algen ähnliche Verhältnisse vorliegen. Dann wäre für die aus zahlreichen Arten zusammengesetzte Algenpopulation in einem oligo-

trophen Gewässer zu erwarten, daß die externe Phosphatkonzentration ständig um den A-Wert fluktuiert. Das Aufnahmesystem müßte sehr nahe am thermodynamischen Gleichgewicht operieren, und der Nettosphattransport in die Zelle bliebe daher gering. Die Daten einer Messung, die am oligotrophen Attersee vorgenommen worden war, stehen nicht im Widerspruch zu dieser Hypothese. Auch hier konnte ein langer linearer Bereich in der semilogarithmischen Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahmerate beobachtet werden. Dabei war der extrapolierte A-Wert praktisch genauso groß wie die gemessene Orthosphatkonzentration (Tab. 5).

Nun sind bei einem eukaryontischen Organismus, bei dem ja die Thylakoide nicht frei im Cytoplasma liegen, die Verhältnisse sicherlich ganz anders als bei Blaualgen. Es ist jedoch denkbar, daß Gleichung (5) in einer verallgemeinerten Form ihre Gültigkeit behält. Dann sollte auch hier ein Schwellenwert $[P]_e = [P]_i K_c/K_i$ existieren, der überschritten werden muß, damit es zu einer Nettosphataufnahme kommt, und man kann einen langen linearen Bereich bei einer semilogarithmischen Auftragung der Aufnahmerate gegen die Phosphatkonzentration erwarten, wenn dieser Schwellenwert in der Größenordnung der Michaelis-Konstante liegt.

Aber auch bei Blaualgen gibt es noch viele Fragen, die einer Klärung bedürfen. Hier interessiert nicht nur, ob das aufgenommene Phosphatmolekül unter Phosphatmangelbedingungen mit einem Kation kotransportiert oder gegen ein Anion ausgetauscht wird. Schließlich hängt es von den Konzentrationen der am Phosphattransport beteiligten Ionen im Cytoplasma und Medium ab, wie weit die externe Phosphatkonzentration im Gleichgewicht unter die cytoplasmatische absinken kann. Untersuchenswert ist auch die im See beobachtete Variabilität der Maximalgeschwindigkeit der Phosphataufnahme und des A-Wertes. Erste Laboratoriumsmessungen der Abhängigkeit der Phosphataufnahme vom pH-Gradienten an der Thylakoidmembran mit *Anacystis nidulans* hatten auch bei der Anzahl der Protonen, die pro inkorporiertem Phosphatmolekül durch die Thylakoidmembran transportiert werden, Hinweise auf eine gewisse Variabilität erbracht. Hier ist nun denkbar, daß die Wirkung von Polyphosphatasen den auf diese Weise ermittelten n-Wert beeinflusst, wie im folgenden kurz ausgeführt werden soll. (Dabei wird wieder, wie in Kapitel 3.3.2, von der Annahme ausgegangen, daß die chemiosmotische Hypothese die hier ablaufenden Prozesse korrekt beschreibt und daß der elektrische Term in der „proton motive force“ vernachlässigt werden kann.)

Formuliert man die Nettosphatflüsse für die in Kapitel 3.3.2 beschriebene Gesamtreaktion der Phosphatinkorporation in Polyphosphate: $(P \sim P)_{n+1} + n[H^+]_C \rightleftharpoons (P \sim P)_n + n[H^+]_T + [P]_i$ und eine möglicherweise gleichzeitig ablaufende Polyphosphatasereaktion: $(P \sim P)_{n+1} \rightleftharpoons (P \sim P)_n + [P]_i$ in Abhängigkeit von der jeweiligen Affinität der Hydrolyse, so ist in Gleichgewichtsnähe:

$$J_P^{\text{Polyphosphatkinase}} = L_P RT \ln \frac{[H^+]_C^n}{K [P]_i [H^+]_T^n} =$$

$$L_P RT \ln \frac{1}{K [P]_i} + n L_P RT \ln \frac{[H^+]_C}{[H^+]_T},$$

$$J_P^{\text{Polyphosphatase}} = L_{P'} RT \ln \frac{1}{K [P]_i}.$$

K ist, wie vorhin, die Gleichgewichtskonstante der Phosphorylierung, L_P und $L_{P'}$ sind Proportionalitätsfaktoren. Der Nettophosphatfluß J_P setzt sich aus beiden Teilprozessen zusammen:

$$J_P = (L_P + L_{P'}) RT \ln \frac{1}{K [P]_i} + n L_P RT \ln \frac{[H^+]_C}{[H^+]_T}.$$

Im Gleichgewicht ist $J_P = 0$ und demnach

$$\ln K [P]_i = n \frac{L_P}{(L_P + L_{P'})} \ln \frac{[H^+]_C}{[H^+]_T}.$$

Man sieht unmittelbar, daß mit

$$n' = n \frac{L_P}{(L_P + L_{P'})}$$

die so gewonnene Gleichung

$$[P]_i = \frac{1}{K} \left(\frac{[H^+]_C}{[H^+]_T} \right)^{n'}$$

nur dann in Gleichung (4) übergeht, wenn $L_{P'} = 0$ ist. Eine etwaige Polyphosphatasereaktion kann daher dazu führen, daß die in der oben beschriebenen Weise bestimmte Anzahl der translozierten Protonen pro inkorporiertem Phosphat von der eigentlichen H^+ /ATP-Stöchiometrie abweicht.

Es ist daher theoretisch möglich, daß die Blaualgenzelle über Polyphosphatasen die Anzahl der translozierten Protonen pro inkorporiertem Phosphat variieren und damit verschieden hohe cytoplasmatische Orthophosphat Spiegel einstellen kann. Damit wäre sie in der Lage, die Phosphatinkorporation nicht nur über die Aktivität des Carriers, sondern auch mit Hilfe des Phosphatgradienten zwischen dem Cytoplasma und dem Medium zu regulieren. Weitere Studien werden hier nötig sein, um einen etwaigen Zusammenhang zwischen der Variabilität des n -Wertes und den Wachstumsbedingungen zu beleuchten; dabei könnte auch ein Vergleich zwischen frei- und intrazellulär symbiontisch lebenden Blaualgen recht aufschlußreich sein, da symbiontische Blaualgen nicht derartig extremen Schwankungen in der Phosphatkonzentration ausgesetzt sind wie die freilebenden.

Schließlich sollte ganz allgemein für die verschiedenen Algenfamilien verbindlich die Frage beantwortet werden, welches Orthophosphat der jeweilige Carrier zu transportieren vermag. Auf Grund der pH-Abhängigkeit der Phosphatinkorporation kann vermutet werden, daß von Grünalgen das H_2PO_4^- - und von Blaualgen das HPO_4^{2-} -Ion aufgenommen wird. Eine derartige Carrierspezifität könnte daher mitverantwortlich dafür sein, daß Grünalgen bevorzugt in einem sauren und Blaualgen in einem eher alkalischen Milieu auftreten.

Man kann somit erwarten, daß die komplexen Vorgänge im Freiland noch besser verstanden werden, wenn die oben beschriebenen Probleme im Laboratorium einer Lösung zugeführt worden sind.

Literatur

- BATTERTON, J. C., VAN BAALEN, C. (1968): Phosphorus deficiency and phosphate uptake in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Canadian Journal of Microbiology* 14, 341–348.
- BAULE, B. (1918): Zu Mitscherlichs Gesetz der physiologischen Beziehungen. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 51, 363–385.
- BINDER, A. (1982): Respiration and photosynthesis in energy-transducing membranes of Cyanobacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 14, 271–286.
- BORNEFELD, T., WEIS, U. (1981): Adenylate energy charge and phosphorylation potential in blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 176, 71–82.
- BROWN, E. J., HARRIS, R. F. (1978): Kinetics of algal transient phosphate uptake and the cell quota concept. *Limnology and Oceanography* 23, 35–40.
- BROWN, E. J., HARRIS, R. F., KOONCE, J. F. (1978): Kinetics of phosphate uptake by aquatic microorganisms: Deviations from a simple Michaelis-Menten equation. *Limnology and Oceanography* 23, 26–34.
- BROWN, E. J., BUTTON, D. K. (1979): Phosphate-limited growth kinetics of *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 15, 305–311.
- BURMASTER, D. E. (1979): The unsteady continuous culture of phosphate-limited *Monochrysis Lutheri* Droop: experimental and theoretical analysis. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 39, 167–186.
- CAPERON, J., MEYER, J. (1972): Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton – II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep-Sea Research* 19, 619–632.
- DEWAR, M. A., BARBER, J. (1973): Cation regulation in *Anacystis nidulans*. *Planta (Berl.)* 113, 143–155.
- DROOP, M. R. (1968): Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis Lutheri*. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 48, 689–733.
- DROOP, M. R. (1973): Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* 9, 264–272.
- DROOP, M. R. (1974): The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 54, 825–855.

- EINSELE, W. (1941): Die Umsetzung von zugeführtem, anorganischem Phosphat im eutrophen See und ihre Rückwirkungen auf seinen Gesamthaushalt. *Zeit. Fischerei u. d. Hilfswissens.* 39, 407–488.
- FALKNER, G., WERDAN, K., HORNER, F., HELDT, H. W. (1974): Energieabhängige Phosphataufnahme der Blaualge *Anacystis nidulans*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 87, 263–266.
- FALKNER, G., HORNER, F., WERDAN, K., HELDT, H. W. (1976a): pH-changes in the cytoplasm of the blue-green alga *Anacystis nidulans* caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. *Plant Physiol.* 58, 717–718.
- FALKNER, G., WERDAN, K., HORNER, F., HELDT, H. W. (1976b): Energieabhängige Phosphataufnahme der Blaualge *Anacystis nidulans*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 89, 285–288.
- FALKNER, G., HORNER, F., SIMONIS, W. (1980): The regulation of the energy-dependent phosphate uptake by the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Planta* 149, 138–143.
- FALKNER, G., STRASSER, P., GRAFFIUS, D. (1984a): Phosphate uptake by blue-green algae in vitro and in a lake during an algal bloom: Useful application of a force-flow relationship. *Hydrobiologia* 108, 265–271.
- FALKNER, G., STRASSER, P., GRAFFIUS, D. (1984b): Phosphate uptake by blue-green algae during an algal bloom. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22, 195–199.
- FUHS, G. W. (1969): Phosphorus content and rate of growth in the Diatoms *Cyclotella nana* and *Thalassiosira fluviatilis*. *J. Phycol.* 5, 312–321.
- FUHS, G. W., DEMMERLE, S. D., CANELLI, E., CHEN, M. (1972): Characterization of phosphorus-limited plankton algae. *Amer. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp.* 1, 113–132.
- GIMMLER, H. (1976): Photophosphorylation in vivo. In: *Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation*. Encyclopedia of Plant Physiology. Ed. A. Trebst and M. Avron. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- GOLDMAN, J. C. (1977): Steady state growth of phytoplankton in continuous culture: Comparison of internal and external nutrient equations. *J. Phycol.* 13, 251–258.
- GOLDMAN, J. C. (1979): Temperature effects on steady-state growth, phosphorus uptake, and chemical composition of a marine phytoplankton. *Microbial Ecology* 5, 153–166.
- GRAFFIUS, D. (1984): Energetische und kinetische Aspekte der Regulation der Phosphataufnahme bei der Blaualge *Anacystis nidulans*. Dissertation, Universität Salzburg.
- HALMANN, M., STILLER, M. (1974): Turnover and uptake of dissolved phosphate in freshwater. A study in Lake Kinneret. *Limnology and Oceanography* 19, 774–783.
- HAMILTON, W. A. (1975): Energy coupling in microbial transport. *Advances in Microbial Physiology* 12, 1–53.
- HAROLD, F. M. (1964): Enzymic and genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 35, 81–90.

- HAYES, F. R., McCARTER, J. A., CAMERON, M. L., LIVINGSTONE, D. A. (1952): On the kinetics of phosphorus exchange in lakes. *Journal of Ecology* 40, 202–216.
- HEALEY, F. P. (1973): Characteristics of phosphorus deficiency in *Anabaena*. *J. Phycol.* 9, 383–394.
- HELDT, H. W., WERDAN, K., MILOVANCEV, M., GELLER, G. (1973): Alkalization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta* 314, 224–241.
- HERBERT, D., ELSWORTH, R., TELLING, R. C. (1956): The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14, 601–622.
- HOFFMANN-OSTENHOF, O., SLECHTA, L. (1957): Transferring enzymes in the metabolism of inorganic polyphosphates and pyrophosphate. *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem. Tokyo Kyoto* 2, 180–189.
- HUTCHINSON, G. E., BOWEN, V. T. (1947): A direct demonstration of the phosphorus cycle in a small lake. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 33, 148–153.
- HUTCHINSON, G. E., BOWEN, V. T. (1950): Limnological studies in Connecticut. IX. A quantitative radiochemical study of the phosphorus cycle in Linsley Pond. *Ecology* 31, 194–203.
- KALLAS, T., DAHLQUIST, F. W. (1981): Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analysis of internal pH during photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biochemistry* 20, 5900–5907.
- KUENZLER, E. J., KETCHUM, B. H. (1962): Rate of phosphorus uptake by *Phaeodactylum tricoratum*. *Biol. Bull. Woods Hole* 123, 134–145.
- KUENZLER, E. J. (1970): Dissolved organic phosphorus excretion by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 6, 7–13.
- LAWRY, N. H., JENSEN, T. E. (1979): Deposition of condensed phosphate as an effect of varying sulfur deficiency in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*). *Arch. Microbiol.* 120, 1–7.
- LEAN, D. R. S. (1973): Movements of phosphorus between its biologically important forms in lake water. *J. Fish. Res. Board. Can.* 30, 1525–1536.
- LEAN, D. R. S., NALEWAJKO, C. (1976): Phosphate exchange and organic phosphorus excretion by freshwater algae. *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 1312–1323.
- LEAN, D. R. S., NALEWAJKO, C. (1979): Phosphorus turnover time and phosphorus demand in large and small lakes. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 13, 120–132.
- LEHMAN, J. T., BOTKIN, D. B., LIKENS, G. E. (1975): The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnology and Oceanography* 20, 343–364.
- LISS, E., LANGEN, P. (1962): Versuche zur Polyphosphat-Überkompensation in Hefezellen nach Phosphatverarmung. *Arch. Microbiol.* 41, 383–392.
- MITCHELL, P. (1966): Chemiosmotic coupling in oxydative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 41, 445–502.
- MONOD, J. (1942): Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann, Paris.
- MÜLLER, H. (1970): Das Wachstum von *Nitzschia actinastroides* (Lemm.) v. Goor im Chemostaten bei limitierender Phosphatkonzentration. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 83, 537–544.

- NALEWAJKO, C., LEAN, D. R. S. (1978): Phosphorus kinetics – algal growth relationships in batch cultures. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21, 184–192.
- NALEWAJKO, C., LEE, K., SHEAR, H. (1981): Phosphorus kinetics in Lake Superior: light intensity and phosphate uptake in algae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 224–232.
- ODUM, E. P., KUENZLER, E. J., BLUNT, SISTER M. X. (1958): Uptake of ^{32}P and primary productivity in marine benthic algae. *Limnology and Oceanography* 3, 340–345.
- OVERBECK, J. (1963): Untersuchungen zum Phosphathaushalt von Grünalgen. VI. Ein Beitrag zum Polyphosphatstoffwechsel des Phytoplanktons. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 76, 276–286.
- PETERS, R. H. (1975): Orthophosphate turnover in central european lakes. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 32, 297–311.
- PETERSSON, K. (1979): Enzymatic determination of orthophosphate in natural waters. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 64, 585–607.
- RHEE, G-Y. (1973): A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.* 9, 495–506.
- RHEE, G-Y. (1974): Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications. *J. Phycol.* 10, 470–475.
- RHEE, G-Y. (1978): Continuous culture in phytoplankton ecology. *Adv. in Aquat. Microbiol.* 2, 151–203.
- RIEGLER, F. H. (1956): A tracer study of the phosphorus cycle in lake water. *Ecology* 37, 550–562.
- RIEGLER, F. H. (1964): The phosphorus fractions and the turnover time of inorganic phosphorus in different types of lakes. *Limnology and Oceanography* 9, 511–518.
- RIEGLER, F. H. (1968): Further observations inconsistent with the hypothesis that the molybdenum blue method measures orthophosphate in lake water. *Limnology and Oceanography* 13, 7–13.
- ROTTENBERG, H. (1978): An irreversible thermodynamic approach to energy coupling in mitochondria and chloroplasts. *Progress in Surface and Membrane Science* 12, 245–325.
- SCHINDLER, D. W. (1977): Evolution of phosphorus limitation in lakes. Natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophic lakes. *Science* 195, 260–262.
- SIMONIS, W., URBACH, W. (1973): Photophosphorylation in vivo. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 89–114.
- SIMONIS, W., BORNEFELD, T., LEE-KADEN, J., MAJUMDAR, K. (1974): Phosphate uptake and photophosphorylation in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. In: U. Zimmermann, J. Dainty (eds.), *Intern. Workshop on Membrane Transport in Plant and Plant Organelles*, 220–225, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SMITH, I. W., WILKINSON, J. F., DUGUID, J. P. (1954): Volution production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *J. Bacteriol.* 68, 450–463.
- STILLER, M., EDELSTEIN, M., VOLOHONSKY, H., SERRUYA, C. (1978): Validity of ^{32}P kinetic experiments in algae. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20, 75–81.

- STRASSER, P. (1982): Die Aufnahme und Abgabe von Metaboliten bei Blaualgen als Ausdruck der Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen. Dissertation, Universität Salzburg.
- STRUCKI, W. (1983): Thermodynamic optimization of biological energy conversions. *Biochemical Society Transactions*, 601st Meeting, Aberdeen II, 45–47.
- THELLIER, M. (1970): An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salts absorption. *Ann. Bot.* 34, 983–1009.
- TILMAN, D., KILHAM, S. S. (1976): Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella Meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* 12, 375–383.
- TITMAN, D. (1976): Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory. *Science* 192, 463–465.
- TREBST, A. (1974): Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 423–458.
- VAN DER MEER, R., WESTERHOFF, H. V., VAN DAM, K. (1980): Linear relation between rate and thermodynamic force in enzyme-catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 591, 488–493.
- VINCENT, J. C., THELLIER, M. (1983): Theoretical analysis of the significance of whether or not enzymes or transport systems in structured media follow Michaelis-Menten kinetics. *Biophys. J.* 41, 23–28.
- WILBRANDT, W., ROSENBERG, T. (1961): The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 13, 109–171.
- WILKINSON, J. F., DUGUID, J. P. (1960): The influences of cultural conditions on bacterial cytology. *Intern. Rev. Cytol.* 9, 1–76.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. D. KLEINER (Universität Bayreuth) für die kritische Durchsicht des Manuskripts, Herrn Prof. Dr. P. SCHUSTER (Universität Wien) für anregende Diskussionen und dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Unterstützung danken. Schließlich gilt besonderer Dank meiner Frau für ihre unermüdliche Hilfe beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A = [P] _i /B	Externe Phosphatkonzentration, bei der $J_p = 0$
a	Proportionalitätsfaktor zwischen L_K^{-1} und μ^2
B	Verhältnis der Phosphatkonzentration zwischen Medium und Cytoplasma im Gleichgewicht
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
Chl.	Chlorophyll
D	Verdünnungsrate des Chemostatinhaltes mit Nährmedium

DCMU	N-(3,4-Dichlorphenyl-), N'N'-dimethylharnstoff
ΔpH_{cyt} , ΔpH_{Thyl}	pH-Gradient an der Cytoplasma- bzw. Thylakoidmembran
DMO	Dimethylloxazolidin-2,4-dion
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
$[H^+]_C$, $[H^+]_T$	Protonenkonzentration im Cytoplasma- und Thylakoidraum
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure
J_P	Nettophosphatinkorporationsrate
K_e , K_i	Michaelis-Konstanten eines asymmetrischen Carriers für Influx und Efflux
K_m	Michaelis-Konstante des Phosphatcarriers
K_s	Substratkonzentration, bei der Algen mit $\frac{\mu_{\text{max}}}{2}$ wachsen
$L_k = \text{RTL}_P 2,3$	Neigung der Geraden bei einer Auftragung von J_P gegen $\log P_e$
L_P	Proportionalitätsfaktor zwischen der Nettoinkorporationsrate und der Absorptionskraft
μ	Spezifische Wachstumsrate
μ_{max}	Maximale Wachstumsrate
$\Delta \mu_H$	Elektrochemische Potentialdifferenz an der Thylakoidmembran
m	Anzahl der mit dem Phosphation kotransportierten Kationen
n	Anzahl der durch die Thylakoidmembran pro inkorporiertem Phosphat translozierten Protonen
n'	Anzahl der durch die Thylakoidmembran pro inkorporiertem Phosphat translozierten Protonen bei Anwesenheit von Polyphosphatasen
$[P]_e$	Externe Orthophosphatkonzentration
$[P]_i$	Cytoplasmatische Orthophosphatkonzentration
P_o	Minimalphosphatgehalt/mg Chl.
P_{tot}	Gesamtphosphorgehalt/mg Chl.
$(P \sim P)_n$, $(P \sim P)_{n+1}$	Polyphosphate
Q	Zellquote
Q_o	Subsistenzquote
s_P	Phosphatkonzentration im Chemostat
s_R	Phosphatkonzentration im Reservoir
t_d	Verdopplungszeit

v	Phosphatinfluxrate
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit des Phosphattransports
x	Zellzahl

Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Beschreibung der Phosphataufnahme bei Algen soll eine Brücke zwischen den limnologischen, wachstumsphysiologischen und biochemischen Aspekten dieses Themas geschlagen werden. Zu diesem Zweck wird zunächst ausgeführt, auf welche Weise die Studien in Limnologie und Wachstumsphysiologie zu der Beobachtung führten, daß die Phosphatinkorporation zum Erliegen kommt, wenn die Phosphatkonzentration im Wachstumsmedium einen zwar sehr geringen, aber definierten Schwellenwert unterschreitet, dessen Größenordnung im nanomolaren Bereich liegt. Ausgehend von dieser Beobachtung wird nun die Frage untersucht, wie die Nettophosphatinkorporation bei Blaualgen reguliert wird. Dabei zeigte sich, daß der Transport von Orthophosphat durch die Zellmembran von einem Carrier katalysiert wird, dessen Aktivität die Geschwindigkeit der Phosphatinkorporation bestimmt. Die Beziehung zwischen der Nettoaufnahmerate J_P , der Phosphatkonzentration im Medium und Cytoplasma $[P]_c$ und $[P]_i$ und der Gleichgewichtsverteilung B der Phosphatmoleküle an der Zellmembran, die in der Nähe des Gleichgewichts die Form

$$J_P = L_k \log \frac{[P]_c}{[P]_i} B$$

hat, war für einen viel weiteren Konzentrationsbereich gültig, als es den Gesetzmäßigkeiten der Nichtgleichgewichtsthermodynamik entsprach. Dies konnte auf zwei Eigenschaften des Phosphatinkorporationssystems zurückgeführt werden. 1. Die cytoplasmatische Phosphatkonzentration ist bei einer gegebenen Lichtintensität konstant, da sie nur vom pH-Gradienten an der Thylakoidmembran abhängt. 2. Der Wert für $[P]_i/B$, der dem oben beschriebenen Schwellenwert entspricht, ist unter phosphatlimitierten Wachstumsbedingungen von der gleichen Größenordnung wie die Michaelis-Konstante des Phosphatcarriers, dessen Maximalgeschwindigkeit dem „Leitfähigkeitskoeffizienten“ L_k proportional ist.

Der weite Gültigkeitsbereich der linearen logarithmischen Beziehung erlaubte die Extrapolation von gemessenen Nettoaufnahmeraten bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen auf den Schwellenwert $[P]_i/B$, den die externe Konzentration überschreiten muß, damit eine Nettoaufnahme stattfindet. Dies ermöglichte für kontinuierliche Kulturen eine Neuberechnung der Konzentrationsabhängigkeit des phosphatlimitierten Algenwachstums und im Freiland auf einfache Weise die Bestimmung des Schwellenwertes. Es stellte sich heraus, daß bei derartigen Kulturen und in einem oligotrophen See die externe Konzen-

tration sehr nahe am Schwellenwert liegt, wodurch die Nettoinkorporation zwangsläufig gering bleibt. Im eutrophen Obertrumer See hingegen stieg sie vor einer Algenblüte weit über den Schwellenwert an. Dies führte zu einem massiven Einstrom von Phosphat in den Polyphosphatpool und damit zu einer Situation, bei der das Algenwachstum nicht mehr von der externen Phosphatkonzentration, sondern von der Größe der intern gespeicherten Polyphosphatmenge kontrolliert wird.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften
mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse](#)

Jahr/Year: 1984

Band/Volume: [193](#)

Autor(en)/Author(s): Falkner Gernot

Artikel/Article: [Die Phosphataufnahme bei Algen unter besonderer
Berücksichtigung der Cyanophyceen. 33-88](#)