

Versuch 4

Abhängigkeit der Atmungsintensität vom Sauerstoffpartialdruck und Wirkung von KCN und Dinitrophenol

Sebastian Schrader

Matrikelnummer: 156527

13. Juli 2000

1 Aufgaben

1. Aus der Konzentrationsabnahme ist der Sauerstoffverbrauch (ohne Inhibitoren) für Hefen und Pflanzensuspensionszellen in $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ pro g Frischmasse zu berechnen. Interpretieren Sie den Unterschied in der auf Frischmasse bezogenen Atmungsrate beider Objekte und berücksichtigen Sie dabei, daß 80–90% der Frischmasse der Pflanzenzellen aus dem Vakuolensaft besteht. Hefezellen besitzen dagegen keine Zentralvakuole.
2. Die Cyanidwirkung bei Suspensionszellen und Hefen ist im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Atmungshemmung durch Cyanidionen und dem alternativen Atmungsweg höherer Pflanzen zu diskutieren.
3. Die Wirkung von Dinitrophenol auf den Sauerstoffverbrauch der Hefe ist im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus dieses Stoffes an der inneren Mitochondrienmembran und mit der Regulation der Glykolyse durch das ATP zu diskutieren.
4. Anhand der Kurven für den Sauerstoffverbrauch der Suspensionszellen ist festzustellen, bis zu welcher Sauerstoff-Konzentration die Endoxidasen (Cytochromoxidase, terminale Oxidase des alternativen Weges) mit Sauerstoff gesättigt sind.
5. Die Abhängigkeit der Atmungsrate ($\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) von der Sauerstoffkonzentration ist für die Suspensionszellen und die Maiswurzeln in einer Grafik vergleichend darzustellen. Berechnen Sie hierzu abschnittsweise die Atmungsrate zwischen 0 und 1 mg/l, zwischen 1 und 2 mg/l usw. bis zu 5 mg O₂/l. Der Unterschied in der Konzentrationsabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs der Suspensionskultur und der Wurzeln ist im Zusammenhang mit der Diffusion des Sauerstoffs zu interpretieren.

2 Meßergebnisse

Sauerstoffverbrauch (M_{O_2}) ohne Inhibitoren

	$\Delta[O_2] / \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	t / min	$M_{O_2} / \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
Hefe	6.25	16.7	250
<i>Chenopodium</i>	5.30	16.7	21.2

Sauerstoffverbrauch (M_{O_2}) mit KCN

	$\Delta[O_2] / \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	t / min	$M_{O_2} / \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
Hefe	0.55	12.5	29.3
<i>Chenopodium</i>	2.75	8.3	22.0

Sauerstoffverbrauch (M_{O_2}) mit DNP¹

	$\Delta[O_2] / \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	t / min	$M_{O_2} / \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
Hefe	2.55	4.17	408

Atmungsrate R bei *Chenopodium* und *Zea mays*

$[O_2] / \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$R / \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$				
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5
<i>Chenopodium</i>	0.30	0.30	0.34	0.32	0.30
<i>Zea mays</i>	0.09	0.10	0.17	0.17	0.17

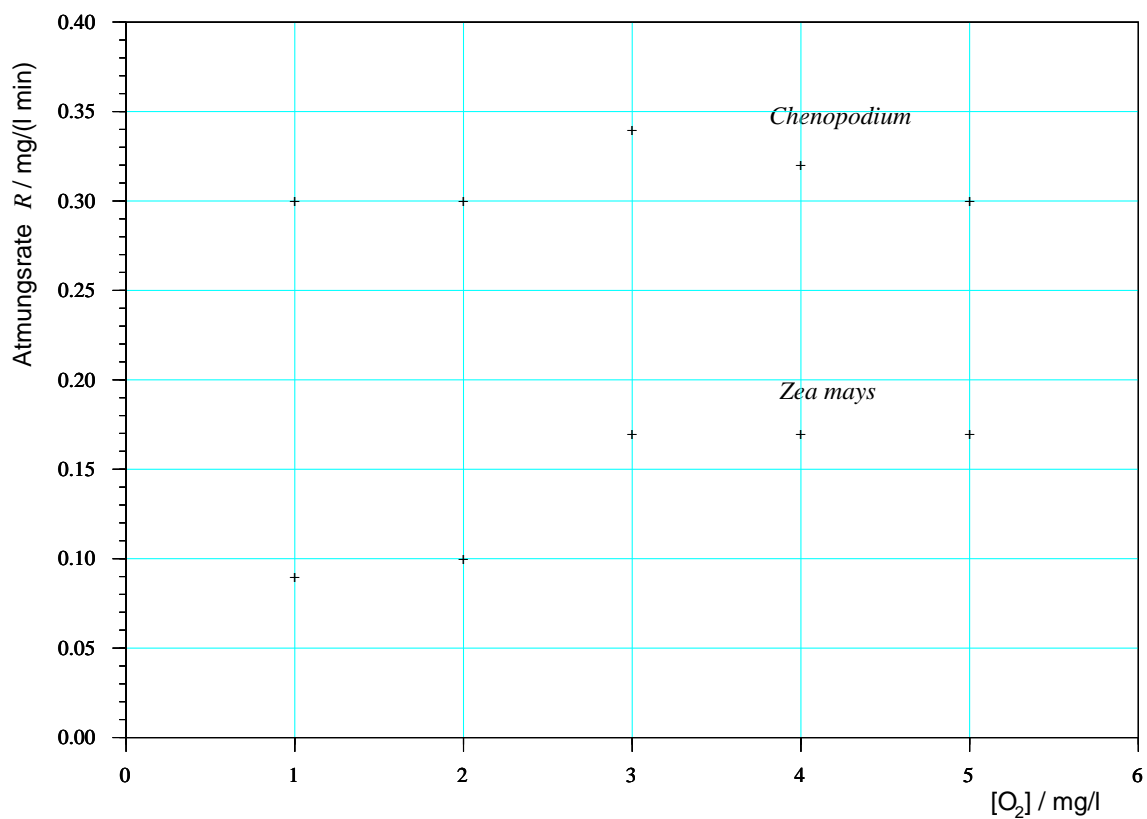


Abbildung 1: Atmungsrate R bei *Chenopodium* und *Zea mays*

¹DNP = Dinitrophenol

3 Berechnungen

Umrechnung von Schreibervorlauf y in Zeit t

$$t = \frac{y}{y_{\min}} \quad [t] = \text{min} \quad y_{\min} = \text{Vorlauf pro Minute (2.4 mm} \cdot \text{min}^{-1}\text{)}$$

Sauerstoffverbrauch M_{O_2}

$$M_{\text{O}_2} = \frac{\Delta[\text{O}_2]}{t \cdot [\text{Susp}]} \quad [M_{\text{O}_2}] = \frac{\mu\text{g}}{\text{min} \cdot \text{g}} \quad \begin{array}{l} \Delta[\text{O}_2] = \text{Sauerstoffverbrauch} \\ [\text{Susp}] = \text{Konzentration der Suspension} \end{array}$$
$$[\text{Susp}] = \frac{m}{V} \quad \begin{array}{l} m = \text{Masse Hefe/Chenopodium/Zea mays} \\ V = \text{Volumen des Nährmediums} \end{array}$$

Atmungsrate R

$$R = \frac{1}{t_2 - t_1} \quad t_1, t_2 = \text{Zeit, zwischen der die Atmungsrate gemessen wird}$$

4 Diskussion

4.1 Sauerstoffverbrauch ohne Inhibitoren für Hefe und *Chenopodium*

Unter der Annahme, daß die Zentralvakuole 90% der Frischmasse von *Chenopodium*-Zellen ausmacht, erhält man für Hefe und *Chenopodium* fast identische Werte für den Sauerstoffverbrauch.

Allerdings müßte der Anteil der Zentralvakuole am Frischgewicht bei *Chenopodium* experimentell (z. B. durch Trockengewichtsbestimmung) ermittelt werden, da hier ausgehend von nahezu gleichem Sauerstoffverbrauch auf ein Masseanteil der Vakuole rückgeschlossen wurde.

4.2 Cyanidwirkung, Atmungshemmung, alternativer Atmungsweg

Hefen besitzen keinen alternativen Atmungsweg, daher ist ihre Sauerstoffaufnahme² (und damit Atmung) bei Hemmung der Atmung durch Cyanid-Ionen stark verringert. Der alternative Atmungsweg höherer Pflanzen nutzt eine andere terminale Oxidase, die nicht durch Cyanid-Ionen gehemmt wird. Daher ist die Sauerstoffaufnahme bei *Chenopodium* nicht verringert.

Aus der leichten Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs bei *Chenopodium* könnte man auf eine geringere Affinität der Endoxidase des alternativen Atmungsweges für ihr Substrat schließen, allerdings ist der experimentell ermittelte Unterschied zu klein, um aussagekräftig zu sein.

4.3 Wirkung von Dinitrophenol

Dinitrophenol macht Membranen für Protonen permeabel, bewirkt also einen Abbau des Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran. Dadurch ist keine ATP-Synthese über die ATPase mehr möglich. Da die Regulation der Glycolyse aber direkt mit der zellulären ATP-Konzentration gekoppelt ist, wird die Durchsatzrate der Glykolyse unter diesen Bedingungen stark erhöht, was sich in einem stark erhöhten Sauerstoffverbrauch bemerkbar macht.

²gemessen als Abnahme der O_2 -Konzentration im Medium

4.4 Sauerstoffsättigung der Endoxidasen

Für die Cytochromoxidase konnte im vorliegenden Versuch keine Konzentration ermittelt werden, bei der ihre Sättigungskonzentration unterschritten wurde, der leichte Abfall unter ein mg O₂ ist ein (systematischer) Fehler des Meßaufbaus, der aus der Koppelung von O₂-Elektrode und y,t-Schreiber resultiert.

Für die Endoxidase des alternativen Atmungsweges muß dagegen eine minimale Sättigungskonzentration im Bereich von etwa 2.5–3 mg O₂ angenommen werden, da ab diesem Wert der Plot nichtlinear wurde.

4.5 Konzentrationsabhängigkeit der Atmungsrate

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, ist die Atmungsrate R für *Zea mays* unterhalb einer Konzentration von 3 mg O₂ von der Sauerstoffkonzentration abhängig. Bei *Chenopodium* konnte dieser Effekt dagegen nicht beobachtet werden³.

Die Erklärung hierfür ist, daß die Diffusion von Sauerstoff im Gewebe relativ langsam verläuft und daß die äußeren Zellen nur den von ihnen nicht benötigten Sauerstoff an weiter innen gelegene Gewebe abgeben. Daher treten unterhalb einer kritischen O₂-Konzentration anaerobe Zustände in den inneren Geweben der Wurzeln auf, die Atmungsrate sinkt. Ist hingegen genügend Sauerstoff im Medium vorhanden, um auch die inneren Gewebe ausreichend zu versorgen, nehmen auch diese an der Atmung teil, was experimentell an einer höheren Atmungsrate erkennbar ist.

Fehlerbetrachtung

Bekannt war, daß der Meßaufbau für niedrige O₂-Konzentrationen einen systematischen Fehler aufweist, der eine Nichtlinearität der Graphen in Richtung einer geringeren Konzentrations-Abnahme hervorruft.

Als weitere Fehler müssen die Ungenauigkeiten bezüglich wahren Meßvolumen und wahrer Masse des gemessenen Lebendmaterials genannt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Genauigkeit für die geforderte Interpretation der Meßwerte ausreichend war. Statistische Aussagekraft besitzen die Ergebnisse allerdings aufgrund der einmaligen Durchführung nicht.

Anlage: Meßgraphen des y,t-Schreibers

³Die Kurve für *Chenopodium* ist m. E. überhaupt nicht aussagekräftig, was wohl, wie der Vergleich mit anderen Gruppen nahelegt, an Meßfehlern liegen muß