

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

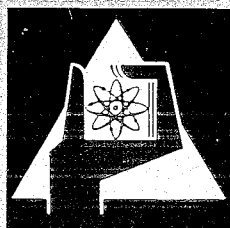
Februar 1970

KFK 1137

Institut für Neutronenphysik und Reaktortechnik

Photosynthese und Sauerstoffaustausch bei Grün- und Bläualgen  
nach  $O^{18}$ -Markierungsversuchen mit strömendem Kohlendioxid-Gas

D. Staschewski



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations. The text notes that without proper record-keeping, it becomes difficult to track expenses, revenues, and other financial data, which can lead to errors and discrepancies.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used for record-keeping. It mentions the use of spreadsheets, databases, and specialized software to manage and analyze data effectively. The text also highlights the importance of regular backups and secure storage to protect the integrity and confidentiality of the records.

3. The third part of the document focuses on the role of the accounting department in maintaining these records. It describes the various tasks and responsibilities of accountants, including data entry, reconciliation, and reporting. The text stresses that accountants must adhere to strict standards and procedures to ensure the accuracy and reliability of the financial information.

4. The fourth part of the document discusses the challenges and risks associated with record-keeping. It identifies common issues such as data loss, corruption, and unauthorized access, and provides strategies to mitigate these risks. The text also mentions the importance of staying updated with the latest technologies and industry best practices to enhance the efficiency and security of the record-keeping process.

5. The fifth part of the document concludes by summarizing the key points and reiterating the importance of a robust record-keeping system. It encourages the organization to invest in the necessary resources and training to ensure that all records are properly maintained and accessible when needed. The text ends with a call to action, urging all staff members to take responsibility for their own record-keeping duties and contribute to the overall success of the organization.

6. The sixth part of the document provides a detailed overview of the financial statements and reports generated from the records. It explains the different types of reports, such as the balance sheet, income statement, and cash flow statement, and how they are used to assess the organization's financial health. The text also discusses the importance of regular reviews and audits to ensure the accuracy and completeness of these reports.

7. The seventh part of the document discusses the role of the internal control system in maintaining accurate records. It describes the various control measures, such as segregation of duties, authorization, and reconciliation, and how they help to prevent errors and fraud. The text emphasizes that a strong internal control system is essential for ensuring the reliability of the financial information.

8. The eighth part of the document provides a detailed overview of the record-keeping process, from data collection to reporting. It describes the various steps involved, including data entry, validation, and review, and highlights the importance of each step in ensuring the accuracy and integrity of the records. The text also mentions the use of automation and technology to streamline the process and reduce the risk of human error.

9. The ninth part of the document discusses the importance of data security and privacy in record-keeping. It identifies the various risks, such as data breaches and unauthorized access, and provides strategies to protect the information. The text also mentions the importance of complying with relevant laws and regulations, such as the General Data Protection Regulation (GDPR), to ensure the confidentiality and security of the records.

10. The tenth part of the document concludes by summarizing the key points and reiterating the importance of a robust record-keeping system. It encourages the organization to invest in the necessary resources and training to ensure that all records are properly maintained and accessible when needed. The text ends with a call to action, urging all staff members to take responsibility for their own record-keeping duties and contribute to the overall success of the organization.

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Februar 1970

KFK 1137

Institut für Neutronenphysik und Reaktortechnik

Photosynthese und Sauerstoffaustausch bei Grün- und Blaualgen  
nach  $O^{18}$ -Markierungsversuchen mit strömendem Kohlendioxid-Gas

von

Dieter Staschewski

Gesellschaft für Kernforschung mbH, Karlsruhe

1. The first part of the document is a letter from the author to the editor.

2. The second part of the document is a letter from the editor to the author.

3. The third part of the document is a letter from the author to the editor.

4. The fourth part of the document is a letter from the editor to the author.

## Zusammenfassung

Bei Suspensionen und Adsorbaten von Einzeller-Algen wurde der Sauerstoffaustausch zwischen Kohlendioxid und Wasser in belichteten und abgedunkelten Systemen mit strömender Stickstoff/Kohlendioxid-Atmosphäre untersucht. In den meisten Versuchen war das  $\text{CO}_2$ -Gas mit dem Isotop  $\text{O}^{18}$  markiert, in zwei Fällen wurde  $\text{O}^{18}$ -Wasser und natürliches  $\text{CO}_2$  verwendet. Als Maß der Austauschgeschwindigkeit im Gesamtsystem diente die Zeitkonstante des exponentiellen Anstiegs oder Abfalls der Isotopenkonzentration im Wasser der Suspension. Die quantitative Analyse der Austauschkinetik ergab nach Modellrechnungen, daß in der Algenzelle eine extrem schnelle Katalyse der zum reversiblen Austausch führenden Kohlensäure-Bildung und ihres Zerfalls stattfindet. Die Blockierung des Ferments Carboanhydrase durch das Sulfoamid "Diamox" bewirkte ein Absinken der gesamten Austauschrate auf Werte, wie sie in reinem Wasser, bzw. in der Pufferlösung ohne Algen gefunden wurden. Die Tatsache, daß sich die Isotopenzusammensetzung im Photosauerstoff unabhängig von der Äquilibrierung des  $\text{CO}_2$  in der Zelle unter normalen Bedingungen nicht von der des Wassers unterscheidet, stützt die vielfach vertretene, jedoch bisher noch unbewiesene These von der Entstehung des Photosauerstoffs aus Wasser. Die Untersuchung des Langzeitverhaltens der belichteten Algen-Suspensionen zeigte einen inversen Fraktionierungseffekt, der eine  $\text{O}^{18}$ -Anreicherung des Photosauerstoffs gegenüber dem Zellwasser hervorruft.

## Abstract

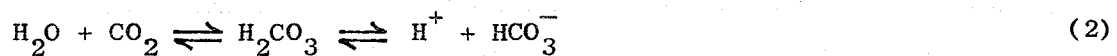
The exchange of oxygen isotopes between carbon dioxide and water was studied in illuminated and dark systems of suspended or adsorbed monocellular algae which were exposed to a streaming atmosphere of nitrogen and carbon dioxide. In most experiments the gaseous  $\text{CO}_2$  contained heavy oxygen, in two runs water enriched in  $\text{O}^{18}$  and natural carbon dioxide were used. The rate of the total exchange was measured by the time constant which characterizes the increase in or decrease of the isotopic concentration in the water of the suspension. A kinetic calculation on the basis of a 3-phase model confirmed that an extremely rapid catalysis of the formation and decay of carbonic acid takes place in the living cell and leads to a reversible oxygen exchange. The inhibition of the enzyme carbonic anhydrase by the sulfonamide "Diamox" effected a decrease of the total exchange rate to the level of the exchange rate in pure water and in buffer solution without algae, respectively. Since the isotopic composition of the photosynthetic oxygen independent of the  $\text{CO}_2$  equilibration in the cell under normal conditions did not differ from that of the water, the water itself must be the sole source of the oxygen produced, as is postulated by a widely accepted, but not yet proven theory. The investigation of illuminated suspensions over a long period of time resulted in an inverse fractionation effect which causes a decrease of the  $\text{O}^{18}$  level in the photosynthetic oxygen relative to the  $\text{O}^{18}$  level of the intracellular water.

### A. Einführung

Bei der Photosynthese grüner Pflanzen entstehen aus den Ausgangskomponenten Wasser und Kohlendioxid als Endprodukte Kohlenhydrate und elementarer Sauerstoff. Die allgemeine Bilanzgleichung der Photosynthese



schließt eine Vielzahl von Teilreaktionen ein, für deren Aufklärung die Frage nach dem stofflichen Ursprung, bzw. der Quelle des photosynthetischen Sauerstoffs von richtungsweisender Bedeutung ist. Nach der Bruttogleichung könnte der Photosauerstoff sowohl aus dem Kohlendioxid als auch aus beiden Ausgangskomponenten stammen. Da jedoch die lebende Zelle stets über Wasser in großem Überschuß verfügt, besteht die Möglichkeit, daß der elementare Sauerstoff ausschließlich durch photochemische Spaltung des Wassers erzeugt wird und ein Teil des  $\text{CO}_2$ -Sauerstoffs nach Reduktionsvorgängen an das Zellwasser zurückgeführt wird. Zur Klärung des Reaktionsmechanismus wurde seit dem Jahre 1940 die Isotopenzusammensetzung des Sauerstoffs, insbesondere im  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$ , entweder im Bereich der natürlichen Häufigkeiten oder aber bei starker  $\text{O}^{18}$ -Markierung einzelner Komponenten untersucht. Der Aussagewert der Experimente mit natürlicher  $\text{O}^{18}$ -Verteilung erwies sich jedoch als gering, weil kaum mehr als elementare Trenneffekte festgestellt wurden, deren Zuordnung unklar war und deren Größe anscheinend auf Grund abweichender physiologischer Bedingungen starke "geographische" Schwankungen zeigte [1]. Die  $\text{O}^{18}$ -Markierungsversuche von Ruben et al. [2], die in verschiedenen Lehrbüchern [1] als Demonstrationsbeispiel für die Markierung mit stabilen Isotopen aufgeführt werden, brachten lediglich das Ergebnis, daß der Photosauerstoff innerhalb der Fehlergrenzen der Messung die  $\text{O}^{18}$ -Markierung des Wassers besitzt. Die daraus gezogene Schlußfolgerung, daß der von der Pflanze entwickelte Sauerstoff nicht aus dem Kohlendioxid sondern aus dem Zellwasser entsteht, ist jedoch unzulässig. Denn der infolge Bildung und Zerfall von Kohlensäure



unvermeidbare Sauerstoffaustausch zwischen den Ausgangskomponenten der Photosynthese, der schon in reinem Wasser mit einer Halbwertszeit in der Größenordnung von 1 min abläuft (Anhang I), wird in der lebenden Zelle mit Sicher-

heit enzymatisch katalysiert. Da bei den üblichen Experimenten mit Bikarbonat/Karbonat-Pufferlösungen die Menge des gelösten  $\text{CO}_2$  zur Wassermenge in einem Molverhältnis von etwa  $1 : 10^6$  bis  $1 : 10^7$  steht (Anhang II), ist der  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des äquilibrierten Kohlendioxids, abgesehen von kleinen Elementareffekten, nicht vom  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des eingesetzten Wassers zu unterscheiden. Eine sichere Aussage kann nur dann erhalten werden, wenn es gelingt, quantitative Informationen über die Austauschkinetik in der Zelle selbst zu gewinnen und den Sauerstoffaustausch in der Zelle durch experimentelle Maßnahmen zu verringern oder zu unterdrücken. Diesen Forderungen entspricht die von uns angewandte dynamische Austauschmethode.

Die vorliegende Untersuchung befaßt sich in erster Linie mit Suspensionen von Einzeller-Algen in natürlichem Wasser, durch die ein konstanter Stickstoffstrom mit etwa 2 Vol%  $\text{O}^{18}$ -Kohlendioxid geleitet wird. Infolge Sauerstoffaustausch nimmt das Wasser der Suspension den  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des  $\text{CO}_2$  an, so daß es nach hinreichend langer Zeit zu einer "Normalisierung" [3-4] der Sauerstoffzusammensetzung des gesamten Wassers kommt. Während dieses Normalisierungsvorganges wird ein momentaner Ausgleich der Isotopenkonzentrationen im gelösten  $\text{CO}_2$  und Wasser, d.h. eine Äquilibrierung der Ausgangskomponenten durch die ständige Absorption von frischem  $\text{CO}_2$  und Desorption von umgesetztem  $\text{CO}_2$  verzögert. Die Austauschgeschwindigkeit kann in einem solchen System durch die Zeitkonstante des langfristigen Normalisierungsvorganges charakterisiert werden, die wiederum durch Messung des  $\text{CO}_2$ -Durchsatzes und der Isotopenkonzentrationen im  $\text{CO}_2$ -Gas und Wasser zu ermitteln ist. Zur Blockierung des austauschaktiven Ferments Carboanhydrase, das in den photosynthetisch wirksamen Zonen der Chloroplasten vorhanden ist, wird das Sulfonamid Diamox herangezogen, welches bereits in einer neueren Arbeit von Budzikiewicz und Inhoffen [5-6] Anwendung fand, allerdings unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen meßbaren Effekt zeigte. Durch Auftragen von abfiltrierten Algen auf eine temperierte Glasschicht lassen sich wasserarme Systeme herstellen. Diese Algen-Adsorbate entsprechen den Sedimenten von Döhler und Egle [7]. Sie sind bei Sättigung des Gasstroms mit Feuchtigkeit tagelang photosynthetisch aktiv und ermöglichen die Einstellung einer stationären Isotopenverteilung zwischen den Komponenten der strömenden und ruhenden Phase.



## B. Aufzucht und Einsatz der Algen

Im Mittelpunkt der Untersuchung stand die für das hier angewandte Verfahren besonders geeignete Einzeller-Alge *Chlorella pyrenoidosa*. Daneben wurde in geringerem Umfang die Blaualge *Anacystis nidulans* eingesetzt. Die Aufzucht der Algen erfolgte in einem 30°C warmen Kulturmedium bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 8 Stunden Belichtung (10 000 Lux) und 16 Stunden Dunkelperiode. Am Ende der Dunkelphase wurden die Algen durch Zentrifugieren vom Kulturmedium abgetrennt und in wechselnder Menge mit einer Pufferlösung von 0,05 m Triäthanolaminhydrochlorid und 0,006 m NaOH (pH 6,8) aufgenommen. Bei den eingesetzten Algen handelte es sich durchweg um junge aktive Zellen von annähernd gleicher Größe und Beschaffenheit, so daß günstige Voraussetzungen für eine Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse bestanden.

## C. Versuchsanordnung und Meßtechnik

Zur Untersuchung der Algen-Suspensionen diente das in Abb.1.dargestellte Reaktionsgefäß A, das aus Solidex-Glas gefertigt ist und im Innern eines Wassermantels ein Rohr mit eingeschmolzener Glasfritte (20 mm Ø) enthält. Das aus 4 konzentrischen Glasrohren bestehende Gefäß B besitzt einen 2,5 mm breiten Spalt mit ringförmigem Querschnitt, in den hinein das schwach angefeuchtete Algen-Sediment mit einem ebenfalls ringförmigen Wollpinsel abgestrichen wird. Das in einer 30 cm hohen, dünnen Schicht am Glas haftende Adsorbat hält ein Ultrathermostat auf 20°C. Die Algen-schicht wird durch eine im zentralen Hohlraum untergebrachte Leuchtröhre (Warmton 8W, 310 Lumen, ca 30 cm Länge) belichtet. Außerdem ist ein mit Magnesiumoxid bedampfter und mit vier weiteren Leuchtröhren bestückter Reflektor aus Aluminiumblech vorgesehen, der das Rohrsystem umgibt und auch zur Belichtung der Suspensionen im Reaktionsgefäß A benutzt wird. Die effektive Beleuchtungsstärke der Lampenordnung beträgt etwa 20 000 Lux.

Als Trägergas wird ein sauerstofffreier Stickstoffstrom von ca 10 l/h über einen Feindruckminderer in ein Befeuchtungssystem (Abb.2, B) geleitet, das den Sättigungsdampfdruck bei 20°C einstellt. Dem feuchten Gasstrom kann unmittelbar vor dem Reaktionsgefäß ein CO<sub>2</sub>-Teilstrom beigemischt werden. Das mit O<sup>18</sup> angereicherte Kohlendioxid, das in der Mehrzahl der Versuche zur Anwendung kam, wurde durch Isotopenaustausch zwischen D<sub>2</sub>O<sup>18</sup> (70 Atom% O<sup>18</sup>) und einem CO<sub>2</sub>-Strom mit natürlicher Sauerstoffzusammensetzung herge-

stellt und nach sorgfältiger Tieftemperatur-Trocknung in eine kleine Stahlflasche kondensiert. Aus dieser läßt man es über ein System von Druckminderern sowie über ein Nadelventil und einen Strömungsmesser in die Hauptgasleitung ein.

Vor Beginn des Versuchs wurde das ganze System mit reinem Stickstoff gespült. Unter gleichzeitiger Erhöhung des  $N_2$ -Vordrucks wurden 80 ml Algen-Suspension in das Gefäß A eingefüllt. Durch einen Pyrogallol-Test im Blasenähler Z bestimmte man den Zeitpunkt, an dem das Spülgas sauerstofffrei war und der eigentliche Versuch durch Zugabe von  $CO_2$  und Einschalten der Beleuchtung begonnen werden konnte. Aus dem Gasstrom wurde zuerst der Wasserdampf in der Falle  $F_1$  mittels Trockeneis/Aceton niedergeschlagen. Das im Reaktionsraum nicht verbrauchte Kohlendioxid (Primär- $CO_2$ ) kondensierte man anschließend in den mit flüssigem Stickstoff gekühlten Vierlingsfallen  $F_2$  und  $F_3$ . Zuletzt wurde der Photosauerstoff in drei hintereinander geschalteten Quarzrohren bei  $700^\circ C$  an reinem Graphit zu CO und  $CO_2$  umgesetzt und das gebildete Kohlendioxid (Sekundär- $CO_2$ ) intermediär ausgefroren. Der wegen des Boudouardschen Gleichgewichts in drei Stufen ausgeführte Umsatz brachte eine Ausbeute von 70 - 75 %  $CO_2$ .

Das Gelingen der Experimente hing sehr stark von der quantitativen Abscheidung des Primär- $CO_2$  ab, die sich als außerordentlich schwierig erwies. In der ersten Versuchsserie wurden dazu insgesamt vier Fallen benutzt. Die erste Falle diente dabei zur gemeinsamen Kondensation von Wasserdampf und  $CO_2$ . Obwohl Blindversuche auf eine ausreichende Trennung von Primär- und Sekundär- $CO_2$  hindeuteten, gab es dennoch in einigen Fällen eine ins Gewicht fallende Vermischung beider und damit eine Verfälschung der  $O^{18}$ -Werte des Photosauerstoffs. Da der Mitführungseffekt nicht in einer ungenügenden Kondensation des Kohlendioxids sondern im Transport von feinstem  $CO_2$ -Staub durch den Gasstrom zu suchen war, konnte das Problem schließlich durch den Einbau von insgesamt 8 Fallen, die nur auf etwa 2/3 ihrer Länge mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden, in befriedigender Weise gelöst werden.

Sofern von derselben Suspension oder demselben Adsorbat in zeitlichen Abständen  $\text{CO}_2$ -Proben zu ziehen waren, wurde der Gasstrom vor dem Fallensystem auf einen Blasenähler D umgeleitet, dessen ca 10 cm hohe Wassersäule den Strömungswiderstand der Fallen und Graphitrohre des Elektro-Ofens ersetzt. Nach Evakuieren der gekühlten Fallen im Hochvakuum und Einkondensieren des gesammelten  $\text{CO}_2$  in das Pipetten-System  $F_7 - K$  bestimmte man die  $\text{CO}_2$ -Menge durch Druckmessung in den geeichten Volumina. Danach konnte die zur massenspektrometrischen Analyse benötigte  $\text{CO}_2$ -Probe in eine 100 ml-Pipette abgezogen werden. Die Eichung des Systems, die mit  $\text{O}_2/\text{N}_2$ -Mischungen bekannter Zusammensetzung unter Nachahmung der Versuchsbedingungen vorgenommen wurde, ermöglichte eine Messung der photosynthetisch erzeugten Sauerstoffmenge. Nach dem Überkondensieren des Primär- und Sekundär- $\text{CO}_2$  wurde das Fallensystem mit trockenem Stickstoff aus einer zweiten Vorratsflasche belüftet und gespült.

Die massenspektrometrischen Isotopenanalysen wurden an einem CEC-Gerät (Modell 21-103 C) ausgeführt. Zur Messung gelangten Proben des Original-, Primär- und Sekundär- $\text{CO}_2$  sowie  $\text{CO}_2$ -Proben, die mit dem Wasser der Algen-Suspensionen bis zum Isotopengleichgewicht geschüttelt worden waren. Als  $\text{O}^{18}$ -Standard diente natürliches Kohlendioxid mit der Isotopenzusammensetzung des Luftsauerstoffs (0,2039 Atom%  $\text{O}^{18}$ ). Jede Probe wurde zweimal gemessen. Der relative Meßfehler lag in der Größenordnung von 1 ‰.

#### D. Experimente und Meßergebnisse

Die erste Folge (Serie I) von Experimenten umfaßt die Messungen an zwei Blaualgen-Suspensionen (BS), einer Chlorella-Suspension (CS), zwei Chlorella-Adsorbaten (CA) und einem Blaualgen-Adsorbat (BA) mit natürlichem Wasser und  $\text{O}^{18}$ -markiertem  $\text{CO}_2$  sowie die Messungen an je einer Chlorella- und Blaualgen-Suspension (CS-, BS- $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ) mit  $\text{O}^{18}$ -Wasser und natürlichem  $\text{CO}_2$ . Die Ausgangskonzentrationen der Synthesekomponenten haben dabei folgende Werte:

Natürliches Wasser:	0,197 Atom% $\text{O}^{18}$
Natürliches $\text{CO}_2$ :	0,204 " "
Angereichertes Wasser:	7,64 " "
Angereichertes $\text{CO}_2$ , direkt aus der Stahlflasche:	6,90-6,85 Atom% $\text{O}^{18}$
Angereichertes $\text{CO}_2$ , abgetrennt aus feuchtem Stickstoff (Natürl. $\text{H}_2\text{O}$ ):	6,79-6,56 " "

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Meßdaten entsprechen dem für die Serie I charakteristischen Ablauf der Versuche mit Suspensionen. Nach Einbringen der Algen in das Reaktionsgefäß und Entfernen der Sauerstoffreste durch Spülen mit Stickstoff beginnt eine Anlaufphase, in welcher der  $\text{CO}_2$ -Teilstrom und die Beleuchtung eingeschaltet sind, das abgehende  $\text{CO}_2$  jedoch entweder nicht aufgefangen und analysiert wird oder aber als Produkt aus den vorausgegangenen Teilversuchen noch nichts über den Zustand des Systems während der eigentlichen Meßzeit aussagt (Anlaufzeit). In der darauf folgenden Sammelphase wird eine bestimmte Zeit lang das  $\text{CO}_2$  aus dem Gasstrom niedergeschlagen, wobei zunächst das Sekundär- $\text{CO}_2$  bei voller Belichtung (L) und das Primär- $\text{CO}_2$  anschließend bei ausgeschalteter Beleuchtung (D) gesammelt wird (Kondensationszeit). Die Summe der stets von der ersten  $\text{CO}_2$ -Zugabe an gerechneten Anlaufzeit und der jeweiligen Kondensationszeit ergibt die gesamte Austauschzeit, über welche die Änderung des  $\text{O}^{18}$ -Gehalts im Wasser der Suspension zu integrieren ist, um von der Start- und Endkonzentration zu gelangen.

Bei den Adsorbaten (Tabelle 2) beziehen sich die Daten für Primär  $\text{CO}_2$  stets auf das belichtete System (L). Wie bereits bemerkt, sind in der Serie I die  $\text{O}^{18}$ -Werte des Photosauerstoffs wegen der unzureichenden Trennung von Primär- und Sekundär- $\text{CO}_2$  unsicher, sofern sich beide im  $\text{O}^{18}$ -Gehalt stark unterscheiden (Werte in Klammern). Die zweite, nach Verbesserung der experimentellen Bedingungen ausgeführte Versuchsserie (Serie II) befaßt sich mit einem Chlorella-Adsorbat und 6 Chlorella-Suspensionen, wovon drei mit einem Zusatz von Diamox (2-Acetylamino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid) behandelt wurden (CS-DX). Das von der Firma Lederle (München) hergestellte Sulfonamid wurde sowohl als Extrakt aus Tabletten als auch in Form der Reinsubstanz angewendet, und zwar bei der Suspension CS4 in  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  molarer Lösung und bei den Suspensionen CS6 und CS7 in  $10^{-3}$  molarer Lösung. Das Präparat bewirkte stets am Anfang des Versuchs eine starke Schaumentwicklung und die Abtrennung von etwa einem Drittel der Algen durch den Schaum, Nach Beseitigung dieser Flotationsprodukte mit saugfähigem Papier blieb die Blasenschicht der Suspension bis zum Ende des Versuchs stabil. Der Flotationseffekt, der bereits bei normalen Algen-Suspensionen angedeutet ist, erinnert an das quantitative Verschäumen der freien Chloroplasten eines unter denselben experimentellen Bedingungen untersuchten Spinat-Extraktes. Die Suspensionen mit Diamox unterscheiden sich weiterhin im zeitlichen Verlauf der Sauerstoffentwicklung von den normalen Systemen, bei welchen die  $\text{O}_2$ -Produktion nur langsam in Gang kommt, nach einer Anlaufphase von etwa

Tabelle 1: Suspensionen von Chlorella und Anacystis in natürlichem und  $O^{18}$ -markiertem Wasser, Serie I

Versuch	Primär- $CO_2$ Atom% $O^{18}$	Sekundär- $CO_2$ Atom% $O^{18}$	$H_2O$ Startkonz. Atom% $O^{18}$	$H_2O$ Endkonz. Atom% $O^{18}$	Anlauf- zeit h	Kondens.- zeit h
Pufferlösung	5,76	-	0,197	0,220	3,5	1,0
BS 1a (L)	-	(0,527)	0,197	-	0,5	5,2
1b (D)	5,63	-	"	-	5,9	2,0
BS 2a (L)	-	(0,797)	0,197	-	0,5	2,0
2b (D)	4,85	-	"	-	3,0	1,0
2c (L)	-	(0,472)	"	-	21,8	2,0
2d (D)	5,05	-	"	0,446	24,3	1,0
CS 1a (L)	-	(0,344)	0,197	-	0,5	3,0
1b (D)	2,99	-	"	0,269	3,6	1,0
CS- $H_2O^{18}$ a(L)	-	6,35	7,30	-	0,8	2,0
b(D)	5,62	-	"	7,24	3,3	1,0
BS- $H_2O^{18}$ a(L)	-	4,13	7,23 ?	-	0,8	2,0
b(D)	4,30	-	"	7,23	3,3	1,0

Versuch	Stickstoff	Kohlendioxid	Wasser- dampf	Photo- Sauerst.
Bez.	Nl/h	Nml/h Vol%	Vol%	Nml/h
Pufferlösung	9,93	221 2,2	2,3	-
BS 1a,b	9,75	180 1,8	2,3	1,2
BS 2a,b	9,76	219 2,2	2,3	5,5
2c,d	9,74	195 2,0	2,4	4,5
CS 1a,b	9,79	205 2,1	2,3	14,0
CS- $H_2O^{18}$ a,b	9,25	190 2,0	-	19,7
BS- $H_2O^{18}$ a,b	8,98	190 2,1	-	7,8

0,5 bis 1 Stunde ihr Maximum erreicht und nach 20 Stunden Belichtung (bei Chlorella) auf annähernd die Hälfte absinkt.

Mit Diamox ist hingegen eine nahezu unverzögerte Sauerstoffabgabe zu beobachten, die am Ende eines 20-Stunden-Versuchs sogar höhere Werte als nach dem ersten Anstieg aufweist (vergl. Tabelle 3, CS 6).

**Tabelle 2:** Adsorbate von Chlorella und Anacystis mit natürlichem Zellwasser, Serie I und II

Versuch	Primär- CO <sub>2</sub>	Sekundär- CO <sub>2</sub>	Anlauf- zeit	Kondensa- tionszeit	Trockengewicht der Algen
Bez.	Atom% O <sup>18</sup>	Atom% O <sup>18</sup>	h	h	mg
CA 1a (L)	-	(1,09)	23,0	2,0	-
1b (L)	6,55	-	25,3	1,0	330
CA 2a (L)	-	(1,81)	1,5	2,0	-
2b (L)	4,90	-	4,0	1,0	-
2c (L)	-	(1,64)	16,7	2,0	-
2d (L)	5,83	-	19,0	1,0	445
CA 3a (L)	4,89	0,820	0,2	1,0	-
3b (L)	5,52	1,23	5,2	1,0	-
3c (L)	6,49	1,31	21,6	2,0	179
BA 1a(L)	-	(1,44)	17,6	3,0	-
1b (L)	6,57	-	21,1	1,0	86

Versuch	Stickstoff	Kohlendioxid		Wasser- dampf	Photo- Sauerst.
Bez.	Nl/h	Nml/h	Vol%	Vol%	Nml/h
CA 1a,b	8,99	179	2,0	2,3	5,5
CA 2a,b	9,57	167	1,7	2,3	16,8
2c,d	9,36	174	1,8	2,3	11,2
CA 3a	7,05	134	1,9	2,3	5,5
3b	8,45	171	2,0	2,3	7,6
3c	8,85	186	2,1	2,3	2,0
BA 1a,b	9,32	170	1,8	2,3	ca 0,1

Bei den meisten Versuchen der Serie II wurde eine gleichzeitige Kondensation von Primär- und Sekundär-CO<sub>2</sub> unter den Bedingungen der Photosynthese vorgenommen. Zur Beschreibung der Experimente mit völliger Abdunklung des Reaktionsgefäßes vor der Photosynthese reichen die Angaben in Tabelle 3 nicht aus. Die Untersuchung der Suspensionen CS 3 und CS 5 läßt sich in folgende Phasen aufgliedern: (Seite 10)

Tabelle 3: Chlorella-Suspensionen in natürlichem Wasser, Serie II

Versuch	Primär-	Sekundär-	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	Anlauf-	Kondens.-
Bez.	CO <sub>2</sub> Atom% O <sup>18</sup>	CO <sub>2</sub> Atom% O <sup>18</sup>	Startkonz. Atom% O <sup>18</sup>	Endkonz. Atom% O <sup>18</sup>	zeit h	zeit h
CS 2a (L)	3,61	0,215	0,197	-	0,0	1,0
2b (L)	3,34	0,255	"	-	5,0	1,0
2c (L)	3,76	0,377	"	0,507	22,0	1,0
CS 3a (D)	4,78	-	0,197	-	0,6	1,0
3b (L)	3,75	0,507	"	0,240	3,1	1,0
CS-DX4a (L)	5,58	0,257	0,197	-	1,0	1,0
4b (D)	5,66	-	"	0,227	4,2	1,0
CS 5a (D)	4,97	-	0,197	-	0,5	1,0
5b (D)	5,02	-	"	-	4,0	1,0
5c (L)	4,67	0,331	"	0,254	6,0	1,0
CS-DX6a (L)	5,75	0,258	0,197	-	0,0	1,0
6b (L)	5,70	0,231	"	-	3,8	1,0
6c (L)	5,73	0,296	"	0,312	19,2	1,0
CS-DX7a (L)	5,71	0,234	0,197	-	0,3	1,0
7b (L)	5,80	0,233	"	0,235	4,3	1,0

Versuch	Stickstoff	Kohlendioxid	Photo-	Zellwasser	Trockenge-
Bez.	Nl/h	Nml/h	Sauerstoff Vol%	g	wicht d.A. g
CS 2a	9,55	161	1,7	14,0	-
2b	9,55	187	1,9	21,0	-
2c	9,35	191	2,0	9,0	0,88
CS 3a	9,35	180	1,9	-	-
3b	9,17	198	2,1	17,5	-
CS-DX 4a	9,64	195	2,0	22,0	-
4b	9,55	197	2,0	-	-
CS 5a	9,25	189	2,0	-	-
5b	9,41	195	2,0	-	-
5c	9,66	200	2,0	16,5	0,64
CS-DX 6a	9,41	169	1,8	11,8	-
6b	9,75	180	1,8	16,5	-
6c	10,1	184	1,8	17,8	-
CS-DX 7a	9,47	178	1,8	18,2	-
7b	9,64	180	1,8	23,0	0,81

	<u>CS 3</u>	<u>CS 5</u>
1.) Spülen mit N <sub>2</sub> im Dunkeln	1,0 Std.	1,0 Std.
2.) Zugabe von CO <sub>2</sub> im Dunkeln	0,6 "	0,5 "
3.) 1. Kondensation von Primär-CO <sub>2</sub> im Dunkeln	1,0 "	1,0 "
4.) 1. Dunkelpause (mit CO <sub>2</sub> )	0,1 "	2,5 "
5.) 2. Kondensation von Primär-CO <sub>2</sub> im Dunkeln	0,0 "	1,0 "
6.) 2. Dunkelpause (mit CO <sub>2</sub> )	0,0 "	0,5 "
7.) Belichtung ohne Kondensation von Primär- und Sekundär-CO <sub>2</sub>	1,4 "	0,5 "
8.) Belichtung mit Kondensation von Primär- und Sekundär-CO <sub>2</sub>	1,0 "	1,0 "

Das Verhalten der Suspension CS-DX 6 zu Beginn der Photosynthese wird mitbestimmt durch eine anomal lange Spülphase von 4 Stunden, in welcher die Algen ohne Beimischung von CO<sub>2</sub> zum Stickstoffstrom belichtet worden sind. Abb.3 und 4 zeigen den zeitlichen Verlauf des O<sup>18</sup>-Gehalts in den Synthesekomponenten der Suspensionen CS2 und CS-DX6 sowie des Adsorbats CA3, bei denen Messungen über eine Versuchsdauer von 20 bis 24 Stunden vorliegen, und den Effekt der Dunkelversuche mit den Suspensionen CS 3 und CS 5.

#### E. Austauschkinetik bei Algen-Suspensionen

Die bei Lichtsättigung und einem Überangebot von CO<sub>2</sub> durchgeführte Photosynthese sollte eine dem Chlorophyll-Gehalt der Algen-Suspension proportionale Sauerstoffentwicklung zur Folge haben, die allerdings u.a. vom physiologischen Zustand und von der Art der Algenzellen abhängt. Photometrische Chlorophyll -Bestimmungen bei den eingesetzten Chlorellen ergaben eine spezifische Produktionsrate von etwa 3 - 4 NmLO<sub>2</sub>/h.mg Chlorophyll. Weiterhin sollten bei Zellen von gleicher Beschaffenheit der Ferment-Gehalt und die Austausch-Aktivität parallel zum Chlorophyll-Gehalt, bzw. zur Sauerstoffentwicklung ansteigen. Die Auswertung der Meßdaten zeigt in der Tat, daß die Geschwindigkeit des Sauerstoffaustausches im Dunkeln unmittelbar nach der Photosynthese proportional zur optimalen O<sub>2</sub>-Produktionsrate anwächst (Abb.5), und zwar bis auf eine beachtliche Ausnahme im Falle der stark konzentrierten Blaualgen-Suspension BS-H<sub>2</sub>O<sup>18</sup>, bei der außerdem eine ungewöhnlich große Differenz zwischen den O<sup>18</sup>-Werten des Photosauerstoffs und des Wassers zu beobachten ist.



Der Sauerstoffaustausch, der für einen langsamen Anstieg oder Abfall der  $O^{18}$ -Konzentration im Suspensions- und Zellwasser sorgt, geht im wesentlichen auf zwei verschiedene Reaktionsmechanismen zurück. Einmal findet ein reversibler Isotopenaustausch zwischen dem gelösten  $CO_2$  und dem Wasser infolge Bildung und Zerfall von Kohlensäure statt, der in der Zelle katalytisch beschleunigt werden kann. Zum anderen kommt es im Zyklus der Photosynthese [8] bei der Reduktion des chemisch gebundenen  $CO_2$  zu Austauschvorgängen, durch die letztlich Sauerstoff aus dem  $CO_2$  an das Wasser irreversibel übertragen wird. Einen dritten Austauschereffekt, der bei den vorliegenden Versuchen im Gesamtgeschehen der Photosynthese integriert ist, dürfte die Zellatmung verursachen.

Bezeichnet man den momentanen  $O^{18}$ -Gehalt des Gesamt-Wassers mit  $n$  und den  $O^{18}$ -Gehalt des durch das  $CO_2$  normalisierten Wassers im stationären Endzustand mit  $n_\infty$ , so läßt sich unter der Voraussetzung konstanter Versuchsparameter und bei Vernachlässigung der Isotopenverdünnung durch den vom Gasstrom mitgeführten Wasserdampf eine Zeitkonstante  $A$  des Normalisierungsvorgangs durch die Differentialgleichung

$$\frac{dn}{dt} = -A(n - n_\infty) \quad (3)$$

oder ihre Lösung

$$(n - n_\infty) = (n_0 - n_\infty) e^{-At} \quad (4)$$

definieren [4]. Die Zeitkonstante  $A$  soll als Maß der Austauschgeschwindigkeit verwendet werden. Sie ist am genauesten aus der Isotopenbilanz vor und nach dem Umsatz der chemischen Komponenten zu ermitteln.

Bezeichnungen:  $x_0$   $O^{18}$ -Gehalt des  $CO_2$  vor Eintritt in die Suspension  
 $x_e$   $O^{18}$ -Gehalt des  $CO_2$  nach Austritt aus der Suspension  
 $n^*$   $O^{18}$ -Gehalt des Photosauerstoffs  
 $v_0$   $CO_2$ -Strom vor dem Eintritt in die Suspension  
 /Mole  $CO_2$ / Mole Wasser pro Zeiteinheit/  
 $v_e$   $CO_2$ -Strom nach Austritt aus der Suspension  
 $s$   $O_2$ -Strom /Mole  $O_2$ /Mole Wasser pro Zeiteinheit/

$$\frac{dn}{dt} \approx 2(v_0 x_0 - v_e x_e) - 2sn^* = A(n_\infty - n) \quad (5)$$

Tabelle 4: Austausch-Zeitkonstanten bei Algen-Suspensionen

Versuch Bez.	$10^3 v_e$ $h^{-1}$	$10^4 s$ $h^{-1}$	$10^3 A_1$ $h^{-1}$	$10^3 A_2$ $h^{-1}$	$A/v_o$
Pufferlösung	2,24	-	0,735	-	0,328
BS 1b (D)	1,82	-	0,672	-	0,369
BS 2b (D)	2,22	-	1,372	-	0,618
2d (D)	1,98	-	1,135	-	0,573
CS 1b (D)	2,07	-	2,517	-	1,216
CS-H <sub>2</sub> O <sup>18</sup> <sub>b</sub> (D)	1,92	-	2,239	-	1,540
BS-H <sub>2</sub> O <sup>18</sup> <sub>b</sub> (D)	1,92	-	2,239	-	1,166
CS 2a (H)	1,49	1,41	1,502	0,294	1,102
2b (H)	1,68	2,11	1,858	0,441	1,217
2c (H)	1,84	0,91	1,855	0,194	1,062
CS 3a (D)	1,82	-	1,161	-	0,638
3b (H)	1,82	1,76	1,762	0,352	1,057
CS-DX 4a (H)	1,75	2,21	0,672	0,458	0,574
4b (D)	1,99	-	0,716	-	0,360
CS 5a (D)	1,91	-	1,104	-	0,578
5b (D)	1,97	-	1,111	-	0,564
5c (H)	1,85	1,66	1,252	0,343	0,790
CS-DX 6a (H)	1,59	1,19	0,525	0,246	0,451
6b (H)	1,65	1,66	0,573	0,346	0,505
6c (H)	1,68	1,79	0,575	0,375	0,511
CS-DX 7a (H)	1,62	1,83	0,554	0,381	0,520
7b (H)	1,59	2,31	0,501	0,483	0,541

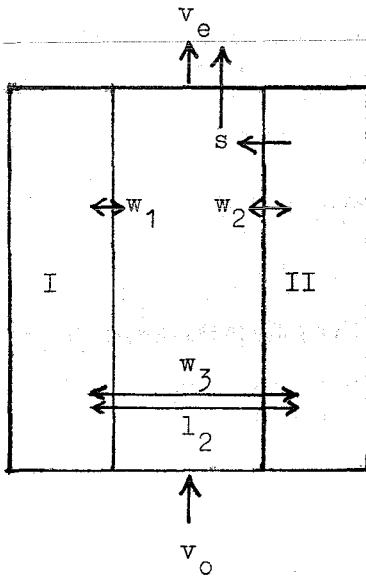
Die Zeitkonstante kann formal in zwei Anteile aufgespalten werden, die den reversiblen und irreversiblen Sauerstoffaustausch kennzeichnen.

$$A = A_1 + A_2 \approx \frac{2v_e (x_o - x_e)}{n_{\infty} - n} + \frac{2s(x_o - n^*)}{n_{\infty} - n} \quad (6)$$

Die nach Gl. 6 berechneten A-Werte sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die graphische Darstellung der normierten Zeitkonstanten  $A/v_o$  und  $A_1/v_e$  als Funktion der  $O_2$ -Bildungsrate zeigt unter gleichen physiologischen Bedingungen im großen und ganzen lineare Abhängigkeiten (Abb.5). Dabei ist der Sauerstoffaustausch in Suspensionen mit jungen Zellen bei Belichtung geringer als im Dunkel kurz nach der Photosynthese. Ein entgegengesetztes Verhalten findet

man bei Zellen, die vor der Belichtung längere Zeit im Dunkeln gehalten wurden. Da die Verzögerung des Austausches mit einer Überhöhung der  $O^{18}$ -Konzentration im Photosauerstoff, die eine Anreicherung des Zellwassers gegenüber dem Außenwasser widerspiegelt, parallel geht, dürfte in diesen Fällen auf einen stark eingeschränkten Wasserwechsel, bzw. auf eine verringerte Permeabilität der Zellwand zu schließen sein.

Der Unterschied zwischen den Zeitkonstanten austauschaktiver Suspensionen im Licht und Dunkeln kann zu einer Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Kohlensäurebildung im Zellwasser sowie zur Ermittlung der Geschwindigkeit des  $CO_2$ -Wechsels zwischen dem Zell- und Außenwasser, bzw. zwischen dem Gasstrom und Zellwasser benutzt werden, sofern der Wasserwechsel selbst hinreichend groß und mithin nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Das Problem läßt sich durch Vernachlässigung des Wasserdampf-Transports, der erst bei stärkerer Anreicherung ins Gewicht fällt, vereinfachen. Man betrachtet ein 3-Phasen-System mit zwei wäßrigen Phasen I und II, die mit der Gasphase  $CO_2$  und untereinander  $CO_2$  und Wasser austauschen.



#### Bezeichnungen:

- $n_1$   $O^{18}$ -Überschuß im Außenwasser (I)
- $n_2$   $O^{18}$ -Überschuß im Zellwasser (II)
- $x_1$   $O^{18}$ -Überschuß des in I gelösten  $CO_2$
- $x_2$   $O^{18}$ -Überschuß des in II gelösten  $CO_2$
- $x_g$   $O^{18}$ -Überschuß des  $CO_2$  in der Gasphase
- $c_1$   $CO_2$ -Gehalt in I  $[\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser I}]$
- $c_2$   $CO_2$ -Gehalt in II  $[\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser II}]$
- $w_1$   $CO_2$ -Wechselrate zwischen Gasphase und I  $[\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser I} \cdot \text{Zeiteinheit}]$
- $w_2$   $CO_2$ -Wechselrate zwischen Gasphase und II  $[\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser II} \cdot \text{Zeiteinheit}]$
- $w_3$   $CO_2$ -Wechselrate zwischen I und II  $[\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser II} \cdot \text{Zeiteinheit}]$
- $l_2$   $H_2O$ -Wechselrate zwischen I und II  $[\text{Mole } H_2O / \text{Mole } H_2O \text{ II} \cdot \text{Zeiteinheit}]$
- $q$  Wasserverhältnis  $[\text{Mole Wasser I} / \text{Mole Wasser II}]$
- $\alpha$   $O^{18}/O^{16}$ -Trennfaktor im System  $CO_2/H_2O$
- $k_1$  Geschwindigkeitskonstante der Kohlensäurebildung in I  $[\text{Zeiteinheit}^{-1}]$

Abb.6: Modell einer Algen-Suspension mit den wäßrigen Phasen I und II

- $k_2$  Geschwindigkeitskonstante der Kohlen-  
säurebildung in II  $\overline{\text{Zeiteinheit}^{-1}}$   
 $r$  Relative Höhe gemessen in Richtung des  
Gasstroms (Bereich 0 bis 1)  
 $s$   $O_2$ -Bildungsrate  $\overline{\text{Mole } O_2 / \text{Mole Wasser I} \cdot}$   
 $\overline{\text{Zeiteinheit}}$   
 $v$   $CO_2$ -Strom  $\overline{\text{Mole } CO_2 / \text{Mole Wasser I + II} \cdot}$   
 $\overline{\text{Zeiteinheit}}$   
 $v_o$   $CO_2$ -Strom vor dem Eintritt in das System  
 $v_e$   $CO_2$ -Strom nach dem Austritt aus dem System  
 $v \equiv v_o - sqr$  ,  $w \equiv w_o v / v_o$

In den flüssigen Phasen sind die Isotopenkonzentrationen sowie die  $CO_2$ -Löslichkeit infolge intensiver Durchmischung als ortsunabhängig anzusehen. Der Isotopengehalt ( $O^{18}$ -Überschuß) wird dabei stets als Differenz zwischen dem Momentanwert und Normalisierungs-Endwert bestimmt. Um die Konzentrationsgradienten in der Gasphase zu eliminieren, müssen effektive Absorptions- oder Gaswechselraten eingeführt werden. Dieses gelingt in brauchbarer Näherung, wenn man die Isotopenbilanz des  $CO_2$ -Austausches unter Vernachlässigung der zeitlichen Änderung der im  $CO_2$ -Gas (innerhalb der Suspension) befindlichen  $O^{18}$ -Menge aufstellt.

$$c_g \frac{\partial x_g}{\partial t} = -v \frac{\partial x_g}{\partial r} - (x_g - x_1)w_1 - (x_g - x_2)w_2q - x_g \frac{\partial v}{\partial r} - sqx_2 = 0 \quad (7)$$

Durch Integration der Gleichung 7 über die Ortskoordinate  $r$  erhält man eine Näherungsbeziehung, welche den momentanen  $O^{18}$ -Wert  $x_{eg}$  des austretenden  $CO_2$ -Gases mit den momentanen  $O^{18}$ -Werten des in I und II gelösten  $CO_2$  verknüpft.

$$x_{eg} = (w_1^* x_1 + w_2^* q x_2) / (v_o - sq) \quad (8)$$

$$w_1^* \equiv \frac{w_1 (v_o - sq)}{w_1 + (w_2 - s)q} \left( 1 - \frac{v_o}{v_o - sq} \cdot e^{-\frac{w_1 + w_2 q}{v_o}} \right) \quad (9)$$

$$w_2^* \equiv \frac{(w_2 - s)(v_o - sq)}{w_1 + (w_2 - s)q} \left( 1 - \frac{v_o}{v_o - sq} \cdot e^{-\frac{w_1 + w_2 q}{v_o}} \right) \quad (10)$$

Die durch Transportvorgänge verursachte  $O^{18}$ -Änderung im gesamten  $CO_2$  beider wässriger Phasen folgt aus der Materialbilanz:

$$\begin{aligned}
 c_1 \frac{dx_1}{dt} + c_2 q \frac{dx_2}{dt} &= - (v_o - sq)x_{eg} - sqx_2 \\
 &= - w_1^* x_1 - (w_2^* + s)qx_2
 \end{aligned} \tag{11}$$

Die Gesamtänderung des Isotopengehaltes im Außen- und Zellwasser ist dementsprechend:

$$\begin{aligned}
 \frac{dn_1}{dt} + q \frac{dn_2}{dt} &= - 2(v_o - sq)x_{eg} - 2sqn_2 \\
 &= - 2w_1^* x_1 - 2w_2^* qx_2 - 2sqn_2
 \end{aligned} \tag{12}$$

Unter Verwendung dieser Materialbilanzen und der in der Austauschkinetik üblichen Ansätze  $\sqrt[4]{}$ , kann ein System von vier linearen homogenen Differentialgleichungen abgeleitet werden.

$$\frac{dn_1}{dt} = - 2w_1^* x_1 - l_2 q (n_1 - n_2) \tag{13}$$

$$\frac{dx_1}{dt} = k_1 (\alpha n_1 - x_1) - \frac{w_1^*}{c_1} x_1 - \frac{w_3}{c_1} q (x_1 - x_2) \tag{14}$$

$$\frac{dn_2}{dt} = - 2w_2^* x_2 - 2sn_2 + l_2 (n_1 - n_2) \tag{15}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_2 (\alpha n_2 - x_2) - \frac{w_2^* + s}{c_2} x_2 + \frac{w_3}{c_2} (x_1 - x_2) \tag{16}$$

Wie die Versuche mit *Chlorella* zeigen, ist die auf die Zellwassermenge normierte  $O_2$ -Produktionsrate bei Lichtsättigung annähernd konstant ( 22 Nm $lO_2$ /h·ml Zellwasser). Aus der Geschwindigkeitskonstante  $k_{\overline{H_2O}}$  der Kohlensäurebildung, die bei 20°C in neutralem oder saurem Medium bei einer Ionenstärke von ca 0,11 (Pufferlösung) etwa den Wert 90 h<sup>-1</sup> hat, läßt sich die austauschkinetische Konstante  $k_1 = \frac{1}{3} k_{\overline{H_2O}}$  errechnen (Anhang I). Bei bekanntem  $k_1$  ist es möglich, über die Zeitkonstante des algenfreien Systems die  $CO_2$ -Wechselrate  $w_1$  zu bestimmen. Wegen der bei Anwesenheit von Algen schlechteren Gasdispersion empfiehlt es sich, dabei nicht die Meßdaten der Pufferlösung selbst zu benutzen, sondern die in Abb.5 wiedergegebenen normierten Austauschkonstanten auf die  $O_2$ -Bildungsrate Null hin zu extrapolieren. Als Unbekannte verbleiben im wesentlichen die Größen  $w_2, w_3$  und  $k_2$ . Die Berechnung von  $w_2$  und  $k_2$  setzt eine Fixierung von  $w_3$  voraus, die mit der Bedingung

$$w_3 = c_1 l_2 \tag{17}$$

vorgenommen wird. Hierbei ist angenommen, daß die Zellwand bei großem Wasser-Durchsatz das gelöste  $\text{CO}_2$  ohne Trenneffekt in der vorhandenen Konzentration aufnimmt und abgibt. Tatsächlich kann der  $\text{CO}_2$ -Austausch zwischen dem Zell- und Außenwasser nur eine untergeordnete Rolle spielen. Würde das  $\text{CO}_2$  ausschließlich von dem Gasstrom auf das Außenwasser und von diesem in gelöster Form auf das Zellwasser übertragen, so könnte die Zeitkonstante A selbst bei beliebig schnellem Isotopenaustausch und  $\text{CO}_2$ -Wechsel zwischen I und II nur den Grenzwert

$$A_{\text{max.}} \approx 2\alpha w_1^* \approx 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$$

erreichen, weil der  $\text{CO}_2$ -Wechsel zwischen Gas und Außenwasser ( $w_1 = 0,87 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) geschwindigkeitsbegrenzend wäre (Anhang III). Da jedoch im Experiment mehr als doppelt so hohe A-Werte gefunden werden, muß der Haupteffekt in dem durch  $w_2$  charakterisierten Direktaustausch zwischen Gas und Zelle zu suchen sein.

Für die numerische Lösung des Problems stehen zwei Methoden zur Verfügung: die Eigenwert-Analyse und die numerische Integration der Differentialgleichungen. Das erste Verfahren basiert darauf, daß die experimentell ermittelte Zeitkonstante des langfristigen Austauschvorgangs mit dem kleinsten Eigenwert der Koeffizienten-Matrix des Gleichungssystems identisch ist. Man hat also die beiden unbekanntenen Größen  $w_2$  und  $k_2$  solange in den beiden Matrizen für den Hell- und Dunkelaustausch zu verändern, bis der kleinste der vier Eigenwerte in der jeweiligen Matrix-Auflösung hinreichend genau mit dem entsprechenden Meßwert der Zeitkonstanten A übereinstimmt. Das Verfahren setzt homogene Differentialgleichungen mit Lösungen von der Form

$$n_i = \sum_{j=1}^4 n_{oij} e^{-\lambda_j t} \quad (18)$$

voraus. Bei der zweiten Methode integriert man das Gleichungssystem nach dem Runge/Kutta-Verfahren auf einem Elektronenrechner, indem man von den Isotopenkonzentrationen zur Zeit  $t=0$  ausgeht und den Konzentrationsverlauf bis zu einer bestimmten Zeit rechnerisch nachbildet. Auch hierbei müssen die unbekanntenen Größen bei der Koeffizientenbildung so lange variiert werden, bis die gemessenen (oder aus den genauer bestimmbaren Zeitkonstanten kalkulierten) Konzentrationswerte durch die numerische Integration erhalten werden. Zur Berechnung wurden folgende Ausgangsdaten für eine "Normal-Suspension" mit  $v_0 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$  verwandt:

$$\begin{array}{llll}
 A_{\text{Puffer}} & = 0,55 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} & c_1 = c_2 = 1,4 \cdot 10^{-5} & k_1 = 30 \text{ h}^{-1} \\
 A_{\text{CS-Hell}} & = 2,16 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} & w_1 = 0,872365 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} & \alpha = 1,0435 \\
 A_{\text{CS-Dunkel}} & = 2,93 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} & w_3 = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1} & q = 0,01 \\
 s & = 0,0177 \text{ h}^{-1} & l_2 = 10 \text{ h}^{-1} & 
 \end{array}$$

Die rechnerische Aufgabe besteht darin, für jede der beiden Zeitkonstanten  $A_{\text{CS}}$  die Konstante  $k_2$  als Funktion von  $w_2$  zu ermitteln. Der Schnittpunkt der  $k_2$ -Kurven in der  $k_2/w_2$ -Darstellung (Abb.7) sollte die realen Werte der gesuchten Größen ergeben. Aus dem Verlauf der Kurven, die sich innerhalb des numerischen Bereichs der elektronischen Rechenmaschine nicht schneiden, ist abzulesen, daß die Bedingung gleicher  $k_2$ - und  $w_2$ -Werte nur mit  $w_2 \approx 0,12$  und  $k_2 \rightarrow \infty$  erfüllt wird. Der Sauerstoffaustausch in der Zelle verläuft demnach unmeßbar schnell. Dieses Ergebnis besagt, daß im Zellwasser die  $\text{O}^{18}$ -Markierung einer Komponente sofort durch Isotopenaustausch beseitigt wird. Eine Entscheidung über den Mechanismus der Sauerstoffentwicklung ist ohne Ausschaltung der Fermentwirkung nicht möglich. Denn die Beweisführung könnte sich dann nur noch auf kleine Konzentrationsverschiebungen infolge elementarer Trenneffekte stützen und wäre wegen der komplexen Natur dieser Effekte von zweifelhaftem Wert.

Erst bei Unterdrückung der Ferment-Katalyse durch Diamox gleicht sich die Austauschgeschwindigkeit im Zellwasser derjenigen im Außenwasser an (Abb.5). In normaler wäßriger Lösung läßt sich jedoch die  $\text{O}^{18}$ -Verteilung beim langfristigen Austausch angeben (Anhang III). Der  $\text{O}^{18}$ -Überschuß  $x$  im gelösten  $\text{CO}_2$  steht zum  $\text{O}^{18}$ -Überschuß  $n$  des Wassers in folgender Beziehung

$$x \approx \frac{\alpha n}{1 + (w^*/kc)} \quad (19)$$

Für die Anfangsperiode der Normalisierung errechnet sich mit  $w^*/kc \approx 1,68$  (Pufferlösung) eine  $\text{O}^{18}$ -Differenz von etwa 4 Atom% zwischen dem gelösten  $\text{CO}_2$  und dem Wasser. Bei vollständiger Ferment-Hemmung sollte dieser Unterschied zumindest größenordnungsmäßig im Zellsystem auftreten. Da der  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des Photosauerstoffs bei Anwesenheit von Diamox dieser Tendenz nicht im geringsten folgt, sondern im Gegenteil den relativen Abfall des  $\text{O}^{18}$ -Gehaltes des Zellwassers mitmacht, muß der Mechanismus der Sauerstoffentwicklung im Sinne der vielfach vertretenen, allerdings nicht bewiesenen Annahme verstanden werden. Der Photosauerstoff entsteht demnach durch Dehydrierung des Wassers.

F. Austauschkinetik bei Algen-Adsorbaten

Die Anwendung der bisher entwickelten analytischen Methoden auf das 2-Phasen-System des Algen-Adsorbats ist wegen der ausgeprägten Ortsabhängigkeit des Problems nicht ohne weiteres möglich. Ein derartiges Adsorbat realisiert den seltenen Fall einer flüssigen Phase mit differentiell kleinen Bezirken oder Zonen, zwischen denen kein direkter Stoffaustausch stattfindet. Die Kinetik des Isotopenaustausches in einem heterogen System dieser Art läßt sich folgendermaßen formulieren.

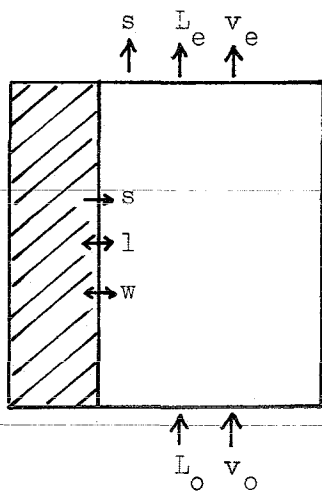


Abb.8: Modell eines Algen-Adsorbats

Bezeichnungen und Definitionen:

- $n$   $O^{18}$ -Gehalt im Zellwasser  
 $x$   $O^{18}$ -Gehalt des gelösten  $CO_2$   
 $n_g$   $O^{18}$ -Gehalt des Wasserdampfes  
 $x_g$   $O^{18}$ -Gehalt des gasförmigen  $CO_2$   
 $n_{og}$   $O^{18}$ -Gehalt des eintretenden Wasserdampfes  
 $n_{eg}$   $O^{18}$ -Gehalt des austretenden Wasserdampfes  
 $x_{og}$   $O^{18}$ -Gehalt des eintretenden  $CO_2$ -Gases  
 $x_{eg}$   $O^{18}$ -Gehalt des austretenden  $CO_2$ -Gases  
 $r$  Relative Höhe der Adsorbat-Schicht (0 - 1)  
 $N_i$  Mole Zellwasser (  $i = 1$  ) oder Dampf (  $i = 1$  ).  
Mole Kohlendioxid (  $i = 2$  ) oder  
Mole Photosauerstoff (  $i = 3$  )

$$c \equiv \frac{N_2(\text{Lösung})}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$c_g \equiv \frac{N_2(\text{Gas})}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$h \equiv \frac{N_1(\text{Gas})}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$s \equiv \frac{N_3(\text{Gas})}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$L \equiv \frac{(dN_1/dt)_{\text{Gas}}}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$v \equiv \frac{(dN_2/dt)_{\text{Gas}}}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$l \equiv \frac{(dN_1/dt)_{\text{Gas-Fl.}}}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$w \equiv \frac{(dN_2/dt)_{\text{Gas-Fl.}}}{N_1(\text{Adsorbat})}$$

$$L \equiv L_o - sr, \quad v \equiv v_o - sr, \quad w/w_o \equiv v/v_o$$

Bei der Aufstellung der Differentialgleichungen, welche die  $O^{18}$ -Änderung im  $CO_2$ -Gas, im gelösten  $CO_2$  der Zelle, im Wasserdampf des Gasstroms und im Zell-



wasser beschreiben, ist die Ortsabhängigkeit des Isotopengehalts, der Stoffkonzentrationen und der Mengenflüsse zu berücksichtigen.

$$c \frac{\partial x_g}{\partial t} = -v \frac{\partial x_g}{\partial r} - (x_g - x)w - sx - x_g \frac{\partial v}{\partial r} \quad (20)$$

$$c \frac{\partial x}{\partial t} = (x_g - x)w + kc(\alpha n - x) \quad (21)$$

$$h \frac{\partial n_g}{\partial t} = -L \frac{\partial n_g}{\partial r} - (n_g - n)l - sn - n_g \frac{\partial L}{\partial r} \quad (22)$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} = (n_g - n)l + 2w(x_g - x) + s(x - n) \quad (23)$$

In der Praxis ist das Problem noch komplizierter, weil bei der Herstellung des Adsorbats unter Umständen mehrere übereinander liegende Algenschichten entstehen, von denen nur die dem Gasstrom zugewandte Schicht zu einem unbehinderten Stoffaustausch mit der Gasphase kommt, während die abgedeckten Zellen weitgehend inaktiv bleiben. Nimmt man einen mittleren Zelldurchmesser der Chlorella von 0,01 mm und einen mittleren Flächenbedarf von  $10^{-6} \text{ cm}^2$ /Zelle an, so ist abzuschätzen, daß im Reaktionsgefäß auf  $820 \text{ cm}^2$  bedeckter Glasfläche etwa  $0,82 \cdot 10^9$  Algen in monozellarer Schicht untergebracht werden können. Dessen ist ein Naßgewicht von 0,4 g und ein Trockengewicht von rund 0,1 g zuzuordnen. Danach sollte es sich bei den untersuchten Chlorella-Adsorbaten um Lagen von 1 bis 4 Zellschichten gehandelt haben, was durchaus dem Befund der visuellen Prüfung entspricht. Das Algen-Adsorbat enthält nach dem Auftragen einen Rest anhaftenden Wassers. Dieses verdunstet im Laufe der Photosynthese, obwohl der Gasstrom feuchtigkeitsgesättigt ist. Der Grund dafür dürfte eine schwache Erwärmung der Zellen gegenüber der temperierten Wandung sein. Nach einer Versuchsdauer von etwa einem Tag beobachtet man bei dünn aufgetragenen Adsorbaten einen nahezu stationären Sättigungsverlauf der Isotopenkonzentrationen im Primär- und Sekundär- $\text{CO}_2$ , wobei der  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des Primär- $\text{CO}_2$  die Werte 6,5 - 6,6 Atom% eines Blindversuchs ohne Algen erreicht, das von den Zellen absorbierte  $\text{CO}_2$  quantitativ umgesetzt wird und der  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des Sekundär- $\text{CO}_2$ , bzw. Photosauerstoffs nur wenig oberhalb von 1 Atom% liegt.

Unter stationären Bedingungen mit  $w = s$  vereinfachen sich Gleichung 21 und 23 soweit, daß bei bekannten Mittelwerten der Konzentrationen und bei bekanntem Wasserwechsel die Geschwindigkeitskonstante  $k$  oder umgekehrt  $l$  aus

bekanntem  $k$  ermittelt werden kann. Bei sehr schnellem Sauerstoffaustausch im Zellwasser ( $x \approx n$ ) gilt für die Rate  $l$  des Wasserwechsels:

$$l \approx \frac{2s(x_g - n)}{n - n_g} \quad (24)$$

Von diesen Möglichkeiten einer  $l$  - oder  $k$ -Bestimmung konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Gebrauch gemacht werden, weil die Isotopenanalyse kleinster Wassermengen experimentelle Schwierigkeiten bereitete. Deshalb ist es auch nicht zulässig, aus den an Adsorbaten erhaltenen Meßwerten Rückschlüsse auf den Mechanismus der  $O_2$ -Entwicklung zu ziehen, obgleich die relativ niedrigen  $O^{18}$ -Werte des Photosauerstoffs wiederum auf das Zellwasser als Quelle hinweisen. Nach den Erfahrungen mit langbelichteten Suspensionen ist allerdings zu vermuten, daß das Zellwasser im Mittel eine wesentlich höhere  $O^{18}$ -Konzentration als der Photosauerstoff aufweist.

#### G. Trenneffekte bei der Photosynthese

Die genaue Analyse des natürlichen Photosauerstoffs und Wassersauerstoffs ergab bereits bei den ersten Untersuchungen dieser Art eine schwache Anreicherung des Isotops  $O^{18}$  im Photo- $O_2$  gegenüber dem Wassersauerstoff ( $H_2O^{nat}$ : 0,196 - 0,198 Atom%  $O^{18}$ ). Dabei wird im Photo- $O_2$  jedoch bei weitem nicht die  $O^{18}$ -Häufigkeit des Luftsauerstoffs (0,2039 Atom%) erreicht. Der Fraktionierungs- oder Trennfaktor der Photosynthese

$$\alpha_F = \frac{\overline{O^{18}/O^{16}}_{O_2}}{\overline{O^{18}/O^{16}}_{H_2O}} \quad (25)$$

schwankt zwischen 1,001 und 1,006  $\overline{9,11}$ . Der höhere  $O^{18}$ -Gehalt des Photosauerstoffs wird von Dole und Jenks  $\overline{9}$  als die nach der statistischen Thermodynamik  $\overline{10}$  zu erwartende Gleichgewichtskonzentration des Isotops  $O^{18}$  interpretiert, von anderen Autoren aber auf einen vom Kohlendioxid herührenden  $O_2$ -Anteil zurückgeführt  $\overline{1}$ . Die mit der Photosynthese simultan verlaufende Atmung der lebenden Zelle, bei der ein bevorzugter Verbrauch von  $O_2^{16}$ , d.h. eine  $O^{18}$ -Anreicherung im verbleibenden Sauerstoffgas mit einem Fraktionierungsfaktor bis zu 1,018 zu beobachten ist, darf bei der Beurteilung des Gesamteffekts nicht vernachlässigt werden. Nach Vinogradov  $\overline{11}$  et al. ist der totale Trenneffekt durch Überlagerung beider Stoffwechselforgänge zu erklären, wobei jeder Teilvorgang einen seiner Intensität proportionalen Beitrag liefert. Die photosynthetische Dehydrierung soll danach Wassersauer-

stoff mit unveränderter Isotopenzusammensetzung freisetzen, während die anteilmäßig schwächere Atmung allein für die  $O^{18}$ -Anreicherung im Sauerstoffgas verantwortlich gemacht wird.

Die eigenen Experimente zeigen eine  $O^{18}$ -Anreicherung des Photo- $O_2$  gegenüber dem Suspensionswasser lediglich in der Anlaufphase. Der Trennfaktor hängt dabei stark von der Vorbehandlung der Algen ab und überschreitet, ganz abgesehen von den Versuchen mit Dunkelperioden vor der Belichtung, die bisher bekannte Größenordnung. So wurden bei den Suspensionen CS 2 und CS-DX 6 jeweils nach einer Stunde Belichtungsdauer im Mittel  $\alpha_F$ -Werte von 1,06 und 1,29 gefunden, die auf einen verminderten Wasserwechsel bei starkem  $O^{18}$ -Austausch in der Zelle zurückzuführen sind (vergl. Abb. 4).

Nach längerer Belichtungszeit tritt jedoch eine Umkehrung des Trenneffekts ein, wobei der  $O^{18}$ -Gehalt des Photosauerstoffs unterhalb des  $O^{18}$ -Niveaus im Zellwasser liegt. Eine Prüfung des Zellwassers fand im Falle der Suspension CS 2 statt. Am Ende des Versuchs wurden die Algenzellen (innerhalb von 40 min) abfiltriert. Das im Hochvakuum bei  $100^\circ C$  abgezogene Zellwasser und zwei Proben Außenwasser kamen zur massenspektrometrischen Analyse. Bei allen drei Wasserproben ergab sich ein  $O^{18}$ -Wert von 0,507 Atom%, während das in der letzten Stunde des Versuchs kondensierte Sekundär- $CO_2$  nur 0,377 Atom%  $O^{18}$  enthielt. Der bei intensiver und langdauernder Photosynthese auftretende Abreicherungs-effekt hängt von der Reaktionszeit, von der Geschwindigkeit des reversiblen Sauerstoffaustausches und anscheinend auch davon ab, welche der Reaktionskomponenten die  $O^{18}$ -Markierung trägt (Tabelle 5).

Die bei den  $H_2O^{18}$ -Suspensionen festgestellte starke Abweichung der  $O^{18}$ -Werte für Photo- $O_2$  vom  $O^{18}$ -Niveau des Gesamtwassers könnte auch durch einen unzureichenden Wasseraustausch zwischen beiden flüssigen Phasen hervorgerufen worden sein. Doch weist die anomal hohe Zeitkonstante bei der Blaualgen-Suspension BS- $H_2O^{18}$  auf einen engen Zusammenhang zwischen dem Abreicherungs-effekt und dem durch Carboanhydrase katalysierten Isotopenaustausch hin. Die Austauschrate wird in Tabelle 5 durch eine auf den  $CO_2$ -Strom und die  $O_2$ -Entwicklung bezogene Zeitkonstante

$$A^* \equiv \frac{(A/v_o)_{\text{Dunkel, aktiv}}}{d(O_2)_{\text{max.}}/dt} \quad (26)$$

gekennzeichnet. Ein Widerspruch besteht zunächst darin, daß die  $O^{18}$ -Abreicherung in einer austauschintensiven Zone stattfindet, wo bei den Versuchen mit

Tabelle 5:  $O^{18}/O^{16}$ -Fraktionierung bei der Entwicklung von Photosauerstoff in Algen-Suspensionen

Versuch Bez.	Versuchs- zeit h	* A h/Nml	Photosauerstoff		Sus.- Wasser	$1/\alpha_F$
			Nml/h	Atom%O <sup>18</sup>	Atom%O <sup>18</sup>	
CS-DX 6c	19,7	0,02	18	0,296	0,310	1,047
CS 2b	5,5	(0,08)	21	0,255	0,270	1,059
CS 2c	22,5	(0,08)	9	0,377	0,500	1,326
CS-H <sub>2</sub> O <sup>18</sup> <sub>a</sub>	1,8	0,08	20	6,35	7,25	1,142
BS-H <sub>2</sub> O <sup>18</sup> <sub>a</sub>	1,8	0,15	8	4,13	7,23	1,751

$O^{18}$ -markiertem  $CO_2$  höhere  $O^{18}$ -Werte im Photosauerstoff, bzw. Zellwasser als im Außenwasser zu erwarten wären. Diese Erwartung wird nur in der Anlaufphase erfüllt. Bei kontinuierlicher Photosynthese hingegen tritt ein Trennprozeß in Erscheinung, der über einen Elementareffekt weit hinausgeht, d.h. über mehrere Trennstufen verlaufen muß. Der infolge Bildung und Zerfall von Kohlensäure vorhandene Sauerstoffaustausch ist andererseits ein Vorgang, der im Prinzip für eine  $O^{18}$ -Abreicherung im Wasser und  $O^{18}$ -Anreicherung im  $CO_2$  sorgt. Den Elementareffekt  $\sqrt{10,12}$  beschreibt ein Trennfaktor  $\alpha \approx 1,04$ . Zur Ausbildung größerer Konzentrationsunterschiede kann es aber nur bei einem Gegenstrom der  $CO_2$ - und Wasserphase mit Phasenumkehr an einem Ende der Trennstrecke kommen. Da anzunehmen ist, daß im Chloroplasten die  $O_2$ -Entwicklung und  $CO_2$ -Reduktion an zwei räumlich getrennten Stellen vollzogen werden, ist bei einer  $CO_2$ -Strömung zur Reduktionszone hin und einer  $H_2O$ -Strömung von der Reduktionszone weg ein Gegenstrom der beiden Phasen denkbar. Die Phasenumkehr würde in der partiellen Reduktion des  $CO_2$ , bzw. der Diphosphoglycerinsäure zu Wasser (und anderen Produkten) zu erblicken sein. Zur Erklärung des Trenneffekts bietet sich demnach folgendes Modell an:

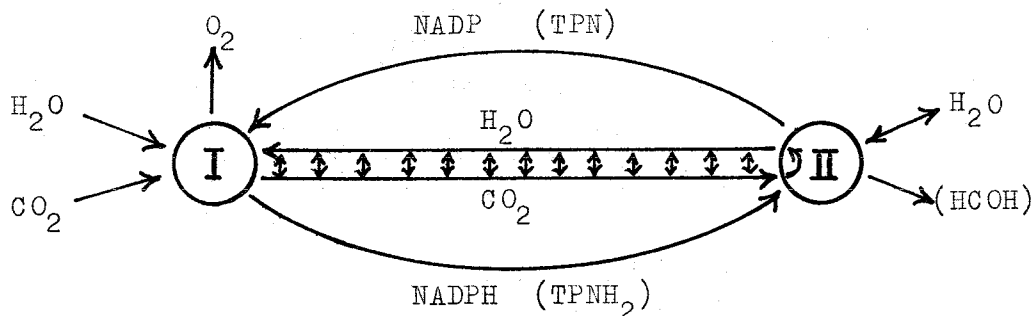


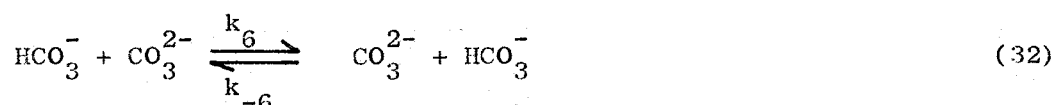
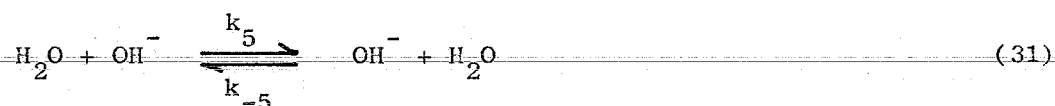
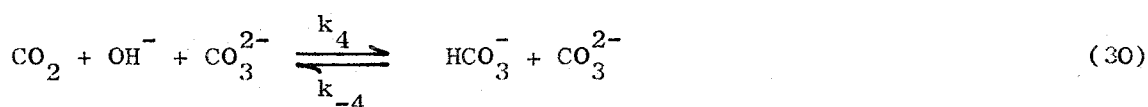
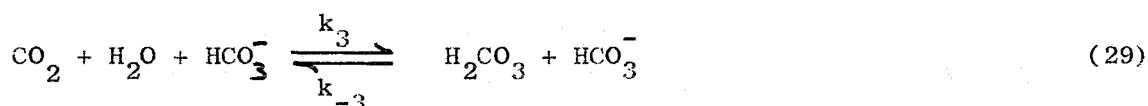
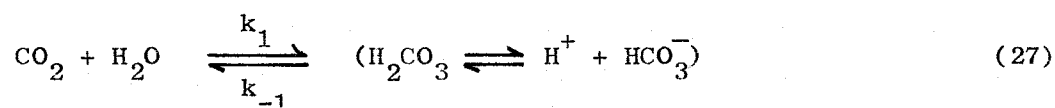
Abb.9: 2-Zonen-Modell des Trennvorgangs bei der photosynthetischen Sauerstoffproduktion.

Die Wirkung des Ferments Carboanhydrase besteht nach dieser Modellvorstellung darin, daß es durch Beschleunigung des Sauerstoffaustausches die Länge oder Höhe einer elementaren Trennstufe verringert und somit den gesamten Anreicherungsgrad multiplikativ erhöht. Letzterer kommt zwangsläufig erst nach der Einstellzeit des Systems bei Ausbildung eines quasi-stationären Zustands voll zum Tragen. Die Reduktionszone II stellt die  $O^{18}$ -Quelle des irreversiblen Austausches dar. Die Entstehungszone I des Photo- $O_2$ , in der eine überwiegend einseitig gerichtete Stoffzufuhr postuliert werden muß, enthält Wasser, dessen  $O^{18}$ -Niveau zwar laufend durch Beimischung der Synthesekomponenten ansteigt, jedoch infolge des  $O^{18}$ -Gradienten zwischen I und II nur mit starker Verzögerung der mittleren  $O^{18}$ -Konzentration des Zell- und Außenwassers folgt. Diese Relaxation würde den Trenneffekt in besonderem Maße steigern, wenn bereits beim Start der Photosynthese Konzentrationsunterschiede zwischen dem Wasser der Zone I und dem übrigen Wasser vorliegen. Derartige Verhältnisse würden das Verhalten der  $H_2O^{18}$ -Suspensionen verständlich machen, jedoch kommt in diesen Fällen noch hinzu, daß in der aktiven Zone eine  $O^{18}$ -Verdünnung durch das austauschende  $O^{18}$ -arme  $CO_2$  vollzogen wird.

Die hier entwickelten Vorstellungen sind lediglich als Versuch einer Deutung zu werten. Allerdings kann es kein Zufall sein, daß die Isotopenzusammensetzung des Photosauerstoffs gerade die für das Wasser vorausbestimmbare Tendenz der  $O^{18}$ -Anreicherung aufweist. Vielmehr liefert der Effekt ein weiteres Argument zugunsten der These, daß der Photosauerstoff durch Spaltung des Wassermoleküls entsteht.

### Anhang I: Austauschreaktionen und Reaktionskinetik in homogener Lösung

Der Sauerstoffaustausch in  $\text{CO}_2$ - und Karbonat-haltigen wäßrigen Lösungen wird durch die Bildung und den Zerfall von Kohlensäure und Bikarbonat hervorgerufen. Es finden dabei folgende Reaktionen erster und zweiter Ordnung statt:



Die Protonen-Austauschvorgänge sind wegen ihrer extrem hohen Geschwindigkeit nicht geschwindigkeitsbestimmend für den Sauerstoffaustausch. Bezeichnet man den  $\text{O}^{18}$ -Gehalt der einzelnen chemischen Komponenten mit  $n_1$  (gelöstes  $\text{CO}_2$ ),  $n_2$  (Bikarbonat),  $n'_2$  (Karbonat),  $n_3$  (Wasser) und  $n_4$  ( $\text{OH}$ -Ionen) und benutzt die Abkürzungen

$$c = \overline{\text{CO}_2} / \overline{\text{H}_2\text{O}} \quad (33)$$

$$c_B = \overline{\text{HCO}_3^-} / \overline{\text{H}_2\text{O}} \quad (34)$$

$$c_K = \overline{\text{CO}_3^{2-}} / \overline{\text{H}_2\text{O}}, \quad (35)$$

so ergeben sich drei reaktionskinetische Gleichungen:

$$\frac{dn_1}{dt} = k' (n_2 - n_1) \quad (36)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = \frac{dn_2'}{dt} = \frac{1}{3} k' \frac{c}{c_B + c_K} (2n_1 - 3n_2 + n_3) \quad (37)$$

$$\frac{dn_3}{dt} = \frac{dn_4}{dt} = kc (n_2 - n_3) \quad (38)$$

$$k' \equiv k_1 \overline{[H_2O]} + (k_{-2} + k_3 \overline{[H_2O]} \overline{[CO_2]} + k_{-4} \overline{[CO_3^{2-}]}) \frac{c_B}{c} \quad (39)$$

Die Lösungen des Gleichungssystems haben die Form:

$$n_i = a_i e^{-\lambda_1 t} + b_i e^{-\lambda_2 t} \quad (40)$$

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} k' \left( 1 + \frac{c}{c_B + c_K} \pm \sqrt{1 + \frac{2}{3} \frac{c}{c_B + c_K} + \left( \frac{c}{c_B + c_K} \right)^2} \right) \quad (41)$$

Bei Vernachlässigung der Anlaufvorgänge erhält man das einfache Zeitgesetz:

$$(n_i - n_\infty) = (n_{oi} - n_\infty) e^{-\lambda t} \quad (42)$$

Dabei bedeuten  $n_{oi}$  die Startkonzentration der i-ten Komponente und  $n_\infty$  die gemeinsame Endkonzentration aller Komponenten (Isotopieeffekte und Trennfaktoren bleiben unberücksichtigt).

$$n_\infty = \frac{2cn_{o1} + 3c_B n_{o2} + 3c_K n'_{o2} + n_{o3}}{1 + 2c + 3c_B + 3c_K} \quad (43)$$

Für das System  $H_2O/CO_2$  folgt aus Gleichung (41) und der Bedingung  $c/c_B \gg 1$  die Zeitkonstante

$$\lambda = \frac{1}{3} k_1 \overline{[H_2O]} \quad (44)$$

Für Systeme mit erheblichem Bikarbonat- und Karbonatgehalt ( $c/c_B \ll 1$ ) findet man

$$\lambda = \frac{1}{3} \left\{ k_1 \overline{[H_2O]} \frac{c}{c_B + c_K} + (k_{-2} + k_3 \overline{[H_2O]} \overline{[CO_2]} + k_{-4} \overline{[CO_3^{2-}]}) \frac{c_B}{c_B + c_K} \right\} \quad (45)$$

Den Zeitkonstanten  $\lambda$  entsprechen Halbwertszeiten

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (46)$$

Tabelle 6: Werte der reaktionskinetischen Konstanten  $\sqrt{4,13}$  bei 25°C

Ionenstärke	$k_1 \sqrt{[H_2O]}$ sec <sup>-1</sup>	$k_{-2}$ sec <sup>-1</sup>	$k_3 \sqrt{[H_2O]}$ Mol <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>	$k_{-4}$ Mol <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>
0	$5,00 \cdot 10^{-2}$	$1,905 \cdot 10^{-4}$		
0,5	$3,64 \cdot 10^{-2}$		$4,8 \cdot 10^{-2}$	
1,5	$2,70 \cdot 10^{-2}$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$
2,5	$2,47 \cdot 10^{-2}$		$4,3 \cdot 10^{-2}$	

Anhang II: Austauschkinetik bei den Versuchen von Ruben et al.  $\sqrt{2}$  zur Photosynthese von Chlorella in O<sup>18</sup>-haltigen KHCO<sub>3</sub>- und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösungen.

Die gemäß den Konzentrationsangaben der Autoren nach Gleichung (45) für 25°C berechneten Zeitkonstanten des Sauerstoffaustausches ergeben größenordnungsmäßig den experimentell gefundenen Verlauf des mittleren O<sup>18</sup>-Gehaltes  $\bar{n}$  im Bikarbonat/Karbonat der Lösung (Tab.7).

$$\bar{n} = \frac{2cn_1 + 3c_B n_2 + 3c_K n'_2}{2c + 3c_B + 3c_K} \quad (47)$$

Eine bessere Übereinstimmung zwischen den theoretisch ermittelten und den gemessenen Werten ist kaum zu erwarten, da nicht einmal die Temperatur der Lösungen angegeben ist. Die Ungenauigkeit der Isotopenmessung ist so groß, daß der O<sup>18</sup>-Gehalt des entwickelten O<sub>2</sub> sowohl dem O<sup>18</sup>-wert  $n_{O_3}$  des eingesetzten Wassers als auch dem Gleichgewichtswert  $n_{\infty}$  der Mischung entsprechen könnte. Zwar stammt der Photosauerstoff mit Sicherheit nicht aus dem CO<sub>2</sub> der Bikarbonat/Karbonat-Lösung, dessen O<sup>18</sup>-Gehalt sich selbst nach mehrstündigem Austausch mit dem Suspensionswasser noch deutlich von dem des Wassers abhebt, doch dürfte innerhalb der Zelle eine rasche Einstellung des Isotopengleichgewichts infolge der katalytischen Wirkung des Enzyms Carboanhydrase erfolgt sein, so daß bei der Photosynthese keine O<sup>18</sup>-Markierung des CO<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O besteht und die Isotopenzusammensetzung des O<sub>2</sub> lediglich den Mittelwert einer äquilibrierten Mischung wiedergibt.



Tabelle 7: Berechnung der Austauschgeschwindigkeit bei den Versuchen von Ruben et al.

Experiment Nr.	1	2	3
$\overline{[\text{KHCO}_3]}$	0,09 Mol/l	0,14 Mol/l	0,06 Mol/l
$\overline{[\text{K}_2\text{CO}_3]}$	0,09 Mol/l	0,06 Mol/l	0,14 Mol/l
$p\text{CO}_2$	$5,085 \cdot 10^{-4}$ at	$1,846 \cdot 10^{-3}$ at	$1,453 \cdot 10^{-4}$ at
$c$	$3,14 \cdot 10^{-7}$	$1,14 \cdot 10^{-6}$	$8,97 \cdot 10^{-8}$
$\overline{[\text{CO}_2]}$	$1,74 \cdot 10^{-5}$ Mol/l	$6,35 \cdot 10^{-5}$ Mol/l	$4,93 \cdot 10^{-6}$ Mol/l
$c/(c_B + c_K)$	$0,97 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \cdot 10^{-4}$	$0,294 \cdot 10^{-4}$
$c_B/(c_B + c_K)$	0,5	0,7	0,3
$k_1 \overline{[\text{H}_2\text{O}]}$	138 h <sup>-1</sup>	141 h <sup>-1</sup>	132 h <sup>-1</sup>
$k_{-2}$	0,66 h <sup>-1</sup>	0,66 h <sup>-1</sup>	0,66 h <sup>-1</sup>
$k_{-3} \overline{[\text{CO}_3^{2-}]}$	1,17 h <sup>-1</sup>	0,78 h <sup>-1</sup>	1,82 h <sup>-1</sup>
$\lambda$	0,310 h <sup>-1</sup>	0,353 h <sup>-1</sup>	0,249 h <sup>-1</sup>
$t_{1/2}$	134 min	118 min	167 min
$\bar{n}_O$ (CO <sub>2</sub> usw.)	0,20 Atom%	0,68 Atom%	0,68 Atom%
$n_{O_3}$ (H <sub>2</sub> O)	0,85 Atom%	0,20 Atom%	0,20 Atom%
$n_\infty$	0,844 Atom%	0,205 Atom%	0,205 Atom%
$\bar{n}$ (t <sub>Ende</sub> )	Atom% O <sup>18</sup> (min)	Atom% O <sup>18</sup> (min)	Atom% O <sup>18</sup> (min)
Rechnung:	0,74 (350)	0,365 (185)	0,445 (165)
Experiment:	0,61 (350)	0,40 (185)	0,57 (165)

Anhang III: Sauerstoffaustausch in einer Wasserprobe, durch die ein Gasstrom aus Stickstoff und CO<sub>2</sub> hindurchperlt.

In salzfreiem Wasser verläuft der Sauerstoffaustausch zwischen dem gelösten CO<sub>2</sub> und dem Wasser bei 25°C mit einer Halbwertszeit von ca 42 sec. Die Einstellung des Isotopengleichgewichts wird jedoch dann gestört, wenn frisches CO<sub>2</sub>-Gas durch das Wasser hindurchströmt und ein CO<sub>2</sub>-Austausch zwischen der Gasphase und flüssigen Phase stattfindet. Dabei soll nun das Wasser entweder einen O<sup>18</sup>-Überschuß oder O<sup>18</sup>-Unterschluß relativ zur Isotopenzusammensetzung im frischen CO<sub>2</sub>-Gas aufweisen. Die CO<sub>2</sub>-Absorptionsrate  $w$  und der CO<sub>2</sub>-Strom  $v$  werden wie im Abschnitt E auf die Wassermenge bezogen. Mit den O<sup>18</sup>-Überschußkonzentrationen  $n$  (Wasser) und  $x$  (gelöstes CO<sub>2</sub>) sind die Differentialgleichungen

$$\frac{dn}{dt} = -2w^* x \quad (48)$$

$$\frac{dx}{dt} = k(\alpha n - x) - \frac{w^*}{c} x \quad (49)$$

aufzustellen, die den Austauschvorgang im System  $H_2O/CO_2$  beschreiben [4].

$$w^* \equiv v(1 - e^{-w/v}) \quad (50)$$

Das Langzeit-Verhalten des Systems wird im wesentlichen durch den Isotopen-transport bestimmt, wobei die vorhandenen  $O^{18}$ -Überschußkonzentrationen im Wasser und im gelösten  $CO_2$  nach folgendem Zeitgesetz abfallen:

$$n = n_0 e^{-At} \quad (51)$$

$$x = x_0 e^{-At} \quad (52)$$

Die Zeitkonstante A, die nach Abklingen der relativ schnellen Anlaufvorgänge in flüssiger Phase die Nivellierung, bzw. Normalisierung der Sauerstoffisotope des Wassers und gelösten  $CO_2$  charakterisiert, ist mit der effektiven  $CO_2$ -Absorptionsrate  $w^*$  und der reaktionskinetischen Konstante  $k = \lambda$  (Gl.44) durch die Gleichung

$$A = \frac{2 \alpha w^* kc}{w^* + kc} \quad (53)$$

verbunden. Aus Gl.(53) folgen unmittelbar die Grenzwerte der Zeitkonstanten bei unendlich großer Geschwindigkeit der Austauschreaktionen einerseits und der Transportvorgänge andererseits:

$$w^* \ll kc \rightarrow A = 2 \alpha w^* \quad (54)$$

$$w^* \gg kc \rightarrow A = 2 \alpha kc \quad (55)$$

Zwischen den  $O^{18}$ -Überschußkonzentrationen n und x besteht dabei eine annähernd feste Beziehung von der Form:

$$x = \frac{\alpha n}{1 + \frac{w^*}{kc} - \frac{A}{k}} \quad (56)$$

Die  $CO_2$ -Absorptionsgeschwindigkeit erreicht bei niedrigen Temperaturen nur geringe Werte. An einer Quarzperlen-Packung, welche im allgemeinen eine bessere dispergierende Wirkung als eine Glasfritte besitzt, wurde bei  $25^\circ C$  mit einem Gasstrom von  $10 l CO_2/h$  und  $14 ml H_2O$  eine Absorptionsrate von  $w = 0,12 h^{-1}$  gemessen [4]. Einem Stickstoffstrom mit nur 2 Vol%  $CO_2$  würde demnach ein w-Wert von  $2,4 \cdot 10^{-3} h^{-1}$  zuzuschreiben sein. Der im Frittengefäß mit 80 ml Pufferlösung durchgeführte Blindversuch zeichnete sich durch eine äußerst feine Verteilung der durch das Wasser perlenden Gasblasen aus. Einederartige Dis-

persion konnte bei Anwesenheit von Algen infolge Verstopfung der Poren nicht erreicht werden. Die auf eine algenfreie Lösung extrapolierten Werte der Zeitkonstanten ergeben daher ungünstigere Absorptionsraten (Tabelle 8).

Tabelle 8:  $O^{18}$ -Konzentrationen im Außenwasser bei Durchsatz von  $CO_2$ -haltigem Stickstoff

	Reine Pufferlösung	Anteil der Pufferlösung bei Algen-Suspensionen
A	$0,735 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	$0,55 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
w*	$2,174 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	$0,707 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
w	$7,89 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	$0,872 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
v	$2,24 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	$2,00 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
k	30 $\text{h}^{-1}$	30 $\text{h}^{-1}$
kc	$4,2 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$	$4,2 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$
x/ $\alpha$ n	0,162	0,373
$\overline{O^{18}} / \overline{CO_2}$ -Gas	6,79 Atom%	6,79 Atom%
$\overline{O^{18}} / \overline{CO_2}$ -Lösung	5,72 Atom%	4,33 Atom%
$\overline{O^{18}} / \overline{H_2O}$	0,20 Atom%	0,20 Atom%

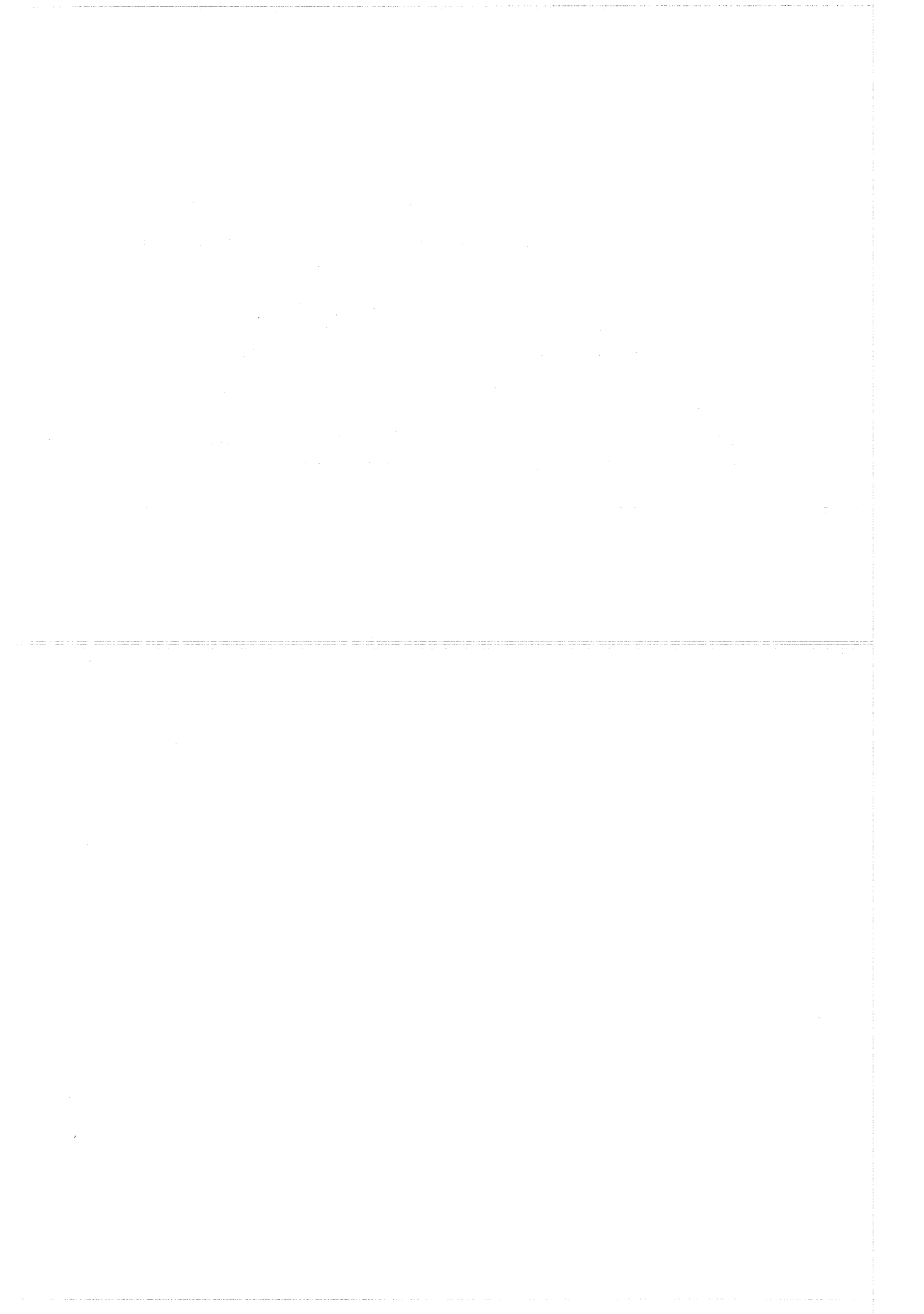
Der Unterschied zwischen dem  $O^{18}$ -Gehalt des Wassers und des gelösten  $CO_2$  ist zumindest in der Anfangsphase des Austausches sehr erheblich. Dieses Konzentrationsgefälle kann in der lebenden Zelle nur dann aufrecht erhalten werden, wenn die Zeit zwischen dem Eintritt des  $CO_2$  durch die Zellwand und dem photosynthetischen Umsatz möglichst kurz ist. In dieser Hinsicht dürften isolierte Chloroplasten den unversehrten Zellen überlegen sein. Ein Versuch mit Spinat-Chloroplasten scheiterte allerdings an der starken Schaumbildung der Suspension. Als günstig erscheinen auch Sedimente von Zellen, die nur aus der Gasphase  $CO_2$  aufnehmen. Da zwischen dem Wasserdampf, mit dem der Gasstrom gesättigt werden muß, und dem gasförmigen Kohlendioxid kein Isotopenaustausch stattfindet, sollte die  $O^{18}$ -Markierung außerhalb der Zelle einwandfrei bestehen bleiben. Es zeigte sich jedoch, daß allein durch Intensivierung der Gas-Absorption und -Desorption die  $O^{18}$ -Markierung in der Zelle nicht erhalten werden kann. Erst bei Blockierung des austauschaktiven Ferments im photosynthetischen Zellgewebe folgt der Isotopenaustausch den einfachen Gesetzmäßigkeiten der Reaktions- und Transportkinetik.

## Literatur

- [1] A.H. BROWN, A.W. FRENKEL:  
Ann.Rev.Biochem.22, 423 (1953)
- [2] S. RUBEN, M. RANDALL, M. KAMEN; J.W. HYDE:  
J.Amer.chem.Soc. 63, 877 (1941)
- [3] D. STASCHEWSKI:  
Ber.Bunsenges.physik.Chem.73, 59 (1969)
- [4] D. STASCHEWSKI:  
Chemie-Ingenieur-Technik 20, 1111 (1969)
- [5] H. BUDZIKIEWICZ, H. ECKAU; H.H. INHOFFEN:  
Z.Naturforschg.24 b, 1147 (1969)
- [6] H. BUDZIKIEWICZ, H.H. INHOFFEN:  
"Progress in Photosynthesis Research", International Congress  
of Photosynthesis Research, Freudenstadt, Juni 1968,  
Herausg.H. Metzner, Tübingen
- [7] G. DÖHLER, K. EGGLE:  
Beitr.Biol.Pflanz.38(1), 99(1962), 39(2), 295(1963)
- [8] O. WARBURG, G. KRIPPAHL, K. JETSCHMANN, A. LEHMANN:  
Z.Naturforschg.18b, 837 (1963)
- [9] M. DOLE, G. JENKS:  
Science 100, 409 (1944)
- [10] H.C. UREY:  
J.chem.Soc.(London) 1947, 562
- [11] A.P. VINOGRADOV, V.M. KUTYURIN, M.V. ULUBEKOVA, I.K. ZADOROZHNY:  
Doklady AN SSSR 134, 1486 (1960)
- [12] D. STASCHEWSKI:  
Ber.Bunsenges.physik.Chem.68, 454 (1964), 69, 426 (1965)
- [13] D.J. POULTON, H.W. BALDWIN:  
Canad.J.Chemistry 45, 1045 (1967)

#### Anmerkung

Diese Untersuchung wurde auf Anregung und unter Mitwirkung von Herrn Dr. K. Knobloch, Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, ausgeführt. Für die Algen-Aufzucht und die Bereitstellung verschiedener Hilfsmittel ist besonders Herrn Dr. Hülsen, Schule für Kerntechnik des Kernforschungszentrums Karlsruhe, zu danken, ebenso Herrn Baumann für die Programmierung des numerischen Rechenverfahrens. Weiterhin sind wir Herrn K. Maurer vom Institut für Kernverfahrenstechnik für die Durchführung zahlreicher massenspektrometrischer  $O^{18}$ -Bestimmungen zu großem Dank verpflichtet



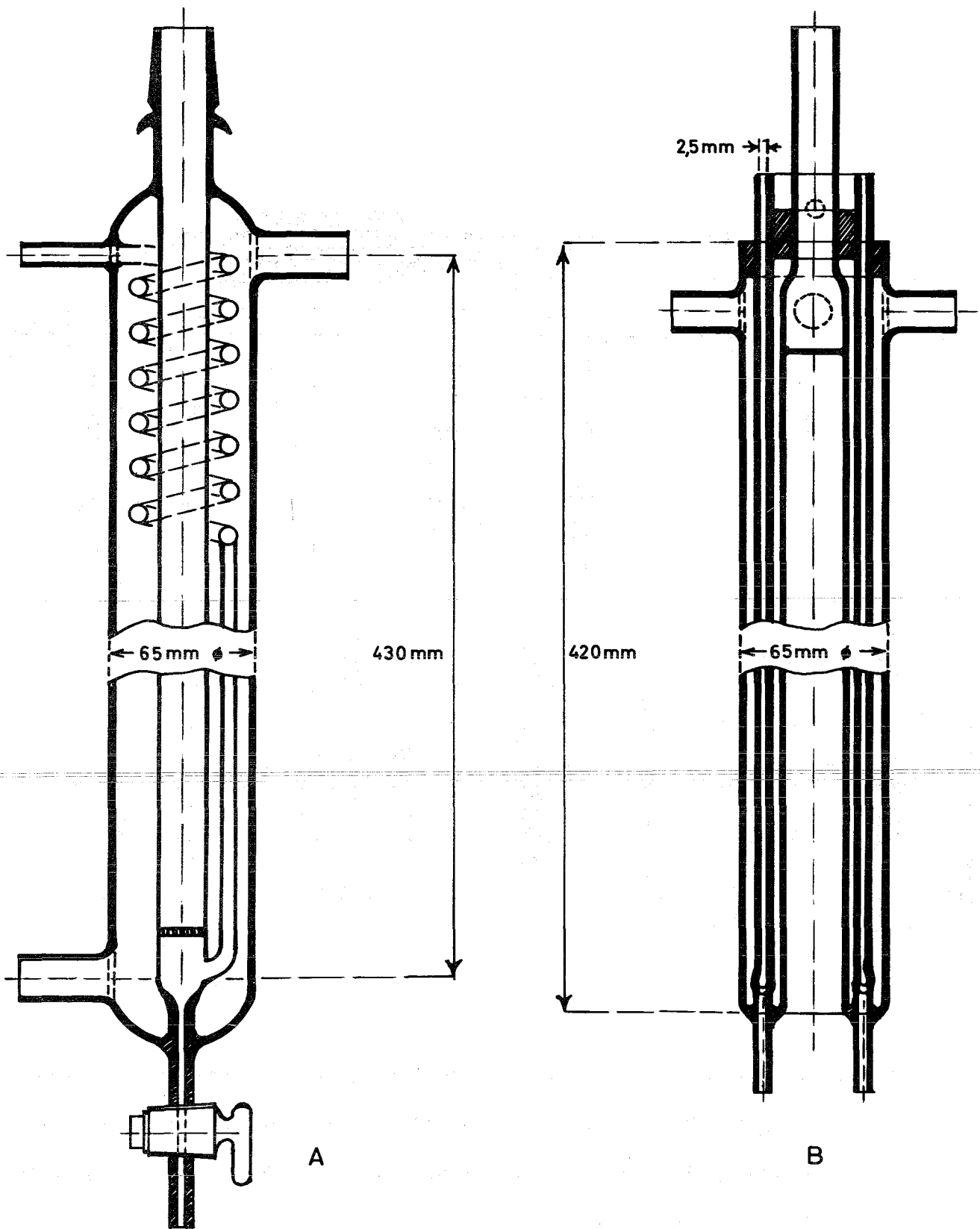


Abb.1, Reaktionsgefäße zur Untersuchung des Sauerstoff-Austausches und der Photosynthese bei Suspensionen(A) und Adsorbaten(B) von Einzeller-Algen

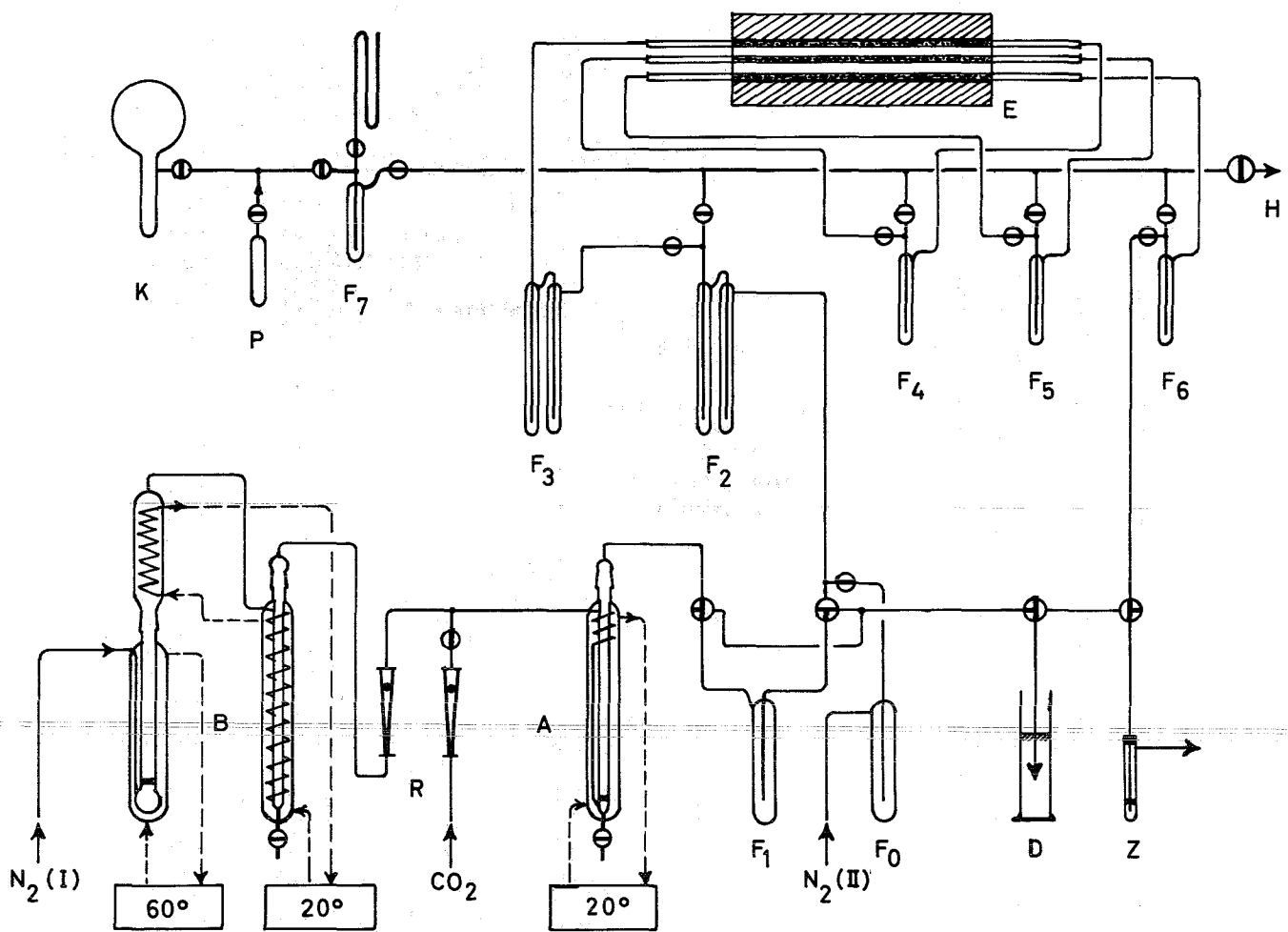


Abb. 2, Schema der experimentellen Anordnung. A Reaktionsgefäß, B Befeuchungssystem, D Wassersäule zur Drucksimulation, E Elektroden,  $F_0 - F_7$  Ausfrierfallen, H Hochvakuumanschluß, K 2l-Kolben, P Gaspipette, R Rotameter, Z Blasenähler



Atom%  $O^{18}$

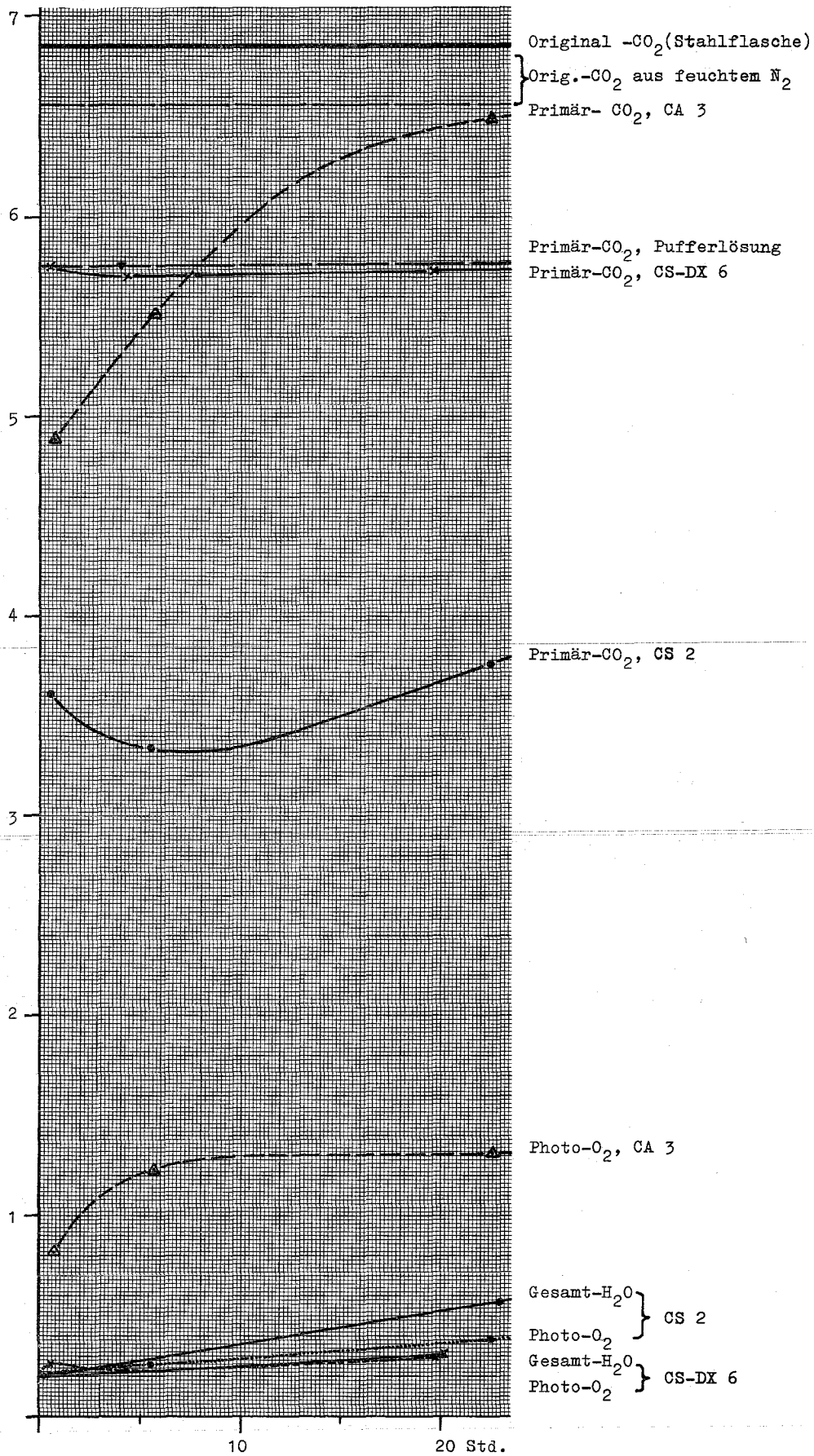


Abb. 3, Zeitabhängigkeit des  $O^{18}$ -Gehalts im  $CO_2$ , Wasser und Sauerstoff bei der Photosynthese von Chlorella

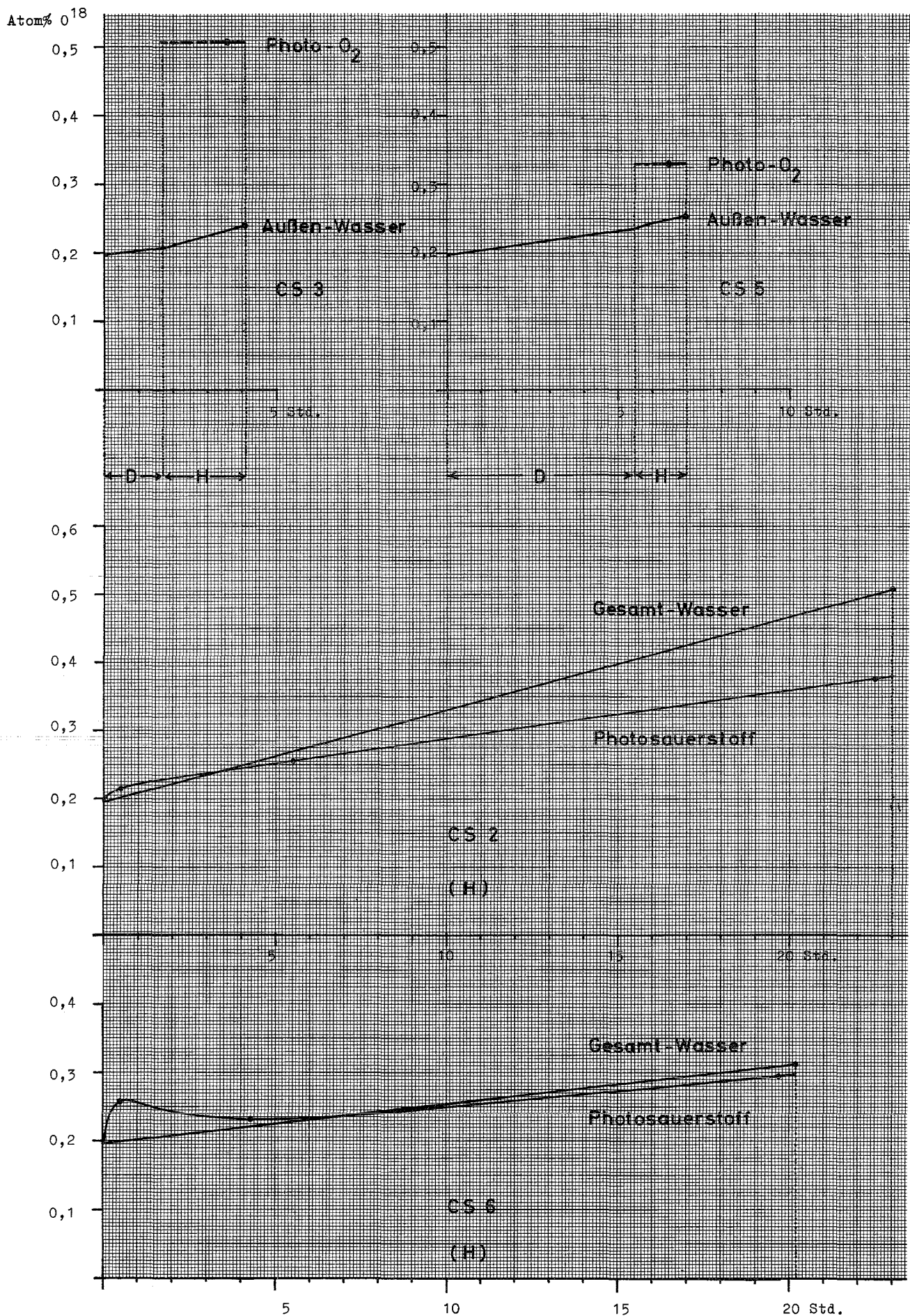


Abb. 4,  $\text{O}^{18}$ -Gehalt des Wassers und Photosauerstoffs bei Chlorella-Suspensionen in Hell- und Dunkelperioden ( H und D )

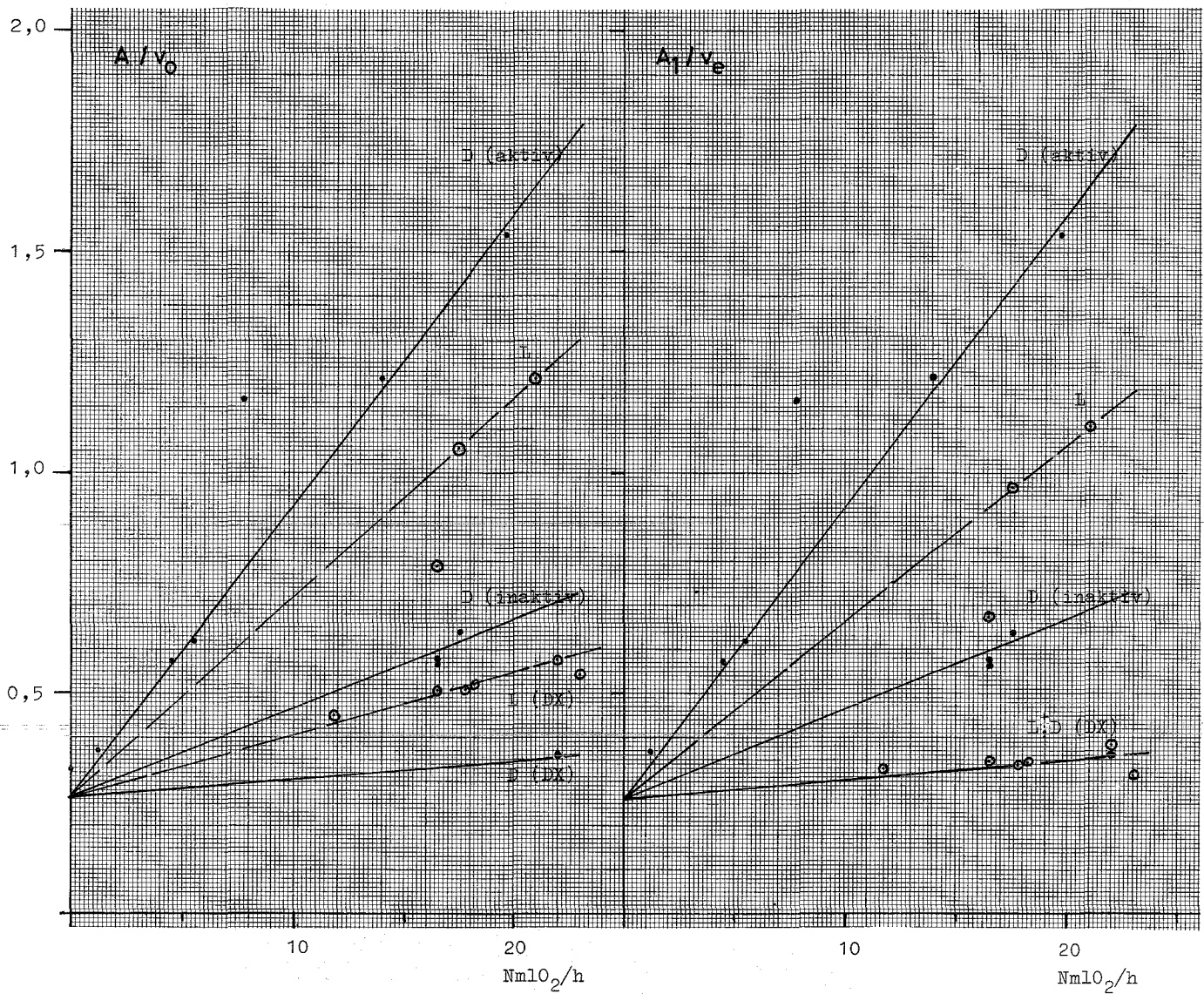


Abb. 5, Verhalten der normierten Zeitkonstanten  $A/v_0$  und  $A_1/v_e$  bei Belichtung (L) und Dunkelperioden (D) mit oder ohne Zusatz von Diamox (DX)

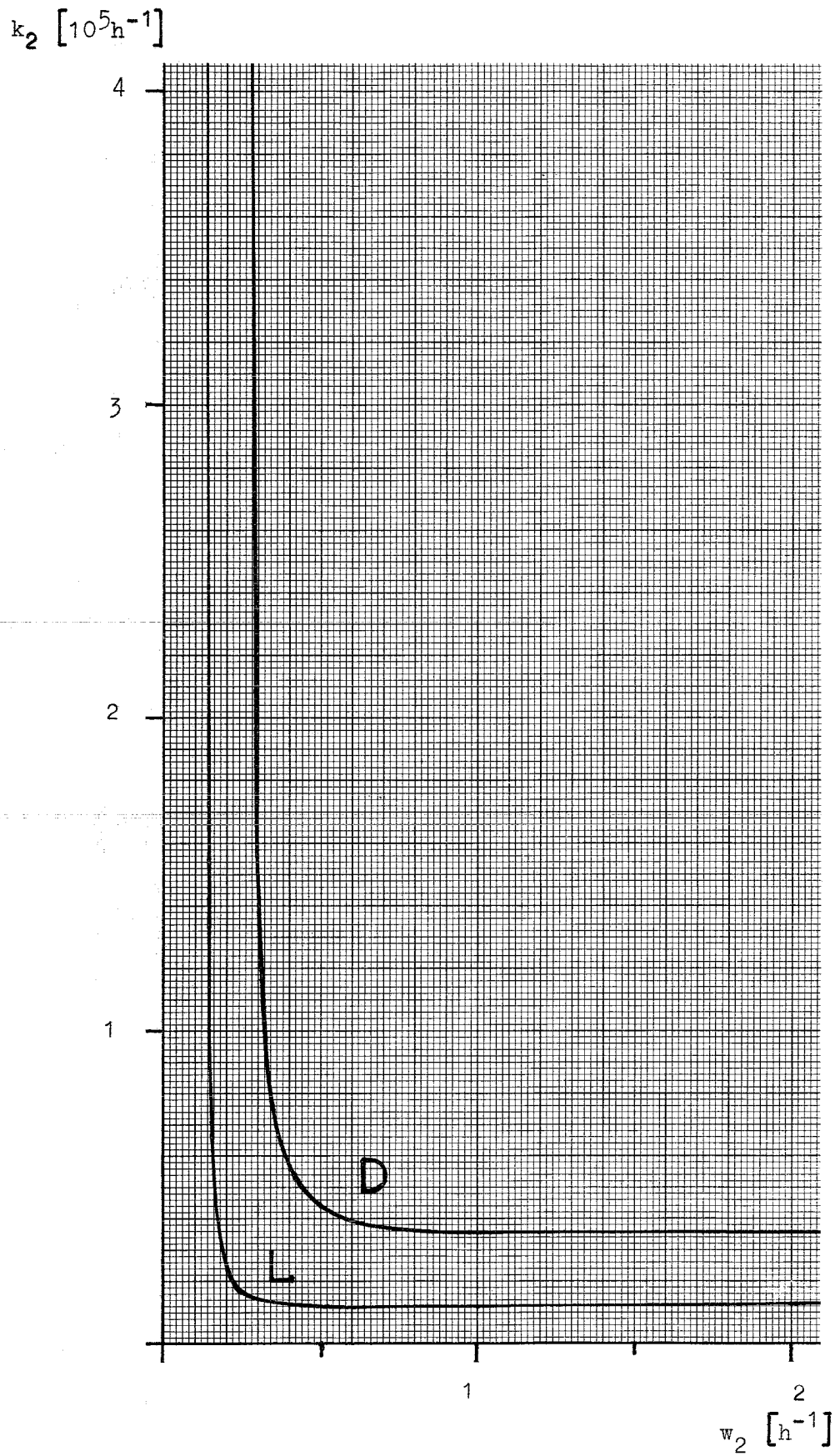


Abb.7, Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  der Algenzellen einer "Normal"-Suspension als Funktion der  $\text{CO}_2$ -Wechselrate  $w_2$  (Gas-Zelle), L Belichtung, D Dunkelperiode nach der Photosynthese