

# Ermittlung kinetischer Parameter der sauren Phosphatasen intakter Zuckerrübenwurzeln bei variiertem Phosphatnahrung

Lutz Beißner und Wilhelm Römer\*

Institut für Agrikulturchemie, Georg-August-Universität Göttingen, Von-Siebold-Str. 6, D-37075 Göttingen

Herrn Prof. Dr. Albrecht Jungk zum 70. Geburtstag

Angenommen: 27. April 1999

## Zusammenfassung – Summary

Der Phosphoraufnahme aus organisch gebundenem Phosphor ( $P_{org}$ ) geht dessen Hydrolyse voraus. Sowohl Mikroben als auch Pflanzen besitzen Phosphatasen, die für die Nutzung des  $P_{org}$  wichtig werden, wenn die Böden niedrige Gehalte an anorganischem Phosphat besitzen. Das könnte ein Grund dafür sein, daß Nährstoffaufnahme Modelle, in denen die P-Mobilisierung durch Phosphatasen nicht berücksichtigt ist, die P-Aufnahme der Pflanzen zu niedrig prognostizieren. Deshalb sollte die Aktivität saurer Phosphatasen ( $P_{org}$ ) an intakten Wurzeln näher untersucht werden. Folgende Fragen galt es zu beantworten: I. Folgt die Kinetik der wurzelgebundenen sauren Phosphatasen ( $P_{asc1}$ ) der Michaelis-Menten-Kinetik? II. Mit welchen der vier geprüften Linearisierungen der Michaelis-Menten-Gleichung (Lineweaver/Burk, Hanes, Eadie/Hofstee, Eisenthal/Cornish-Bowden) lassen sich plausible Werte für  $V_{max}$  und  $K_m$  ermitteln? III. Hat die P-Ernährung einen Einfluß auf die Kinetik-Parameter? Dazu wurden Zuckerrübenpflanzen in Nährlösungen bei 1 bzw. 100  $\mu M$  P angezogen. Die  $P_{asc}$ -Aktivität wurde mittels p-Nitrophenylphosphat (25 bis 15000  $\mu M$  p-NPP) bei pH 5 an intakten Wurzeln gemessen und die  $V_{max}$ -Werte pro m Wurzellänge (WL) berechnet.

Die Kinetik der sauren  $P_{asc}$  folgt prinzipiell der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Transformation nach Eadie/Hofstee bzw. die Auswertung nach Eisenthal u. Cornish-Bowden legt die Existenz von mindestens zwei Enzymen bzw. Enzymsystemen nahe ( $P_{asc1}$ ,  $P_{asc2}$ ). Folgende Kinetikparameter wurden ermittelt:

$P_{asc1}$ : P-arme Pflanzen:

$V_{max}$ : 43–45  $nmol\ m^{-1}\ WL\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 31–37  $\mu M$  NPP;

P-reiche Pflanzen:

$V_{max}$ : 7  $nmol\ m^{-1}\ WL\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 47–53  $\mu M$  NPP.

$P_{asc2}$ : P-arme Pflanzen:

$V_{max}$ : 230–293  $nmol\ m^{-1}\ WL\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 1579–3845  $\mu M$  NPP;

P-reiche Pflanzen:

$V_{max}$ : 123–171  $nmol\ m^{-1}\ WL\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 3027–7000  $\mu M$  NPP.

In ausreichend mit P versorgten Pflanzen haben somit beide  $P_{asc}$  eine geringere Affinität zu  $P_{org}$  und eine geringere Hydrolyse rate von  $P_{org}$ . Für die P-Ernährung der Pflanzen dürfte die  $P_{asc1}$  die größere Rolle spielen.

## Determination of kinetic parameters of acid phosphatases in intact sugar beet roots of variable phosphorus nutrition

Organically bound phosphorus has to be hydrolysed before its P can be taken up by plants. Both microbes and plant roots possess phosphatases, which could be of importance especially in soils with low concentrations of inorganic phosphorus in the soil solution. This could be the reason why nutrient uptake models underestimate the P-uptake by plants when P-mobilization by the phosphatases of roots is not taken into consideration. Therefore the activity of acid phosphatases ( $P_{asc}$ ) was determined to answer the following questions: 1) To which extent does the root bound acid phosphatase ( $P_{asc}$ ) follow Michaelis-Menten kinetics? 2) By which of the four linear transformations of the Michaelis-Menten equation (Lineweaver/Burk, Hanes, Eadie/Hofstee, Eisenthal/Cornish-Bowden) can plausible values of  $V_{max}$  and  $K_m$  be determined? 3) Which effect has the P nutrition of the plant on these kinetic parameters? Sugar beet plants were grown in full nutrient solution containing 1 and 100  $\mu M$  P respectively. The  $P_{asc}$  activity of the intact roots was measured at pH 5 using p-nitrophenylphosphate (25–15000  $\mu M$  p-NPP).  $V_{max}$  values were calculated per m root length. Acid phosphatase activity principally followed Michaelis-Menten kinetics. Transformations and calculations of  $V_{max}$  and  $K_m$  after Eadie/Hofstee and Eisenthal/Cornish-Bowden suggested the existence of at least two enzyme systems ( $P_{asc1}$ ,  $P_{asc2}$ ). The following kinetic parameters were found:

$P_{asc1}$ : P deficient plants:

$V_{max}$ : 43–45  $nmol\ m^{-1}\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 31–37  $\mu M$  NPP;

P sufficient plants:

$V_{max}$ : 7  $nmol\ m^{-1}\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 47–53  $\mu M$  NPP.

$P_{asc2}$ : P deficient plants:

$V_{max}$ : 230–293  $nmol\ m^{-1}\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 1579–3845  $\mu M$  NPP;

P sufficient plants

$V_{max}$ : 123–171  $nmol\ m^{-1}\ min^{-1}$ ,  $K_m$ : 3027–7000  $\mu M$  NPP.

Thus plants with sufficient P nutrition have a lower affinity to  $P_{org}$  and a lower hydrolysis of  $P_{org}$ . For P nutrition of crops  $P_{asc1}$  might be the most important enzyme.

**Key words:** sugar beet roots / kinetic of acid phosphatase / P nutrition / phosphatase activity

## Einleitung

Die Gehalte von Böden an organisch gebundenem Phosphor können beachtlich hoch sein (Dahal 1977)

Für die Pflanzen ist aber in erster Linie der in der Bodenlösung gelöste Phosphor (P) entscheidend, das gilt für  $PO_4$ -P ( $P_i$ ), wie für organisch gebundenen Phosphor ( $P_o$ ). Auch an gelöstem P findet man in Ackerböden

1993; Chardon, 1995; Georges, 1998), in Böden mit hohen Güllegaben sogar bis 100  $\mu\text{M}$  (Theilen, 1992). Dabei wird  $P_{\text{org}}$  in der Bodenlösung ähnlich gepuffert wie  $P_i$  (Seeling, 1993). Das bedeutet, daß auch die  $P_{\text{org}}$ -Fraktion wichtige Voraussetzungen für die P-Aufnahme durch die Pflanze erfüllt. Tatsächlich sind die Pflanzen in der Lage, organische P-Verbindungen wie z.B. Amidophosphate und Ethylesterphosphate als unzersetzte Moleküle aufzunehmen und in die Sprosse zu verlagern (Römer et al., 1978). Die Aufnahme solcher P-Verbindungen erfolgt jedoch anders als bei  $P_i$  stoffwechselunabhängig mittels passiver Mechanismen (Römer und Schilling, 1984). So findet eine für die Pflanze relevante P-Aufnahme aus solchen organischen Verbindungen nur bei hohen Außenkonzentrationen und hohen Transpirationsraten statt. Wenn diese P-Verbindungen aber an der Wurzeloberfläche zu  $P_i$  hydrolysiert werden, kann dieser  $P_i$  unabhängig von der Transpiration der Pflanze auch bei niedrigen Konzentrationen effektiv aufgenommen werden. Der Hydrolyseprozeß des  $P_{\text{org}}$  spielt vermutlich bei Bedingungen geringer  $P_i$ -Konzentrationen in der Bodenlösung eine größere Rolle als bei hoher P-Versorgung der Böden, denn bei nicht ausreichender P-Versorgung zeigen Pflanzenwurzeln erhöhte Aktivitäten saurer Phosphatasen (McLachlan, 1980; Dracup et al., 1984; Beißner und Römer, 1999). Außerdem nahmen z.B. Zuckerrüben bei geringer P-Versorgung mehr P aus dem Boden auf, als mittels P-Aufnahmemodell berechnet wurde (Claassen et al., 1991). Bei hoher P-Versorgung gab es diese Diskrepanz nicht. Das kann ein Hinweis sein, daß die Pflanzen bei P-Mangel verstärkt  $P_{\text{org}}$  nutzen. Werte für die  $P_{\text{org}}$ -Konzentration und dessen Hydrolyserate gehen in das Modell nicht ein. Kennt man einerseits die  $P_i$ -Influxraten von Wurzeln (Claassen et al., 1991) und andererseits Hydrolyseraten der Wurzeln in Abhängigkeit vom Angebot an  $P_{\text{org}}$  (Substratkonzentration), so wären Abschätzungen über das Potential der Wurzeln zur P-Aufnahme aus  $P_{\text{org}}$  möglich. Es war deshalb das Ziel der Untersuchungen, die Kinetik saurer Phosphatasen (pH 5) intakter Zuckerrübenwurzeln bei unterschiedlicher P-Ernährung (1 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) näher zu untersuchen und für die Gesamtheit der sauren Phosphatasen der intakten Wurzeln  $V_{\text{max}}$ - und  $K_m$ -Werte zu ermitteln. Hierzu wurden drei lineare Transformationen der Michaelis-Menten-Kinetik (Lineweaver/Burk, 1934; Hanes, 1932; Eadie, 1942) und die direkte Linearisierung nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) verwendet.

## Material und Methoden

### Anzucht der Pflanzen

Die Anzucht der Zuckerrüben (cv. Reka) erfolgte in Nährlösungen in der Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen bei einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 16/8-Stunden, einer Temperatur von 20°/15°C und einer relativen Luftfeuchte von 70%, hierbei betrug die photosynthetisch aktive Strahlung während der Tag-Periode 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Das Saatgut wurde

zunächst in Fließpapier vorgekeimt, wobei nach ca. 1 Woche einheitlich entwickelte Pflanzen in Nährlösungsgefäße überführt werden konnten. Die Konzentration an P in der Nährlösung war mit 1 bzw. 100  $\mu\text{M}$  P stark differenziert, so daß eine physiologisch unterschiedliche Reaktion der Pflanzen erwartet werden konnte. Andere Makro- und Mikronährelemente wurden nach Jungk und Barber (1974) verabreicht. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in 3L-Gefäßen mit belüfteter Nährlösung, die täglich gewechselt wurde. Die Bestimmung der Wurzelphosphataseaktivität erfolgte 14 Tage nach dem Umsetzen der Pflanzen in die Nährlösungsgefäße, wobei 6 Pflanzen pro Gefäß angezogen wurden.

### Bestimmung der Sproß-P-Gehalte

Das bei 105°C getrocknete und gemahlene Pflanzenmaterial (0,5 g) wurde mittels Säuregemisch ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; Vol.-Verhältnis 7:2:1; 5 ml) aufgeschlossen und die P-Konzentration spektralphotometrisch nach Scheffer und Pajenkamp (1952) bestimmt.

### Bestimmung der Wurzellänge

An den Wurzeln haftendes Wasser wurde durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 1200  $\text{U min}^{-1}$  mit einer Tischzentrifuge entfernt. Nach anschließender Bestimmung der Wurzelfrischmasse (WFM) konnte die Wurzellängenmessung mit der Linien-Schnittpunkt-Methode nach Newman (1966) vorgenommen werden. Hierzu wurden die Wurzelproben in 0,5 cm lange Stücke zerschnitten und zwei repräsentative Unterproben von 0,2 bis 0,5 g WFM entnommen und auf einem Sieb gleichmäßig verteilt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Wurzellänge, indem bei 100-maligem zufälligem Verschieben des Siebes die Schnittpunkte zwischen den Wurzeln und einer im Okular des Mikroskops befindlichen Haarlinie gezählt wurden. Die Wurzellänge der Unterprobe konnte dann nach Einsetzen der gefundenen Werte in die folgende Gleichung errechnet werden:

$$L_U = (N \cdot F \cdot \pi) / (2 \cdot n \cdot H)$$

Hierbei ist  $L_U$  = Wurzellänge (cm), N = Summe der Schnittpunkte aller Messungen, F = Fläche des Siebes ( $\text{cm}^2$ ), n = Anzahl der Zählungen (100), H = Länge der Haarlinie (cm).

### Bestimmung der Aktivität der sauren Wurzelphosphatasen

Die Phosphataseaktivität der Zuckerrübenwurzeln wurde in Anlehnung an McLachlan (1980) und Seeling (1993) bzw. Juma und Tabatabai (1988) bestimmt. Hierbei diente p-Nitrophenylphosphat in 0,1 M Na-Citrat-Puffer (pH 5,0) als Enzymsubstrat. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in der Klimakammer unter Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen wie bei der Pflanzenanzucht. Mit Aluminiumfolie umwickelte Erlenmeyerkolben dienten als Versuchsgefäße, deren Volumen bzw. Füllungsgrad der Größe des Wurzelsystems angepaßt war. Die Wurzeln intakter Einzelpflanzen wurden zunächst für 10 Minuten in die belüftete Substrat-Pufferlösung getaucht, nach Ablauf der Reaktionszeit aus der Lösung entnommen und ein Aliquot von 1 ml der Substratlösung zum Abstoppen der Hydrolyse mit 5 ml 0,1 M NaOH versetzt. Durch die Alkalisierung mit NaOH wird das Reaktionsprodukt Nitrophenol in das gelb gefärbte Nitrophenol-Anion überführt, das sich spektralphotometrisch quantitativ (bei 405 nm) bestimmen läßt.

Um die Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität aufzuzeigen, wurden Substratkonzentrationen von 25, 50, 100, 300, 500, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 und 15000  $\mu\text{M}$  NPP angeboten. Die Konzentration war auch in der niedrigsten Stufe so gewählt, daß das Substrat über den Reaktionszeitraum von 10 Minuten nicht vollständig hydrolysiert wurde. Für jede Substratkonzentration wurden 6 Wiederholungen angesetzt.

**Ermittlung von Kinetikparametern**

Enzymkinetische Reaktionen können mit der von *Michaelis* und *Menten* (1913) entwickelten und als Michaelis-Menten-Gleichung bekannt gewordenen Beziehung mathematisch beschrieben werden.

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

Es wird deutlich, daß die Geschwindigkeit (*v*) der enzymatischen Reaktion von der Substratkonzentration (*S*), der maximalen Umsatzrate (*V<sub>max</sub>*) und der Michaelis-Menten-Konstanten (*K<sub>m</sub>*) abhängig ist. Um zu prüfen, inwieweit eine variierte P-Ernährung die kinetischen Aktivitätsparameter der sauren Phosphatase verändert, wurden die *V<sub>max</sub>*- und die *K<sub>m</sub>*-Werte bestimmt. Hierzu wurden 4 verschiedene lineare Transformationen der Michaelis-Menten-Gleichung verwendet (siehe *Cornish-Bowden*, 1979 und *Lasch*, 1987):

Lineweaver/Burk-Diagramm (*Lineweaver* und *Burk*, 1934)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

Hanes-Diagramm (*Hanes*, 1932)

$$\frac{S}{v} = \frac{S}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (3)$$

Eadie/Hofstee-Diagramm (*Eadie*, 1942)

$$v = -K_m \cdot \frac{v}{S} + V_{max} \quad (4)$$

Direktes lineares Diagramm (*Eisenthal* und *Cornish-Bowden*, 1979)

$$V_{max} = \frac{v}{S} \cdot K_m + v \quad (5)$$

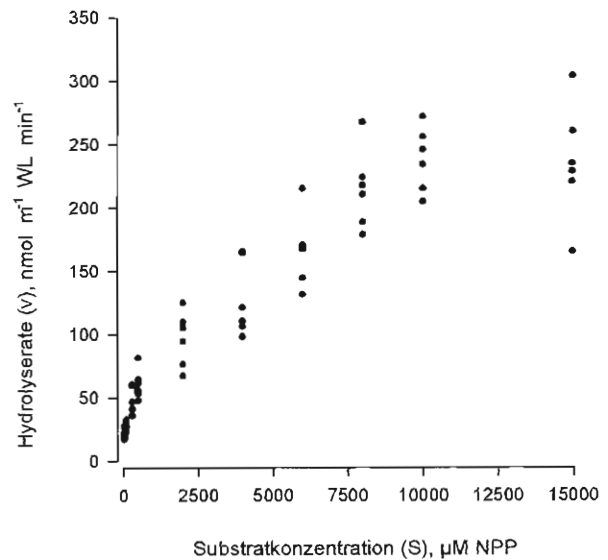
**Ergebnisse**

Die 14tägige Anzucht der Pflanzen bei variiertem P-Angebot führte zu P-Konzentrationen in den P-Mangelpflanzen (1 µM P) von 2 mg P · g<sup>-1</sup> und bei den P-reich ernährten Pflanzen (100 µM P) zu 6 mg P · g<sup>-1</sup> in der Sproßtrockenmasse.

Abb. 1 zeigt die Kinetik der Wurzelphosphataseaktivität der bei einer P-Konzentration von 1 µM angezogenen Zuckerrübenpflanzen.

Auch ohne angepaßte Funktion (Kurve) ist eine klare Abhängigkeit der Hydrolyserate (*v*) vom Substratangebot (*S*) zu erkennen, wobei die Hydrolyserate zunächst steil ansteigt und sich schließlich oberhalb von 7500 µM Substrat asymptotisch einem Maximalwert (*V<sub>max</sub>*) nähert. Die NPP-Hydrolyse beschreibt damit eine Sättigungskurve im Sinne der Michaelis-Menten-Kinetik. Allerdings ist eine beträchtliche Streuung der jeweiligen sechs Einzelmeßwerte bei den verschiedenen Substratkonzentrationsstufen erkennbar, was für die anschließende lineare Transformation von Bedeutung ist.

Nachfolgend werden die einzelnen Transformationen zur Ermittlung von *V<sub>max</sub>* und *K<sub>m</sub>* der p-NPP-Hydrolyse vorgestellt. Auf die ausführliche Darstellung der Meßwerte der bei 100 µM P angezogenen Pflanzen wird hier verzichtet. Die Resultate dieser Varianten werden in Tab. 1 besprochen.



**Abbildung 1:** Abhängigkeit der Hydrolyserate von der Substratkonzentration (p-NPP) saurer Phosphatasen intakter Zuckerrübenwurzeln bei Anzucht in Nährlösung mit 1 µM P.

**Figure 1:** Rate of hydrolysis as a function of the concentration of nitrophenylphosphate (NPP) by acid phosphatase of intact sugar beet roots grown in nutrient solution with 1 µM P.

Die Bestimmung von *V<sub>max</sub>* und *K<sub>m</sub>* durch die verschiedenen linearen Transformationen führt unter idealen Bedingungen, d.h. keinerlei Streuung der Meßwerte je Substratkonzentrationsstufe und exakter Lage der Meßpunkte auf einer hyperbolischen Kennlinie zu ähnlichen Resultaten. Da jedoch reale Meßwerte in der Regel aus unterschiedlichen Gründen fehlerbehaftet sind bzw. bei

**Tabelle 1:** Kalkulierte *V<sub>max</sub>*- und *K<sub>m</sub>*-Werte saurer Phosphatasen von intakten Zuckerrübenwurzeln, gewachsen in Nährlösungen mit 1 bzw. 100 µM P.

**Table 1:** Calculated *V<sub>max</sub>*- and *K<sub>m</sub>*-values of acid phosphatasen of intact sugar beet roots, grown in nutrient solution with 1 or 100 µM P.

Procedure of transformation	<i>V<sub>max</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>
	nmol m <sup>-1</sup> root length min <sup>-1</sup>	µM NPP
1 µM P		
Lineweaver u. Burk	100	122
Hanes	256	1720
Eadie/Hofstee		
Phosphatase 1	45	37
Phosphatase 2	230	1579
Eisenthal u. Cornish-Bowden		
Phosphatase 1	43	31
Phosphatase 2	293	3845
100 µM P		
Lineweaver u. Burk	24	261
Hanes	149	4360
Eadie/Hofstee		
Phosphatase 1	7	53
Phosphatase 2	123	3027
Eisenthal u. Cornish-Bowden		
Phosphatase 1	7	47
Phosphatase 2	171	7000

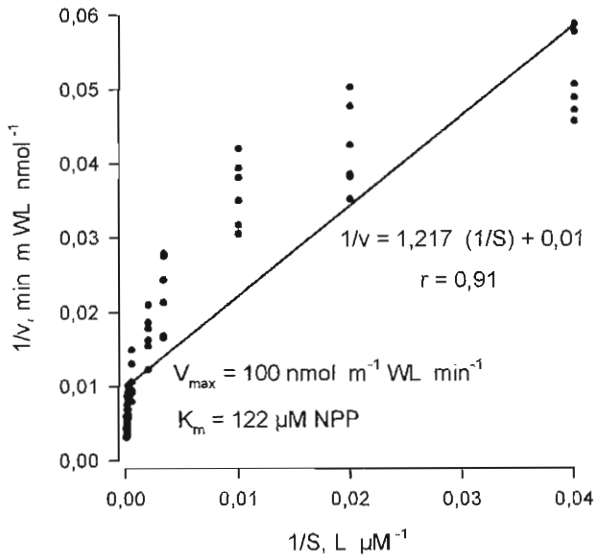


Abbildung 2: Lineare Transformation der Michaelis-Menten-Kinetik nach Lineweaver und Burk für die Hydrolyse von p-NPP durch Wurzelphosphatasen von Zuckerrübe bei Anzucht in Nährlösung (1 μM P).  
 Figure 2: Plot of 1/v against 1/S (Lineweaver-Burk or double reciprocal plot) of acid phosphatase from intact sugar beet roots grown in nutrient solution with 1 μM P.

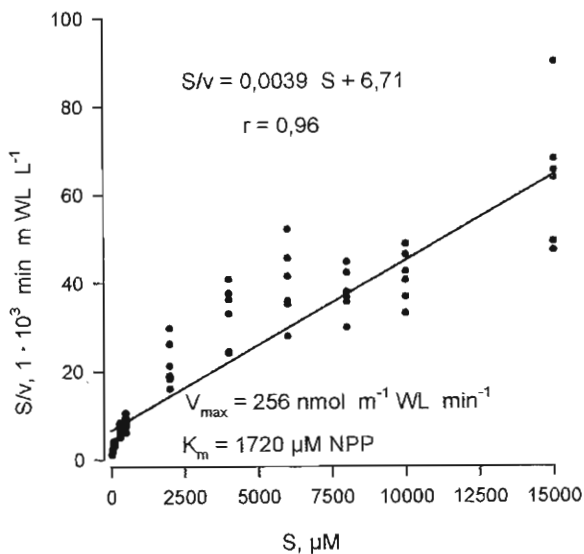


Abbildung 3: Lineare Transformation der Michaelis-Menten-Kinetik nach Hanes für die Hydrolyse von p-NPP durch Wurzelphosphatasen von Zuckerrübe bei Anzucht in Nährlösung (1 μM P).  
 Figure 3: Plot of S/v against S (Hanes plot) of the acid phosphatase from the intact sugar beet roots grown in nutrient solution with 1 μM P.

notwendigen Meßwiederholungen Streuungen auftreten, führt die Anwendung der genannten Transformationen, wie Abb. 2, 3, 4, 5 und Tab. 1 zeigen, zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Bei der in der Biochemie vielfach verwendeten Transformation nach Lineweaver und Burk (Abb. 2) wird der reziproke Wert der gemessenen Aktivität gegen den reziproken Wert der Substratkonzentration aufgetragen. Infolge der doppelt reziproken Darstellung der Meßwerte sind die bei niedriger Substratkonzentration gemessenen

Hydrolyseraten bestimmend für den Verlauf der Regressionsgeraden.

Die Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  werden durch Umformung der Geradengleichung ermittelt, wobei die Steigung von 1,217 den Quotienten aus  $K_m$  und  $V_{max}$  darstellt und der Ordinatenschnittpunkt von 0,01 sich als reziproker Wert von  $V_{max}$  ergibt. Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die unterschiedliche Wichtung der Meßwerte und deren Streuung bei der Umformung in eine Gerade. Hierbei zeigen, bedingt durch die doppelt reziproke Darstellung der Meßwerte, die bei niedriger Substratkonzentration gemessenen Hydrolyseraten eine deutlich ausgeprägtere Streuung der transformierten Werte als die bei hoher Substratkonzentration bestimmten Aktivitäten. Eine ausreichend genaue Ermittlung von  $V_{max}$  und  $K_m$  durch die Transformation nach Lineweaver und Burk ist demzufolge nur bei einer Wichtung streuender Meßwerte möglich.

Bei der Linearisierung nach Hanes (Abb. 3) erfolgt die Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Hydrolyserate gegen die Substratkonzentration. Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Linearisierung nach Lineweaver und Burk ist die homogenere Streuung der transformierten Meßwerte. Die sich aus der Umformung der Geradengleichung ergebenden Werte für  $V_{max}$  von 256 nmol m<sup>-1</sup> Wurzellänge Minute<sup>-1</sup> und  $K_m$  von 1720 μM vermitteln bereits (siehe Abb. 1) den Eindruck relativ guter Übereinstimmung mit den Meßwerten.

Da beide Transformationen im vorliegenden Fall stark abweichende Resultate liefern, bietet die Linearisierung nach Eadie, den Angaben von Hofstee (1952) zufolge, die Möglichkeit, zu erkennen, ob die Abweichungen ursächlich auf die unterschiedliche Bewertung streuender Meßwerte durch die genannten Verfahren zurückzuführen

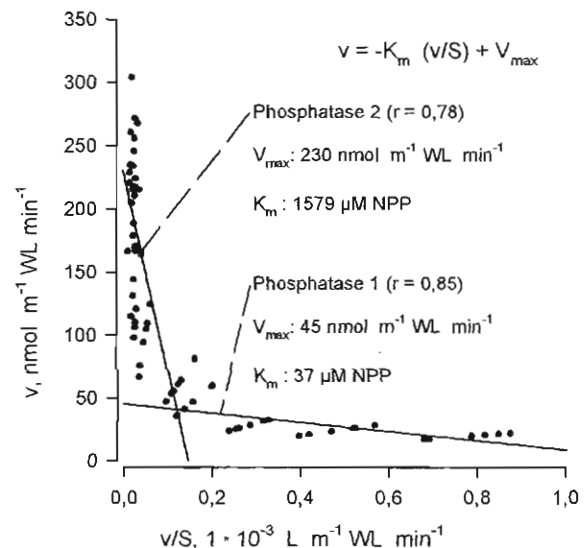


Abbildung 4: Lineare Transformation der Michaelis-Menten-Kinetik nach Eadie/Hofstee für die Hydrolyse von p-NPP durch Wurzelphosphatasen von Zuckerrüben bei Anzucht in Nährlösung (1 μM P).  
 Figure 4: Plot of v (rate of hydrolysis of p-NPP m<sup>-1</sup> rootlength min<sup>-1</sup>) against v/S (Eadie/Hofstee plot) of acid phosphatase from intact sugar beet roots grown in nutrient solution with 1 μM P.

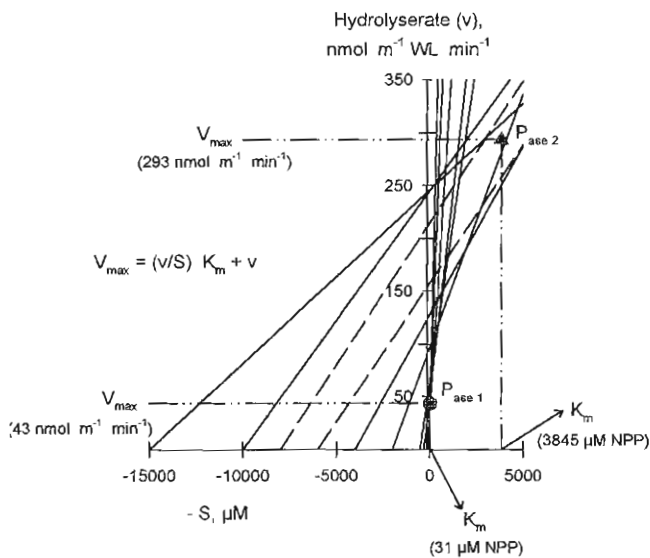


Abbildung 5: Lineare Transformation der Michaelis-Menten-Kinetik nach Eisenthal und Cornish-Bowden für die Hydrolyse von p-NPP durch Wurzelphosphatasen von Zuckerrüben bei Anzucht in Nährlösung (1 μM P).

Figure 5: Direct linear plot of v against  $K_m$  (Eisenthal and Cornish-Bowden plot) of the acid phosphatase of intact sugar beet roots grown in nutrient solution with 1 μM P.

sind oder ob bezüglich der gemessenen Aktivitäten eine kombinierte Wirkung verschiedener Enzymsysteme angenommen werden kann.

Bei diesem in Abb. 4 dargestellten Verfahren wird die gemessene Hydrolyserate dem Quotienten aus Hydrolyserate und Substratkonzentration gegenübergestellt. Die transformierten Meßwerte lassen sich, bedingt durch ihre punktuelle Verteilung, nicht durch Anlegen lediglich einer Regressionsgeraden linearisieren. In diesem Fall ist die Berechnung von zwei Regressionen zweckmäßig. Hierbei beschreibt die jeweils negative Steigung der Geraden die  $K_m$  und der Ordinatenschnittpunkt  $V_{max}$ . Auf Grund des Eadie-Hofstee Diagrammes kann angenommen werden, daß die gemessenen Hydrolyseraten auf die Wirkung zweier Enzymsysteme (Phosphatase 1 bzw. 2) zurückgeführt werden können.

Ein gänzlich anderes Verfahren zur Bestimmung von  $V_{max}$  und  $K_m$  ist die sogenannte direkte lineare Auftragung nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974). Bei dieser Methode wird die Michaelis-Menten-Gleichung in eine Gleichung umgeformt, die  $V_{max}$  als eine Funktion von  $K_m$  darstellt (Einzelheiten vgl. Lasch, 1987). Abb. 5 gibt die eigenen Resultate wieder. Hierbei stellt jeder Meßwert bzw. jeder Mittelwert aus 6 Wiederholungen je Substratkonzentrationsstufe eine Gerade mit der Steigung  $v/S$ , dem Abszissenschnittpunkt  $-S$  und dem Ordinatenschnittpunkt  $v$  dar. Im vorliegenden Fall wurden die Geraden für alle 11 NPP-Substratkonzentrationsstufen konstruiert. Im Idealfall fehlerfreier Meßwerte liefert der gemeinsame Schnittpunkt aller Geraden im 1. Quadranten die gesuchten Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$ . Da die vorliegenden Meßwerte jedoch fehlerbehaftet sind, respektive die Schnittpunkte der

Geraden aufgrund des Auftretens von Isoenzymen weit streuen (siehe Abb. 5), ergeben sich im konkreten Fall von 11 Messungen maximal 55 [=  $n \cdot (n-1)/2$ ] Schnittpunkte. Die Berechnung der Koordinaten des Schnittpunktes zweier Geraden erfolgt dabei über die Schnittpunktgleichung:

$$K_{m\ 1,2} = (v_2 - v_1) / \left( \frac{v_1}{S_1} - \frac{v_2}{S_2} \right) \quad (6)$$

$$V_{max\ 1,2} = (S_1 - S_2) / \left( \frac{S_1}{v_1} - \frac{S_2}{v_2} \right) \quad (7)$$

Die Indizes 1 und 2 stehen hierbei für die erste, d.h. niedrigere NPP-Substratkonzentrationsstufe ( $S_1$ ) und die dabei gemessene Wurzelphosphataseaktivität ( $v_1$ ) bzw. für die zweite, entsprechend höhere NPP-Substratkonzentration ( $S_2$ ) und Aktivität ( $v_2$ ). Die Parameter wurden für Pflanzen beider P-Ernährungsstufen ermittelt.

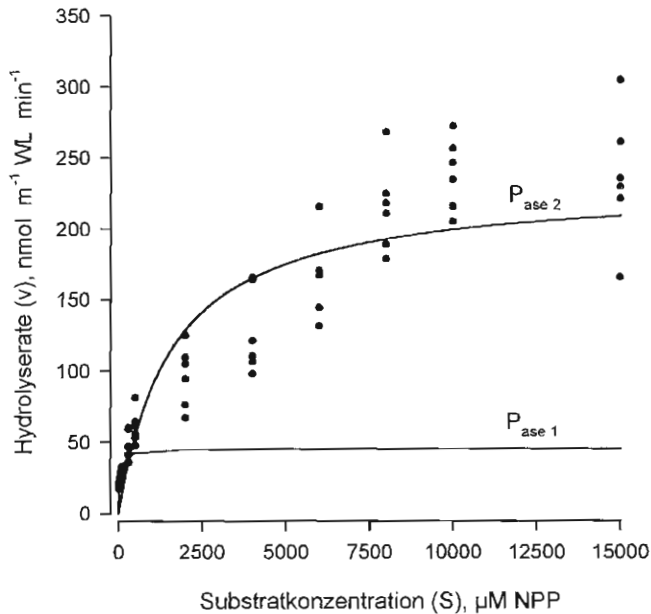
Aus dem Schnittpunkt zweier Geraden erhält man demzufolge einen spezifischen Wert für  $V_{max}$  und  $K_m$ . Die beste Schätzung der Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  für den gesamten Datensatz ergibt sich aus den Medianen aller ermittelten Werte von  $V_{max}$  bzw.  $K_m$ .

Wie Abb. 5 zeigt, ist jedoch eine deutliche Häufung von Schnittpunkten im Bereich niedriger (< 100) aber auch hoher (> 150) Hydrolyseraten zu erkennen. Dies weist ebenfalls, wie schon die Transformation nach Eadie gezeigt hat (siehe Abb. 4), auf das Vorhandensein von zwei Enzymen oder Enzymsystemen hin. Bei separater Berechnung der enzymkinetischen Parameter für zwei Phosphatasen ergibt sich für die im niedrigen Substratkonzentrationsbereich (bis 300 μM) sehr effektive Phosphatase ( $P_{ase\ 1}$ ) eine maximale Hydrolyserate ( $V_{max}$ ) von 43 nmol m<sup>-1</sup> WL min<sup>-1</sup> und ein  $K_m$ -Wert von 31 μM. Demgegenüber konnte für die zweite Phosphatase ( $P_{ase\ 2}$ ) ein  $V_{max}$  von 293 nmol m<sup>-1</sup> WL min<sup>-1</sup> und ein  $K_m$  von 3845 μM berechnet werden.

Der im 3. Quadranten liegende und somit negative Werte liefernde Schnittpunkt zwischen der bei einer NPP-Konzentration von 6000 und 8000 μM gemessenen Aktivität (siehe gestrichelte Geraden) wurde bei der Bestimmung der entsprechenden Werte für  $V_{max}$  und  $K_m$  nicht berücksichtigt. Diese Vorgehensweise ist nach Angaben von Lasch (1987) für stark fehlerbehaftete Meßwerte notwendig.

Die Tab. 1 liefert eine Zusammenfassung der über die genannten Transformationsverfahren ermittelten Werte für  $V_{max}$  und  $K_m$  für die bei 1 μM P und bei 100 μM P angezogenen Pflanzen.

Für die Werte der bei sehr niedriger P-Konzentration angezogenen Pflanzen fällt auf, daß sich sowohl mit der Transformation nach Hanes als auch nach Eadie/Hofstee ( $P_{ase\ 2}$ ) sehr ähnliche  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte ergeben. Vergleichbare Resultate wurden auch mit der Transformation nach Eisenthal und Cornish-Bowden für  $P_{ase\ 2}$



**Abbildung 6:** Kinetik für zwei hypothetisch saure Phosphatasen ( $P_{ase1}$ ;  $P_{ase2}$ ) von intakten Zuckerrübenwurzeln, gewachsen in Nährlösung mit  $1 \mu\text{M P}$ ; Kalkulation nach Eadie/Hofstee.

**Figure 6:** Kinetics assuming two acid phosphatases ( $P_{ase1}$ ;  $P_{ase2}$ ) of intact sugar beet roots grown in nutrient solution with  $1 \mu\text{M P}$ ; calculation after Eadie/Hofstee.

errechnet. Dies deutet auf die Existenz eines Enzyms bzw. eines Enzymsystems ähnlichen Verhaltens mit relativ geringer Substrataffinität (hoher  $K_m$ -Wert) hin.

Wesentlich erscheint jedoch weiterhin, daß die Transformationen nach Eadie-Hofstee und Eisenthal und Cornish-Bowden übereinstimmend die Existenz eines Enzyms mit sehr hoher Substrataffinität ( $P_{ase1}$ ) bei gleichzeitig niedriger  $V_{max}$  nahelegen.

Die variierte P-Ernährung und der dadurch bedingte unterschiedliche P-Status der Pflanzen spiegeln sich in einer ebenso deutlichen Differenzierung der Parameter der Wurzelphosphatasekinetik wider. Der Vergleich der berechneten kinetischen Parameter zwischen den Pflanzen beider P-Stufen zeigt, unabhängig von der gewählten Transformation, für hoch versorgte Pflanzen 50% höhere  $K_m$ -Werte bei gleichzeitig niedrigeren  $V_{max}$ -Werten. Die Wurzeln suboptimal ernährter Pflanzen wiesen halb so hohe  $K_m$ -Werte, d. h. eine ausgeprägtere Substrataffinität auf. Beachtenswert aber ist, daß die bei niedrigem P-Angebot gefundenen Relationen in bezug auf die Differenzen oder Gemeinsamkeiten der  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte zwischen den Transformationen bei hohem P-Angebot im wesentlichen die gleichen sind.

Die Abb. 6 zeigt nochmals für die P-Mangelpflanzen die bereits aus Abb. 1 bekannten Aktivitätsmeßwerte bei steigendem Substratangebot. Die beiden Kurven stellen die nach Anwendung der Eadie/Hofstee-Transformation (siehe Abb. 4) berechneten Kennlinien für 2 Phosphatasen dar. Es wird deutlich, daß das Aktivitätsmaximum von Phosphatase 1 bereits unter  $500 \mu\text{M NPP}$  erreicht wird, während das von Phosphatase 2 erst bei  $15000 \mu\text{M NPP}$

nahezu erreicht ist. Bei solchen Substratkonzentrationen steigt die Enzymaktivität aber nur noch minimal an. Bei Substratkonzentrationen von  $> 15 \text{ mM}$  kann man deshalb davon ausgehen, daß diese für Ermittlungen von  $P_{ase}$ -Aktivitäten, z.B. beim Testen variierten pH-Einflusses (Beißner und Römer, 1999) nicht begrenzend sind.

## Diskussion

### Einfluß der Transformationsverfahren auf die Kinetikparameter und deren Nutzung

Die Untersuchungen zur Kinetik saurer Wurzelphosphatasen an vollständig intakten Pflanzen haben gezeigt, daß die gewählte Versuchsmethode die Bestimmung enzymkinetischer Parameter zuläßt bzw. die Aktivität der  $P_{asen}$ , trotz erkannter Abweichungen von der Ideallinie, im Grundsatz der Michaelis-Menten-Funktion folgt, wenn auch die einzelnen Transformationsverfahren z.T. sehr unterschiedliche Resultate hinsichtlich der kinetischen Parameterwerte erbrachten.

So lieferte die Linearisierung nach Lineweaver und Burk (1934) Ergebnisse, die nur wenig an den eigentlichen Meßdaten orientiert erscheinen. Die Ermittlung von realistischen Werten für die Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  ist ohne eine rechnerisch sehr aufwendige Wichtung der streuenden Meßwerte nicht möglich. Das genannte Verfahren wird deshalb, obwohl in der Enzymologie vielfach angewandt, von Lasch (1987) als am ungünstigsten beurteilt. Geht man davon aus, daß die gemessene Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat durch die Aktivität nur einer spezifischen Phosphatase bedingt ist, so liefert die Linearisierung nach Hanes (1932, Abb. 3), bedingt durch die homogene Streuung der transformierten Meßwerte, vermutlich realistische, eng an den Meßwerten orientierte Resultate. Die Anwendung der Eadie/Hofstee-Transformation (Eadie, 1942) und der direkten linearen Transformation nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) führen aber übereinstimmend zu der Vorstellung, daß die gemessenen Hydrolyseraten auf die Aktivität von mindestens 2 Enzymen bzw. Enzymsystemen zurückgeführt werden können, die sich in ihren kinetischen Kennwerten deutlich unterscheiden. Hierbei konnten für das als Phosphatase 1 bezeichnete Enzym über beide Transformationsverfahren sehr ähnliche Werte für  $V_{max}$  und  $K_m$  ermittelt werden (siehe Tab. 1). Hinzu kommt, daß die nach Lineweaver und Burk (1934) ermittelten Parameterwerte sehr viel näher an den Werten der Phosphatase 1 liegen als die nach Hanes (1932) berechneten Werte. Ursache hierfür ist die starke Wichtung der Meßwerte im Bereich niedriger Konzentrationen bei der Lineweaver/Burk-Transformation. Dieser ist der für die Pflanze relevante Konzentrationsbereich. Aus diesem Grund wird die Vorstellung von der Existenz von 2 Enzymsystemen favorisiert und der Phosphatase 1 die

größere Bedeutung hinsichtlich der Nutzung organisch gebundenen Phosphors durch die Pflanze zugesprochen.

Wenn bei der Modellierung der P-Aufnahme der Pflanzen bei niedrigem P-Niveau die Nutzung des  $P_{org}$  mit einbezogen werden soll, so könnte es sinnvoll sein, die Kinetikparameter der  $P_{ase1}$  in die Kalkulation einzubeziehen, da die P-armen Pflanzen eine höhere Affinität zum  $P_{org}$  (kleine  $K_m$ -Werte) besitzen als P-reich ernährte. Für solche Berechnungen müßten aber die Konzentrationen an nutzbarem  $P_{org}$  und dessen Pufferung durch die Festphase ebenfalls ermittelt werden. Daneben ist bekannt geworden, daß P-arme Pflanzen wie z.B. verschiedene Lupinenarten (Egle et al., 1999), Spinat und Zuckerrüben (Beißner und Römer, 1998; Keller und Römer, 1998) relativ hohe Exsudationsraten an organischen Säuren zeigen und diese sehr effektiv  $P_i$  (Gerke, 1994) und  $P_{org}$  des Bodens (Beißner, 1997) mobilisieren können. Damit ergeben sich insgesamt für die Modellierung neue Primärdatenquellen, die auch schon genutzt werden (Kirk et al., 1998; Beißner und Römer, 1998).

#### Einfluß des P-Ernährungszustandes auf die enzymkinetischen Parameterwerte

Die stark abgestufte P-Zufuhr führte zu einer deutlich unterschiedlichen Wurzelphosphatasekinetik (siehe Tab. 1). So wiesen die bei hohem P-Niveau angezogenen Pflanzen, unabhängig von der gewählten Transformation, deutlich höhere  $K_m$ -Werte bei gleichzeitig niedrigeren  $V_{max}$ -Werten auf als unter P-Mangel aufgezogene Pflanzen. Die Wurzeln suboptimal ernährter Zuckerrüben zeigten demzufolge eine stärker ausgeprägte Substrataffinität und höhere maximale Hydrolyseraten. Beachtenswert erscheint jedoch, daß die Transformationen nach Eadie/Hofstee (Eadie, 1942) und Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) sowohl für die bei hohem als auch für die bei niedrigem P-Niveau angezogenen Pflanzen die Existenz von 2 Phosphatasen nahelegen. Unter Bodenbedingungen dürften die als Phosphatase 1 bezeichneten Enzyme oder Enzymsysteme im Hinblick auf die Hydrolyse organischer P-Verbindungen der Bodenlösung von wesentlicherer Bedeutung sein; denn in einem relativ P-armen Lößboden in Niedersachsen (Seeling, 1993) wurden in der Bodenlösung  $4 \mu\text{M P}$  und in einem mexikanischen Andisol  $10 \mu\text{M P}$  als organisch gebundener Phosphor gemessen (Georges, 1998). Das sind Konzentrationen, die am ehesten für das Enzymsystem hoher Affinität relevant sind.

#### Vergleich mit anderen Kulturpflanzen

Untersuchungen zur Kinetik von Wurzelphosphatasen wurden u.a. von Seeling (1993) an Sommergerstenpflanzen, die bei niedriger P-Konzentration angezogen waren, durchgeführt. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  erfolgte ebenfalls anhand verschiedener Transformationsverfahren, die auch zu entsprechend unterschiedlichen Resultaten führten. Für

Sommergerste konnte bei Anwendung der Transformation nach Lineweaver und Burk ein  $K_m$ -Wert von  $319 \mu\text{M}$  ermittelt werden, während mit der Hanes-Transformation ein  $K_m$ -Wert von  $1350 \mu\text{M}$  berechnet wurde. Bemerkenswert war weiterhin, daß die Transformation nach Eadie/Hofstee, wie bei Zuckerrübe, zu dem Resultat führte, daß die an der Wurzeloberfläche gemessene Hydrolyserate auf die Aktivität mindestens zweier Enzymsysteme zurückgeführt werden konnte. Die für Wurzelphosphatasen von Sommergerste bestimmten  $K_m$ -Werte lagen tendenziell auf gleichem Niveau wie bei Zuckerrübe.

Der Vergleich der für wurzelgebundene Phosphatasen von Zuckerrübe ermittelten kinetischen Parameter mit weiteren in der Literatur beschriebenen Resultaten ist z.T. recht schwierig. Für Komplexe von sauren Phosphatasen aus Maiswurzeln mit verschiedenen Tonmineralen werden von Dick und Tabatabai (1987)  $K_m$ -Werte von ca.  $1000 \mu\text{M}$  genannt. Dracup et al. (1984) konnten für wurzelzellwandgebundene Phosphatasen von Klee einen  $K_m$ -Wert von  $700 \mu\text{M}$  ermitteln. Die Berechnung von  $K_m$  erfolgte hierbei jedoch aus den zusammengefaßten Daten von bei hoher und niedriger P-Konzentration der Nährlösung angezogenen Pflanzen. Kraus (1989) bestimmte für hochgradig aufgereinigte Phosphatasen aus Wurzeln bzw. Zellwandfraktionen homogenisierter Wurzeln von Mais  $K_m$ -Werte von  $298$  bis  $578 \mu\text{M}$  gegenüber p-NPP. Demgegenüber konnten von Juma und Tabatabai (1988) für saure Wurzelphosphatasen aus steril bzw. nicht steril angezogenen Sojabohnen- und Maisgenotypen  $K_m$ -Werte zwischen  $1430$  und  $2730 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Für die kinetischen Studien wurde jedoch auch hier homogenisiertes Wurzelmaterial verwendet, so daß ein Vergleich mit Phosphatasen, die in den Zellwänden der Rhizodermis vorliegen, nicht statthaft erscheint. Die eigenen Resultate lassen sich demnach lediglich mit den von Seeling (1993) an Sommergerste ermittelten Parametern vergleichen, die ebenfalls nahelegen, daß die gemessene Phosphataseaktivität durch mehrere Enzyme bzw. Enzymsysteme verursacht wurde.

#### Mögliche Ursachen für Abweichungen von der idealen Michaelis-Menten-Kinetik

Die in den eigenen Untersuchungen zur Kinetik saurer Wurzelphosphatasen beobachteten Abweichungen von der idealen Michaelis-Menten-Kinetik konnten auch in Versuchen von Dracup et al. (1984) und Seeling (1993) festgestellt werden. Zwei Gründe werden als mögliche Ursachen angeführt. So wird einerseits angenommen, daß die gemessene Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat auf die Wirkung verschiedener Phosphatasen mit unterschiedlicher Substrataffinität zurückgeführt werden kann. Die Resultate der Eadie/Hofstee-Transformation (Eadie, 1942) und die Linearisierung nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) bestätigen diese Auffassung. Auch Kraus (1989) konnte in Wurzeln und in Zellwandfraktionen

homogenisierter Wurzeln von Mais jeweils zwei Phosphatasen nachweisen.

Als weitere Ursache für die beobachteten Abweichungen wird eine unterschiedliche Lokalisation des Enzyms an der Wurzel und eine damit verbundene veränderte Zugänglichkeit durch das Substrat diskutiert (Seeling, 1993). Die Aktivität könnte durch die Diffusion des Substrats zu bzw. des Produkts (Dracup et al., 1984) von den Orten der Hydrolyse beeinflusst worden sein. Gerade in Anbetracht der dargelegten Ursachen für die erkannten Abweichungen von der Idealfunktion kann jedoch generell auch für die im wesentlichen wurzelgebundenen Phosphatasen der Zuckerrübe von der Gültigkeit der Michaelis-Menten-Beziehung ausgegangen werden.

Mit der räumlichen Zugänglichkeit hat auch die Frage zu tun, inwieweit die Werte für  $V_{max}$  und  $K_m$  die mit NPP als Substrat ermittelt wurden, auf die P-Ester, die in der Bodenlösung vorkommen, übertragbar sind; denn NPP ist kein natürlich vorkommendes Substrat. Seine enzymatische Hydrolyse erfolgt sicher durch Phosphatasen die wenig spezifisch sind. Direkte Vergleichsuntersuchungen mit chemisch ähnlich gebauten Estern sind uns nicht bekannt. Wenn die Hydrolyse eines aromatischen Ringes mit einem Phosphatrest der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, so darf man das auch für Moleküle ähnlicher Gestalt wie Glukose-, Fruktose-, Ribose- oder auch Inositolmonophosphat erwarten. Mit solchen Verbindungen ist in der Bodenlösung durchaus zu rechnen (Evans, 1985), während Myoinositolhexaphosphat auf Grund seiner starken Bindung an Bodenteilchen kaum in der Bodenlösung auftritt (Beißner, 1997).

## Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Landwirtschaft und Umwelt“ sowie Konrad Mengel und Helmut Beringer für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

## Literatur

- Beißner, L. (1997): Mobilisierung von Phosphor aus organischen und anorganischen P-Verbindungen durch Zuckerrübenwurzeln. Cuvillier Verlag, Göttingen, 214 Seiten.
- Beißner, L., Römer, W. (1998): Mobilization of phosphorus by root exudates of sugar beet. 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Montpellier, France, Symposium no 43, Summaries Vol. II, p. 776.
- Beißner, L., Römer, W. (1999): Der Einfluß von P-Ernährung und pH auf die Phosphataseaktivität von Zuckerrübenwurzeln. J. Plant Nutr. Soil Sci. 162, 83–88.
- Claassen, N., Meyer, D., Jungk, A. (1991): Phosphorus acquisition of field grown sugar beet and its evaluation with a simulation model, in Scaife, A. (Edit.): Proc. of the 1<sup>th</sup> Congr. of Europ. Soc. of Agronomy, Paris.
- Chardon, W. (1997): Organically combined phosphorus in soil solutions and leachates. In: Phosphorus loss from soil to water. Edit. Tunney, H., Carton, O. T., Brookes, P. C., Johnston, A. E., CAB International. 363–366.
- Cornish-Bowden, A. (1979): Fundamentals of enzyme kinetics. Butterworth; London, Boston.
- Dalal, R. C. (1977): Soil organic phosphorus. Adv. Agron. 29, 83–117.
- Dick, W. A., Tabatabai, M. A. (1987): Kinetics and activities of phosphatase-clay complexes. Soil Sci. 143, 5–15.
- Dracup, M. N. H., Barrett-Lennard, E. G., Greenway, H., Robson, A. D. (1984): Effect of phosphorus deficiency on phosphatase activity of cell walls from roots of subterranean clover. J. Exp. Bot. 35, 466–480.
- Eadie, G. S. (1942): The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. J. Biol. Chem. 146, 85–93.
- Egle, K., Römer, W., Gerke, J., Keller, H. (1999): The influence of phosphorus nutrition on organic acid exudation of the roots of three lupin species. IX International Lupin Conference, Klink/Müritz, Germany
- Eisenthal, R., Cornish-Bowden, A. (1974): The direct linear plot – A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem. J. 139, 715–720.
- Evans, A. (1985): The adsorption of inorganic phosphate by a sandy soil influenced by dissolved organic compounds. Soil Sci. 140, 251–255.
- Georges, M. A. (1998): Nutzung organischer Phosphorverbindungen durch vier Sommerweizen genotypen, M. Sc. Thesis, Universität Göttingen.
- Gerke, J. (1994): Kinetics of soil phosphate desorption as affected by citric acid. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. 157, 17–22.
- Hanes, C. S. (1932): Studies on plant amylases I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochem. J. 26, 1406–1421.
- Hofstee, B. H. J. (1952): On the evaluation of the constants  $V_m$  and  $K_m$  in enzyme reactions. Science 116, 329–331.
- Juma, N. G., Tabatabai, M. A. (1988): Comparison of kinetic and thermodynamic parameters of phosphomonoesterases of soils and of corn and soybean roots. Soil Biol. Biochem. 20, 533–539.
- Jungk, A., Barber, S. A. (1994): Phosphate uptake rate of corn roots as related to the proportion of the roots exposed to phosphate. Agron. J. 66, 554–557.
- Keller, H., Römer, W. (1998): Ausscheidung organischer Säuren bei Spinat in Abhängigkeit von der P-Ernährung und dessen Einfluß auf die Löslichkeit von Cu, Zn, und Cd im Boden. Ökophysiol. des Wurzelraumes 8, 187–195.
- Kirk, G., Santos, E., Findenegg, G. (1998): Phosphate solubilization by organic acid excretion. 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Montpellier, France, Symposium no 43, Summaries Vol. II, p. 782.
- Kraus, M. (1998): Nutzung organischen Phosphats (Phytat) und Aufnahme anorganischen Phosphats durch die Wurzel von Mais. Diss., Universität Bayreuth.
- Lasch, J. (1987): Enzymkinetik. Springer-Verlag Berlin.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658–660.
- McLachlan, K. D. (1980): Acid phosphatase activity of intact roots and phosphorus nutrition in plants. I. Assay conditions and phosphatase activity. Aust. J. Agric. Res. 31, 429–440.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333–369.
- Newman, E. J. (1966): A method of estimating the total length of root in a sample. J. Appl. Ecol. 3, 139–145.
- Römer, W., Abd el Hadi, A., Allam, N., Schilling, G. (1978): Untersuchungen über das Verhalten substituierter Phosphoroxidtriamide und Phosphorsäureester in Pufferlösungen und Pflanzen. Arch. Acker- u. Pflanzenbau u. Bodenkd. 22, 675–683.



*Römer, W., Schilling, G.* (1984): Aufnahmeverhalten von Bis-[dimethylamido]-phosphorsäureamid und Orthophosphat bei Getreidepflanzen. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179, 599–609.

*Scheffer, F., Pajenkamp, H.* (1952): Phosphatbestimmung in Pflanzenaschen nach der Molybdän-Vanadin-Methode. *Z. Pflanzenemähr. Düngung Bodenk.* 56, 2–8.

*Seeling, G.* (1993): Beitrag des organisch gebundenen Bodenphosphors zur P-Versorgung der Pflanze – Prozesse und Faktoren der Nutzung. Dissertation, Universität Göttingen.

*Theilen, M.* (1992): Einfluß langjähriger Düngung mit Schweinegülle bzw. Triplephosphat auf Bindungsformen und Verlagerung von Phosphat im Boden. Diplomarbeit, Inst. f. Agrikulturchemie, Universität Göttingen.