

Biochemisch-oekologische Studien zum Phosphathaushalt von *Azotobacter chroococcum*

JÜRGEN OVERBECK

Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön/Holstein

ABSTRACT: Biochemical-ecological studies on the phosphate-metabolism of *Azotobacter chroococcum*. The influence of different phosphate-compounds, especially of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ and fructose-1,6-diphosphate, on nitrogen fixation was studied in three tribes of *Azotobacter chroococcum*. In stagnant nonaerated cultures a phosphate-optimum exists for the nitrogen-fixation of $90 \mu\text{g P/ml}$. Using fructose-1,6-diphosphate the same quantity of nitrogen is fixed with only $50 \mu\text{g P/ml}$. In aerated cultures the differences between inorganic phosphate and fructose-1,6-diphosphate (regarding their influence on the nitrogen-fixation) disappear. The quotient: used up C/fixated N also depends on aeration. In stagnant cultures containing organic phosphate-compounds, the C/N-quotient is lower than in those containing inorganic phosphate. In aerated cultures, however, the C/N-quotient is lowest with orthophosphate. The experiments indicate that the phosphate-esters are incorporated into the cell immediately without splitting up on the cell surface. These incorporated phosphateesters in non-aerated cultures, lacking an extensive oxidative phosphorylation, are apparently important for the economy of nitrogen fixation. The ecological role of the incorporation of phosphate-esters is discussed in relation to the fact that a great part of phosphorus in the natural environment is not inorganic but organic phosphate.

EINLEITUNG

Die Verwertung des organischen oder komplex gebundenen, nicht in anorganischer Form vorkommenden Phosphors spielt im Stoffhaushalt der Gewässer eine Rolle. Denn der größte Teil des Phosphats liegt im Süßwasser häufig nicht in anorganischer, sondern in gebundener Form vor. Andererseits ist Phosphat in den meisten Fällen der die pflanzliche Produktion begrenzende Minimumfaktor. Vom Phosphathaushalt beziehungsweise von der Verwendbarkeit der Phosphate hängt also die Produktionshöhe ab.

Die Möglichkeiten der Phosphatausnutzung durch die Bakterien- beziehungsweise Algenzellen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Phosphataufnahme scheint grundsätzlich ein aktiver Prozeß zu sein. Anorganisches Phosphat wird hierbei mit spezifischen Mechanismen in die Zelle transportiert. Phosphatester werden jedoch im allgemeinen nicht direkt inkorporiert. Sie müssen vielmehr durch Phosphatasen an der Zelloberfläche gespalten werden. Erst danach ist die Zelle in der Lage, das hierbei freigesetzte anorganische Phosphat aufzunehmen. Phosphatasen an der Zelloberfläche

sind bei Bakterien, Algen und Pilzen weit verbreitet. Ihr Vorkommen macht es möglich, daß gebundene Phosphate so weitgehend verwertet werden können.

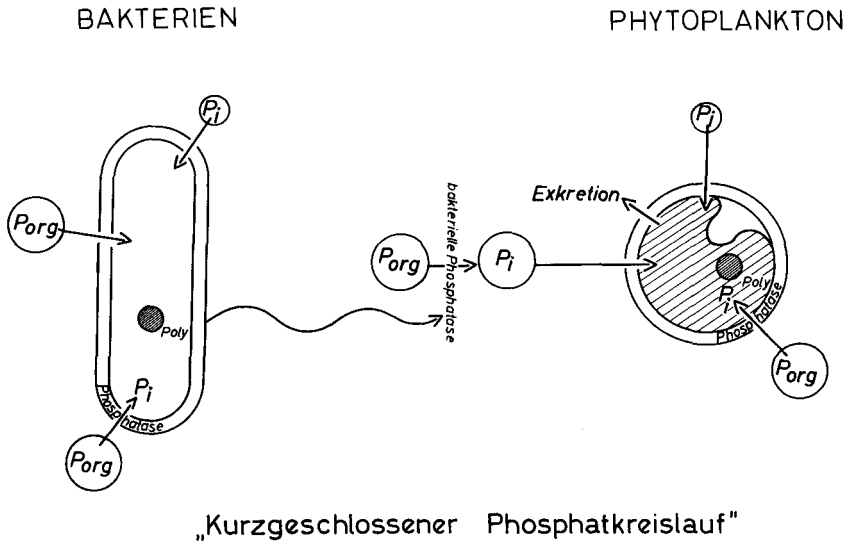


Abb. 1: Schema des Phosphorkreislaufs zwischen Bakterien- und Algenzelle. P_i : anorganisches Phosphat; P_{org} : organisch gebundenes Phosphat; Poly: Polyphosphat. Weitere Erläuterung im Text

Bis in jüngste Zeit hat man angenommen, daß dies der einzige Aufnahme-mechanismus für Phosphorverbindungen sei. Vor kurzem hat man jedoch auch die Aufnahme intakter, nicht gespaltener phosphorylierter Verbindungen bei Bakterien beobachtet (FRAENKEL, FALCOZ-KELLY & HORECKER 1964, HAYASHI, KOCH & LIN 1964).

Für den gesamten, im einzelnen sehr komplizierten und zum Teil noch wenig bekannten ökologischen Aspekt des Phosphorstoffwechsels, der neben der Aufnahme auch die Speicherung und die Ausscheidung von Phosphat und die Tätigkeit freier Phosphatasen im Wasser beinhaltet, hat man die deskriptive Sammelbezeichnung „Kurzgeschlossener Phosphatkreislauf“ eingeführt. Die Bezeichnung besagt, daß eine Biocoenose auf einer sehr geringen Nährstoffbasis eine Massenentwicklung entfalten kann, da die Nährstoffe nicht festgelegt, sondern mit Hilfe der angedeuteten Mechanismen sehr schnell aufgenommen und wieder abgegeben werden. Um einen Beitrag zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen dieser ökologisch wichtigen Vorgänge zu leisten, untersuchten wir den Einfluß von anorganischem und organischem Phosphat auf die Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter* ist ein stickstoffbindendes Bakterium des Bodens, das mit verschiedenen Arten auch im Gewässer verbreitet ist und neben anderen Mikroorganismen einen wichtigen Beitrag zur Stickstoffbilanz des natürlichen Standorts liefert.

Da seit langem bekannt ist, daß Phosphor zu den begrenzenden Faktoren für die Stickstoffbindung gehört, mußte die leicht meßbare Stickstoffbindung von *Azoto-*

bacter einen guten Maßstab für die Verwertung verschiedener Phosphatverbindungen darstellen. *Azotobacter* schien uns auch deshalb für diese Untersuchung besonders geeignet, da bereits mehrfach festgestellt wurde, daß das Bakterium organisches Phosphat verwerten kann. So fand JENSEN (1954a, b), daß neben anorganischem Phosphat auch Glycerophosphat und Hexosediphosphat ausgenutzt werden. Der Verfasser glaubt sogar, daß die Wachstumsrate von *Azotobacter* bei Verwendung organisch gebundener Phosphate ansteigt. Diese Angaben sind der direkte Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung, deuten sie doch die Möglichkeit an, daß verschiedene Phosphate beziehungsweise phosphorylierte Verbindungen unmittelbar in den Stoffwechsel von *Azotobacter* einbezogen werden können.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die Versuche wurde eine anorganische Grundlösung mit 2% Glucose als Kohlenstoff-Quelle verwendet. Zu der Lösung gaben wir die folgenden Phosphorverbindungen in wechselnden Konzentrationen (0 bis 90 $\mu\text{g P/ml}$): Orthophosphat, Pyrophosphat, Metaphosphat, Glycerophosphat, Fructose-1,6-diphosphat und Glucose-1-phosphat. An dieser Stelle sollen die mit Fructose-1,6-diphosphat erzielten Ergebnisse dargestellt werden.

In den Versuchen wurden die Stickstoffbindung sowie der Zuckerverbrauch durch *Azotobacter chroococcum* in Abhängigkeit von der Phosphatquelle gemessen. Die Ansätze wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben, die je 10 ml mit *Azotobacter*-Suspension beimpfter Nährlösung enthielten, durchgeführt. Die Kolben waren entweder unbelüftet oder wurden durch starkes Schütteln belüftet. Als Beispiel für einen derartigen Versuch mag Abbildung 2 dienen.

Die nicht durchlüftete Nährlösung enthält je 60 $\mu\text{g P/ml}$ aus anorganischem Phosphat beziehungsweise aus Fructose-1,6-diphosphat. Es ist deutlich zu erkennen, daß mit Fructose-1,6-diphosphat schneller und mehr Stickstoff gebunden wird als mit anorganischem Phosphat. Auch im Zuckerverbrauch macht sich die fördernde Wirkung des Fructose-1,6-diphosphats deutlich bemerkbar. Denn bei Anwesenheit dieser organischen Phosphorverbindung wird der Zucker schneller in den Stoffwechsel einbezogen als mit anorganischem Phosphat (Abb. 3).

Führt man die gleichen Versuche mit durchlüfteten Kulturen durch, ändern sich die Ergebnisse deutlich: Abgesehen davon, daß im Gegensatz zur stagnierenden Kultur der gesamte Zucker bereits nach 2 Tagen verbraucht ist (stagnierend nach 4 bis 5 Tagen oder unvollständig), stimmen jetzt die Stickstoffbindung von Fructose-1,6-diphosphat und Orthophosphat gut überein. Fructose-1,6-diphosphat hat also unter dem Einfluß der Belüftung seine Vorrangstellung verloren (Abb. 4, 5).

Es ist wichtig festzustellen, daß in den Schüttelkulturen trotz stark beschleunigten Zuckerverbrauchs und intensiverer Stickstoffbindung die tatsächliche Ausbeute an Stickstoff nicht höher liegt als unter stagnierenden Kulturbedingungen.

Der Quotient verbrauchte mg Kohlenstoff/gebundene mg Stickstoff (C/N) charakterisiert gut die Ökonomie der Stickstoffbindung. Je kleiner der Quotient ist, das heißt je mehr Stickstoff je Kohlenstoffmenge gebunden wird, desto ökonomischer wird die

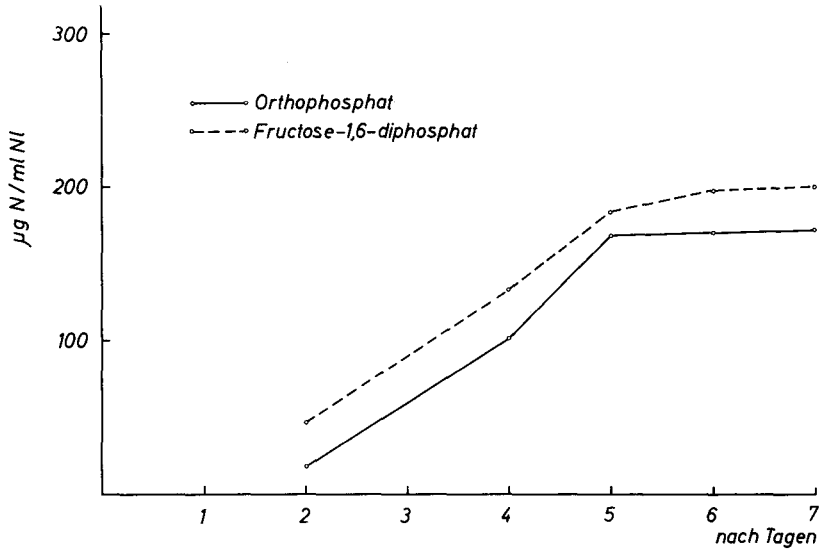


Abb. 2: Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum* bei einer Phosphorkonzentration (Na_2HPO_4 bzw. Fructose-1,6-diphosphat) von $60 \mu\text{g P/ml}$ in stagnierender Kultur

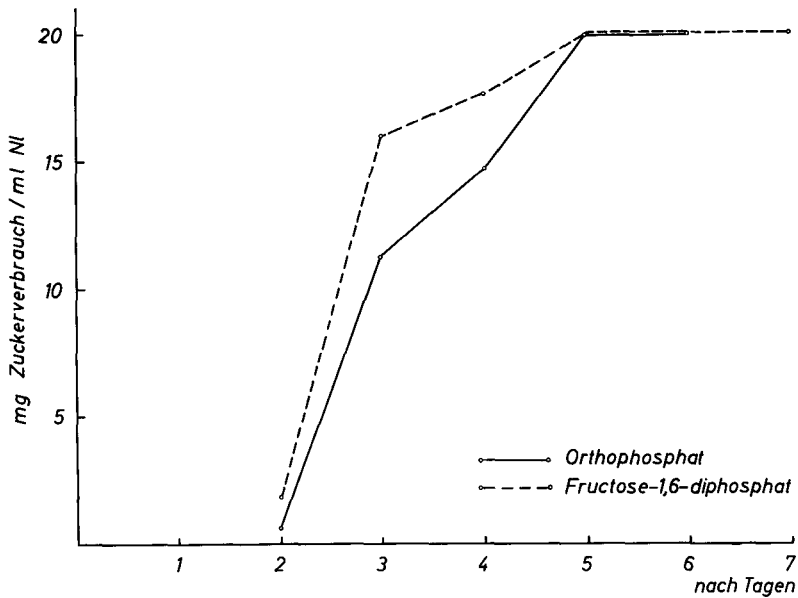


Abb. 3: Zucker-Verbrauch durch *Azotobacter chroococcum* bei einer Phosphorkonzentration (Na_2HPO_4 bzw. Fructose-1,6-diphosphat) von $60 \mu\text{g P/ml}$ in stagnierender Kultur

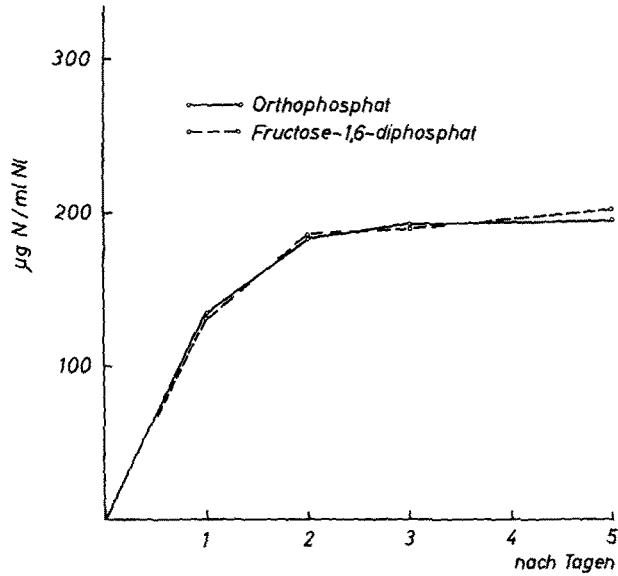


Abb. 4: Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum* bei einer Phosphorkonzentration (Na_2HPO_4 bzw. Fructose-1,6-diphosphat) von $60 \mu\text{g P/ml}$ in Schüttelkultur

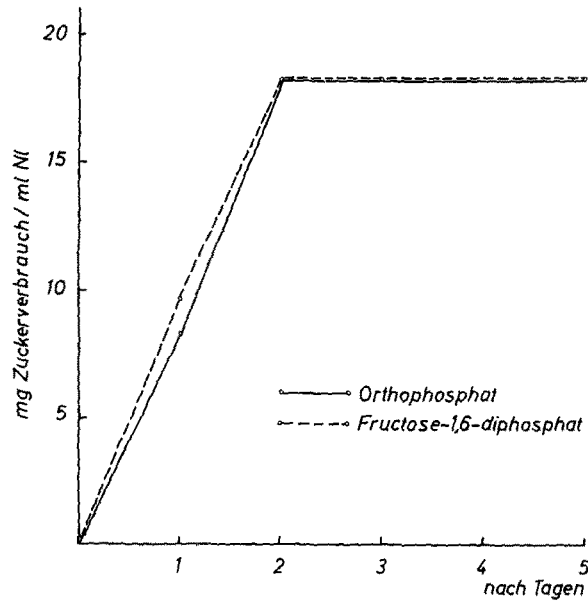


Abb. 5: Zucker-Verbrauch durch *Azotobacter chroococcum* bei einer Phosphorkonzentration (Na_2HPO_4 bzw. Fructose-1,6-diphosphat) von $60 \mu\text{g P/ml}$ in Schüttelkultur

Kohlenstoffquelle ausgenutzt. Abbildung 6 zeigt, daß Fructose-1,6-diphosphat einen deutlichen Einfluß auf den C/N-Quotienten hat. Die Kurven besagen, daß in stagnierenden Kulturen bei Vorhandensein eines Phosphatesters weniger Energie für die Stickstoffbindung benötigt wird als mit anorganischem Phosphat. Die Phosphatester bewirken also eine Energieeinsparung. In belüfteten Schüttelkulturen finden wir genau umgekehrte Verhältnisse. Denn hier ist das C/N-Verhältnis bei Verwendung von Orthophosphat am geringsten. Bei Fructose-1,6-diphosphat liegt der C/N-Koeffizient zwar auch teilweise niedriger als in unbelüfteten Kulturen, ist aber höher als der Orthophosphat-Koeffizient.

Die immer wieder bestätigte fördernde Wirkung des Fructose-1,6-diphosphats legt den Verdacht nahe, daß vielleicht schon Fructose allein das Wachstum von *Azotobacter* gegenüber anderen Kohlenstoffquellen fördert. Bei einem Vergleich von Fruc-

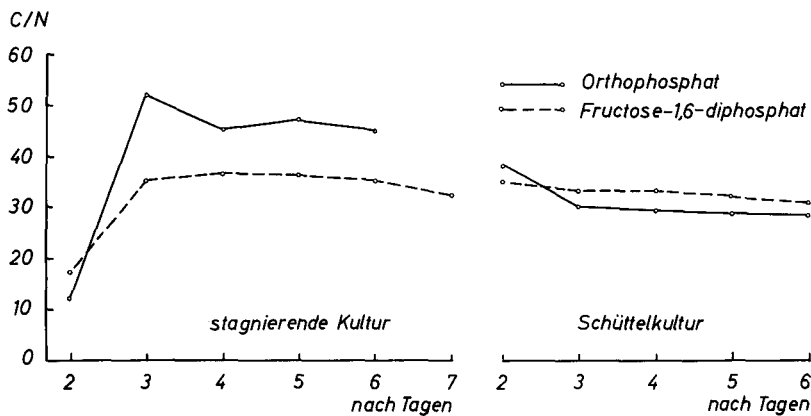


Abb. 6: Vergleich der C/N-Relationen in stagnierenden und Schüttelkulturen von *Azotobacter chroococcum* mit 90 µg P/ml aus Na_2HPO_4 bzw. Fructose-1,6-diphosphat

tose und Glucose als Kohlenstoffquellen zeigte sich aber, daß Fructose allein die Menge des gebundenen Stickstoffs nicht beeinflusst. Die fördernde Wirkung muß also mit den Phosphatbindungen des Fructose-1,6-diphosphats zusammenhängen.

Wie ist es zu erklären, daß in stagnierenden Kulturen Fructose-1,6-diphosphat und (in geringerem Maße) auch andere Phosphatester die Stickstoffbindung fördern? Wir deuten den Befund so, daß die energiereichen Phosphatesterbindungen unzerstört in die *Azotobacter*-Zelle gelangen. Das Bakterium braucht daher weniger neue Phosphatesterbindungen zu knüpfen und spart damit Energie ein, was in dem mit Fructose-1,6-diphosphat deutlich verringerten, das heißt ökonomischeren C/N-Quotient zum Ausdruck kommt. Daß Phosphatester grundsätzlich von Bakterien aufgenommen werden können, wurde bereits oben gezeigt. Bei Durchlüftung steigt in Zusammenhang mit der verstärkten Atmung, kenntlich an dem stark erhöhten Zuckerverbrauch, auch die oxydative Phosphorylierung stark an. Damit stehen jetzt, im Gegensatz zur stagnierenden Kultur, Phosphatbindungen im Überschuß zur Verfügung, und eine zusätzliche Lieferung weiterer Phosphatbindungen ist in diesem Falle für den Stoffwechsel bedeu-

tungslos. In durchlüfteten Kulturen fördern zusätzliche Phosphatesterbindungen daher nicht mehr die Stickstoffbindung.

Unsere Ergebnisse stimmen gut mit ganz anders angelegten Versuchen von JENSEN (1954) überein. Der Autor stellte fest, daß der Magnesium-Bedarf von *Azotobacter* von der Phosphatquelle abhängig sei. Denn mit Glycerophosphat oder Hexosediphosphat werden nur etwa 20 % der bei Orthophosphat zur optimalen Stickstoffbindung erforderlichen Magnesiummenge benötigt. Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß durch die Darbietung gebundenen Phosphats (Glycerophosphat, Hexosediphosphat) die Magnesiummenge eingespart wird, die bei Verwendung von Orthophosphat zur Enzymaktivierung für die Neubildung von Phosphatestern benötigt wird. Wenn Phosphatesterbindungen geliefert werden, brauchen diese nicht erst geknüpft zu werden, wozu Magnesium benötigt wird. Mit dieser Anschauung stimmt unser Ergebnis gut überein, daß der spezifisch fördernde Einfluß des gebundenen Phosphats bei starker Durchlüftung erlischt. Es müssen also auch die Versuche von JENSEN in der Weise interpretiert werden, daß Phosphatbindungen ungespalten in die *Azotobacter*-Zelle aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust werden.

Die mögliche Verwendung der Phosphorbindungen durch *Azotobacter* nach Aufnahme der ungespaltenen Phosphatester ist für den Stoffwechsel des Bakteriums bedeutungsvoll. Man weiß heute, daß im Stoffwechsel eine Koppelung zwischen energieverbrauchenden Synthesereaktionen und energieliefernden Abbaureaktionen in vielen Fällen durch Energieüberträger erfolgt. Als solche dienen besonders die sogenannten energiereichen Verbindungen. Der hohe Energieinhalt dieser Verbindungen äußert sich darin, daß sie bei der Hydrolyse einen hohen Betrag freier Energie liefern (mehr als 6 Cal./mol.). Es handelt sich bei den energiereichen Verbindungen im wesentlichen um Phosphatester. Als Energieträger besonders wichtig ist ATP, das 2 energiereiche Bindungen und damit ein hohes Gruppenübertragungspotential besitzt. ATP ist direkt als Energiespeicher der Zelle zu betrachten, der die durch „Verbrennungsprozesse“ in der Zelle freigesetzte chemische Energie auffängt, speichert und sie den Verbrauchsorten im Bedarfsfalle zuführt.

Fructose-1,6-diphosphat gehört nicht zu diesen energiereichen Verbindungen, denn das Phosphatübertragungspotential von F-1,6-DP beträgt nur etwa 3 Cal./mol.. Es ist damit zu gering, um Phosphatester neu zu knüpfen, aber es gibt spezifische Enzyme, die Phosphatesterbindungen übertragen können, die sogenannten Transphosphatasen. Durch sie können also Phosphatester im Stoffwechsel weitergegeben werden.

In unserem speziellen Fall würden Phosphatbindungen aus dem Medium aufgenommen und in der Zelle weiterverarbeitet werden. Organismen, die hierzu befähigt sind, besitzen einen selektiven Vorteil, denn sie sind in der Lage, ungenützte Energiereserven des Standortes für ihren Stoffwechsel nutzbar zu machen. Die Biochemie des Phosphatstoffwechsels hat also einen wichtigen ökologischen Aspekt. THIENEMANN, der Nestor der modernen Limnologie, hat Ökologie verschiedentlich durch das Begriffspaar „Leben und Umwelt“ charakterisiert. Was hier geschildert wurde, ist Leben und Umwelt, das heißt Ökologie, in biochemischen-mikrobiologischen Dimensionen. Stoffwechsel und Umwelt bilden offenbar eine aufeinander abgestimmte, optimale Einheit. Limnologie, unter einem biochemisch-ökologischen Gesichtspunkt betrieben, schafft die

Voraussetzungen dafür, tiefere Einblicke in diese Verknüpfung von Leben und Umwelt zu erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Untersuchung der Frage, ob der Stickstoffbinder *Azotobacter chroococcum* organische Phosphorverbindungen verwerten kann, werden $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und Fructose-1,6-diphosphat in ihrer Wirkung auf die Stickstoffbindung und den Zuckerverbrauch des Bakteriums verglichen.
2. Es zeigte sich, daß Fructose-1,6-diphosphat einen spezifischen Einfluß auf die Stickstoffbindung ausübt. Denn unter stagnierenden Kulturbedingungen ergibt der Phosphatester eine ökonomischere Stickstoffbindung als anorganisches Orthophosphat, das heißt, es wird mehr Stickstoff je Kohlenstoffmenge gebunden (Abb. 6). Bei Belüftung verschwindet der fördernde Einfluß des Fructose-1,6-diphosphats auf die Stickstoffbindung.
3. Die durch Fructose-1,6-diphosphat in unbelüfteten Kulturen gesteigerte Stickstoffausbeute wird dadurch erklärt, daß Phosphatesterbindungen in die Zelle aufgenommen und dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden. Bei Belüftung sind Phosphatbindungen dagegen im Zusammenhang mit verstärkten Phosphorylierungen im Überschuß vorhanden. Ein zusätzliches Angebot exogener Phosphatbindungen ist in diesem Falle für den Stoffwechsel bedeutungslos.
4. Da am natürlichen Standort Phosphate häufig nicht frei, sondern gebunden vorliegen, wird die ökologische Bedeutung der Befunde diskutiert.

Eine ausführliche Darstellung der Versuche erscheint zusammen mit H. MALKE in der Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie.

ZITIERTE LITERATUR

- FRAENKEL, D. G., FALCOZ-KELLY, F. & HORECKER, B. L., 1964. The utilization of glucose-6-phosphate by glucosinaseless and wild-type strains of *Escherichia coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 1207–1213.
- HAYASHI, S. I., KOCH, J. P. & LIN, E. C. C., 1964. Active transport of L- α -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* **239**, 3098–3105.
- JENSEN, H. L., 1954a. The magnesium requirements of *Azotobacter* and *Beijerinckia*, with some additional notes on the latter Genus. *Acta Agric. scand.* **6**, 224–236.
- 1954b. The *Azotobacteriaceae*. *Bact. Rev.* **18**, 195–213.

Discussion following the paper by OVERBECK

BARNES: Would not a critical experiment be to test the effect on homogenates with addition of high energy phosphates?

OVERBECK: Wir haben bisher nicht mit energiereichen Phosphaten wie ATP gearbeitet. Es konnte aber eine deutliche Phosphatasen- beziehungsweise Transphosphatasenaktivität im Sinne der Deutung unserer Versuche festgestellt werden.