

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Die Speicherstoffe von *Chromatium okenii**

Von
H. G. SCHLEGEL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1961)

Obwohl sich die großen Schwefelpurpurbakterien vom Typ des *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* durch ihre Größe von der Masse der Bakterien abheben, sind sie durch Übergangsformen mit den kleinen Purpurbakterien verbunden und dem Bakterienreich zweifelsfrei zuzuordnen. Ihre Größe erleichtert die mikroskopische Beobachtung, läßt Innenstrukturen erkennen und ermöglicht die Anwendung cytologischer und mikrochemischer Verfahren zur Identifizierung von Zeleinschlüssen.

Schwefelpurpurbakterien (*Thiorhodaceae*) unterscheiden sich von *Athiorhodaceae* im wesentlichen durch die Fähigkeit, Schwefelwasserstoff als Wasserstoff-Donator verwerten und als Intermediärprodukt der Sulfatbildung Schwefel in Form von Tröpfchen ablagern zu können. Darüber hinaus sind sie — nach bisherigen Erfahrungen — durch das Unvermögen, molekularen Sauerstoff zu verwerten, ausgezeichnet und sind obligat an anaerobe Bedingungen gebunden. In den meisten stoffwechselphysiologischen Potenzen sind beide Gruppen von Purpurbakterien einander jedoch weitgehend gleich. Ihr Gehalt an photosynthetisch aktiven Pigmenten ermöglicht ihnen die Verwertung von Lichtenergie zu Syntheseleistungen (CO_2 -Fixierung, Einbau organischer Substrate, Wachstum und Vermehrung). Die zwischen beiden Gruppen bestehenden engen Beziehungen ließen vermuten, daß sie auch die gleichen Speicherstoffe anzuhäufen vermögen.

Bereits 1935 hat GAFFRON ausgesprochen, „daß die PB (Purpurbakterien) zwei Grundkörper zu bilden vermögen, von denen einer Kohlenhydrat sein mag. Kohlenhydrat ist aber bestimmt nicht derjenige Körper, der in erster Linie gebildet wird“. Diese zweite in den Zellen von *Rhodobacillus* angehäuften Substanz, die bereits 1933 isoliert und durch Elementaranalyse als $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n$ charakterisiert worden war (GAFFRON 1933), ist unlängst an *Rhodospirillum rubrum* mit Poly- β -hydroxybuttersäure identifiziert worden (DOUDOROFF u. STANIER 1959). Dieses Polymere wird angehäuften, wenn die Zellen in Gegenwart von Acetat, Butyrat oder β -Hydroxybutyrat im Licht wachsen oder in Abwesenheit einer N-Quelle assimilieren; mit Bernsteinsäure als Substrat werden vorwiegend Polysaccharide gespeichert (STANIER u. Mitarb. 1959).

Chromatium okenii Stamm „Ostrau“, der seit seiner Anreicherung (SCHLEGEL u. PFENNIG 1961) in einem vollsynthetischen Mineralmedium mit Vitamin B 12 (PFENNIG 1961) in Kultur gehalten wird, wurde unter den üblichen Bedingungen in 500 ml Schraubverschlußflaschen im

* Herrn Professor Dr. E. G. PRINGSHEIM zum 80. Geburtstag gewidmet.

Schwachlicht herangezogen. Aus diesen Normalkulturen stammende Zellen enthalten keine nachweisbaren Mengen von Poly- β -hydroxybuttersäure (PHBS); jedoch lassen sich regelmäßig Polysaccharide nachweisen; der Gehalt an reduzierendem Zucker, der durch Säurehydrolyse bestimmbar wird, beträgt etwa 10% des Trockengewichts der Zellen.

Eine Anhäufung von PHBS wurde durch Zusatz von Acetat zu erreichen versucht. Wurde den Normalkulturen Acetat verabreicht, so erfolgte keine bemerkbare Synthese von PHBS. Wurden die Zellen jedoch von der Nährlösung abgetrennt, gewaschen und in einer stickstoff- und kohlendioxidfreien Nährlösung aufgeschwemmt und mit 0,1% Na-acetat versehen, so waren nach wenigen Tagen bereits kleine Granula zu erkennen. Nach 10 Tagen boten die Zellen das in Abb. 1 wiedergegebene Bild. Die Zellen waren von großen Einschlüssen dicht erfüllt, deren Brechungsindex größer als der des Cytoplasmas, jedoch kleiner als der der Schwefeltröpfchen ist. Die Einschlüsse färben sich mit Sudanschwarz B an (Abb. 2). Eau de Javelle (MEYER 1901; WILLIAMSON u. WILKINSON 1958) entfärbt die Zellen momentan, löst dann die Zellwand und das Plasma auf und hinterläßt die nackten Einschlüsse (Abb. 3a und b). Bedeckt man die auf dem Objekttträger aufgetrockneten Zellen mit Chloroform oder dem als Immersionsöl verwendeten Lösungsmittel Anisol, so quellen die Einschlüsse stark, führen zur Zerreißung der Zellwand und gehen in Lösung (Abb. 4).

Diese mikroskopischen Befunde deuteten bereits darauf hin, daß die Einschlüsse aus PHBS bestehen, wenn auch die Beteiligung anderer Fette an ihrem Aufbau nicht ausgeschlossen ist. Die Identifizierung der angehäuften Substanz wurde an Zellen vorgenommen, die nach zehntägiger Inkubation mit Acetat im Licht augenscheinlich etwa halb so viele Einschlußkörper angehäuften wie die in Abb. 1 dargestellten. Die lyophilisierten Zellen wurden mit Chloroform extrahiert; bei Zusatz von 1,2 Volumina Äther zu dem durch Filtration abgetrennten Chloroformextrakt wurde ein feinflockiger Niederschlag erhalten, der abgesaugt, erneut in Chloroform gelöst und wieder gefällt wurde. Der Elementaranalyse nach (C = 55,7%, H = 7,08%) handelt es sich um PHBS. Der relativ hohe Schmelzpunkt (186–189°C) steht mit der Beobachtung im Einklang, daß schon geringe Mengen dieses Polymeren dem Chloroform eine verhältnismäßig hohe Viscosität verleihen.

Nach den bisherigen Erfahrungen wird PHBS von *Chromatium okenii* in Abwesenheit von Kohlendioxid in einem Schwefelwasserstoff und Acetat enthaltenden Mineralmedium im Licht gespeichert. Die Anhäufung von PHBS erfolgt auch in Abwesenheit einer N-Quelle. Ob der Ausschluß von CO₂ dabei notwendig ist, konnte noch nicht eindeutig festgestellt werden. Bei höheren Beleuchtungsstärken erfolgt die Speicherung erheblich rascher als bei dem oben angegebenen Versuch.

Ein Polysaccharid, das durch Jod rotbraun angefärbt wird, scheinen die Zellen während des Wachstums in der normalen Nährlösung in Mengen von 5—10% des Trockengewichts stets zu enthalten. Zu einer darüber hinausgehenden Anhäufung des Kohlenhydrats kommt es bei Zusatz

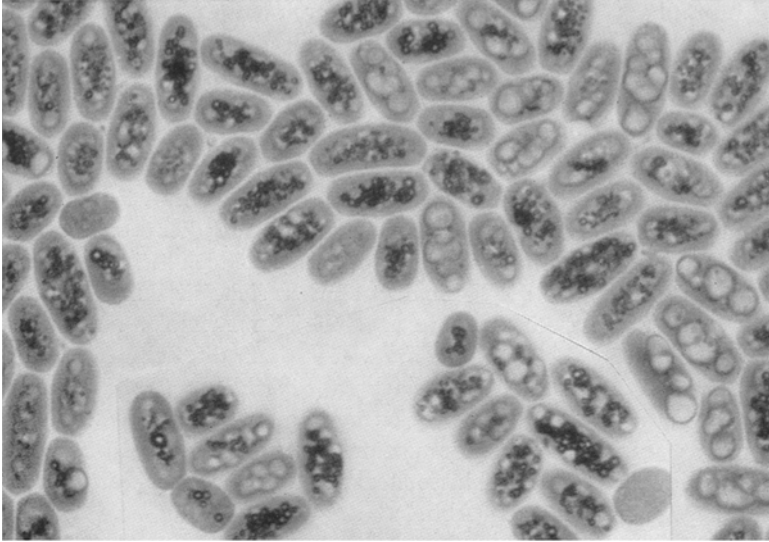


Abb. 1. Einschlüsse von Poly- β -hydroxybuttersäure in *Chromatium okenii*; einige Zellen enthalten außerdem Schwefeltröpfchen (in der Abbildung schwarz)

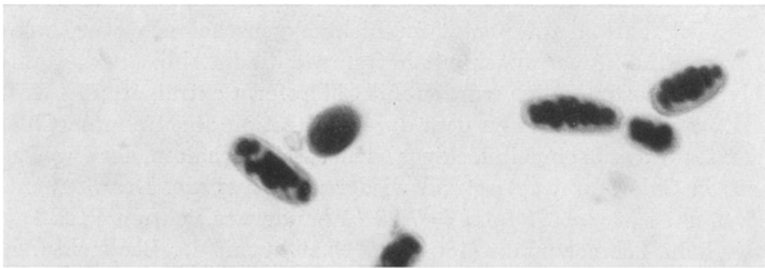


Abb. 2. Dieselben Zellen nach Anfärbung mit Sudan-Black B

von Bernsteinsäure (über 30%), Äpfelsäure und Propionsäure zu der normalen Nährlösung. In Abwesenheit einer N-Quelle scheint die Polysaccharidspeicherung noch rascher abzulaufen; ob Kohlendioxyd entbehrlich ist, bleibt zu prüfen.

Neben diesen beiden Speichersubstanzen enthalten Schwefelpurpurbakterien noch zwei weitere Reservestoffe: Schwefel und Polyphosphate.

Schwefel wird immer gespeichert, wenn den Zellen im Licht und bei Anwesenheit eines H-Acceptors Schwefelwasserstoff zur Verfügung steht;

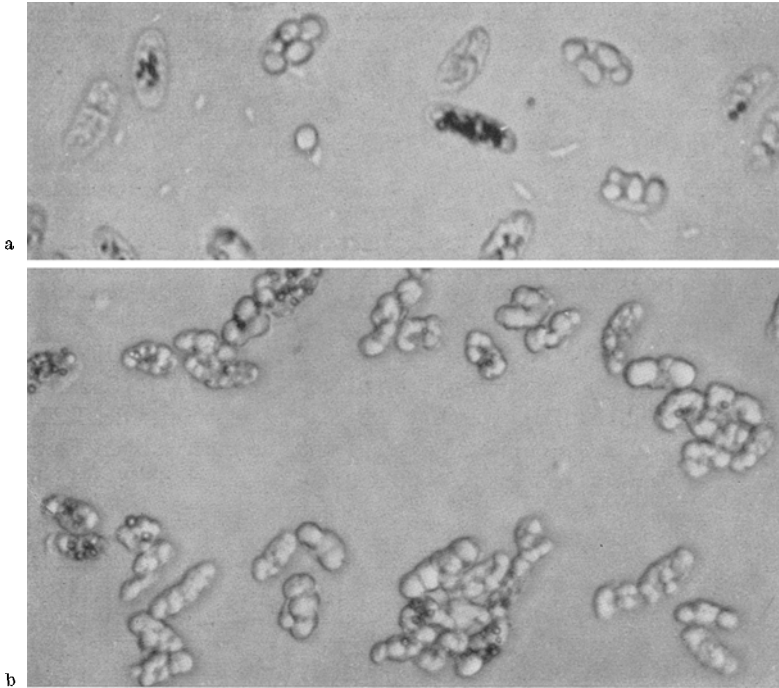


Abb.3. 1 min nach Zusatz von Eau de Javelle beginnen sich Plasma und Zellwand aufzulösen (a); Einschlusskörper von Poly- β -hydroxybuttersäure nach 5 min langer Einwirkung von Eau de Javelle (b)

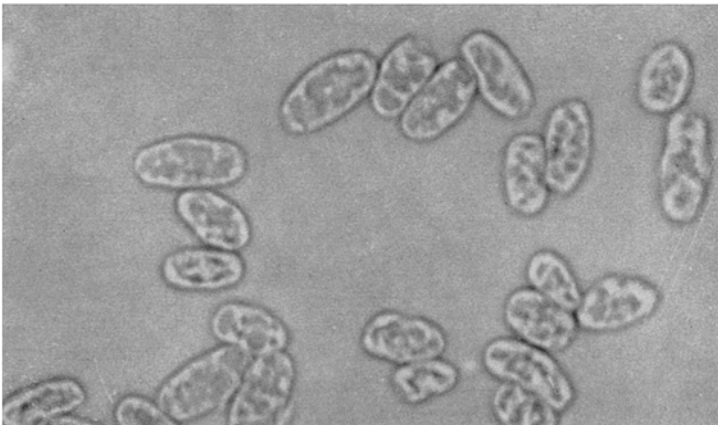


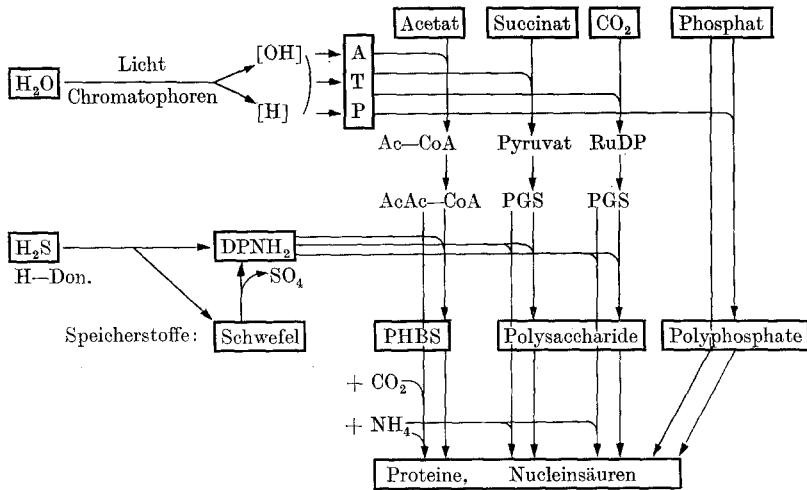
Abb.4. Nach Zusatz von Chloroform aufgequollene Zellen

Schwefel stellt gewissermaßen potentielle Reduktionskraft dar und ermöglicht der Zelle eine Fixierung von Kohlendioxyd auch bei Abwesenheit eines H-Donators.

Polyphosphate wurden in *Chromatium okenii* bisher lediglich analytisch nachgewiesen; ihre Bildungsbedingungen wurden noch nicht überprüft.

Eine Zuordnung der hier genannten Speicherstoffe zu den Strukturen, die in elektronenmikroskopischen Abbildungen von Ultradünnschnitten von Purpurbakterien sichtbar sind, ist noch nicht möglich. Sämtliche bisher vorliegenden Aufnahmen wurden vor Bekanntwerden der Bildungsbedingungen der Speicherstoffe angefertigt (NIKLOWITZ u. DREWS 1955; VATTER u. WOLFE 1958; HICKMAN u. FRENKEL 1959; DREWS 1960). Es ist jedoch anzunehmen, daß es sich bei den auffallend großen Vacuolen in *Rhodospirillum rubrum* (NIKLOWITZ u. DREWS 1955; DREWS 1960) und den sudanophilen Granula entsprechenden Vacuolen eines anderen Stammes (VATTER u. WOLFE 1958) um Einschlußkörper von PHBS handelt.

Vor dem Hintergrund der derzeitigen Vorstellung über die Photosynthese der Purpurbakterien (STANIER u. Mitarb. 1959; LOSADA u. Mitarb. 1960; ARNON 1961; STANIER 1961) lassen sich die an der Bildung von Speicherstoffen beteiligten Vorgänge und die notwendigen Voraussetzungen in einem Schema zusammenfassen. Die Rolle des Lichtes



beschränkt sich auf die Bereitstellung von Energie. In Chromatophoren lokalisierte Pigmente transformieren Lichtenergie in die Form der Adenosintriphosphorsäure (ATP), welche die zu endogenen Syntheseprozessen notwendige Energie überträgt. Als Wasserstoff-Quelle fungiert Schwefelwasserstoff. Ist Schwefelwasserstoff im Überschuß vorhanden, so wird Schwefel gespeichert. Der während der Oxydation von Schwefelwasser-

stoff zu Schwefelsäure anfallende Wasserstoff wird — wahrscheinlich — über Phosphopyridinnucleotide den Orten reduktiver Syntheseprozesse zugeleitet. Mit Acetat als einziger verwertbarer Kohlenstoffquelle wird PHBS gespeichert. Mit Succinat und Kohlendioxyd wird die Synthese von Polysacchariden begünstigt. Phosphate werden in Form von Polyphosphaten vorübergehend festgelegt. Zur Synthese von Proteinen und Nucleinsäuren und zum Wachstum der Thiorhodaceen ist Kohlendioxyd anscheinend unentbehrlich. Essigsäure ermöglicht bei Abwesenheit von CO_2 kein Wachstum.

In der Fähigkeit, Essigsäure und „acetatbildende“ Substrate zu verwerten und als Polymeres zu speichern, kann man eine Anpassung an die Verhältnisse des natürlichen Standortes sehen. Die Schwefelpurpurbakterien sind in der Natur dort verbreitet, wo organische Materialien unter anaeroben Bedingungen zersetzt werden. Unter den Produkten dieses unvollständigen Abbaus herrschen organische Säuren wie Buttersäure und Essigsäure vor. Nur wenige Organismen sind in der Lage, diese Substanzen unter anaeroben Bedingungen als Substrate zu verwerten. Für die in den sauerstoffhaltigen Zonen derartiger Standorte verbreiteten, Essigsäure verwertenden, farblosen und grünen Flagellaten prägte PRINGSHEIM (1935) die Bezeichnung „Acetatflagellaten“. Die Tatsache, daß schwefelfreie und schwefelhaltige Purpurbakterien Acetat verwerten und in Form von PHBS als Polymeres speichern können, berechtigt dazu, den aerophilen Flagellaten die anaerophilen Purpurbakterien als eine zweite ökologische Gruppe der „Acetatorganismen“ an die Seite zu stellen.

Die zur Erhaltung der Zelle im Dunkeln notwendige Energie scheint bei Schwefelpurpurbakterien durch Oxydation endogener Speicherstoffe unter Reduktion gespeicherten Schwefels aufgebracht zu werden. *Chromatium* Stamm *D* scheidet im Dunkeln Essigsäure, Schwefelwasserstoff und Kohlendioxyd aus (HENDLEY 1955). Ob sich die Rolle der gespeicherten Polymeren in ihrer Funktion als Substrate des Dunkelstoffwechsels erschöpft oder ob sie unter günstigen Wachstumsbedingungen im Licht auch wieder in Syntheseprozesse einbezogen werden und Bausteine für die Cytoplasmasyntese liefern können, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassung

Chromatium okenii häuft während der Belichtung in einer acetathaltigen Mineralnährlösung große Mengen von Poly- β -hydroxybuttersäure intracellulär an. Die Bedingungen der Speicherstoffsynthese werden dargelegt.

Für die experimentelle Mitarbeit danke ich Fräulein G. RICHTER. Die Untersuchungen wurden mit einer Sachbeihilfe durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

- ARNON, D. I.: Photosynthetic phosphorylation and a unified concept of photosynthesis. V. Internatl. Congress of Biochem. Moskau 1961.
- DOUDOROFF, M., and R. Y. STANIER: Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature (Lond.)* **183**, 1440—1442 (1959).
- DREWS, G.: Untersuchungen zur Substruktur der „Chromatophoren“ von *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodospirillum molischianum*. *Arch. Mikrobiol.* **36**, 99 bis 108 (1960).
- GAFFRON, H.: Über den Stoffwechsel der schwefelfreien Purpurbakterien. *Biochem. Z.* **260**, 1—17 (1933).
- GAFFRON, H.: Über den Stoffwechsel der Purpurbakterien. II. *Biochem. Z.* **275**, 301—319 (1935).
- HENDLEY, D. D.: Endogenous fermentation of Thiorhodaceae. *J. Bact.* **70**, 625—634 (1955).
- HICKMAN, D. D., and A. W. FRENKEL: The structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 277—290 (1959).
- LOSADA, M., A. V. TREBST, S. OGATA and D. I. ARNON: Equivalence of light and adenosine triphosphate in bacterial photosynthesis. *Nature (Lond.)* **186**, 753 to 760 (1960).
- MEYER, A.: Notiz über das Verhalten der Sporen und Fett-Tropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **29**, 809—810 (1901).
- NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikrobiol.* **23**, 123—129 (1955).
- PFENNIG, N.: Eine vollsynthetische Nährlösung zur selektiven Anreicherung einiger Schwefelpurpurbakterien. *Naturwissenschaften* **48**, 136 (1961).
- PRINGSHEIM, E. G.: Über Acetatflagellaten. *Naturwissenschaften* **23**, 110—114 (1935).
- SCHLEGEL, H. G., u. N. PFENNIG: Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 1—39 (1961).
- STANIER, R. Y.: Photosynthetic mechanisms in bacteria and plants: Development of a unitary concept. *Bact. Rev.* **25**, 1—17 (1961).
- STANIER, R. Y., M. DOUDOROFF, R. KUNISAWA and R. CONTOPOULOU: The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 1246—1260 (1959).
- VATTER, A. E., and R. S. WOLFE: The structure of photosynthetic bacteria. *J. Bact.* **75**, 480—482 (1958).
- WILLIAMSON, D. H., and J. F. WILKINSON: The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. gen. Microbiol.* **19**, 198—209 (1958).

Professor Dr. H. G. SCHLEGEL

Institut für Mikrobiologie der Universität, Göttingen, Gosslerstraße 16