

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

II. Symbiose-spezifische Merkmale der Stoffwechselphysiologie und der Cytologie des Symbioseverbandes und ihre Regulation

WERNER REISSER

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, Abt. Exp. Phykol. (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

II. Symbiosis-Specific Properties of the Physiology
and the Cytology of the Symbiotic Unit and Their Regulation

Abstract. The endosymbiotic association of *Paramecium bursaria* Ehrbg. with *Chlorella* spec. (green *Paramecium*) was studied both physiologically and cytologically. Comparison of the properties of the symbiotic unit with those of the symbiotic partners which had been isolated from it revealed the following features and differences: 1. Up to 6000 lux the photosynthetic capacity of the symbiotic unit is higher than that of the isolated symbiotic algae grown independently in mass culture under defined conditions. Alga-free *Paramecium bursaria* (colourless *Paramecium*) show a very low rate of CO₂-fixation. 2. The green *Paramecium* has a higher compensation point of photosynthesis (4000–5000 lux) than the isolated alga (200–400 lux). 3. Green paramecia consume less oxygen in darkness than colourless organisms but more than the isolated algae. 4. The uptake of carbohydrates from the culture medium by green paramecia is lower than the uptake by alga-free *P. bursaria* but higher than the one of the isolated algae. 5. Symbiotic algae within the intact symbiotic unit show tightly packed photosynthetic membranes and an intense deposition of starch. In the presence of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) or in darkness the arrangement of thylakoids is less compact and the deposition of starch is reduced. The growth and the number of the symbiotic algae in situ is regulated by a complex mechanism to which the intracellular level of carbohydrates belongs. The results are discussed in connection with ecological aspects of the *Paramecium bursaria*-endosymbiosis.

Key words: *Paramecium bursaria* – *Chlorella* – Symbiosis – Regulation.

Zusammenfassung. Der endosymbiontische Verband von *Paramecium bursaria* Ehrbg. mit *Chlorella* spec. (grünes *Paramecium*) wurde physiologisch und cytologisch untersucht. Ein Vergleich der Eigenschaften der Symbioseeinheit mit denen der getrennt kultivierten Symbiosepartner ergab die folgenden Merkmale und Unterschiede: 1. Der symbiontische Verband hat bis zu einer Beleuchtungsstärke von 6000 lux eine stärkere Photosyntheseleistung als die aus ihm isolierte und in Massenkultur in einem definierten Medium kultivierte Alge. Algenfreie *P. bursaria* zeigen nur eine minimale Fähigkeit zur CO₂-Fixierung. 2. Der Kompensationspunkt der Photosynthese liegt beim algenhaltigen *Paramecium* bei ca. 4000–5000 lux, derjenige der getrennt kultivierten Alge bei ca. 200–400 lux. 3. Die Symbioseeinheit hat im Dunkeln im Vergleich mit algenfreien *P. bursaria* einen niedrigeren, im Vergleich mit der frei kultivierten Alge jedoch einen höheren Sauerstoffbedarf. 4. Das grüne *Paramecium* nimmt weniger Kohlenhydrate aus dem Medium auf als algenfreie Paramecien, hat aber eine höhere Aufnahmeleistung als die isoliert gezogene Algen. 5. Im Symbioseverband besitzt die symbiontische Alge im Licht eine kompakte Lagerung der photosynthetischen Membranen und eine massive Stärkeablagerung. Die Vergiftung der Photosynthese durch 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) oder die Kultur im Dunkeln führt in algenhaltigen Paramecien zu einer aufgelockerten Lagerung der Thylakoide und einer Verringerung der Stärkeablagerung. Die Algenpopulation unterliegt im symbiontischen Verband einem komplexen Regulationsmechanismus, bei dem u. a. der intracelluläre Kohlenhydratspiegel eine Rolle spielt. Die geschilderten Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der Ökologie des grünen *P. bursaria* diskutiert.

Unter dem Begriff der Symbiose wird allgemein das „Zusammenleben ungleichnamiger Organismen“ (de Bary, 1879) verstanden. Eine engere Fassung dieser Definition bezieht einen gegenseitigen Nutzen ein (Starr, 1975: „mutually beneficial symbiosis“), d. h. die Stabilität und Leistungsfähigkeit einer derartigen Symbiose wird um so höher sein, je größer die Abstimmung der stoffwechselphysiologischen Organisation der beteiligten Partner aufeinander ist, die sich bis zu einem gewissen Grade in ihrem Verhalten als Funktionseinheit im natürlichen Milieu äußert. Die derartige Verbindung zweier unterschiedlicher Organismen zu einer neuen Organisationsstufe mit einem qualitativ anderen Verhalten als es diese bei getrenntem Auftreten zeigen, kann somit als charakteristisches Merkmal einer Symbiose im obigen Sinne gelten und wurde bisher u. a. an Flechten- (Flechteninhaltsstoffe) und an Rhizobiensymbiosen (Leghämoglobin) demonstriert. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb die Symbioseigenschaften des allgemein als Endosymbiose beschriebenen Verbandes von *Paramecium bursaria* Ehrbg. mit *Chlorella spec.*, des sog. grünen Parameciums, untersucht werden. Grüne Paramecien sind hinsichtlich ihrer Morphologie und Cytologie schon mehrfach bearbeitet worden (u. a. Dangeard, 1900; Le Dantec, 1892; Karakashian, 1970; Karakashian et al., 1968; Pringsheim, 1928; Vivier et al., 1967), wobei die vorliegenden Untersuchungen überwiegend deskriptiver Natur sind, ohne eine nähere physiologische Charakterisierung der beteiligten Organismen vorzunehmen. Mit der Entwicklung von Methoden zur Isolierung und Massenkultur der symbiontischen *Chlorella* unter definierten Bedingungen (Reisser, 1975) ist jetzt jedoch die Möglichkeit gegeben, die voneinander getrennten Symbiosepartner im Vergleich mit dem Symbioseverband physiologisch und cytologisch zu untersuchen. Damit ist eine unerläßliche Voraussetzung zur Analyse des symbiontischen Geschehens und der die Stabilität und Funktionstüchtigkeit der Symbiose bedingenden Regulationsmechanismen erfüllt. Im folgenden soll deshalb der Verband von *P. bursaria* mit *Chlorella spec.* an Hand von Untersuchungen zur Photosyntheseleistung, zum Sauerstoffbedarf und zur Verwertung externer Kohlenhydrate, die durch elektronenmikroskopische Beobachtungen ergänzt werden, auf die eingangs postulierten Symbiosekriterien hin überprüft werden.

MATERIAL UND METHODEN

Die Kultur des grünen Parameciums und der aus ihm isolierten Algen erfolgte nach Reisser (1975, 1976) im Licht-Dunkel-Wechsel (14:10) mit einer Beleuchtungsstärke von ca. 3800 lux (*Paramecium*) bzw. 3800 und ca. 10000 lux (*Chlorella*) bei einer Temperatur zwischen 22 und 24°C.

Zur Bestimmung der Assimilationsraten von ¹⁴C-markiertem NaHCO₃ bzw. von Glucose oder Maltose (Radiochemical Center Amersham, England) wurden die Algen in frischem Nährmedium, in dem Kaliumnitrat durch eine äquimolare Menge an Kaliumchlorid ersetzt worden war (pH 5,0), suspendiert und nach einstündiger Adaptationszeit bei 22°C 3 h lang mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle inkubiert (NaHCO₃ 0,016 M; Glucose 0,021 M; Maltose 0,028 M). Für die Messungen der Assimilationsleistung grüner und algenfreier *Paramecium bursaria* fand unter denselben Bedingungen das von Karakashian (1963) verwendete Medium Verwendung (NaHCO₃ 0,013 M; Glucose 0,028 M; Maltose 0,014 M). Vor Versuchsbeginn wurden die Organismen mehrmals in sterilem Medium gewaschen.

Die Auftrennung der grünen Paramecien in eine Algen- und eine *Paramecium*-Fraktion erfolgte durch Aufbrechen der algenhaltigen Organismen in einer Yeda-Pressen (Shneyour u. Avron, 1970) und anschließende Zentrifugation.

Zur Bestimmung der Radioaktivität diente ein Flüssigkeitszintillationszähler (Packard, Illinois, Model 2450 Tri-Carb).

Die Messung des Sauerstoffbedarfes geschah polarographisch (Biological Oxygen Monitor Model 53, YSI Ohio) bei 22°C in den für die Inkubationsexperimente angegebenen Medien.

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach Mckinney (1941).

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde das Zellmaterial mit gepuffertem Osmiumtetroxid (Palade, 1952) fixiert. Die Einbettung in Epon erfolgte nach Luft (1961), die Nachkontrastierung nach Reynolds (1963).

ERGEBNISSE

Die bisherigen Untersuchungen der Wachstumsleistung grüner *Paramecium bursaria* und algenfreier *P. bursaria*, sog. farbloser Paramecien, lassen vermuten, daß die symbiontische *Chlorella* durch Abgabe von Photosyntheseprodukten – wahrscheinlich vorwiegend Maltose – zur Ernährung ihres Wirtes beitragen kann (u. a. Brown u. Nielsen, 1974; Karakashian, 1963; Loefer, 1936; Pado, 1965; Muscatine et al., 1967; Weis, 1967, 1968, 1969, 1974). Sie ermöglichen jedoch nur eine unzureichende Beurteilung der Bedeutung der Photosynthese für die Symbiose als Funktionseinheit im natürlichen Milieu, in dem *Paramecium* stets organische Kohlenstoffquellen – z. B. in Form von Bakterien – zur Verfügung stehen. Daher wurde die photosynthetisch fixierte CO₂-Menge und ihre Beziehung zur Exkretion von organischem Material bei der symbiontischen Alge im intakten Symbioseverband und bei der isoliert kultivierten Alge unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In beiden Fällen (Tabelle 1) steigt die photosynthetische CO₂-Fixierung durch die Alge ebenso wie die Menge der abgegebenen Verbindungen mit zunehmender Beleuchtungsstärke an. Der CO₂-Einbau und die Abgabe von organischen Verbindungen sind im Dunkeln und bei Vergiftung der Photosynthese mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) (Trebst, 1974) sowie in farblosen *P. bursaria* nur minimal. Somit erfolgt die CO₂-Fixierung auch im Symbioseverband vorwiegend auf photosynthetischem

Tabelle 1. Photosyntheseleistung und ausgeschiedene Maltosemenge^a von *Chlorella spec.* in der *Paramecium bursaria*-Symbiose und in isolierter Kultur in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke

		lux	100	700	6000	21000
			10 ⁻² µMol CO ₂		µg Chlorophyll ⁻¹ 3 h ⁻¹	
Photosyntheseleistung (Gesamtfixierung)	<i>Chlorella</i> isoliert		1,32	2,05	9,89	14,17
	<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband		1,70	4,04	10,07	10,52
Aktivität im Inkubationsmedium (<i>Chlorella</i> isoliert) bzw. in der <i>Paramecium</i> -Fraktion (<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband)			% Gesamtfixierung			
	<i>Chlorella</i> isoliert		62,2	53,7	38,0	34,4
	<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband		32,2	45,6	51,1	56,9
Aktivität im Inkubationsmedium (<i>Chlorella</i> isoliert) bzw. in der <i>Paramecium</i> -Fraktion (<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband)			10 ⁻³ µMol Maltose		µg Chlorophyll ⁻¹ 3 h ⁻¹	
	<i>Chlorella</i> isoliert		0,68	0,92	3,13	4,06
	<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband		0,46	1,54	4,29	4,99

^a Für die Berechnung wurde angenommen, daß die von den symbiontischen Chlorellen abgegebenen markierten Verbindungen zu 100% aus Maltose bestehen und dieselbe spezifische Aktivität wie das eingesetzte ¹⁴C-markierte NaHCO₃ besitzen

Wege durch die endosymbiontische *Chlorella*. Bemerkenswerterweise ist das Verhältnis der Menge an ausgeschiedenen Substanzen zur Gesamtfixierung an CO₂ bei den isolierten Algen nicht konstant, sondern sinkt mit steigender Beleuchtungsstärke. Im Gegensatz dazu nimmt der ¹⁴C-Anteil im Wirt (sog. *Paramecium*-Fraktion, Tabelle 1), d. h. die Menge der von den Algen in der Symbiose ausgeschiedenen Verbindungen, mit ansteigender Beleuchtungsstärke relativ und absolut zu. Ein Vergleich der Gesamtfixierung durch die isolierten Algen und das grüne *Paramecium* verdeutlicht, daß der symbiontische Verband bis 6000 lux mehr CO₂ fixiert als die isolierte *Chlorella*; bei 700 lux fast doppelt soviel. Dieses Verhältnis kehrt sich erst oberhalb von 6000 lux um. Dadurch liegt die Steigerungsrate der CO₂-Fixierung von 100 auf 21000 lux beim grünen *Paramecium* insgesamt niedriger als bei der getrennt kultivierten Alge. Im Symbioseverband wird damit – im Gegensatz zur isolierten Alge – die maximale Photosyntheseleistung schon bei 6000 lux erreicht. Offenbar liegt ein Regulationsmechanismus vor, bei dem es sich vermutlich nicht nur um eine einfache Diffusionsbarriere des Wirtscytoplasmas für extern angebotenes CO₂ handelt, da in diesem Falle der symbiontische Komplex bei niedrigeren Beleuchtungsstärken keine höhere Fixierungsrate als die isolierte Alge aufweisen dürfte. Dieses Verhalten stellt eine interessante Parallele zu demjenigen von Licht- und Schattenpflanzen (Egle, 1960) dar, die bei gegebener Beleuchtungsstärke ebenfalls unterschiedlich hohe CO₂-Fixierungsraten besitzen. Die im Vergleich mit der Alge in situ oberhalb

von 6000 lux höhere Fixierungsrate der isolierten *Chlorella* könnte zusätzlich auf eine limitierte CO₂-Versorgung im symbiontischen Verband hinweisen. Eine Beeinflussung der perialgalen CO₂-Konzentration im *Paramecium* durch die Veratmung der von den *Chlorellen* ausgeschiedenen Maltose ist ebenfalls möglich.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie weit die interne Versorgung des grünen *Parameciums* mit Kohlenhydraten dessen Nutzung externer Nahrungsquellen beeinflussen und es dadurch – zumindest teilweise – unabhängig von Kohlenhydratquellen im Milieu machen kann. Bei Einbauversuchen von ¹⁴C-markierter Glucose durch algenfreie *P. bursaria*, algenhaltige *Paramecien* und die isolierten symbiontischen Algen zeigte sich, daß algenfreie *Paramecien* (100%) rund 6mal mehr Glucose aufnehmen als algenhaltige (16,8%), deren Aufnahmemenge wiederum wesentlich höher als diejenige der symbiontischen *Chlorella* (0,2%) ist. Derselbe Befund ergibt sich bei der Messung der Aufnahme von ¹⁴C-markierter Maltose. In Verbindung hiermit ist die in anderem Zusammenhang publizierte Beobachtung wichtig, daß die vorliegende *Chlorella* weder mit Glucose noch mit Maltose als alleinigen Kohlenstoffquellen wachsen kann (Reisser, 1975), die Aufnahme dieser Kohlenhydrate durch die Alge in der Symbiose also keine Rolle spielt. Damit ist bewiesen, daß die Menge der dem *Paramecium* endogen durch die Maltoseabgabe seiner symbiontischen Algen zur Verfügung stehenden Kohlenhydrate die Aufnahme externer Kohlenhydrate gegebenenfalls senken und dadurch das *Paramecium*

Tabelle 2. Sauerstoff-Aufnahme und -Abgabe von algenhaltigen und algenfreien *Paramecium bursaria* im Vergleich mit der isoliert kultivierten symbiontischen *Chlorella spec.* in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke

lux	<i>Paramecium bursaria</i> ohne symbiontische Chlorellen	<i>Paramecium bursaria</i> mit symbiontischen Chlorellen	<i>Paramecium bursaria</i> mit symbiontischen Chlorellen	Isolierte <i>Chlorella</i>
	$10^{-2} \text{ mg O}_2 \text{ min}^{-1} 10^6 \text{ Zellen}^{-1}$		$10^{-2} \text{ mg O}_2 \text{ min}^{-1}$	$\text{mg Chlorophyll}^{-1}$
0	- 17,2	- 2,8	- 7,9	- 1,5
500	/	- 1,8	- 5,2	+ 0,8
2600	/	- 0,9	- 2,6	+ 1,0
5800	/	+ 1,1	+ 3,1	+ 7,7

+ = Sauerstoffabgabe; - = Sauerstoffaufnahme

unabhängiger von Nahrungsquellen im äußeren Milieu machen kann. Somit bietet sich jetzt auch eine physiologische Erklärung für die seit langem bekannte Beobachtung (Karakashian, 1963), wonach grüne und farblose *P. bursaria* in einem bakterienarmen Milieu im Licht unterschiedliche Wachstumsraten zeigen: Algenhaltige Paramecien wachsen auf Grund ihrer Eigenversorgung mit Kohlenhydraten schneller als algenfreie Vergleichsorganismen, die vollständig auf die offenbar limitierte Nahrungsquelle im Kulturmedium (Bakterien) angewiesen sind. In Verbindung damit ergibt sich die Frage, ob und gegebenenfalls welche Beziehungen zwischen der Zahl der endosymbiontischen Algen und der Menge der vom symbiontischen Verband aus dem Nährmedium aufgenommenen Kohlenhydrate besteht. Grüne Paramecien wurden deshalb in Parallelversuchen mit markierter Glucose und NaHCO_3 inkubiert und anschließend für 3 Wochen ins Dunkle überführt, um sie an Algen zu verarmen. Dabei sank der als Indicator für die Zahl der symbiontischen Algen bestimmte Chlorophyllgehalt der Paramecien um etwa 53%, die im Licht bei sättigender Beleuchtungsstärke gemessene CO_2 -Fixierung jedoch nur um ca. 17%. Die parallele Messung der Glucoseaufnahme durch die an Algen verarmten Paramecien erbrachte eine Steigerung der Aufnahmemenge um ca. 650% gegenüber normal algenhaltigen Organismen. Somit steigt mit sinkender Algenzahl im *Paramecium* und damit geringerer Produktion an Kohlenhydraten die Aufnahme extern angebotener Kohlenhydrate durch das *Paramecium* an. Gleichzeitig bestätigen die geschilderten Beobachtungen im physiologischen Versuch, daß die Zahl der symbiontischen Algen durch die Kultur des *Parameciums* im Dunkeln zwar reduziert wird, diese aber — bei einer bestimmten submaximalen Teilungsrates des Wirtes — nicht gänzlich aus dem Symbioseverband verschwinden und lebensfähig bleiben. Bei Überführung derartiger Dunkelkulturen ins Licht findet eine rasche Vermehrung der Algen

auf Grund der einsetzenden, als CO_2 -Fixierung gemessenen Photosynthese statt.

Die geschilderten Versuche weisen bezüglich der Kohlenhydratproduktion und des Kohlenhydratverbrauches im Symbioseverband auf eine enge stoffwechselphysiologische Verbindung zwischen *Paramecium* und Alge hin. Damit stellt sich die Frage, ob der symbiontische Verband den für die Veratmung der von den Algen ausgeschiedenen Substanzen notwendigen Sauerstoffbedarf des *Parameciums* durch photosynthetische Eigenproduktion decken kann. Hierdurch würde das grüne *Paramecium* von einem weiteren Milieufaktor weitgehend unabhängig. Ein Vergleich von Sauerstoffproduktion und -verbrauch algenhaltiger Paramecien im Dunkeln und bei verschiedenen Beleuchtungsstärken sowie farbloser Paramecien und der isolierten symbiontischen Chlorellen (Tabelle 2) ergab, daß der Photosynthese-Kompensationspunkt der aus dem *Paramecium* isolierten *Chlorella* (200–400 lux) niedriger ist als der Kompensationspunkt der symbiontischen Einheit (4000–5000 lux). Die isolierte Alge gibt demnach schon bei geringen Beleuchtungsstärken (z. B. 2600 lux) mehr Sauerstoff als das grüne *Paramecium* ab. Im symbiontischen Verband findet somit wahrscheinlich bereits im Schwachlicht eine — zumindest teilweise — Versorgung des *Parameciums* mit Sauerstoff durch die Algen statt. Das grüne *Paramecium* besitzt eine wesentlich stärkere Atmungsleistung als die aus ihm isolierten Algen und weist dementsprechend einen höheren Kompensationspunkt auf. Bereits bei Beleuchtungsstärken oberhalb von 4000–5000 lux decken die symbiontischen Chlorellen den Sauerstoffbedarf des gesamten Systems (vgl. Engelmann, 1881). Im Dunkeln zeigen algenfreie *P. bursaria* einen höheren Verbrauch an atmosphärischem Sauerstoff als grüne Organismen. Dies deutet auf einen prinzipiell gesteigerten Bedarf an organischer Nahrung bei den algenfreien Paramecien hin.

Tabelle 3. Unterschiede in der elektronenmikroskopisch sichtbaren Struktur von *Chlorella spec.* in der *Paramecium bursaria*-Symbiose und bei isolierter Anzucht unter verschiedenen Bedingungen

	lux	Strukturierung des Thylakoidsystems	Stärkeablagerung	Bemerkungen
Isolierte <i>Chlorella</i>	3800	aufgelockert	vorhanden	
	10000	aufgelockert	vorhanden	
	10000 + Fleischextrakt (0,1%)	aufgelockert	verringert	
	0	aufgelockert	fehlt	
<i>Chlorella</i> im symbiontischen Verband	3800	dicht	vermehrt	
	3800 + DCMU (10^{-6} M)	aufgelockert	verringert – fehlt	Kanalbildung an perialgalen Vacuolen des Parameciums
	0	aufgelockert	verringert – fehlt	

Die aufgezeigten physiologischen Unterschiede zwischen der isoliert kultivierten und der im Symbioseverband existierenden *Chlorella* sowie die wechselseitige Beeinflussung der Symbiosepartner führen zwangsläufig zum zweiten in dieser Arbeit angeschnittenen Problem, ob sich diese unterschiedliche physiologische Leistungsfähigkeit der Alge auch cytologisch als Strukturunterschiede nachweisen läßt. Hierzu wurden grüne Paramecien im Licht-Dunkel-Wechsel (3800 lux), im Dauerdunkel (7 Tage) und im Licht-Dunkel-Wechsel in Gegenwart von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU, 10^{-6} M, 7 Tage) kultiviert und elektronenmikroskopisch untersucht. Als Vergleich dienten die aus ihnen isolierten symbiontischen Chlorellen, welche auxotroph im Licht-Dunkel-Wechsel bei 3800 und bei 10000 lux sowie im Dauerdunkel (7 Tage) angezogen wurden. Die cytologische Organisation der bei Licht-Dunkel-Wechsel im symbiontischen Verband vorliegenden *Chlorella* entspricht den von Karakashian et al. (1968) und von Vivier et al. (1967) publizierten Angaben: becherförmiger Plastid, ein bis mehrere Mitochondrien und Dictyosomen, Microbodies. Es soll deshalb im folgenden nur auf durch Ernährungs- und Milieubedingungen verursachte Unterschiede der strukturellen Organisation eingegangen werden (Tabelle 3). Auffällig ist vor allem die kompakte Strukturierung des Thylakoidsystems mit dicht aneinander liegenden Membranen in der endosymbiontischen im Licht-Dunkel-Wechsel kultivierten *Chlorella*, die von einer massiven Stärkebildung begleitet wird und sich deutlich von der aufgelockerten Lagerung der photosynthetischen Membranen und der geringeren Stärkeablagerung der bei derselben Beleuchtungsstärke kultivierten isolierten Alge unterscheidet (Abb. 1 und 5). Im Dauerdunkel bzw. in Gegenwart des Photosynthesegiftes 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) angezogene grüne Paramecien weisen eine aufgelockerte Struktur des Thylakoidsystems auf. Die Stärkeablagerung ist reduziert, das Pyrenoid ist stets vor-

handen (Abb. 2 und 3). In Gegenwart von Fleischextrakt (0,1%) nimmt die Stärkeablagerung ab, sie fehlt im Dauerdunkel gänzlich (isolierte symbiontische *Chlorella*, Abb. 6). Die charakteristische Packung der photosynthetischen Membranen der im *Paramecium* vorliegenden Chlorellen kann auf einem Adaptationsprozeß an das spezielle symbiontische Milieu beruhen. Bei der Infektion algengreier *P. bursaria* mit den aus ihnen isolierten Algen zeigte sich nach 24 h, daß zwar nur ein geringer Prozentsatz der angebotenen Algenmenge in die Symbiose aufgenommen wird, die im *Paramecium* überlebenden Chlorellen aber hinsichtlich der Struktur ihres Thylakoidsystems ein den endosymbiontischen Algen in situ ähnliches Bild aufweisen (Abb. 7). Hingewiesen werden soll außerdem auf eine bei den grünen Paramecien nur im Dauerdunkel oder im Licht-Dunkel-Wechsel nach Vergiftung der Photosynthese mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) zu beobachtende Veränderung an der die Algen einschließenden Vacuolenmembran. Diese zeigt zuweilen Ausstülpungen und kanalartige Fortsätze in das Cytoplasma des Wirtes hinein, die teilweise bis in die Nähe seiner Pellicula reichen (Abb. 3 und 4). Diese cytologischen Strukturen sind bisher bei grünen Paramecien noch nicht beobachtet worden. Möglicherweise stehen sie im Zusammenhang mit der Abstoßung von Algenzellen aus dem symbiontischen Verband.

DISKUSSION

Ein Vergleich und eine Analyse der hier vorgelegten Ergebnisse zum Verhalten der symbiontischen Algen in isoliertem Zustand und in situ, bei denen die Frage nach den Symbiose-spezifischen Eigenschaften des Symbioseverbandes im Vordergrund stehen soll, hat zu berücksichtigen, daß die Organismen unter sehr verschiedenen Milieubedingungen untersucht worden sind. Dabei handelt es sich um ein prinzipielles Problem jeglicher Symbioseforschung, das bislang noch

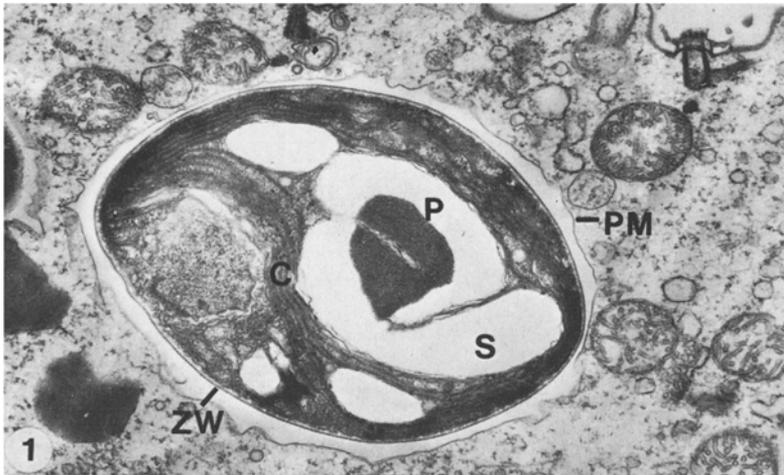


Abb. 1

Chlorella spec. im symbiontischen Verband mit *Paramecium bursaria*; Anzucht im Licht-Dunkel-Wechsel (14:10), Beleuchtungsstärke 3800 lux. C Chloroplast; K Kanal; P Pyrenoid; PE Pellicula des Parameciums; PM Membran der perialgalen Vacuole; S Stärke; ZW Zellwand. 16500×

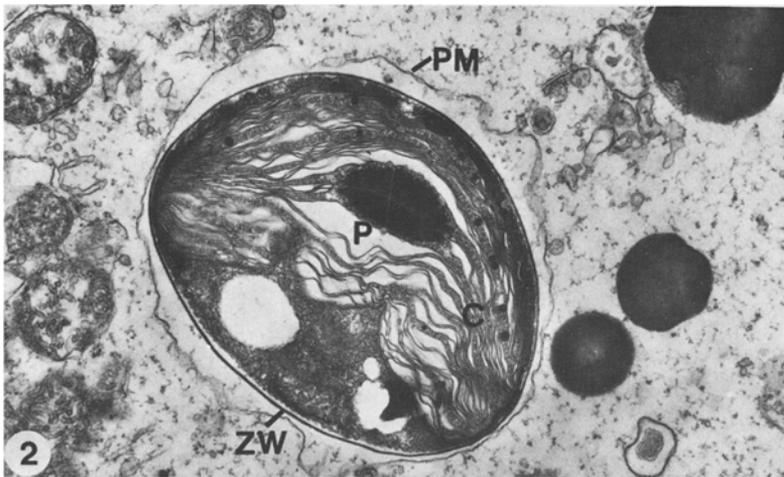


Abb. 2

Chlorella spec. im symbiontischen Verband mit *Paramecium bursaria* nach Vergiftung der Photosynthese mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU, 10^{-6} M); sonst wie Abbildung 1

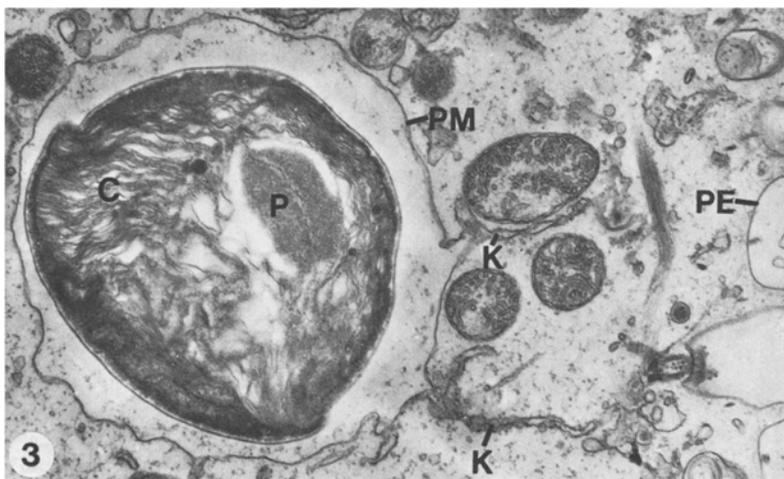


Abb. 3

Chlorella spec. im symbiontischen Verband mit *Paramecium bursaria*; Dauerdunkel

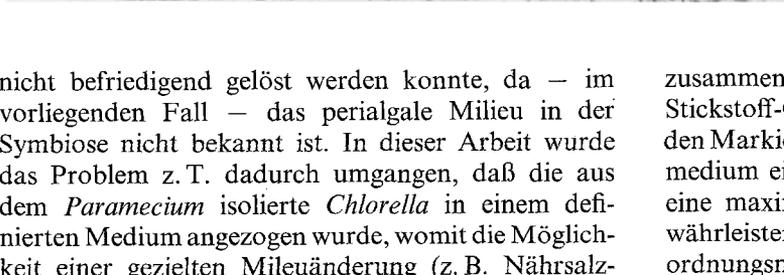


Abb. 4

Ausschnitt aus einem grünen *Paramecium bursaria*; Kanalbildung an der Membran der perialgalen Vacuole; sonst wie Abbildung 3

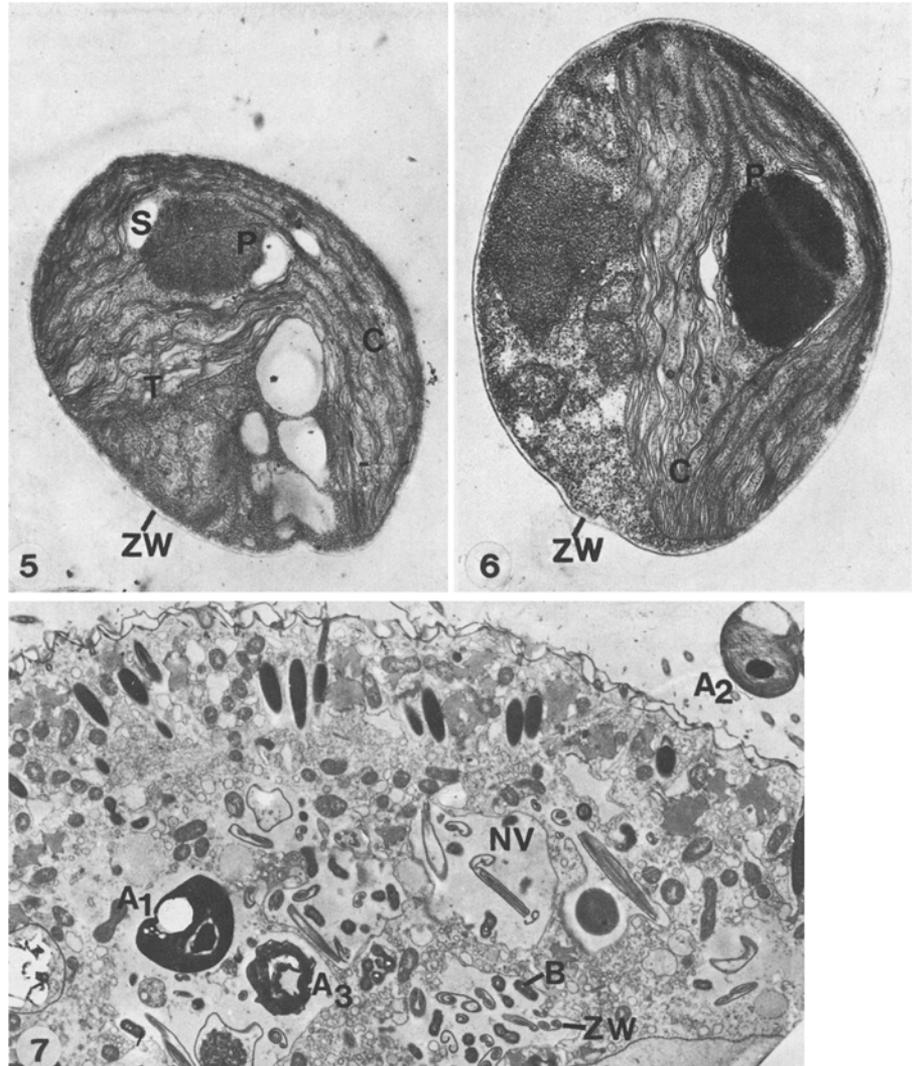
nicht befriedigend gelöst werden konnte, da — im vorliegenden Fall — das perialgale Milieu in der Symbiose nicht bekannt ist. In dieser Arbeit wurde das Problem z. T. dadurch umgangen, daß die aus dem *Paramecium* isolierte *Chlorella* in einem definierten Medium angezogen wurde, womit die Möglichkeit einer gezielten Milieuänderung (z. B. Nährsalz-

zusammensetzung, verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen, pH-Wert, usw.) gegeben war. Bei den Markierungsversuchen wurde für das Inkubationsmedium ein saurer pH-Wert (5,0) gewählt, da dieser eine maximale Maltoseabgabe durch die Algen gewährleisten soll (Muscatine et al., 1967). Größenordnungsmäßig stimmen die von den isoliert kultiv-

Abb. 5
Isoliert kultivierte symbiontische
Chlorella spec.; Anzuchtbedingungen
wie Abbildung 1

Abb. 6
Isoliert kultivierte symbiontische
Chlorella spec.; Anzuchtbedingungen
wie Abbildung 3

Abb. 7
Algenfreies *Paramecium bursaria* nach
Infektion mit der symbiontischen
Chlorella spec.; Nahrungsvacuolen
(NV) gefüllt mit Bakterien (B) und
Resten verdauter Algen (A₃, ZW);
beachte die unterschiedliche Plastiden-
struktur in den Chlorellen außerhalb
(A₂) und innerhalb (A₁) des Para-
meciums. 3400 ×



vierten und die von den im Symbioseverband vorliegenden Algen ausgeschiedenen Mengen an ¹⁴C-markierten Substanzen überein (Tabelle 1). Möglicherweise liegt daher auch in den perialgalen Vacuolen ein saurer pH-Wert vor.

Der Vergleich der Teilungsraten grüner und farblosere *Paramecium bursaria* unter verschiedenen Milieubedingungen (u. a. Karakashian, 1963; Pado, 1965; Siegel, 1960; Weis, 1967, 1968, 1969) läßt vermuten, daß die von den symbiontischen Algen abgegebene Maltose wesentlich zur Ernährung des Wirtsorganismus beiträgt. Physiologisch bewiesen wird diese Annahme durch die hier durchgeführten Fütterungsversuche mit Glucose und Maltose: Algenfreie *P. bursaria*, die keine interne symbiontische Kohlenhydratproduktion besitzen, nehmen wesentlich mehr Kohlenhydrate aus dem Medium auf als algenhaltige Organismen,

deren eigene Aufnahmemenge wiederum über derjenigen der isolierten symbiontischen Alge liegt und sich nicht durch Addition oder Subtraktion der Aufnahmemengen der isoliert kultivierten Symbiosepartner errechnen läßt. Offensichtlich ist zur Deckung des Kohlenhydratbedarfes des *Parameciums* ein bestimmter Kohlenhydrat Spiegel erforderlich, der in algenhaltigen Organismen – zumindest teilweise – durch die Maltose-ausscheidenden Algen gespeist wird. Algenfreie Tiere hingegen müssen dementsprechend mehr Kohlenhydrate bzw. andere organische Nahrung aus dem Medium aufnehmen. Bezüglich der Kohlenhydratversorgung konnte damit für das grüne *Paramecium* ein qualitativ anderes, Symbiosecharakteristisches Verhalten bewiesen werden, das den isolierten Partnern nicht eigen ist und sich nur aus deren Zusammenwirken in einer neuen Einheit erklären läßt.

Ein weiteres Beispiel für eine derartige Verhaltensänderung ist der geringere Verbrauch an atmosphärischem Sauerstoff durch die algenhaltigen Paramecien im Dunkeln gegenüber algenfreien Vergleichsorganismen (Tabelle 2). Im Licht ist der Sauerstoffverbrauch der symbiontischen Einheit als Folge der photosynthetischen Eigenproduktion durch die endosymbiontischen Algen geringer als bei farblosen *P. bursaria*. Pado (1967) stellt an grünen Paramecien bei verminderter Zahl der endosymbiontischen Algen ein Absinken des Sauerstoffbedarfes fest. Hieraus extrapoliert er für algenfreie *P. bursaria* einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch als für grüne Paramecien im Dunkeln. Diese Berechnung berücksichtigt jedoch nicht, daß sich das Verhalten von farblosen und von grünen Paramecien nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ unterscheidet. Dementsprechend zeigen die hier angeführten Meßergebnisse einen höheren Sauerstoffverbrauch der algenfreien im Vergleich mit den grünen Paramecien im Dunkeln, wobei der Photosynthese-Kompensationspunkt des symbiontischen Verbandes zwischen 4000 und 5000 lux liegt. Zu prinzipiell selben Ergebnissen kommen Pardy u. Dieckmann (1975) auf Grund ihrer Untersuchung der Atmung von grünen Hydren (Sauerstoffverbrauch algenhaltiger Organismen im Dunkeln: $25,6 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$; Sauerstoffverbrauch algenfreier Organismen im Dunkeln: $28,2 \text{ ml O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$). Bezüglich der Lage des Photosynthese-Kompensationspunktes machen sie keine genaue Angabe, dieser dürfte aber für die grünen Hydren oberhalb von 4300 lux liegen. Für den Kompensationspunkt von *Convolvata roseoffensis* liegen die Angaben zwischen 1100 und 3300 lux (Nozawa et al., 1972), für Flechten zwischen 400 (*Certraria glauca*) und 2000 lux (*Ramalina fraxinea*) (Quispel, 1959).

Ein weiterer Hinweis für ein Symbiose-eigenes Verhalten des grünen Parameciums ist die Beobachtung, daß der symbiontische Verband bei niedrigen Beleuchtungsstärken (bis 6000 lux) eine stärkere CO_2 -Fixierung als die isolierten symbiontischen Algen zeigt. Er weist offenbar eine höhere Effektivität in der Nutzung der angebotenen CO_2 -Menge auf, während algenfreie *P. bursaria* eine im Verhältnis dazu minimale Leistung besitzen.

Die Ausbildung neuer Symbiose-eigener Merkmale läßt sich nicht nur physiologisch, sondern auch cytoologisch bei einem Vergleich der Ultrastruktur der isolierten symbiontischen Chlorellen und der im intakten Verband lebenden Algen aufzeigen. Grüne Paramecien haben bei Anzucht im Licht-Dunkel-Wechsel eine auffällig dichtere Strukturierung des Thylakoidsystems als die bei denselben Beleuchtungsstärken angezogenen isolierten Chlorellen. Es handelt sich damit um ein nur in der Symbiose auftretendes Merkmal der Alge,

das ebenfalls von Karakashian et al. (1968) und von Vivier et al. (1967) bei *P. bursaria* und u. a. von Muscatine (1974) sowie von Pardy (1976) bei grünen Hydren beschrieben wird. Die Ursache dieser endosymbiontischen Plastidenstruktur ist im Augenblick noch nicht bekannt. Treharne et al. (1964) beobachteten in einer bei ca. 1100 lux kultivierten *Chlorella pyrenoidosa* eine dichtere Packung der Thylakoide als bei ca. 11 500 lux. Es ist jedoch fraglich, ob sich diese Befunde ohne weiteres auf die Verhältnisse in *P. bursaria* übertragen lassen, da wahrscheinlich selbst bei dichter Packung keine vergleichbar starke, den Lichtgenuß der Algen in der Symbiose vermindernde Abschattung erfolgt (Eigenrotation des Parameciums!). Außerdem sind bei den hier untersuchten Beleuchtungsstärken (bis 10000 lux) an den isoliert kultivierten symbiontischen Algen keine Unterschiede hinsichtlich der Struktur des Thylakoidsystems festzustellen. Da die Packung der Thylakoide auch vom CO_2 -Gehalt des Milieus abhängig sein kann (Gergis, 1969; vgl. Karakashian, 1970), könnte allerdings auch ein entsprechender Einfluß der in ihrer Größe unbekanntenen CO_2 -Konzentration der perialgalen Vacuole Ursache der „symbiontischen“ Struktur der photosynthetischen Membranen sein. Auf einen unmittelbaren Einfluß der Photosynthesefähigkeit auf die Struktur des Thylakoidsystems weisen Vergiftungsversuche mit dem Photosynthesegift 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) hin. Hierbei ist jedoch im Augenblick nicht eindeutig zu klären, warum die *Chlorella* im Symbioseverband bei dieser Vergiftung oder im Dunkeln eine Chloroplastenstruktur zeigt, die derjenigen der getrennt kultivierten Alge ähnelt. Die Alge besitzt auch bei einer Kultur des symbiontischen Verbandes im Dunkeln ein Pyrenoid, wohingegen Karakashian et al. (1968) bei grünen Paramecien und Pardy (1976) bei symbiontischen Chlorellen enthaltenden Hydren ein Verschwinden des Pyrenoids im Dunkeln feststellen.

Die hier diskutierten Befunde erlauben insgesamt eine positive Beantwortung der eingangs gestellten Frage nach der Symbioseeseigenschaft des Verbandes von *P. bursaria* mit *Chlorella spec.* Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtung, daß algenhaltige *P. bursaria* — nicht jedoch algenfreie — eine Photoakkumulation zeigen (Pado, 1972; Saji u. Oosawa, 1974) ergänzt.

Voraussetzung für die Stabilität und die Funktionstüchtigkeit einer Symbiose ist die Existenz von Regulationsmechanismen, die das Zusammenleben der beteiligten Organismen koordinieren. So ist für die *P. bursaria*-Endosymbiose die Koordination der Wachstumsraten der beiden Symbiosepartner von entscheidender Bedeutung. Das hier wirksame regulatorische Prinzip ist bis heute allerdings unbekannt.

Es ist anzunehmen, daß der Regulation der Algenzahl in den Paramecien ein komplexer Mechanismus zugrunde liegt, der wahrscheinlich — zumindest im Licht — nicht in erster Linie auf der Verdauung der symbiontischen Algen beruht, da grüne Paramecien im Licht und im Dunkeln im bakterienreichen Milieu vergleichbare Teilungsraten aufweisen (Karakashian, 1963). Auffällig ist, daß die Koordinierung der Teilungsraten der symbiontischen Partner unter bestimmten Bedingungen aufgehoben werden kann. So kommt es bei Überführung algenhaltiger Paramecien ins Dunkle (Famintzin, 1891) sowie bei Behandlung mit 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) (Reisser, 1976) zu einem starken Absinken der Algenzahl, die — sowohl durch statistische Ausdünnung der Algenpopulation als auch durch Fressen der Algen durch den Wirt — zur Bildung algenfreier Paramecien führen kann. Während hier die Synchronisation wahrscheinlich als Folge des Ausfalls der Photosynthese — und damit möglicherweise durch das Absinken eines bestimmten für den Energiehaushalt des Parameciums wichtigen regulativ wirkenden Kohlenhydratspiegels — aufgehoben wird und einen Algenverlust zur Folge hat, kann es im Gegensatz dazu unter anderen Bedingungen durch eine Aufregulierung der Algenzahl dahin kommen, daß sich die Algen schneller als der Wirt teilen: Bei der Infektion farbloser *P. bursaria* mit geeigneten Chlorellen wird nur ein Teil der angebotenen Algen in die Symbiose aufgenommen. Durch eine erhöhte Teilungsrate dieser Algen kommt es anschließend zum raschen Ergrünen der Paramecien bis ein stationärer Zustand erreicht ist (Karakashian u. Karakashian, 1973; Siegel, 1960). Überführt man grüne Paramecien von einer niedrigeren in eine höhere Beleuchtungsstärke, dann nimmt die Algenzahl solange zu bis sie ein neues stabiles Niveau erreicht hat (Pado, 1965). Diese Beobachtung zeigt, daß die Größe der endosymbiontischen Algenpopulation im Licht in gewissen Bereichen auch abhängig ist von der Beleuchtungsstärke, wobei eine obere Begrenzung gegeben zu sein scheint. Diese obere Begrenzung ist jedoch wahrscheinlich nicht durch die der Alge vom *Paramecium* zur Verfügung gestellte CO₂-Menge bedingt. Im elektronenmikroskopischen Bild weisen nämlich die symbiontischen Chlorellen der im Licht-Dunkel-Wechsel kultivierten Paramecien eine auffällige Stärkespeicherung auf, die auf eine für die gegebenen endosymbiontischen Bedingungen ausreichende CO₂-Versorgung hindeuten. Damit müssen weitere Faktoren — neben den bereits erwähnten — als Regulativ diskutiert werden. Dabei ist u. a. an eine mangelhafte Stickstoffversorgung zu denken, jedoch führt die zusätzliche Fütterung grüner Paramecien mit Nitrat als einer von den isolierten Chlorellen zu wertenden Stickstoffquelle (Reisser, 1975) nicht zu

einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Verminderung der Stärkeablagerung in den symbiontischen Algen. Allerdings kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Algen im *Paramecium* tatsächlich Nitrat als externe Stickstoffquelle nutzen können.

Da die isolierte symbiontische Alge Vitaminbedürftig ist (Vitamin B₁ und B₁₂, Reisser, 1975), kommt als weiteres Regulativ die Vitaminversorgung in Betracht. Dem ist jedoch entgegenzuhalten, daß es in anderen *P. bursaria*-Stämmen nicht Vitaminbedürftige endosymbiontische Chlorellen geben soll (Weis u. Berry, 1974). Diese Frage bedarf einer eingehenden Überprüfung.

Regulatorische Funktionen können auch allgemein der Versorgung mit bestimmten Nährsalzen und Spurenelementen sowie dem intracellulären pH-Wert zukommen. Möglicherweise liegt auch eine rein volumenmäßige Begrenzung der Algenpopulation in den Paramecien vor. Nach Sud (1968) beanspruchen rund 400 symbiontische Chlorellen ca. 20% des Wirtsvolumens.

Pardy u. Heacox (1976) schließen auf Grund ihrer Experimente an grünen Hydren auf die Existenz einer regulatorisch auf die Algenzahl wirkenden morphogenetischen Substanz. Transplantationsversuche an *Stentor spec.* (Tartar, 1953) deuten an, daß die endosymbiontischen Chlorellen von *Stentor polymorphus* bei einem Überwiegen von *St. coeruleus*-Cytoplasma verloren gehen. Untersuchungen an *Zoanthus flos marinus* (v. Holt, 1968) lassen eine mögliche Kontrolle der Algenpopulation durch vom Wirt ausgeschiedenes Glycin vermuten.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen speziell symbiontischen Verhaltensweisen befähigen das grüne *Paramecium*, eine größere Zahl ökologischer Nischen zu besetzen und auf eine Änderung der Milieubedingungen flexibler zu reagieren als algenfreie Paramecien und wahrscheinlich auch die symbiontische *Chlorella*, welche bisher allerdings noch nicht in freilebendem Zustand beobachtet werden konnte. So ist anzunehmen, daß grüne Paramecien gegenüber algenfreien *P. bursaria* in der Natur infolge ihres geringeren Bedarfes an externen organischen Nahrungsquellen z. B. auch in einem nährstoffarmen Milieu oder in Perioden von Nahrungsmangel überleben können, und auch geringere Ansprüche an den Sauerstoffgehalt des Gewässers stellen. Andererseits findet aber auch die in der Symbiose auftretende *Chlorella* im *Paramecium* ein Milieu, das sie mit Nährstoffen versorgt und ihr als unbeweglichem Organismus durch die Beweglichkeit des Wirtes über den Mechanismus der Photoakkumulation eine ausreichende Photosynthese ermöglicht.

In weiterführenden Arbeiten sollen die der Symbiose zugrunde liegenden Regulationsmechanismen

eingehender untersucht und eine Analyse des Verhaltens des symbiontischen Verbandes als Funktionseinheit im natürlichen Milieu vorgenommen werden.

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Frl. S. Hecker.

LITERATUR

- de Bary, A.: Die Erscheinung der Symbiose. Strassburg: Trübner 1879
- Brown, J. A., Nielsen, P. J.: Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. J. Protozool. **21**, 569–570 (1974)
- Dangeard, P. A.: Les *Zoochlorelles* du *Paramecium bursaria*. Le Botaniste **7**, 161–191 (1900)
- Le Dantec, F.: Recherches sur la Symbiose des Algues et des Protozoaires. Ann. Inst. Pasteur **6**, 190–198 (1892)
- Egle, K.: Apparente und reelle Photosynthese, Gaswechselgleichgewicht, Lichtatmung. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. V/1 (W. Ruhland, Hrsg.), S. 182–210. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960
- Engelmann, T. W.: Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. Pflügers Arch. ges. Physiol. **25**, 285–292 (1881)
- Famintzin, A.: Beitrag zur Symbiose von Algen und Thieren. Mém. de l'Acad. Imp. d. sc. **38**, 1–17 (1891)
- Gergis, M. S.: A colorless *Chlorella* mutant containing thylakoids. Arch. Mikrobiol. **68**, 187–190 (1969)
- v. Holt, C.: Uptake of glycine and release of nucleoside-polyphosphates by *Zooxanthellae*. Comp. Biochem. Physiol. **26**, 1071–1079 (1968)
- Karakashian, M. W., Karakashian, S. J.: Intracellular digestion and symbiosis in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. **81**, 111–119 (1973)
- Karakashian, S. J.: Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. Physiol. Zool. **36**, 52–68 (1963)
- Karakashian, S. J.: Morphological plasticity and the evolution of algal symbionts. Ann. N.Y. Acad. Sci. **175**, 474–487 (1970)
- Karakashian, S. J., Karakashian, M. W., Rudzinska, M. A.: Electron microscopic observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae. J. Protozool. **15**, 113–128 (1968)
- Loefer, J. B.: Effect of certain "peptone" media and carbohydrates on the growth of *Paramecium bursaria*. Arch. Protistenk. **87**, 142–150 (1936)
- Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. biophys. biochem. Cytol. **9**, 409–414 (1961)
- Mckinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. biol. Chem. **140**, 315–322 (1941)
- Muscatine, L.: Endosymbiosis of cnidarians and algae. In: Coelenterate biology: Reviews and new perspectives (L. Muscatine, H. M. Lenhoff, eds.), pp. 359–395. New York: Academic Press 1974
- Muscatine, L., Karakashian, S. J., Karakashian, M. W.: Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant *Hydra*. Comp. Biochem. Physiol. **20**, 1–12 (1967)
- Nozawa, K., Taylor, D. L., Provasoli, L.: Respiration and photosynthesis in *Convoluta roscoffensis* Graff, infected with various symbionts. Biol. Bull. **143**, 420–430 (1972)
- Pado, R.: Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I. The influence of light on the growth of symbionts. Folia biol. (Praha) **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)
- Pado, R.: Spectral activity of light and phototaxis in *Paramecium bursaria*. Acta Protozool. **11**, 387–393 (1972)
- Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. **95**, 285–298 (1952)
- Pardy, R. L.: The morphology of green *Hydra* endosymbionts as influenced by host strain and host environment. J. Cell Sci. **20**, 655–669 (1976)
- Pardy, R. L., Dieckmann, C.: Oxygen consumption in the symbiotic hydra *Hydra viridis*. J. exp. Zool. **194**, 373–378 (1975)
- Pardy, R. L., Heacox, A. E.: Growth of algal symbionts in regenerating *Hydra*. Nature (Lond.) **260**, 809–810 (1976)
- Pringsheim, E. G.: Physiologische Untersuchungen an *Paramecium bursaria*. Arch. Protistenk. **64**, 289–418 (1928)
- Quispel, A.: Lichens. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XI (W. Ruhland, Hrsg.), S. 577–604. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959
- Reisser, W.: Zur Taxonomie einer auxotrophen *Chlorella* aus *Paramecium bursaria* Ehrbg. Arch. Microbiol. **104**, 293–295 (1975)
- Reisser, W.: Die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* spec. in der *Paramecium bursaria*-Symbiose. I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoffwechsel. Arch. Microbiol. **107**, 357–360 (1976)
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate stain at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208–213 (1963)
- Saji, M., Oosawa, F.: Mechanism of photoaccumulation in *Paramecium bursaria*. J. Protozool. **21**, 556–561 (1974)
- Shneyour, A., Avron, M.: High biological activity in chloroplasts from *Euglena gracilis* prepared with a new gas pressure device. FEBS Letters **8**, 164–166 (1970)
- Siegel, R. W.: Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. **19**, 239–252 (1960)
- Starr, M. P.: A generalized scheme for classifying organismic associations. Symp. Soc. exp. Biol. **29**, 1–20 (1975)
- Sud, G. C.: Volumetric relationships of symbiotic *Zoochlorella* to their hosts. J. Protozool. **15**, 605–607 (1968)
- Tartar, V.: Chimeras and nuclear transplantations in ciliates, *Stentor coeruleus* × *S. polymorphus*. J. exp. Zool. **124**, 63–103 (1953)
- Trebst, R.: Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Ann. Rev. Plant Physiol. **25**, 423–458 (1974)
- Treharne, R. W., Melton, C. W., Roppel, R. M.: Electron spin resonance signals and cell structure of *Chlorella pyrenoidosa* grown under different light intensities. J. molec. Biol. **10**, 57–62 (1964)
- Vivier, E., Petitprez, A., Chivé, A. E.: Observations ultrastructurales sur les *chlorelles* de *Paramecium bursaria*. Protistologica **3**, 325–334 (1967)
- Weis, D. S.: Correlated growth of alga and protozoan in *Paramecium bursaria*. J. Protozool. **14**, 12–13 (1967)
- Weis, D. S.: Host-symbiont interaction in *Paramecium bursaria*. J. Protozool. **15**, 17 (1968)
- 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. micros. Soc. **93**, 135–140 (1974)
- Weis, D. S., Berry, J. L.: Correlation of host mating behavior with species of endosymbiotic algae in *Paramecium bursaria*. J. Protozool. **21**, 416 (1974)

Eingegangen am 8. Juli 1976