

## Short Communications

# Die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella spec.* in der *Paramecium bursaria*-Symbiose

## I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoff-Stoffwechsel

WERNER REISSER

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, Abteilung für Experimentelle Phykologie (W. Wiessner), Untere Karspüle 2, D-3400 Göttingen, Bundesrepublik Deutschland

The Metabolic Interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella spec.* in the *Paramecium bursaria*-Symbiosis

### I. The Nitrogen and the Carbon Metabolism

**Abstract.** Symbiotic *Chlorellae* have been isolated from *Paramecium bursaria* Ehrbg. and cultivated under conditions of nitrogen deficiency. Reinfection of *Chlorella*-free *Paramecium bursaria* with these nitrogen-deficient algae resulted in a complete regeneration and multiplication of the algae within the host cells. The endosymbiotic algal cells of the *Paramecium bursaria*-symbiosis can be supplied by their host with nitrogen.

The inhibition of photosynthesis by 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) leads in green *Paramecium bursaria* to a breakdown of the symbiotic steady state-system resulting in a loss of algal cells. Obviously the endosymbiotic algae cannot be fed heterotrophically by their host to such an extent that a stable symbiosis is maintained.

The application of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) can be used as a new method for culturing *Chlorella*-free *Paramecium bursaria*.

**Key words:** *Chlorella* — *Paramecium bursaria* — Symbiosis — Metabolic interactions.

**Zusammenfassung.** Infektionsexperimente algenfreier *Paramecium bursaria* mit aus diesen isolierten und unter Stickstoffmangel-Bedingungen vorkultivierten Algen deuten darauf hin, daß die Versorgung der endosymbiontischen Algen mit stickstoffhaltigen Verbindungen durch ihren Wirt in einem zu gutem Wachstum und Vermehrung der Alge ausreichendem Maße möglich ist. Die Bedeutung dieser stoffwechselphysiologischen Beziehung für die Symbiosepartner wird diskutiert.

Die Vergiftung der Photosynthese der endosymbiontischen *Chlorella* durch 3-(3,4-Dichlorophenyl)-

1,1-dimethylharnstoff (DCMU) führt in grünen *Paramecium bursaria* durch Beeinflussung des Kohlenstoff-Stoffwechsels zu einer Entkoppelung des symbiontischen steady state-Systems und damit zur Auflösung der Symbiose. Eine ausreichende heterotrophe Ernährung der Alge durch das *Paramecium* ist in der Symbiose offenbar nicht möglich.

Die Anwendung von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) kann als neue Methode zur Züchtung algenfreier *Paramecium bursaria* dienen.

*Paramecium bursaria* Ehrbg. tritt in der Natur im allgemeinen in einer als Endosymbiose umschriebenen Einheit mit *Chlorella spec.* auf: sog. grünes *Paramecium*. Physiologische Untersuchungen dieser Symbiose hatten bislang hauptsächlich das Verhalten grüner Paramecien unter verschiedenen Kulturbedingungen und Versuche zur Infektion algenfreier (sog. farbloser) Organismen durch aus diesen isolierte oder andere Algen zum Inhalt (u.a. Bomford, 1965; Hirschon, 1969; Karakashian, 1963; Karakashian u. Karakashian, 1965; Loefer, 1936; Pado, 1965, 1967; Siegel, 1960; Weis, 1967, 1969, 1974). Hinsichtlich der chemischen Natur der zwischen den Symbiosepartnern möglicherweise ausgetauschten Substanzen liegen nur wenige gesicherte Ergebnisse vor. So fand z. B. Parker (1926) Hinweise auf einen CO<sub>2</sub>-Austausch zwischen *Paramecium* und Alge (vgl. Pringsheim, 1928), und Brown u. Nielsen (1974) wiesen die Abgabe von Kohlenhydraten (Maltose, Glucose, Fructose) sowie von Malat durch die Alge in der Symbiose nach.

Eine der Ursachen für die mangelhafte Kenntnis der spezifischen ernährungsphysiologischen Beziehungen in der *Paramecium bursaria*-Symbiose war die Schwierigkeit der axenischen Massenkultur der symbiontischen *Chlorella* in einem definierten Nährmedium, die somit stoffwechselphysiologischen Unter-

suchungen außerhalb des Symbioseverbandes weitgehend entzogen war. Mit der Entwicklung eines definierten Kulturmediums für eine aus *Paramecium bursaria* isolierte symbiontische *Chlorella* (Reisser, 1975) ist deren Massenkultur jetzt aber durchführbar. Dadurch ergeben sich neue Möglichkeiten, den individuellen Stoffwechsel der Symbiosepartner, ihre stoffwechselphysiologischen Beziehungen in der Symbiose sowie die Rückwirkungen dieser Beziehungen auf den eigenen Stoffwechsel der beiden Partner eingehender zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit berichtet über erste Ergebnisse zum Problem des Stickstoff- und des Kohlenstoff-Austausches zwischen *Paramecium bursaria* und *Chlorella spec.* in der Symbiose.

## MATERIAL UND METHODEN

Untersuchungsmaterial waren grüne *Paramecium bursaria* aus einem Teich im Göttinger Botanischen Garten, die entsprechend der von Sonneborn (1950; Siegel, 1960) angegebenen Methode kultiviert wurden. Algenfreie *Paramecium bursaria* wurden durch Kultur im Dauerdunkel und tägliches Überimpfen in frisches Nährmedium erhalten. Die symbiontische *Chlorella* wurde aus dem o. a. Material isoliert und in dem von Reisser (1975) angegebenen Nährmedium in axenischer Massenkultur angezogen. Stickstoffmangel-Algen wurden im selben Medium, in dem Kaliumnitrat durch eine äquimolare Menge an Kaliumchlorid ersetzt worden war, kultiviert. Die Infektionsversuche algenfreier *Paramecium bursaria* mit diesen Algen fanden in dem von Karakashian (1963) verwendeten Medium statt, dem an Stelle der Stickstoffquelle äquimolar Calciumchlorid zugesetzt wurde. Die Behandlung grüner *Paramecium bursaria* mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU,  $10^{-6}$  m) wurde in dem bei Sonneborn (1950) angegebenen Medium vorgenommen.

## ERGEBNISSE

Bislang fehlt ein direkter Nachweis für den Austausch stickstoffhaltiger Verbindungen zwischen *Paramecium bursaria* und seiner endosymbiontischen *Chlorella*. Daher wurden aus grünen Paramecien isolierte symbiontische Chlorellen in einer Massenkultur unter Stickstoffmangel-Bedingungen angezogen und die infolgedessen fast farblosen und zum Wachstumsstillstand gekommenen Algen (Stickstoffmangel-Chlorose) anschließend algenfreien *Paramecium bursaria* in einem Stickstoffmangel-Medium zur Aufnahme in den Symbioseverband angeboten. Sie wurden von den Paramecien aufgenommen und vermehrten sich in diesen. Etwa 10 Tage nach der Infektion konnten vollständig grüne *Paramecien* beobachtet werden. Stickstoffmangel-Algen, die keine symbiontische Verbindung eingegangen waren, starben hingegen nach kurzer Zeit ab. In Kontrollversuchen konnten die für die Infektion benutzten Algen bei Kultur ohne Paramecien nur nach Zusatz von Nitrat zum Ergrünen gebracht

werden, wobei der Regenerationsprozeß rascher als im Symbioseverband ablief. Damit ist nachgewiesen, daß die symbiontische *Chlorella* in einem stickstofffreien Medium im Symbiosekomplex die Chlorophyllsynthese sowie Wachstum und Vermehrung wieder aufnimmt. Offensichtlich kann somit die Alge durch das *Paramecium* mit stickstoffhaltigen Verbindungen versorgt werden.

Bisherige Arbeiten über die *Paramecium bursaria*-Symbiose, insbesondere Versuche zur Züchtung algenfreier Organismen (Pringsheim, 1928; Siegel, 1960) sowie Untersuchungen zur Wachstumsleistung grüner Paramecien (Karakashian, 1963; Pado, 1965, 1967; Pringsheim, 1928; Weis, 1967, 1969, 1974), lassen vermuten, daß – mit Bezug auf den Kohlenstoff-Stoffwechsel – die Photosyntheseaktivität der Alge für die Stabilität und Effektivität des symbiontischen Komplexes von großer Bedeutung ist. Es ergibt sich daher die Frage nach dem Verhalten des Symbioseverbandes bei gestörter Photosynthese und – damit zusammenhängend – als weiteres Problem, ob die Kohlenstoffversorgung der Alge in der Symbiose – ähnlich wie es mit der Stickstoffversorgung geschieht – durch das *Paramecium*, dem im bakterienhaltigen Milieu ausreichend Nahrungsquellen zum eigenen Wachstum zur Verfügung stehen, auf heterotrophem Wege übernommen werden kann. Deshalb wurde die Photosyntheseaktivität der symbiontischen Algen in den Paramecien durch 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) (Trebst, 1974) gehemmt und danach das Verhalten des Symbioseverbandes bei Weiterkultur im Licht beobachtet.

In vergleichenden Inkubationsversuchen mit aus *Paramecium bursaria* isolierten Chlorellen und radioaktiv markiertem  $\text{CO}_2$  wurde ferner der Einfluß der Vergiftung auf die Menge der von den Algen abgegebenen Substanzen – hauptsächlich Maltose – geprüft. Es zeigte sich, daß deren Abgabe um mehr als 95% gehemmt wurde.

In der Symbiose kam es durch den Einfluß von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) zu einer Verminderung der Zahl der symbiontischen Chlorellen pro Wirtsorganismus, wobei die Paramecien, die alle 2 Tage in frisches Nährmedium übertragen wurden, nach etwa 3–4 Wochen völlig algenfrei waren. Parallel zum Verlust der Algen traten in den Paramecien vermehrt die sog. Schewiakoff'schen Kristalle (Pringsheim, 1928) auf. Das Wachstum algenfreier *Paramecium bursaria* wurde durch den Hemmstoff nicht negativ beeinflusst. Durch die Behandlung mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) stirbt zumindest ein Teil der symbiontischen Algen nicht ab: Bei Überführung der fast farblosen Paramecien in ein hemmstofffreies Nährmedium lassen sich nach kurzer Zeit wieder voll ergrünte Organismen

beobachten. Ebenso findet eine Erholung der isolierten symbiontischen Algen nach Einwirkung von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) in hemmstofffreier Massenkultur statt. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die symbiontische Alge auch im Symbiosekomplex auf die photosynthetische Kohlenstoffversorgung angewiesen ist und ihre Versorgung mit Kohlenstoffverbindungen bei einem Ausfall der Photosynthese somit nicht durch das *Paramecium* in ausreichendem Maße übernommen werden kann.

## DISKUSSION

Ungeachtet des Nachweises, daß in der *Paramecium bursaria*-Symbiose die Stickstoffversorgung der symbiontischen *Chlorella* durch das *Paramecium* erfolgen kann, bleibt die Frage nach der chemischen Natur dieser an die Alge abgegebenen stickstoffhaltigen Substanzen offen und die Bedeutung dieser Art der Stickstoffernährung für den symbiontischen Komplex in einem die Eigenversorgung der Alge ermöglichenden nitrathaltigem Nährmedium ungeklärt. Nach Cook (1970) nehmen die symbiontischen Algen in grünen Hydren von ihrem Wirt abgegebene Aminosäuren auf. Eigene Untersuchungen an den aus *Paramecium bursaria* isolierten Algen wiesen neben Nitrat auch Ammonsalze und Glutaminsäure als verwertbare Stickstoffquellen nach. Muscatine et al. (1974) diskutieren für *Convoluta roscoffensis* die Nutzung von Stickstoffabfallprodukten durch die endosymbiontischen Algen, welche auf diese Weise zur Entgiftung des intracellulären Milieus beitragen und damit Einfluß auf die Wachstumsleistung ihres Wirtes ausüben könnten. Hinsichtlich der Verhältnisse bei *Paramecium bursaria* ist es denkbar, daß die Aufnahme organischer Stickstoffverbindungen durch die Algen für diese deshalb von Vorteil ist, weil sie so ihre in der Symbiose durch Abgabe von Kohlenhydraten (Brown u. Nielsen, 1974) unausgeglichene Energiebilanz durch die Verwertung stickstoffhaltiger organischer Substanzen zumindest teilweise verbessern könnten. Möglicherweise treffen derartige Überlegungen zum Energiehaushalt auch auf andere Symbiosen zu.

Als Ursache der Entkoppelung des symbiontischen steady state-Systems und damit der Auflösung der Symbiose durch das Photosynthesegift 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Einmal wird das Wachstum der symbiontischen Algen als Folge der unterbundenen Photosynthese stark gehemmt. Dadurch könnte es zu einer statistischen Verminderung der Algenzahl in den sich teilenden Paramecien kommen, da eine ausreichende heterotrophe Ernährung der

Alge durch ihren Wirt den vorliegenden Befunden zufolge nicht stattfindet und die Teilungsfrequenz der Algenpopulation dann nicht mit derjenigen der Paramecien Schritt halten kann. Diese Überlegung wird durch den Befund (Reisser, 1975) gestützt, daß eine aus *Paramecium bursaria* isolierte *Chlorella* in einem definierten CO<sub>2</sub>-freien Medium im Dauerdunkel mit verschiedenen Kohlenhydraten als Kohlenstoffquellen (Glucose, Galaktose, Lactose, Maltose) nicht wachsen kann.

Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, daß als Folge der Einwirkung von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) die Menge der von den Algen an das *Paramecium* abgegebenen Kohlenstoffverbindungen sinkt, deren qualitative und quantitative Zusammensetzung als Art Erkennungsmuster für den Wirt dienen könnte. Eine Beeinträchtigung oder ein völliger Ausfall dieses Erkennungssystems könnte Ursache für die Auflösung der Symbiose werden. Die Entfernung der Alge aus dem Symbioseverband wäre daher sowohl als aktiver als auch als passiver Mechanismus vorstellbar. Die Klärung dieser Frage bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten. Über sie wird — ebenso wie über die stoffwechselphysiologische Umstimmung des *Parameciums* bei Verlust des Symbiosepartners, für die das Auftreten der sog. Schewiakoffschen Kristalle bei algenfreier Kultur (Wichterman, 1941) ein Hinweis ist — an anderer Stelle berichtet werden.

Als Nebenergebnis dieser Arbeit zeigt sich, daß die Anwendung von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) neben der Kultur im Dauerdunkel (Pringsheim, 1928) und der Einwirkung von Röntgenstrahlen (Wichterman, 1943) als eine weitere Methode zur Züchtung algenfreier *Paramecium bursaria* dienen kann.

Diese Arbeit wurde aus Sonderforschungsmitteln des Landes Niedersachsen unterstützt. Herrn Akad.-Dir. Dr. W. Koch (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut Göttingen) danke ich für zahlreiche Anregungen und Diskussionen.

## LITERATUR

- Bomford, R.: Infection of alga-free *Paramecium bursaria* with strains of *Chlorella*, *Scenedesmus*, and a yeast. *J. Protozool.* **12**, 221–224 (1965)
- Brown, J. A., Nielsen, P. J.: Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic chlorellae to *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.* **21**, 569–570 (1974)
- Cook, C. B.: Uptake of <sup>35</sup>S-amino acids by symbiotic algae (Zoochlorellae) from the food of green *Hydra*. *Amer. Zool.* **10**, 544 (1970)
- Hirshon, J. B.: The response of *Paramecium bursaria* to potential endocellular symbionts. *Biol. Bull.* **136**, 33–42 (1969)
- Karakashian, S. J.: Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. *Physiol. Zool.* **36**, 52–68 (1963)

- Karakashian, S. J., Karakashian, M. W.: Evolution and symbiosis in the genus *Chlorella* and related algae. *Evolution* **19**, 368–377 (1965)
- Loefer, J. B.: Effect of certain "peptone" media and carbohydrates on the growth of *Paramecium bursaria*. *Arch. Protistenk.* **87**, 142–150 (1936)
- Muscatine, L., Boyle, J. E., Smith, D. C.: Symbiosis of the acoel flatworm *Convoluta roscoffensis* with the alga *Platymonas convolutae*. *Proc. roy. Soc. B* **187**, 221–234 (1974)
- Pado, R.: Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I. The influence of light on the growth of symbionts. *Folia Biol.* **13**, 173–182 (1965)
- Pado, R.: Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. II. Photosynthesis. *Acta Soc. Bot. pol.* **36**, 97–108 (1967)
- Parker, R. C.: Symbiosis in *Paramecium bursaria*. *J. exp. Zool.* **46**, 1–12 (1926)
- Pringsheim, E. G.: Physiologische Untersuchungen an *Paramecium bursaria*. *Arch. Protistenk.* **64**, 289–418 (1928)
- Reisser, W.: Zur Taxonomie einer auxotrophen *Chlorella* aus *Paramecium bursaria* Ehrbg. *Arch. Microbiol.* **104**, 293–295 (1975)
- Siegel, R. W.: Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. *Exp. Cell Res.* **19**, 239–252 (1960)
- Sonneborn, T. M.: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. exp. Zool.* **113**, 87–148 (1950)
- Trebst, R.: Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 423–458 (1974)
- Weis, D. S.: Correlated growth of alga and protozoan in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.* **14**, 12–13 (1967)
- Weis, D. S.: Regulation of host and symbiont population size in *Paramecium bursaria*. *Experientia (Basel)* **15**, 664–666 (1969)
- Weis, D. S.: Sparing effect of light on bacterial consumption of *Paramecium bursaria*. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **93**, 135–140 (1974)
- Wichterman, R.: Studies on *Zoochlorella*-free *Paramecium bursaria*. *Biol. Bull.* **81**, 304–305 (1941)
- Wichterman, R.: The biological effects of X-rays on mating types and conjugation of *Paramecium bursaria*. *Anat. Rec.* **87**, 113–127 (1943)

Eingegangen am 5. November 1975