

# Untersuchungen über den Einfluß von subbakteriostatischen Chloramphenicolkonzentrationen auf bakterielles Wachstum in kontinuierlicher Kultur

Von

R. Brunner, W. Oberzill und N. Matsché

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Brunner)

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 8. April 1967)

Subbakteriostatische Chloramphenicolkonzentrationen vermindern die Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterien. Die Zusammenhänge werden zuerst an stationären Kulturen betrachtet. Es folgt eine Untersuchung in kontinuierlicher Kultur, wobei neben Glucose als limitierendem Faktor verschiedene Chloramphenicolkonzentrationen angewendet werden. Die dabei festgestellte Konstanz der *Michaelis—Menten*-Konstante für die einzelnen Organismen, unabhängig von der angewendeten Chloramphenicolkonzentration, wird im Zusammenhang mit bestehenden Theorien über die Wirkungsweise von Chloramphenicol diskutiert.

Die kontinuierliche Züchtung ermöglicht das Wachstum von Mikroben unter konstanten kontinuierlichen Bedingungen. Die Wachstumsrate kann dabei mit Hilfe eines limitierenden Substrates beeinflusst werden, wie *Monod* bereits 1942 zeigte<sup>1</sup>.

Die dabei von ihm aufgestellte Beziehung

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S) \quad (1)$$

entspricht formal der *Michaelis—Menten*-Gleichung, wobei  $K_s$  hier diejenige Substratkonzentration bedeutet, bei der die Wachstumsrate

---

\* Herrn Prof. Dr. F. Wessely zu seinem 70. Geburtstag freundlichst gewidmet.

<sup>1</sup> J. Monod, Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Paris 1942.

den halbmaximalen Wert annimmt. Als jeweilige Substratkonzentration in einem kontinuierlichen Prozeß kann man bei guter Durchmischung die Konzentration des limitierenden Substrates im Ablauf ansehen. Bei Einhaltung konstanter Bedingungen stellt sich bei kontinuierlichen Züchtungen ein Gleichgewicht (steady state) ein, was sich in einer Konstanz der Populationsdichte zeigt. Mathematisch läßt sich dieser Gleichgewichtszustand folgendermaßen formulieren:

$$d X/d t = X_f \cdot F/V + \mu X - X \cdot F/V \quad (2)$$

Änderung der Organismenkonz. im Fermenter	Zunahme durch die Organismen im Zulauf	Zunahme durch Wachstum	Verlust im Ablauf
---	--	---------------------------	-------------------

$X$  Konzentration der Organismen  
 $X_f$  Konzentration der Organismen im Zulauf  
 $F$  Zulaufrate bzw. Ablaufrate (ml/Stde.)  
 $V$  Fermentervolumen.

Das Volumen des Fermenters kann man eliminieren, wenn man sich auf die Verdünnungsrate  $D = F/V$  bezieht. Nach Erreichen des steady state ist  $d X/d t = 0$  und das erste Glied  $X_f D$  verschwindet, wenn im Zulauf keine Keime vorhanden sind, so daß man schreiben kann

$$d X/d t = \mu X - D X = 0, \quad (3)$$

woraus folgt

$$\mu = D \quad (4)$$

Es zeigt sich also, daß die Wachstumsrate  $\mu$  der Organismen durch die Größe der Verdünnungsrate  $D$  in beliebigen Grenzen zwischen 0 und der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  gewählt werden kann. Der Einfluß von Chloramphenicol auf Organismenpopulationen unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultivierung sollte Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

#### Methodisches

Als Grundlage für die kontinuierlichen Versuche mußten vorerst die Werte der maximalen Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  für die verwendeten Organismen

- Escherichia coli B
- Staphylococcus aureus SG 511
- Aerobacter aerogenes ATCC 16092

in „Batch-Kultur“ ermittelt werden. Als Nährmedium diente dabei, wie auch bei allen nachfolgenden Versuchen, Bacto Penassay Broth (1 : 10 verdünnt, entsprechend 100 mg Glucose/l), die für die Batch-Versuche mit 200 mg Glucose/l zusätzlich versehen war, um zu verhindern, daß der Metabolismus des Zuckers während des Anwachsens limitierende Bedingungen schafft.

Die Versuche wurden unter den gleichen apparativen Bedingungen wie die nachfolgenden kontinuierlichen Versuche durchgeführt, wobei Rühren mit Magnetrührern oder Blattrührern auf das Ergebnis keinen Einfluß hatte.

Die Auswertung erfolgte hier durch photometrische Messung der Trübung bei 650  $\mu$ . Die Anwendung von manometrischen Atmungsmessungen am Warburg-Apparat erbrachte ebenfalls gut übereinstimmende Ergebnisse.

Alle Versuche wurden bei 37° C ausgeführt, wobei eine genaue Aufrechterhaltung der Temperatur durch die Aufstellung der Fermenter in thermostatierten Wasserbädern ermöglicht wurde.

Für die kontinuierlichen Versuche wurden Gefäße mit Planschliff verwendet, in deren Deckel sich 4 Öffnungen befanden. Die mittlere Öffnung diente zur Einführung des Rührers, die 3 seitlichen Öffnungen wurden für den Zulauf und den Ablauf der Nährlösung, sowie für den Druckausgleich, der zugleich die Versorgung mit Luftsauerstoff ermöglichte, benützt. Das Nutzvolumen der Gefäße betrug je 1000 ml.

Mit Hilfe von peristaltischen Schlauchquetschpumpen (Firma Bühler) erfolgte der Transport der Nährlösung. Es kamen zwei Pumpen mit unterschiedlicher Förderleistung zur Anwendung, so daß ein Förderbereich von 15 bis 3000 ml/Stde. zur Verfügung stand. Durch Absaugen der Nährlösung von der Flüssigkeitsoberfläche (mit größerer Geschwindigkeit als der des Zulaufs) wurde das Volumen im Fermenter konstant gehalten. Die unterschiedlichen Förderungen bei einer Pumpe konnten durch Verwendung verschiedener Schläuche verwirklicht werden. Wie die Verfolgung einzelner Versuche zeigte, konnte ein steady state nach dreimaligem Volumsaustausch angenommen werden. Die dafür in Frage kommenden Zeiten betragen z. B. für eine Verdünnungsrate

$$D = 1,5 \quad 2 \text{ Stunden}$$

$$D = 0,3 \quad 10 \text{ Stunden}$$

$$\left( t = \frac{3V}{F} \text{ dreifacher Volumsaustausch} \right) \text{ Zulauftrate}$$

Es wurden also frühestens nach den dafür in Frage kommenden Zeiten Proben zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Fließgleichgewicht gezogen. Für diese Bestimmungen standen verschiedene Methoden zur Auswahl. Eine Methode — mit Verwendung von 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phenol<sup>2</sup> — erwies sich als nicht ausreichend empfindlich. Auch mit der Methode nach *Somogyi*<sup>3</sup> und deren photometrischer Variante nach *Nelson*<sup>4</sup> konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Es mußte ja gefordert werden, daß noch Konzentrationen unter 10 mg Glucose/l genügend genau erfaßt werden konnten. Diese Empfindlichkeit konnte mit der Phenol—Schwefelsäure-Methode<sup>5</sup> erreicht werden, die auch bei den Versuchen zur Anwendung kam.

Nach der Entfernung der Keime und des in der Nährlösung noch vorhandenen Eiweißes mit Zinksulfat und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung wurden 2 ml der Probe mit 5 ml konzentrierter Schwefelsäure und 1 ml 5proz. wäßriger Phenollösung versetzt und die Intensität der entstandenen Färbung nach 10 Min. bei 485  $\mu$  am Spektralphotometer (Zeiss PMQ 2) ermittelt.

<sup>2</sup> *E. Borel, F. Hostettler und H. Deuel, Helv. Chim. Acta* **35**, 115 (1952).

<sup>3</sup> *M. Somogyi, J. Biol. Chem.* **160**, 61 (1945).

<sup>4</sup> *N. Nelson, J. Biol. Chem.* **153**, 315 (1944).

<sup>5</sup> *M. Dubois, K. A. Gilles, I. K. Gamilton, P. A. Rebers und F. Smith, Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).

Die Vorratsflaschen für die Nährlösung hatten ein Volumen von 5 l. Die Nährlösung wurde 20 Min. bei 121° autoklaviert und noch im heißen Zustand zur Vermeidung von Infektionen mit der gewünschten Menge an Chloramphenicollösung versehen und an den Fermenter angeschlossen. Probeläufe die ohne Beimpfung durchgeführt wurden, zeigten, daß die Apparatur steril betrieben werden konnte.

### Versuche und Ergebnisse

#### A. Untersuchungen in stationären Kulturen (Batch-Kulturen)

Chloramphenicol verringert die Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen; eine Darstellung im Koordinatensystem  $\ln$  (Organismenzahl) ge-

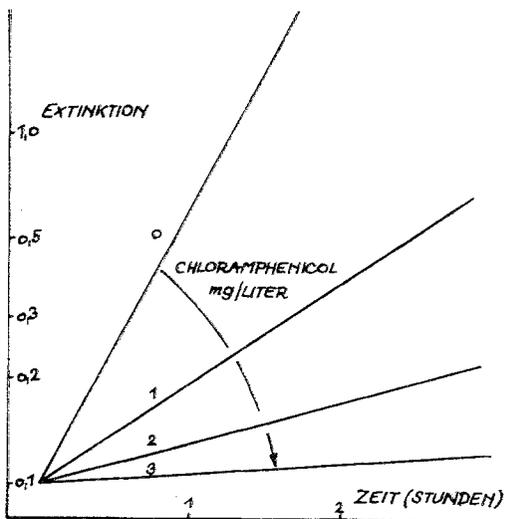


Abb. 1. Abnahme der Wachstumsrate  $\mu$  mit zunehmender Chloramphenicolkonzentration (schematisch)

gen Zeit zeigt die Abnahme der Wachstumsrate  $\mu$ , die aus dem Quotienten  $\Delta \ln X / \Delta t$  gebildet wird, mit zunehmender Chloramphenicolkonzentration (Abb. 1).

Im Bereich niederer Chloramphenicol-Konzentration wurde ein Zusammenhang aufgefunden, der sich mathematisch folgendermaßen formulieren läßt:

$$\ln \mu = \ln \mu_{\max} - kc \quad (5)$$

- $\mu_{\max}$  maximale Wachstumsrate ohne Chloramphenicol  
 $\mu$  jeweilige Wachstumsrate mit Chloramphenicol  
 $c$  Chloramphenicolkonzentration  
 $k$  Konstante

Bei einer graphischen Darstellung im Koordinatensystem  $\ln \mu$  gegen  $c$  erhält man dann eine Gerade, deren Anstieg  $-k$  und deren Ordinatenabschnitt  $\ln \mu_{\max}$  beträgt.

Bei Konzentrationen über 3 mg Chloramphenicol/l kann diese Beziehung jedoch nicht mehr angewendet werden, da die Gerade in eine Kurve und schließlich in eine Parallele zur Ordinate übergeht (Abb. 2). Der Schnittpunkt

dieser Parallelen mit der Abszisse stellt den MIC-Wert (minimal inhibitory concentration) für den Organismus unter den angewandten Bedingungen dar. Eine Gültigkeit von Beziehung (5) über einen weiteren Bereich würde be-

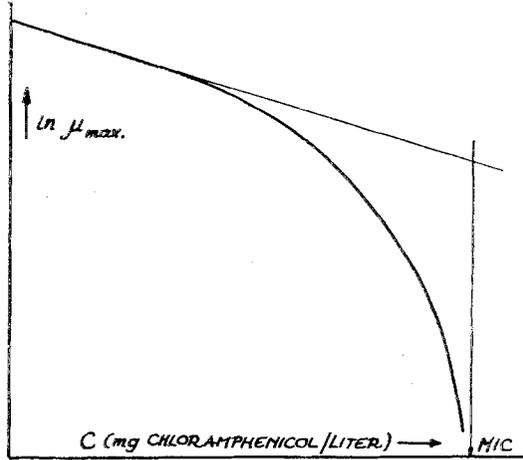


Abb. 2. Beziehung zwischen Wachstumsrate und Chloramphenicolkonzentration in Abhängigkeit vom Konzentrationsbereich (schematisch)

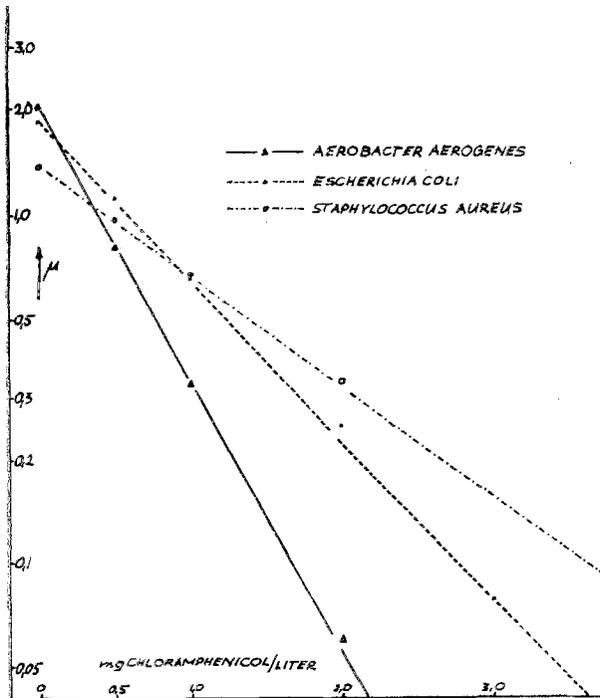


Abb. 3. Beobachtungspunkte der Beziehung zwischen Wachstumsrate und Chloramphenicolkonzentration im Bereich niedriger Konzentrationen

deuten, daß auch noch bei hohen Konzentrationen von Chloramphenicol Wachstum auftreten kann, was aber nicht der Fall ist. Die Beziehung (5) geht bei Konzentrationen über 3 mg Chloramphenicol/l in einen linearen Zusammenhang zwischen Wachstumsrate  $\mu$  und Chloramphenicolkonzentration  $c$  über, wie er auch von *Garrett* und *Brown*<sup>6</sup> festgestellt wurde.

Eine Zusammenstellung der Wachstumsraten für die drei verwendeten Organismen in Abhängigkeit von den Chloramphenicolkonzentrationen ist in Abb. 3 gegeben.

Da die Versuche mit Konzentrationen unter 3 mg Chloramphenicol/l durchgeführt wurden, kam die Darstellung im Koordinatensystem  $\ln \mu$  gegen  $c$  zur Anwendung. Aus der Abbildung ist deutlich die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Organismen ersichtlich. Die aus den stationären Versuchen erhaltenen Werte von  $\mu_{\max}$  dienten als Grundlage für die Versuche in kontinuierlicher Kultur.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  von der Chloramphenicolkonzentration

Testkeim	Wachstumsrate bei mg Chloramphenicol		
	0	1	2
<i>A. aerogenes</i>	2,02	9,33	0,06
<i>E. coli</i>	1,82	0,65	0,25
<i>St. aureus</i>	1,35	0,67	0,35

Tab. 1 gibt diese Werte an, die als Maximalwerte der Verdünnungsrate zu gelten hatten, andernfalls Auswaschung der Organismen eingetreten wäre.

#### B. Untersuchungen in kontinuierlichen Kulturen

Mit den Ergebnissen aus den stationären Versuchen ließen sich nun kontinuierliche Versuche durchführen. Das limitierende Substrat im Zulauf — in unserem Fall 100 mg Glucose/l — bewirkte dabei unterhalb der als Grenzwert geltenden Verdünnungsrate  $\mu_{\max} = D$  eine automatische Einstellung des Gleichgewichtes. Die Reihenfolge der Versuche wurde so gewählt, daß zuerst Versuche bei niedriger Organismendichte (d. h. hohe Verdünnungsrate) vorgenommen wurden und die Versuche mit höheren Organismendichten (niedrigere Verdünnungsrate) später durchgeführt wurden. Auf diese Weise wurde mit Sicherheit erreicht, daß die Einstellung des Gleichgewichtes nach dreimaligem Fermentervolumsaustausch erzielt war. Die aus diesen im Gleichgewicht befindlichen kontinuierlichen Systemen gezogenen Proben lieferten die in Tab. 2, S. 1338, zusammengefaßten Analysenwerte.

Die Abnahme der Glucosekonzentration im Ablauf mit der Verkleinerung der Verdünnungsrate ist aus den einzelnen Versuchsreihen deutlich ersichtlich. Bei Zulaufsraten über  $\mu_{\max}$  muß ja, da Auswaschung der Organismen eintritt, die Glucosekonzentration im Ablauf gleich der Konzentration im Zulauf sein; wenn die Zulaufsraten gegen 0 geht, muß die Konzentration dagegen ebenfalls gegen 0 gehen, da die kontinuierliche Kultur dann in eine statische übergegangen ist.

<sup>6</sup> *E. Garrett* und *M. Brown*, *J. Pharm. Pharmacol. Suppl.* 15, 195 (1963).

Tabelle 2. Abhängigkeit der Glucosekonzentration im Ablauf von der Verdünnungsrate  $D$  und der Chloramphenicolkonzentration

		Aerobacter aerogenes				
		Ohne Chloramphenicol				
Verdünnungsrate $D$		1,82	1,58	1,34	1,00	0,93
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		35,8	10,3	5,6	4,00	3,5
		Mit 1 mg Chloramphenicol/l				
Verdünnungsrate $D$		0,30	0,27	0,24	0,21	0,19
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		31,2	17,4	9,5	6,5	5,3
		Escherichia coli				
		Ohne Chloramphenicol				
Verdünnungsrate $D$		1,59	1,61	1,37	1,18	0,98
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		50	26,5	13,3	8,00	5,4
		Mit 1 mg Chloramphenicol/l				
Verdünnungsrate $D$		0,633	0,565	0,445	0,35	0,33
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		90,7	22,2	9,8	5,3	4,0
		Mit 2 mg Chloramphenicol/l				
Verdünnungsrate $D$		0,23	0,21	0,18	0,155	0,145
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		44,5	21,0	11,4	7,6	5,7
		Staphylococcus aureus				
		Ohne Chloramphenicol				
Verdünnungsrate $D$		1,18	0,99	0,765	0,485	0,415
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		62,5	28,6	11,5	5,7	4,5
		Mit 1 mg Chloramphenicol/l				
Verdünnungsrate $D$		0,58	0,46	0,33	0,27	0,19
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		66,7	21,0	10,5	7,3	4,2
		Mit 2 mg Chloramphenicol/l				
Verdünnungsrate $D$		0,25	0,16	0,145	0,135	
Glucosekonz. (mg/l)						
im Gleichgewicht		33,5	10,0	7,8	7,4	

Die graphische Darstellung der Ergebnisse für die einzelnen Keime (Abb. 4) läßt erkennen, daß bei der halbmaximalen Verdünnungsrate die Glucosekonzentration im Ablauf ( $S = K_s$ ) unabhängig von der Chloramphenicolkonzentration ist.

Bei der Auftragung der obigen Ergebnisse in einem Koordinatensystem  $1/D$  gegen  $1/S$  entsprechend der Darstellung nach *Lineweaver*

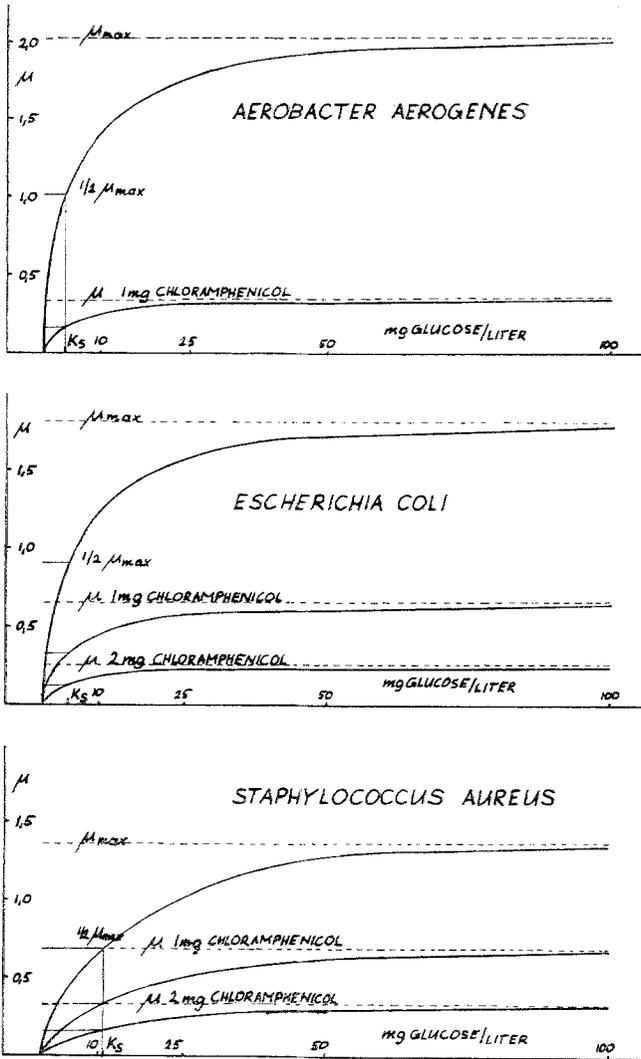


Abb. 4. Abhängigkeit der Glucosekonzentration im Ablauf von der Verdünnungsrate bei verschiedenen Chloramphenicolkonzentrationen

und *Burk* ergibt jede Versuchsreihe eine Gerade. Die *Monodsche* Gleichung der Form

$$D = D_{max} \cdot S / (K_s + S) \tag{6}$$

kann ja auch geschrieben werden als

$$1/D = K_s / D_{max} \cdot S + 1/D_{max}, \tag{7}$$

was die Gleichung einer Geraden im oben genannten Koordinatensystem ergibt. In Abb. 5 ist diese Auftragung für die einzelnen Organismen dargestellt. Der Schnittpunkt der einzelnen Geraden mit der Abszisse, der den

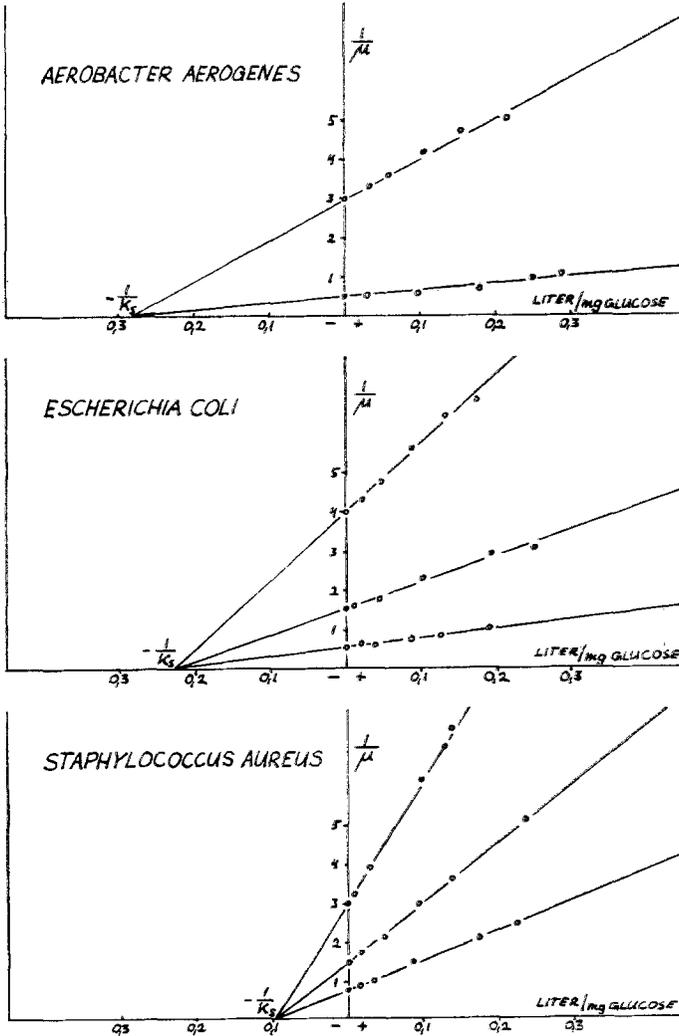


Abb. 5. Beziehungen wie in Abb. 4 in der Darstellungsweise nach Lineuaver—Burk

negativen reziproken Wert von  $K_s$  darstellt, ist dabei, wie auch schon in Abb. 4 gezeigt wurde, für jeden Organismus ein konstanter Wert.

#### Diskussion

Weil  $K_s$  immer denselben Wert annimmt, gleichgültig ob mit oder ohne Chloramphenicol gearbeitet wird, ist wohl anzunehmen, daß  $K_s$

nicht nur jene Substratkonzentration darstellt, bei der die Wachstumsrate den halbmaximalen Wert besitzt, sondern daß sich hinter  $K_s$  auch eine physiologisch bedeutsame Größe verbirgt. Da für enzymatische Reaktionen die *Michaelis—Menten*-Beziehung

$$v = v_{\max} \cdot S/(K + S) \quad (8)$$

gilt, hat die Analogie mit der Beziehung nach *Monod* sicher einen tieferen physiologischen Sinn.

Etwa so: das Wachstum wird durch Stoffwechselforgänge, die natürlich enzymatischer Natur sind, verursacht. Vielleicht ist es vor allem eine Reaktion (Masterreaktion) in der Stoffwechselkette, die hier zur Wirkung kommt; höchstwahrscheinlich sind aber hier sogar mehrere solcher Reaktionen involviert, für die ein  $K$  bzw. ein  $K_s$  für das Wachstum gilt.

Man könnte eventuell so formulieren:

$$\mu = \text{prop. } v \quad (9)$$

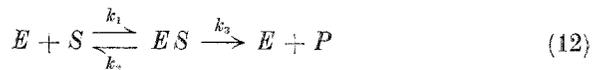
( $v$  = Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion bzw. Reaktionen)

Da 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot S/(K_s + S), \quad (10)$$

gilt 
$$\text{prop. } v = \text{prop. } v_{\max} \cdot S/(K_s + S). \quad (11)$$

Daraus ist zu sehen, daß das  $K$  von *Michaelis—Menten* mit dem  $K_s$  von *Monod* identisch ist.

Nach *Michaelis—Menten* galt ja



Die Geschwindigkeit, mit der  $P$  gebildet wird, ist der Konzentration von  $ES$  proportional, welche wieder von den Konzentrationen von  $E$  und  $S$  abhängt.

$$k_1 [E] [S] - k_2 [ES] = k_3 [ES] \quad (13)$$

aus

$$K = [E_{\text{auf}} - ES] \cdot S/[ES] \quad (14)$$

folgt

$$ES = E_{\text{anf}} \cdot S/(K + S) \quad (15)$$

da  $v = \text{prop.} \cdot ES$  und  $v_{\max} = \text{prop.} \cdot E_{\text{anf}}$  (wenn alles anfängliche Enzym als  $ES$  vorliegt) also

$$v = v_{\max} S/(K + S) \quad (16)$$

Wenn nun in der Gleichung von *Monod* das  $K_s$  dem  $K$  von *Michaelis—Menten* entspricht, bedeutet die Gleichheit des  $K_s$  bei den Wachstumsprozessen mit und ohne Chloramphenicol, daß das Chloramphenicol die

Affinität des Enzyms, die ja durch  $K$  angegeben wird (der Enzyme der Stoffwechselkette der Wachstumsprozesse), zum Substrat nicht ändert.

Die Tatsache, daß bei der Batch-Fermentation das  $\mu_{\max}$  mit steigender Chloramphenicolkonzentration immer kleiner wird, ist jedenfalls darauf zurückzuführen, daß auch die Anfangskonzentration der beteiligten Enzyme abnimmt. Chloramphenicol drängt also die Bildung der Enzyme zurück. Dadurch wird die Wachstumsrate bei zunehmender Chloramphenicolkonzentration immer geringer.

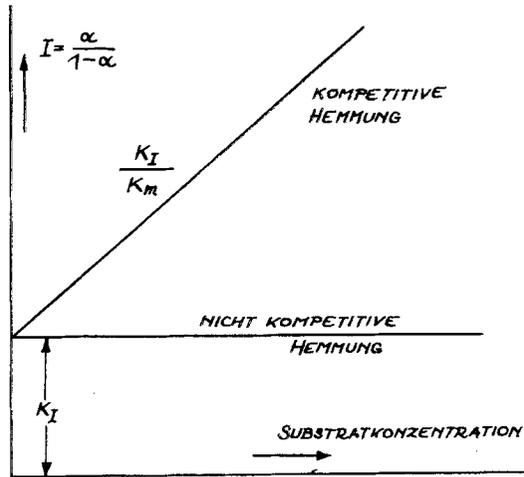
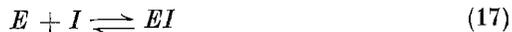


Abb. 6. Kompetitive und nicht kompetitive Enzymhemmung (schematisch)

Eine mögliche Beeinflussung der Enzymwirkung durch kompetitive Hemmung ist hier durch die große Verschiedenheit von Substrat (Glucose) und Inhibitor (Chloramphenicol) wohl nicht zu erwarten.

Für den Fall einer eventuellen nichtkompetitiven Hemmung, bei der der Inhibitor eine andere aktive Stelle des Enzyms besetzt als das Substrat, müßte gelten.



$$K_i = \frac{[E - EI] \cdot [I]}{[EI]} \quad (18)$$

Wenn man das Verhältnis  $v$  (= prop.  $[E - EI]$ ) zu  $v_0$  (= prop.  $E$ ) der Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors zur ungehemmten Geschwindigkeit mit  $\alpha$  bezeichnet, kann man weiter schreiben

$$EI = E \cdot (1 - \alpha), \text{ woraus sich} \quad (19)$$

$$I \cdot \alpha / (1 - \alpha) = K_i \quad (20)$$

ergibt.

Eine graphische Darstellung für die verschiedenen Hemmungstypen ist in Abb. 6 angegeben.

Der als „fractional activity“ bezeichnete Wert  $\alpha$  müßte dann ebenso für das Verhältnis  $\mu$  (mit) :  $\mu_{\max}$  (ohne) [wobei  $\mu_{\max}$  (ohne) die Wachstumsrate ohne Chloramphenicol darstellt] gelten. Aus der aufgefundenen linearen Beziehung

$$\ln \mu = \ln \mu_{\max} - kc$$

für die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Chloramphenicolkonzentration kann man ableiten:

$$\ln (\mu/\mu_{\max}) = \ln \alpha = -kc = -k [I] \quad (21)$$

$$\ln \alpha/[I] = -k. \quad (22)$$

Der offensichtliche Unterschied der beiden Beziehungen (20) und (22) zeigt also deutlich, daß es sich im vorliegenden Fall auch nicht um eine nichtkompetitive Hemmung handeln kann.

In Anwesenheit von Chloramphenicol wird die bakterielle Proteinsynthese gehemmt<sup>7</sup>. Da nun Enzyme Proteine darstellen, ist der Schluß, daß es sich hier um eine Hemmung der Enzymsynthese ohne Änderung der Affinität der Enzyme handelt, naheliegend. Die verlangsamte Reaktions- bzw. Wachstumsgeschwindigkeit ist dann nur auf die geringere Enzymkonzentration zurückzuführen.

<sup>7</sup> S. Dagley und J. Sykes, *Biochem. J.* **74**, 11 (1960).