

Die Zinkaufnahme in das Innere von *Chlorella*

S. MATZKU und E. BRODA

Institut für Biologie, Reaktorzentrum Seibersdorf
und Institut für Physikalische Chemie, Radiochemische Abteilung, Universität Wien

Eingegangen am 6. November 1969, 2. Februar 1970

The Uptake of Zinc into the Interior of *Chlorella*

Summary. The uptake of labelled Zn by asynchronous *Chlorella fusca* was measured under conditions of optimum and minimum energy supply (light and air, or dark and nitrogen, respectively). Part of the Zn equilibrates rapidly with the medium, and soon after the uptake it can be washed out quickly with non-labelled Zn carrier solution; it is probably bound in the free space (cell wall). This component of the uptake is also observed with cells kept in minimum conditions, with dead cells and with isolated cell wall material.

Under optimum conditions Zn is taken up strongly for long periods and cannot be washed out completely. The velocity of uptake depends on the Zn content of the cells, and follows saturation kinetics. The uptake has no influence on the efflux of preabsorbed Rb. The retained Zn is thought to be inside the cells. It may enter by way of a pump. However, an energy-independent path of entry, with a different temperature coefficient, is also observed. All uptake processes are influenced by Ca.

Part of the labelled Zn is slowly removed from the interior of the cell on treatment with a solution of carrier Zn or EDTA. This loss does not depend on energy supply and may occur via the second pathway. Net loss of labelled Zn is also observed after the energy supply is turned off, without change of solution, but the loss can be compensated by a simultaneous increase in the external concentration of labelled Zn. The question is discussed whether the energy-dependent Zn uptake is an "active" process.

Die Kationen einer Anzahl von Schwermetallen werden durch *Chlorella fusca* gegenüber der Aufnahmelösung mehrtausendfach angereichert. Am Beispiel des radioaktiv markierten Zinks wurde in unserem Laboratorium festgestellt (Findenegg und Broda, 1966; Broda et al., 1967; Broda, 1968; Findenegg, 1968), daß neben energieunabhängigen auch energieabhängige Mechanismen der Aufnahme bestehen. Diese treten bei Belüftung und besonders bei Belichtung der Algensuspension in Erscheinung. Die Aufnahme in Licht und Luft sei als Aufnahme unter Optimal-, jene in Dunkel und Stickstoff als Aufnahme unter Minimalbedingungen bezeichnet. Natürlich findet gleichzeitig Gewinn und Verlust von Zn statt, so daß die Zu- oder Abnahme des Gehalts eine Differenz darstellt.

Unter Minimalbedingungen fällt die Geschwindigkeit der Aufnahme, wie gefunden wurde, schon in Minuten stark ab. Dagegen dauert sie

unter Optimalbedingungen lange mit erheblicher Geschwindigkeit fort; diese Daueraufnahme schließt an eine viel raschere Kurzeitenaufnahme an, die wohl der Kurzeitenaufnahme unter Minimalbedingungen entspricht. Die Alge wird durch Zn — im Gegensatz zu Cu — in den angewendeten Konzentrationen nicht geschädigt. Dies wird daran erkannt, daß markiertes Rb während oder nach der Behandlung mit Zn mit normaler Geschwindigkeit energieabhängig aufgenommen wird (Krausz und Broda, 1965; Burgmann, unveröff.); vermutlich wird auch die „Zn-Pumpe“ selbst nicht vergiftet. Vorliegend wird über Experimente zur Aufklärung der Mechanismen der Prozesse der Aufnahme und Abgabe von Zn berichtet.

Experimentelles

Algenmaterial

Chlorella fusca 211 - 8b der Sammlung Göttingen wurde unter autotrophen Bedingungen im Dauerlicht halbkontinuierlich gezüchtet (Findenegg und Springer-Lederer, 1967). Die Nährlösung von Ruppel (1962) wurde verwendet, nur wurde Zn weggelassen und der Phosphatpuffer durch äquimolare KH_2PO_4 -Lösung ersetzt (Findenegg, 1968). Täglich wurden 7—10 g Frischgewicht geerntet, was 1,5—2,3 g Trockengewicht entspricht. (Nachfolgend beziehen sich Gewichtsangaben stets auf Trockengewicht.) Der aktivierungsanalytisch bestimmte Zn-Gehalt der Algen betrug 60—100 ppm.

Versuchsführung

Vor dem Aufnahmeversuch wurden die Algen aus der Nährlösung zentrifugiert und 4mal gewaschen. Dann wurden in Flachgefäßen (Schichtdicke 13—16 mm; Springer-Lederer und Rosenfeld, 1968) 1 g Algen je Liter dest. Wasser oder $5 \cdot 10^{-3}$ m CaCl_2 suspendiert. Die Suspension wurde durch einen Strom von Luft oder Stickstoff durchmischt, die beide von CO_2 befreit waren. Algenproben aus einer Ernte konnten gleichzeitig in 30 Gefäßen verschiedenen Gasatmosphären — in Licht oder Dunkel — ausgesetzt werden. Die Lichtstärke an der Oberfläche der Flachgefäße war 4000 Lux (Leuchtstoffröhre Philips TL 65 W/05); Lichtsättigung war nicht erreicht, wie durch Änderung der Suspensionsdichte nachgewiesen wurde.

Wo nicht anders bemerkt, war die Temperatur 25° C. Außer wenn die pH-Abhängigkeit studiert wurde, war der pH-Wert bei der Aufnahme stets 5, so daß Zn-Hydroxid nicht ausfallen könnte. Der pH-Wert wurde manuell durch Zutropfen von HCl oder NaOH eingestellt und aufrecht erhalten, d. h. zumindest vor jeder Probenahme erneuert.

Etwa 3 Std nach der Ernte der Algen und nachdem diese 1 Std unter den Bedingungen des folgenden Aufnahmeversuchs gehalten („konditioniert“) worden waren, wurde markiertes Zn als Chlorid zugefügt (^{65}Zn , Halbwertszeit 245 Tage). Die Aufnahme erfolgte also nicht aus der Nährlösung; sie wurde durch wiederholte Probenahme verfolgt, deren erste in der Regel 10 min nach Versuchsbeginn stattfand („Kurzeitenaufnahme“). Zur Bestimmung der Gesamtaufnahme wurde die Suspension entweder zentrifugiert und das Zn im Überstand gemessen, oder sie wurde durch Membranfilter von 0,8 μm Porenweite (Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen) filtiert und der Rückstand 2mal mit 3 ml Wasser gewaschen. Für die Messung wurden Filter und Algen in einem Röhrchen mit saurer Trägerlösung (2 m ZnCl_2 + 2 m HCl) aufgenommen, um das Volumen jenem der Überstandsproben anzugleichen. Die Messung erfolgte stets mit Szintillationszähler und Bohrochkristall.

Zur Bestimmung des „auswaschbaren“ Teils des aufgenommenen Zn, d. h. der Kurzzeitabgabe, wurden die Algen entweder auf dem Filter mit 15–20 ml Trägerlösung (10^{-3} m $\text{ZnCl}_2 + 5 \cdot 10^{-3}$ m CaCl_2 , pH = 5,5) 5–10 min. gewaschen, oder sie wurden mit der gleichen Trägerlösung zentrifugierend gewaschen. Zur Bestimmung der Langzeitabgabe unter gewünschten Bedingungen wurden die wie beschrieben gewaschenen Algen mit 10^{-3} m ÄDTA und Wasser nachgewaschen, dann in den Flachgefäßen behandelt und der Überstandsmessung unterworfen.

„Chemisch schonende“ Tötung der Algen wurde durch Zugabe einiger Tropfen eines Gemisches von Chloroform und Toluol (1:1) zur Suspension und Rühren mit einem Gasstrom während 20 min bewirkt.

Ergebnisse

a) Einfluß der Energieversorgung und Temperaturkoeffizient

Abb. 1 gibt die Aufnahme von Zn in Optimal- und Minimalbedingungen. Bei Belichtung wurde in Stickstoff eine nur wenig kleinere Aufnahme als in Luft gefunden (nicht gezeigt). Wenn Ca fortgelassen wurde (nicht gezeigt), war der Unterschied zwischen Optimal- und Minimalbedingungen geringer; offenbar hemmt das Ca die Kurzzeitaufnahme stärker als die Langzeitaufnahme.

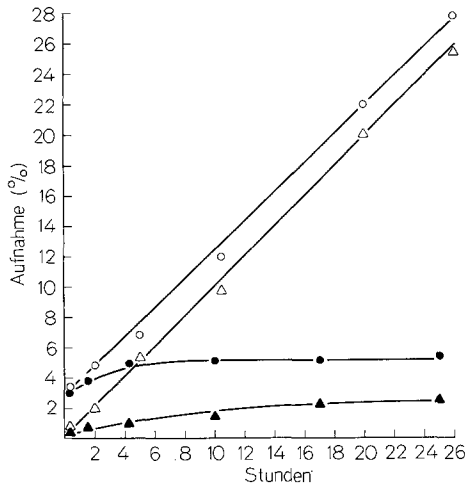


Abb. 1. Abhängigkeit der Zn-Aufnahme von der Energieversorgung. Aus $5 \cdot 10^{-6}$ m $\text{Zn} + 5 \cdot 10^{-3}$ m Ca , pH 5. Optimal: \circ — \circ Gesamtaufnahme, Δ — Δ nicht auswaschbarer Teil. Minimal: \bullet — \bullet Gesamtaufnahme, \blacktriangle — \blacktriangle nicht auswaschbarer Teil

Bei Steigerung des pH-Werts zwischen 4,3 und 5,7 nahm sowohl die Kurzzeit- als auch die Langzeitaufnahme zu (nicht gezeigt). In weiteren Versuchen wurde in Minimalbedingungen 20 Std mit Lösungen von Salzen vorkonditioniert, die bekanntermaßen energieabhängig aufgenommen werden, und zwar wurden K oder unmarkiertes Zn (beide in 100fachem

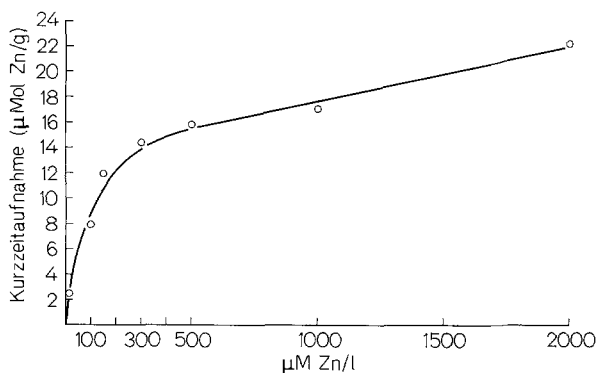


Abb. 2. Kurzzeltaufnahme von Zn in Abhängigkeit von der Konzentration. (Kein Ca)

Überschuß gegenüber dem später eingesetzten markiertem Zn) angewendet; die darauf folgende Aufnahme des ^{65}Zn in Minimalbedingungen blieb unbeeinflusst.

$5 \cdot 10^{-3}$ m Dinitrophenol (DNP) in der Aufnahmelösung (25°C) unterdrückte die Aufnahme in Dunkel und Luft, aber nicht die viel kleinere Aufnahme in Dunkel und Stickstoff. Versuche in Licht und Luft wurden mit DNP nicht durchgeführt, da unter diesen Bedingungen rasche Zersetzung der Algen eintritt (Springer-Lederer und Rosenfeld, 1968).

Die Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) der Geschwindigkeiten der Langzeitaufnahmen im Bereich $10\text{--}25^\circ\text{C}$ ergaben sich aus den Neigungen der Aufnahmekurven (10^{-3} m Ca) 60—150 min nach Versuchsbeginn in Optimalbedingungen zu 2,2—2,6, jedoch in Minimalbedingungen zu 1,2—1,4 (nicht auswaschbare Teile).

b) Einfluß der Zn-Konzentration

Die Kurzzeltaufnahme von Zn erreichte selbst bei einer Konzentration $2 \cdot 10^{-3}$ m noch keine Sättigung (Abb. 2). Die Geschwindigkeit der Aufnahme von Zn unter Optimalbedingungen als Funktion der Konzentration wurde mit und ohne $5 \cdot 10^{-3}$ m Ca gemessen. In Gegenwart von Ca waren die Aufnahmegeschwindigkeiten zwar kleiner, aber vom Ende der Kurzzeltaufnahme an durch etwa 15 Std konstant. In Abwesenheit von Ca, wo in der ganzen Meßzeit (4 Std) abnehmende Geschwindigkeit der Aufnahme beobachtet wurde, wurden die Geschwindigkeiten im Zeitraum 60—150 min nach Versuchsbeginn für die Auswertung ausgewählt (Abb. 3).

Die Michaelis-Konstante K_m der energieabhängigen Komponente ergab sich in verschiedenen Serien zu 5,7—8,7 μm , die maximale Geschwindigkeit V_{max} zu 0,91—0,95 $\mu\text{M/g} \cdot \text{h}$. In Anwesenheit von Ca wurden

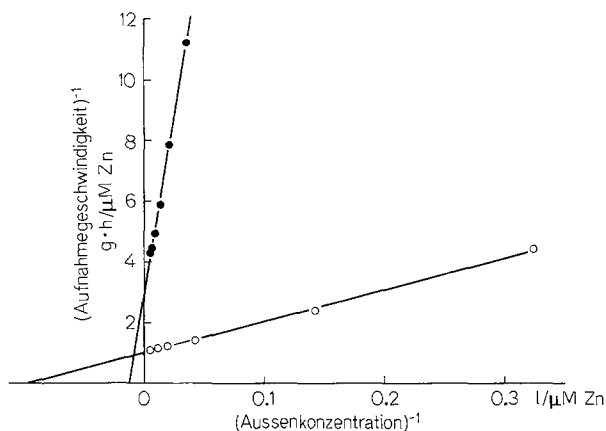


Abb. 3. Kinetik der energieabhängigen Aufnahme von markiertem Zn (Lineweaver-Burk-Diagramm). ● — 5 · 10⁻³ m Ca, ○ — kein Ca

Werte $K_m = 40-70$ und $V_{max} = 0,3-0,6$ für die Aufnahme des Zn ermittelt; Versuche mit anderen mehrwertigen Kationen haben so wie jene mit Ca eine Hemmung der Zn-Aufnahme gezeigt (Matzku, 1969).

Zur Prüfung, ob eine Veränderung des osmotischen Druckes, wie sie bei Einsatz von Zn-Salz verschiedener Konzentration auftreten muß, schon für sich allein eine Änderung der energieabhängigen Aufnahme bewirkt, wurde die Aufnahme unter Optimalbedingungen auch nach Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ m Mannit — osmotisch etwa $6 \cdot 10^{-4}$ m $ZnCl_2$ entsprechend — gemessen. Kein Unterschied wurde gefunden.

c) Abgabe von Zn

Das kurzzeitig aufgenommene Zn läßt sich mit Trägerlösung vollständig auswaschen. Die Langzeitabgabe von Zn an 10^{-3} m unmarkierte Zn-Lösung zeigt Abb. 4. In einem parallelen Experiment (nicht gezeigt) wurde statt der Zn-Lösung 10^{-3} m ÄDTA-Lösung verwendet; das Ergebnis war das gleiche. Die geringere Zn-Abgabe an dest. Wasser war offenbar durch Wiederaufnahme von Zn vorgetäuscht. In keinem Fall fand die Abgabe innerhalb der Versuchszeit ein Ende; vielmehr wurden stets 10—20% der jeweils noch in den Zellen vorhandenen Menge an markiertem Zn je Tag abgegeben.

d) Aufnahme durch tote Zellen

Tote Algen (Abb. 5) sind infolge rascher Zersetzung kein wohldefiniertes Material. Jedenfalls wurde — wie bei der Kurzaufnahme durch lebende Algen — auch bei hoher Zn-Konzentration in der Lösung noch

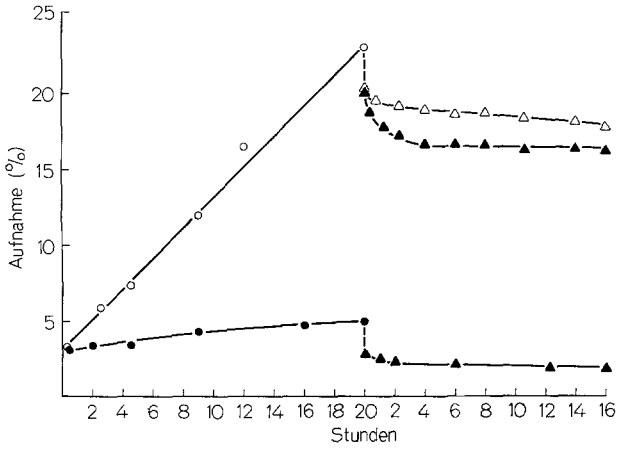


Abb. 4. Langzeitabgabe von Zn. Nach Aufnahme aus 10^{-5} m Zn + $5 \cdot 10^{-3}$ m Ca. Gesamtaufnahme optimal o—o, minimal ●—●. Abgabe (Licht-Luft oder Dunkel-Stickstoff gleich) in unmarkierte Zn-Lösung ▲—▲, in dest. Wasser △—△

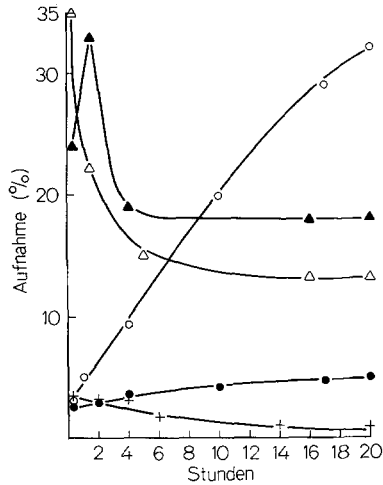


Abb. 5. Aufnahme von Zn durch tote Zellen. Aus $1,5 \cdot 10^{-6}$ m Zn + $5 \cdot 10^{-3}$ m Ca. Tote Zellen: Gesamtaufnahme Licht-Luft △—△, Dunkel-Stickstoff ▲—▲. Nicht auswaschbarer Teil (Licht-Luft oder Dunkel-Stickstoff gleich) +—+. Lebende Zellen (zum Vergleich): Gesamtaufnahme optimal o—o, minimal ●—●

keine Sättigung erreicht. Außerdem hing die aufgenommene Menge von der Zeit zwischen der Tötung (und gleichzeitigem Zusatz von markiertem Zn) und der Probenahme ab. Die Aufnahme in Licht und Luft war im allgemeinen kleiner als in Dunkel und Stickstoff, was auf photochemische Einwirkung zurückzuführen sein dürfte. Der nicht-auswasch-

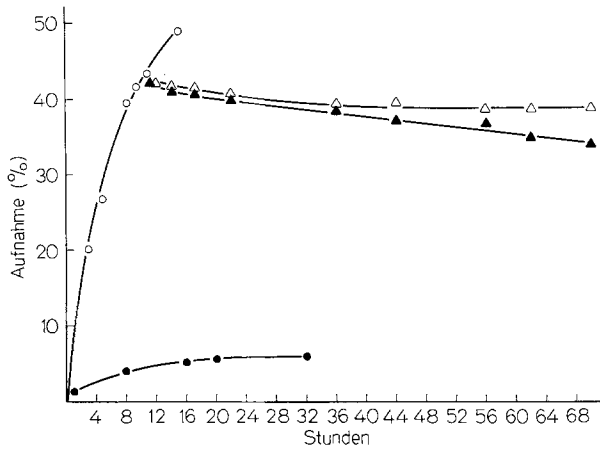


Abb. 6. Einfluß der Abschaltung der Energieversorgung. Zn-Aufnahme (aus $2 \cdot 10^{-6}$ m Zn) optimal ○—○, minimal (zum Vergleich) ●—●. Gehalt der Zellen an markiertem Zn nach Übergang auf Dunkel-Stickstoff △—△. Gehalt bei Zusatz eines Überschusses (10^{-2} m) von unmarkiertem Zn in Licht-Luft (zum Vergleich) ▲—▲

bare Teil war stets gering und sank überdies mit der Zeit ab; er war größer, wenn das Zn (in Licht und Luft oder in Dunkel und Stickstoff) bereits vor der Tötung der Zellen diesen zugefügt worden war (nicht gezeigt).

e) Änderung der Energieversorgung während des Versuchs

Wenn den Zellen markiertes Zn in Minimalbedingungen zugeführt wurde und dann ohne sonstige Änderung Licht und Luft eingesetzt wurden, so wurde natürlich eine plötzliche Beschleunigung der Aufnahme verzeichnet. Wurde hingegen (Abb. 6) — wieder ohne sonstige Änderung — an eine Licht-Luft-Periode ($2 \cdot 10^{-6}$ m Zn, kein Ca) eine Dunkel-Stickstoff-Periode angeschlossen, so nahm der Gehalt der Zellen an markiertem Zn (nicht auswaschbarer Teil) ab; Aufnahme und Abgabe wurden durch Messung der mit Träger gewaschenen Algen verfolgt. Der Zn-Gehalt der Zellen blieb allerdings während der Versuchszeit immer sehr viel höher, als wenn von Anfang an Minimalbedingungen geherrscht hätten.

In einer weiteren Serie (nicht gezeigt) wurde gleichzeitig mit der Umschaltung auf Dunkel und Stickstoff die Konzentration des markierten Zn in der Außenlösung durch Zusatz von Zn gleicher spezifischer Aktivität auf höhere Werte (bis $1,6 \cdot 10^{-5}$ m) gesteigert. Bei den höheren Zn-Konzentrationen wurde weitere Zunahme des Gehalts der Algen an nicht auswaschbare Zn beobachtet; bei dem Zwischenwert von etwa $4 \cdot 10^{-6}$ m blieb der Zn-Gehalt konstant.

f) Abhängigkeit der Aufnahme vom Zn-Gehalt der Zellen

Die anfängliche Aufnahmegeschwindigkeit von markiertem Zn (nicht auswaschbarer Anteil) unter Optimalbedingungen durch Algen mit verschiedenen Gehalten an unmarkiertem Zn wurde verglichen. Dazu waren diese verschieden lang mit unmarkiertem Zn ($3 \cdot 10^{-5}$ m, kein Ca) behandelt worden; die Zn-Gehalte ergaben sich aus der Aktivität paralleler Proben, die ebenso lange mit markiertem Zn behandelt worden waren. Zur Bestimmung der jeweiligen Aufnahmegeschwindigkeit wurden die Algen von der unmarkierten Lösung befreit, gewaschen und in $3 \cdot 10^{-5}$ m markiertem Zn suspendiert; die Aufnahme wurde im Intervall 15–150 min nach Zugabe des markierten Zn bestimmt, wo eine gleichzeitige Abgabe von markiertem Zn noch vernachlässigt werden kann. Ergebnisse eines typischen Versuchs gibt die Tabelle.

Tabelle. *Abhängigkeit der Aufnahme vom Zn-Gehalt der Zelle*

Zeit (Std nach Versuchsbeginn)	Zn-Konzentration der Zellen (10^{-6} M Zn/g)	Anfängliche Aufnahme- geschwindigkeit (10^{-6} M Zn/g·h)
0	1,2	1,5
10	6,8	0,44
22	8,6	0,21
30	9,6	0,21
46	11,7	0,22

g) Abhängigkeit der Rb-Abgabe von der Zn-Aufnahme

Ausgehend von einer für Hefe aufgestellten Hypothese (Fuhrmann und Rothstein, 1968) wurde die Wirkung einer energieabhängigen Zn-Aufnahme auf die gleichzeitige Abgabe von markiertem Rb (stellvertretend für K) gemessen. Zellen wurden mit $7,7 \cdot 10^{-5}$ M Rb/g beladen und die Abgabe an Media mit und ohne unmarkiertes 10^{-4} m Zn während 8 Std verglichen. Die an parallelen Proben bestimmte Aufnahme von markiertem Zn (nicht auswaschbarer Teil) während dieser Zeit war $1,18 \cdot 10^{-6}$ M/g. Dieser Aufnahme wäre nach der Hypothese einer Rb-Abgabe von $2,4 \cdot 10^{-6}$ M/g äquivalent. Eine solche zusätzliche Abgabe (über die gesondert gemessene Abgabe an Zn-freies Medium von $16,7 \cdot 10^{-6}$ M Rb/g hinaus) war jedoch gewiß nicht größer als 10^{-6} M Rb/g.

Diskussion

Die Kurzeitaufnahme ist durch rasche Einstellung eines Gleichgewichts mit dem freien Raum (der Zellwand), durch starke Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, durch Auswaschbarkeit mit Trägerlösung und

durch Unabhängigkeit von der Energieversorgung gekennzeichnet. Offenbar beruht die Kurzeitaufnahme auf physiko-chemischen Mechanismen (Ionenaustausch und Komplexbildung); das Zn bleibt in der Zellwand, die bei *C. fusca* Polysaccharide, Polypeptide und Lipoide enthält (Northcote et al., 1958; Northcote, 1962; Punnett und Derrenbacher, 1966).

Laut Abb. 2 werden aus $2 \cdot 10^{-3}$ m Lösung kurzzeitig $2,2 \cdot 10^{-5}$ M Zn/g aufgenommen. Bei Annahme eines Zellvolumens von $200 \mu\text{m}^3$ und einer Dicke der Zellwand von $2,1 \cdot 10^{-6}$ cm (Northcote, 1962) ergibt sich in größenordnungsmäßiger Übereinstimmung mit der Bindungskapazität isolierter Zellwände für Zn (Schuster und Broda, 1970) ein Gehalt von $2,8 \cdot 10^{-4}$ M/g Zellwand.

Schonend getötete Zellen (Abb. 5), wo energieabhängige Vorgänge nicht auftreten, dürften durch ähnliche Prozesse aufnehmen. Allerdings übertrifft die Aufnahme toter Zellen die Kurzeitaufnahme, da bei der Tötung das Zellinnere zugänglich wird. Bei längerer Versuchsdauer gehen Zn-bindende Inhaltsstoffe verloren, und der Zn-Gehalt nimmt wieder ab. Deshalb ist die Aufnahme schlecht reproduzierbar.

Unter Optimalbedingungen überlagert sich der Kurzeitaufnahme die energieabhängige Langzeitaufnahme (Abb. 1). Diese wäre noch stärker, wenn nicht allmählich ein Teil des freien Zn durch organische Säuren komplexiert würde, die durch *Chlorella* abgegeben werden (s. Coombs und Whittingham, 1966). Wie der Ladungsausgleich erfolgt, ist nicht bekannt; der negative Ausgang des Versuchs (g) zeigt, daß der Eintritt von Zn-Ionen nicht durch Austritt von Alkali-Ionen kompensiert wird. Die Konzentrationsabhängigkeit der Langzeitaufnahme in Optimalbedingungen (b) entspricht einer Sättigungskinetik. Die Michaelis-Konstante liegt im gleichen Bereich wie bei der Aufnahme verschiedener Kationen in relativ niedriger Konzentration durch Pflanzenwurzeln (s. Fried und Broeshart, 1967).

Unter Minimalbedingungen wird nach Ende der Kurzeitaufnahme weiterhin langsam Zn aufgenommen (Abb. 1). Nach dem Kriterium der Auswaschbarkeit scheint es, daß auch hier das Zn durch die Zellmembran durchtritt. Dennoch dürfte es sich bei der Langzeitaufnahme in Dunkel und Stickstoff vorwiegend nicht um einen durch Gärung (siehe Gibbs, 1962) mit Energie versorgten Prozeß handeln. Erstens war Q_{10} (ähnlich wie bei der Diffusion von Ionen in Wasser) nur 1,3, während Q_{10} unter Optimalbedingungen 2,4 war. Zweitens konnte die Aufnahme durch Vorbehandlung mit konzentrierter K- oder (unmarkierter) Zn-Lösung nicht unterdrückt werden, d. h. eine Erschöpfung der Energiereserven war ohne Wirkung. Die Zellmembran dürfte eher über einen zweiten Weg durchschritten werden. Es könnte sich um Diffusion durch den Stoff der Membran oder durch Kanäle handeln.

Damit steht im Einklang, daß nicht auswaschbares markiertes Zn aus damit vorbeladenen Zellen langsam abgegeben wird, und zwar energieunabhängig (Abb. 6). Um einen Austauschprozeß — so wie er für die Abgabe von K durch *Chlorella* beschrieben wird (Barber, 1968a) — kann es sich nicht handeln, denn die Abgabe verläuft gleich schnell in ÄDTA wie in Zn-Lösung. Qualitativ stimmt also das Gesamtbild zu der Annahme von Pumpe und Leck, wobei noch die Überlagerung durch die Kurzeitenaufnahme zu berücksichtigen ist. Die Leckstellen haben mindestens den gleichen Radius wie das hydratisierte Zn-Ion, d. h. 4,4 Å (Robinson und Stokes, 1959).

Die Ähnlichkeit der relativen Geschwindigkeit (Geschwindigkeit bezogen auf Gehalt) der Abgabe von nicht auswaschbarem Zn nach Aufnahme in Optimal- oder Minimalbedingungen weist darauf hin, daß es sich in beiden Fällen im gleichen Kompartiment befindet. Jedoch kann sich nicht das ganze Zn im gleichen Zustand befinden, denn die Abgabegeschwindigkeit nimmt nicht einfach exponentiell ab; dies ist dadurch zu deuten, daß ein Teil des Zn im Zellinneren chemisch gebunden ist („Ionenfalle“).

Der Abfall der Aufnahmegeschwindigkeit mit der Zeit (Tabelle 1) kann nicht auf Erschöpfung des Energievorrats beruhen, da diese Versuche in Licht und Luft ausgeführt wurden. Offenbar wirkt der Zn-Gehalt regelnd, ähnlich wie die Aufnahme von K durch *E. coli* (Goldman et al., 1966) und jene von Sulfat durch *Chlorella* (Vallée und Jeanjean, 1968) aufgrund des Gehalts an K bzw. „aktivem Sulfat“ geregelt wird. Vorversuche mit synchroner *Chlorella* haben gezeigt, daß die Geschwindigkeit der Zn-Aufnahme zusätzlich noch vom Alter der Zellen abhängt und zwar war sie am Ende der Lichtperiode am größten (Matzku, 1969).

Die Geschwindigkeit der energieabhängigen Aufnahme ist maximal von der Größenordnung 10^{-6} M/g, was bei frischen Algen des oben angegebenen Volumens $3 \cdot 10^{-11}$ M/cm²·h entspricht. Die Aufnahme ist somit viel langsamer als die von K durch *C. fusca* aus Nährlösung (Barber, 1968b). Wegen dieser Kleinheit und auch wegen der Größe des Vorrats an im freien Raum gebundenen Zn ist eine Verarmung der Umgebung der Zelle an Zn und eine dadurch bedingte Verminderung der Aufnahme, d. h. eine Verfälschung der kinetischen Daten, nicht zu erwarten.

Das elektrochemische Potential des Zn im Zellinneren ist unbekannt, da weder die dortige Konzentration des freien Zn noch die Spannungsdifferenz zwischen innen und außen bestimmt wurde. (Barbers, 1968c, Wert von -40 mV wurde unter abweichenden Bedingungen ermittelt.) Dennoch gibt es Hinweise darauf, daß die beobachtete energieabhängige Aufnahme des Zn „aktiv“ ist, daß also durch die Energie nicht nur eine Schwelle überwunden werden muß. Erstens kann der Zn-Gehalt lebender Zellen jenen toter Zellen bei weitem übertreffen (Abb. 5).

Zweitens wurde nicht auswaschbares Zn nach Abschaltung der Energiezufuhr und daher der Zn-Pumpe verloren (Abb. 6). Dies ist zwanglos dadurch zu deuten, daß das elektrochemische Potential des Zn nach energieabhängiger Aufnahme innen größer war als außen. Damit stimmt überein, daß der resultierende Verlust durch gleichzeitige Steigerung der Außenkonzentration an Zn kompensierend unterdrückt, also ein stationärer Zustand eingestellt werden konnte.

Wir danken dem Bundesministerium für Verkehr und Verstaatlichte Unternehmungen der Republik Österreich für finanzielle Förderung durch einen Forschungsauftrag „Aufnahme von Spurenelementen durch Pflanzenzellen“ an E. B.

Literatur

- Barber, J.: The efflux of potassium from *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **163**, 531—538 (1968a).
- Light-induced uptake of potassium and chloride by *Chlorella pyrenoidosa*. Nature (Lond.) **217**, 876—878 (1968b).
- Measurement of the membrane potential and evidence for the active transport of ions in *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **150**, 618—625 (1968c).
- Broda, E.: The uptake of some heavy trace elements by *Chlorella*. In: Stofftransport und Stoffverteilung in Zellen höherer Pflanzen (Hrsg. K. Mothes et al.), p. 109—116. Berlin: Akademie-Verlag 1968.
- Springer-Lederer, H., Findenegg, G. R., Paschinger, H.: Passive und aktive Komponenten der Anreicherung von Ionen durch *Chlorellaalgen*. Ber. Bunsenges. physik. Chem. **71**, 891—893 (1967).
- Coombs, J., Whittingham, C. P.: The effect of high partial pressures of oxygen on photosynthesis in *Chlorella*. Phytochemistry **5**, 643—651 (1966).
- Findenegg, G. R.: Aktive und passive Aufnahme von Spurenelementen durch *Chlorella*. Diss. Wien 1968.
- Broda, E.: Stoffwechsellabhängige Aufnahme von Zink durch *Chlorella*. Naturwissenschaften **53**, 358—359 (1966).
- Springer-Lederer, H.: Apparat zur laufenden Gewinnung von *Chlorella*-Algen für chemische Untersuchungen. Allg. prakt. Chem. **18**, 279—280 (1967).
- Fried, M., Broeshart, H.: The soil-plant system, p. 92. New York: Academic Press 1967.
- Fuhrmann, G. F., Rothstein, A.: The transport of Zn, Co and Ni into yeast cells. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **163**, 325—330 (1968).
- Gibbs, M.: Fermentation. In: R. Lewin (Hsg.), Physiology and biochemistry of algae, p. 91—97. New York: Academic Press 1962.
- Goldman, D., Schultz, S. G., Epstein, W.: Repressive control of potassium transport in *E. coli*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **130**, 546—548 (1966).
- Krausz, H., Broda, E.: Aufnahme von Spurenelementen durch Ionenaustausch in Pflanzenzellen. Mh. Chem. **96**, 695—705 (1965).
- Matzku, S.: Untersuchungen über den Mechanismus der Aufnahme von markiertem Zink durch *Chlorella*. Diss. Wien 1969.
- Northcote, D. H.: Plant cell surfaces. In: The structure and function of the membranes and surfaces of cells. Biochem. Soc. Symp. **22**, 105—113 (1962).
- Goulding, K. J., Horne, R. W.: Chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. Biochem. J. **70**, 391—397 (1958).

- Punnett, T., Derrenbacher, E. C.: The amino acid composition of algal cell walls. *J. gen. Microbiol* **44**, 105—114 (1966).
- Robinson, R. A., Stokes, R. H.: *Electrolyte solutions*, p. 126. London: Butterworth 1959.
- Ruppel, H. G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von *Chlorella* bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. *Flora (Jena)* **152**, 113—138 (1962).
- Schuster, I., Broda, E.: Die Bindung von Zink durch Zellwände von *Chlorella*. *Mh. Chem.* **101**, 285—295 (1970).
- Springer-Lederer, H., Rosenfeld, D. L.: Energy sources for the absorption of rubidium by *Chlorella*. *Physiol. Plantarum* **21**, 435—444 (1968).
- Vallée, M., Jeanjean, R.: Le système de transport de SO_4^{2-} chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **150**, 599—606 (1968).

Dr. S. Matzku
Institut für Nuklearmedizin
Deutsches Krebsforschungszentrum
D-69 Heidelberg, Berliner Straße 21

Prof. Dr. E. Broda
Institut für Physikal. Chemie der
Universität Wien
Wien IX, Währingerstraße 42, Österreich