

# Einfluß von Sauerstoff auf die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung von *Synechococcus*

Effect of Oxygen on Photosynthetic CO<sub>2</sub> Fixation of *Synechococcus*

Günter Döhler

Botanisches Institut der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Siesmayerstr. 70, D-6000 Frankfurt a. M.

Z. Naturforsch. **36 c**, 93–97 (1981); eingegangen am 9. Oktober 1980

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> Fixation, Effect of Oxygen and CO<sub>2</sub> Concentrations, *Synechococcus*

The cyanobacterium *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* strain L 1402-1) was grown at +35 °C in air and in air enriched with 2.2 vol.% CO<sub>2</sub>. The effect of different oxygen concentrations (0, 2, 20, 50, 75 and 99.97 or 97.8 vol.%) was studied in low (0.03 vol.%) and high (2.2 vol.%) CO<sub>2</sub> concentrations at +35 °C. After exposure to a nitrogen atmosphere and low CO<sub>2</sub> content <sup>14</sup>C-bicarbonate was mainly incorporated into aspartate and glycine/serine. During oxygenic photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation label in aspartate decreased and a high degree of radioactivity could be found in 3-phosphoglyceric acid and sugar monophosphates. The Calvin cycle was the main fixing pathway in 2.2 vol.% CO<sub>2</sub> during anoxygenic and oxygenic conditions independent on the O<sub>2</sub> concentrations during the experiments. No oxygen enhancement of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation could be found. Possible mechanism involved in CO<sub>2</sub> fixation pathways and glycolate metabolism underlying the effect of oxygen was discussed.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse über die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung bei Cyanobakterien (= Blaualgen) zeigten, daß offensichtlich der Calvin-Cyclus als Weg der CO<sub>2</sub>-Assimilation vorherrscht [1–3]. Jedoch wurde bei *Synechococcus* auch eine hohe Aspartatmarkierung vor allem am Anfang der Belichtung gefunden [4–6], was für das Ablaufen einer Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat spricht. Zur Unterscheidung zwischen C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen wurde die Wirkung von Sauerstoff auf die Photosyntheserate herangezogen [7]. Untersuchungen über die Wirkung aerober und anaerober Bedingungen auf die Kinetik des <sup>14</sup>C-Einbaues in die Produkte der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wurden einerseits nur Produkte des Calvin-Cyclus [8, 9] und andererseits bei der anoxygenen CO<sub>2</sub>-Fixierung in niedrigem CO<sub>2</sub>-Gehalt (0,03 vol.%) eine hohe Aspartat- und Glycin/Serin-Markierung [6,10] gefunden. Zur weiteren Charakterisierung der CO<sub>2</sub>-Assimilation von Cyanobakterien wurde der O<sub>2</sub>-Einfluß bei in niedrigem und hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultivierten *Synechococcus*-Zellen eingehend untersucht.

## Experimentelles

*Synechococcus* (= *Anacystis nidulans* Stamm L 1402-1) der Algenreinkultursammlung, Göttingen wurde bei +35 °C und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 18:6 Std. in niedrigem (0,03 vol.%) und hohem (2,2 vol.%) CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die Beleuchtungsstärke in den Kulturröhrchen betrug 5000 lx und die Durchflußmenge 60 l/h. Vor Versuchsbeginn sind die *Synechococcus*-Zellen 1 Stunde mit der während der Anzucht verwendeten CO<sub>2</sub>-Konzentration in einer speziellen Assimilationskammer aus Plexiglas begast worden. Verwendung fanden folgende Sauerstoffkonzentrationen: 0, 2, 20, 50, 75 und 99, 97 bzw. 97,8 vol.%. Die elektronisch gesteuerte Küvette gestattete Fixierungszeiten im 2 bzw. 5sec-Rhythmus. Die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Fixierungsexperimente, Extraktion, dünnschichtchromatographische Auftrennung der <sup>14</sup>C-markierten Substanzen und die Messung der Radioaktivität wurden nach der bei Döhler [11] beschriebenen Prozedur durchgeführt. Die spezifische Aktivität der verwendeten Bicarbonatlösung war 56,9 bzw. 59,1 µCi/µmol. 10 µCi/ml *Synechococcus*-Suspensionen wurden eingesetzt. Mit Lichtbeginn erfolgte die [<sup>14</sup>C]-Bicarbonatzugabe. Als Bezugsgrößen wurden der Chlorophyll a-Gehalt nach Kratz und Myers [12] und die Trockensubstanz bestimmt. Die *Synechococcus*-Zellen wurden stets zur gleichen Zeit geerntet und auf die gleiche optische

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Döhler.

0341-0382/81/0100-0093 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Dichte konzentriert, damit für die Versuche ein möglichst vergleichbares Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Diese Standardisierung war erforderlich, da Miyachi und Okabe [8] ein vom Entwicklungszustand der Zellen abhängiges Verhalten gegenüber Sauerstoff fanden.

### Ergebnisse und Diskussion

In einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre wird bei *Synechococcus* [<sup>14</sup>C]-Bicarbonat vornehmlich in Aspartat und Glycin/Serin eingebaut, wenn die Anzucht mit Preßluft (0,03 vol.% CO<sub>2</sub> und 21 vol.% O<sub>2</sub>) oder in 3,0 vol.% CO<sub>2</sub> und Preßluft erfolgte. Wurde 3,0 vol.% CO<sub>2</sub> zugegeben, so betrug die Markierung dieser Substanzen weniger als 5% der Gesamtradioaktivität der Photosyntheseprodukte [6, 10]. Diese Befunde waren der Anlaß einer eingehenden Untersuchung der Wirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Photosyntheserate und die Verteilung der <sup>14</sup>C-markierten Verbindungen von in niedrigem (0,03 vol.%) und in hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt (2,2 vol.%) kultivierten *Synechococcus*-Zellen. Die Kinetikexperimente in 0,03 vol.% CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> zeigten am Anfang

der Belichtung (bis zu 30 sec) einen <sup>14</sup>C-Einbau nur in Aspartat und Glycin/Serin (Abb. 1). Nach längerer Fixierungsdauer wurde eine Abnahme in der prozentualen Verteilung dieser Substanzen und eine Zunahme der Radioaktivität in 3-Phosphoglycerat und den Zuckermomophosphaten gefunden. Dieses Ergebnis stimmt weitgehend mit den von Döhler früher publizierten Daten überein. Wird dem Gasgemisch Sauerstoff — hier 50 vol.% — zugesetzt, dann nimmt der prozentuale Anteil von 3-Phosphoglycerat und den Zuckermomophosphaten stark zu und der von Aspartat und Glycin/Serin deutlich ab (vgl. Abb. 1). Den Einfluß der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (2, 20, 50, 75 oder 99,97 vol.%) auf den prozentualen Anteil der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte nach einer Fixierungsdauer von 1 min veranschaulicht Tab. I. Besonders auffällig ist die starke Abnahme der <sup>14</sup>C-Markierung von Aspartat in Gegenwart von Sauerstoff, obwohl sich der prozentuale Anteil von Phosphoenolpyruvat praktisch nicht ändert. Przybylla [13] beobachtete am gleichen Objekt in 100% Sauerstoff ebenfalls eine drastische Verringerung des Anteils von Aspartat. Bemerkenswert ist, daß bei einer Begasung der *Synechococcus*-Suspension mit 2% O<sub>2</sub> ein Vertei-

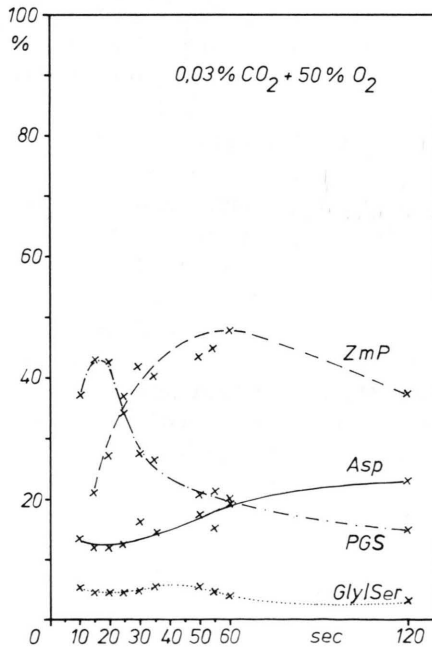
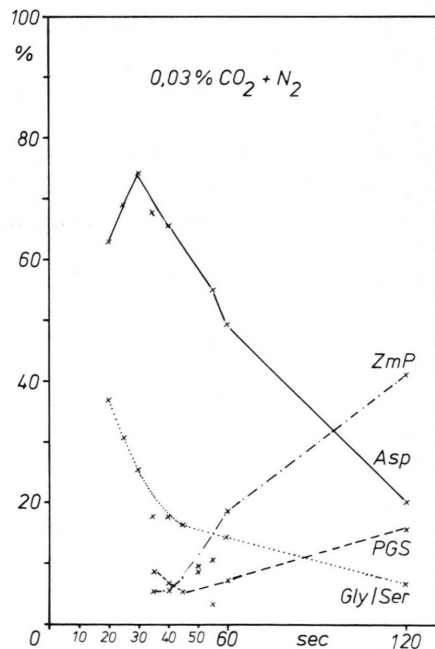


Abb. 1. Kinetik des <sup>14</sup>C-Einbaus in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* L 1402-1) bei +35 °C in 0,03 vol.% CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> bzw. 50 vol.% O<sub>2</sub>. Anzucht unter Preßluftbegasung bei +35 °C und 5000 lx. Beleuchtungsstärke während des Experiments 10000 lx. Asp Aspartat, Gly/Ser Glycin/Serin, PGS 3-Phosphoglycerinsäure und ZmP Zuckermomophosphate.

Tabelle I. Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf das Verteilungsmuster der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* L 1402-1) nach einer Fixierungsdauer von 1 min bei + 30 °C. Vor Versuchsbeginn wurde die Suspension 1 Std. mit dem angegebenen Gasgemisch und 0,03 vol.% CO<sub>2</sub> durchströmt (40 l/h). Die Anzucht erfolgte bei + 35 °C, 5000 lx und Preßluft (0,03 vol.% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub>). Die Radioaktivität ist in dpm angegeben.

Substanz	N <sub>2</sub>		2% O <sub>2</sub>		21% O <sub>2</sub>		50% O <sub>2</sub>		75% O <sub>2</sub>		99,97% O <sub>2</sub>	
	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]
Aspartat	3067	49,2	1164	10,9	496	9,2	5143	17,9	4410	17,5	1211	8,5
Asparagin			446	4,2	500	9,3			355	1,4		
Glycin/Serin	911	14,6	644	6,0	257	4,7	1098	3,8	1224	4,8	459	3,2
3-Phosphoglycerinsäure	466	7,4	2248	21,2	1132	21,1	5758	20,0	5507	20,0	4326	30,7
Zuckermorphosphat	1169	18,7	4939	46,7	2573	47,9	13755	47,9	10891	43,2	6459	45,8
Phosphoenolpyruvat	158	2,4	277	2,6	108	2,0	150	0,5	447	1,7	336	2,3
Alanin			371	3,5	161	3,0	993	3,4	726	2,8	310	2,2
Glutamat	100	1,6	96	0,9	93	1,7			283	1,1	232	1,6
Threonin							252	0,8	118	0,4		
Citrat/Glycerat	362	5,8	235	2,2			372	1,3	346	1,3	280	2,0
Phosphoglykolsäure					42	0,7	513	1,7			264	1,8
Glykolsäure			61	0,5			640	2,2	501	1,9	198	1,4
Dihydroxyacetonphosphat									225	0,8		

Tabelle II. Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf das Verteilungsmuster der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* L 1402-1) nach einer Fixierungsdauer von 1 min bei + 30 °C. Vor Versuchsbeginn wurde die Suspension 1 Stunde mit dem entsprechenden Gasgemisch (O<sub>2</sub>-Gehalt und 2,2 vol.% CO<sub>2</sub>) durchströmt (40 l/h). Die Anzucht erfolgte bei + 35 °C, 5000 lx und 2,2 vol.% CO<sub>2</sub> mit Preßluft. Die Radioaktivität ist in dpm angegeben.

Substanz	N <sub>2</sub>		2% O <sub>2</sub>		21% O <sub>2</sub>		50% O <sub>2</sub>		75% O <sub>2</sub>		98% O <sub>2</sub>	
	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]	[dpm]	[%]
Aspartat	422	9,7	415	5,9	515	6,8	452	6,8	477	6,6	635	6,9
Asparagin	134	3,0										
Glycin/Serin	231	5,3	166	2,3	142	1,9	163	2,4	127	1,7	192	2,0
3-Phosphoglycerinsäure	837	19,2	998	14,4	1170	15,7	720	10,8	1480	20,5	1676	18,3
Zuckermorphosphat	2318	53,4	4695	67,8	4861	65,3	3893	58,8	4601	63,7	5790	63,3
Phosphoenolpyruvat	177	4,0	87	1,2	98	1,3	167	2,5	128	1,7	102	1,1
Alanin	150	3,4	182	2,6	170	2,2	157	2,3	110	1,5	155	1,6
Glutamat					47	0,6					44	0,4
Citrat/Glycerat			135	1,9	88	1,1	101	1,5			84	0,9
Phosphoglykolsäure	70	1,6	144	2,0	178	2,3	768	11,6	197	2,7	194	2,1
Glykolsäure					108	1,4	101	1,5	94	1,3	201	2,1
Malat			102	1,5	62	0,9	92	1,4			70	0,8

lungsmuster gefunden wird, das sich in höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen nur unwesentlich verändert. Unterschiede wurden allerdings in der Radioaktivität der Phosphoglykolsäure und Glykolsäure gemessen, die mit steigendem O<sub>2</sub>-Gehalt etwas zunimmt (Tab. I und II). Da die Markierungsrate von Glycerat praktisch gleichbleibt, spricht dies für das Abfließen des Glykolatweges, was mit früheren Befunden übereinstimmt [3, 8]. Die O<sub>2</sub>-Konzentration kontrolliert demnach die Glykolatsynthese in *Synechococcus*.

Im Muster der prozentualen Verteilung der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte wurde bei Durch-

führung der Experimente in hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (2,2 vol.%) mit *Synechococcus*-Zellen, die ebenfalls in 2,2 vol.% CO<sub>2</sub> kultiviert worden sind, keine so drastischen Unterschiede gefunden. Da das Muster der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte bei dieser hohen CO<sub>2</sub>-Konzentration (2,2 vol.%) in N<sub>2</sub> und 2,0 vol.% O<sub>2</sub> praktisch identisch war, werden hier die Daten von 2% O<sub>2</sub> denen von 50% O<sub>2</sub> gegenübergestellt (Abb. 2). In jedem Fall dominieren hier die Produkte des Calvin-Cyclus. In einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre und bei niedrigem O<sub>2</sub>-Gehalt (2%) während des Versuchs ist der prozentuale Anteil von Aspartat

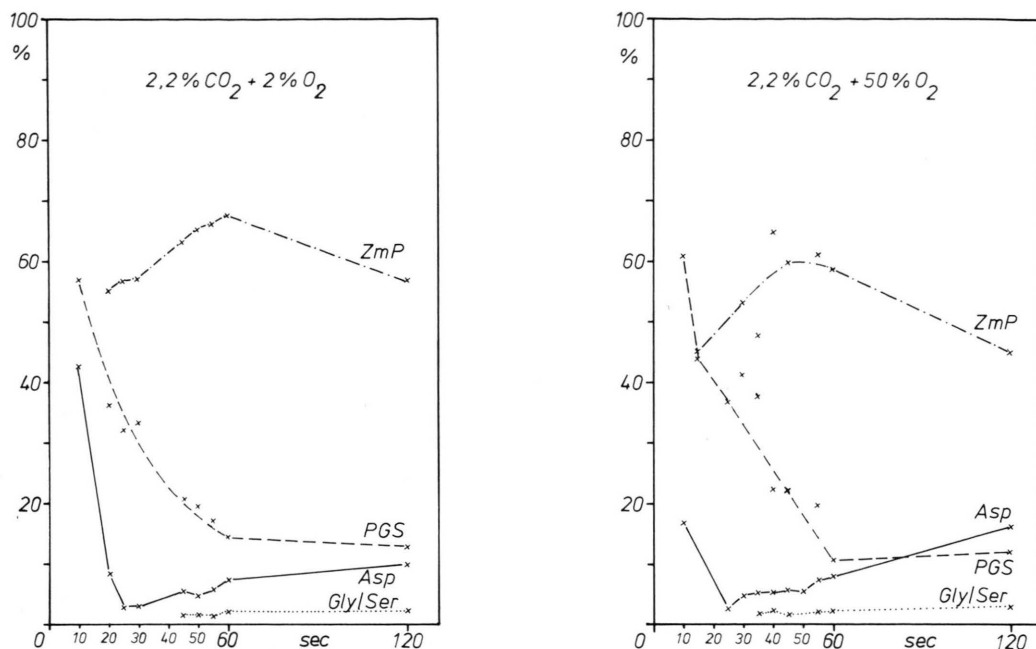


Abb. 2. Kinetik des <sup>14</sup>C-Einbaues in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* L 1402-1) bei +35 °C in 2,2 vol.% CO<sub>2</sub> + 2 bzw. 50 vol.% O<sub>2</sub>. Anzucht bei Begasung mit 2,2 vol.% CO<sub>2</sub> und Preßluft. Weitere Angabe siehe Abb. 1.

am Anfang der Belichtung höher als bei Begasung mit 50% O<sub>2</sub>. Die Markierungsrate von Glycin/Serin wird durch verschiedene O<sub>2</sub>-Konzentrationen nur wenig beeinflusst; einen etwas höheren prozentualen Anteil findet man allerdings in einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre (vgl. Tab. II). Ähnliche Beobachtungen liegen von Miyachi und Okabe [8] vor, die bei in 1,5–2,0 vol.% CO<sub>2</sub> und Preßluft kultivierten *Anacystis*-Zellen keinen Unterschied im Muster der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte feststellen konnten. Wenn die Anzucht in N<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub> erfolgte, wurden bei der oxygenen und anoxygenen CO<sub>2</sub>-Fixierung ebenfalls nur Produkte des Calvin-Cyclus gefunden [9]. Offensichtlich übt der CO<sub>2</sub>-Gehalt während der Anzucht von *Synechococcus* einen entscheidenden Einfluß auf den Weg der CO<sub>2</sub>-Assimilation aus [6].

Die geringe Wirkung, die der Sauerstoffgehalt auf den prozentualen Anteil des größten Teils der <sup>14</sup>C-markierten Photosyntheseprodukte hat, demonstriert Tab. II. Die Markierung der Produkte des Calvin-Cyclus (z.B. 3-Phosphoglycerinsäure, Zuckermonophosphate) wird praktisch nicht beeinflusst. Der prozentuale Anteil der Aminosäuren (Aspartat, Glycin/Serin und Alanin) und von Phosphoenolpyruvat

liegt in einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 2,2% CO<sub>2</sub> deutlich über den in Gegenwart von Sauerstoff gemessenen Werten. Das Fehlen von Sauerstoff während des Versuchs begünstigt eine Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat und der hohe CO<sub>2</sub>-Gehalt bewirkt ein schnelles Anlaufen des Calvin-Cyclus. Eine CO<sub>2</sub>-Anreicherung in der Zelle über das PEP-carboxylase-System entfällt, somit ist die hohe Aminosäure-Markierung verständlich. Auch nach längeren Fixierungszeiten (z. B. 10 min) wurde keine wesentliche Änderung im Muster der CO<sub>2</sub>-Fixierung unter dem Einfluß verschiedener O<sub>2</sub>-Konzentrationen festgestellt.

Unter unseren experimentellen Bedingungen wurde die Rate der CO<sub>2</sub>-Fixierung (ab 4 min Photosynthese) durch Sauerstoff gehemmt, was mit den Untersuchungen von Przybylla [13] übereinstimmt. Bei Fixierungszeiten unter 4 min (in 0,03% CO<sub>2</sub>) bzw. unter 1 min (2,2% CO<sub>2</sub>) wurde in einer N<sub>2</sub> Atmosphäre die niedrigste Gesamtfixierungsrate gemessen. Dies geht auf die unter diesen Bedingungen langandauernde Induktionsphase der Photosynthese zurück [14], d. h. der stationäre Photosynthesewert wird erst relativ spät erreicht. Die Verringerung der Rate der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Fixierung bezogen auf den Chloro-

phyl a-Gehalt betrug etwa 20% in 99,97 bzw. 97,8% O<sub>2</sub>. Demgegenüber fanden Miyachi und Okabe [8] eine Steigerung der Gesamtfixierungsrate in Gegenwart von Sauerstoff, die bei 10% O<sub>2</sub> einen maximalen Wert erreichte (Photosynthesezeit: 40 min). Die von uns bei *Synechococcus* beobachtete Hemmung der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung hat seine Ursache offensichtlich in einer Beeinträchtigung der Aktivität der Ribulose-1.5-bisphosphatcarboxylase. Nach Befunden von Miyachi und Okabe [8] hemmt Sauerstoff die Aktivität dieses Enzyms. Außerdem kann eine Beeinflussung des CO<sub>2</sub>-Transportes bzw. CO<sub>2</sub>/Bikarbonatverhältnisses in der Zelle über die Carboanhydrase durch Sauerstoff eine Rolle spielen.

#### Danksagung

Für die großzügige Unterstützung zur Durchführung der Versuche im Botanischen Institut der Universität Bern danke ich Herrn Prof. Dr. K. Erisman, Bern und Herrn Dipl.-Biol. Mati für seine Mitarbeit. Mein besonderer Dank gilt der European Molecular Biology Organisation (EMBO) für die Finanzierung des Forschungsaufenthaltes in der Schweiz und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe. Fräulein Isolde Burkhardt danke ich für die ausgezeichnete technische Mitarbeit.

- [1] R. A. Pelroy u. J. A. Bassham, Arch. Mikrobiol. **86**, 25–38 (1972).
- [2] M. J. A. Ihlenfeldt u. J. Gibson, Arch. Mikrobiol. **102**, 13–21 (1975).
- [3] G. Döhler u. K.-R. Przybylla, Planta (Berl.) **110**, 153–158 (1973).
- [4] G. Richter, Planta (Berl.) **57**, 202–214 (1961).
- [5] E. R. Jansz u. F. J. Maclean, Can. J. Mikrobiol. **19**, 497–504 (1973).
- [6] G. Döhler, Ber. dtsch. bot. Ges. **87**, 229–238 (1974).
- [7] C. B. Osmond, Photosynthesis and Photorespiration, (M. D. Hatch ed.), 472–482 (1971).
- [8] S. Miyachi u. K. Okabe, Plant & Cell Physiol. **17**, 973–986 (1976).
- [9] G. Peschek, FEBS Letters **106**, 34–38 (1979).
- [10] G. Döhler, Z. Pflanzenphysiol. **78**, 416–420 (1976).
- [11] G. Döhler, Planta (Berl.) **107**, 33–42 (1972).
- [12] W. A. Kratz u. J. Myers, J. Gen. Physiol. **39**, 11–22 (1955).
- [13] K.-R. Przybylla, Diss. Frankfurt/M. (1974).
- [14] K. Egle u. G. Döhler, Z. Naturforsch. **19 b**, 773–777 (1964).