

Isolierung und Charakterisierung Antipyrin-abbauender Bakterien

Isolation and Characterization of Antipyrine-degrading Bacteria

Hartmut Blecher, Renate Blecher, Rudolf Müller und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim

Z. Naturforsch. **33 c**, 120–123 (1978) ; eingegangen am 27. Oktober 1977

Antipyrine, Chloridazon, Bacterial Degradation, Catechol: Oxygen 2,3-Oxidoreductase

Five different strains of bacteria utilizing antipyrine as sole source of carbon were isolated from soil. It was shown by morphological and physiological examinations, that the new isolates are closely related to strains selected with the herbicide chloridazon. All of these bacteria are characterized by special features and cannot be classified according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Part of the strains which were selected with antipyrine not only grow with antipyrine but also with chloridazon. The others cannot be grown on chloridazon. However, resting cells of the latter group convert chloridazon to its catechol derivative (5-amino-4-chloro-2 (2,3-dihydroxyphenyl)-3(2H)-pyridazinone). In these bacteria a catechol-2,3-dioxygenase (catechol: oxygen 2,3-oxidoreductase, EC 1.13.11.2) was found which readily catalyzes the cleavage of the catechol derivative of antipyrine (2,3-dimethyl-1-(2,3-dihydroxyphenyl)-pyrazolone(5)). The enzyme shows only slight activity with the corresponding derivative of chloridazon.

Aus Bodenproben sehr verschiedener Klimagebiete [1–3] konnten Bakterien isoliert werden, die mit Chloridazon, dem Wirkstoff des rübenselktiven Herbizids Pyramin®, als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können. Beim Wachstum wird der Benzolteil dieser Verbindung abgebaut und als Kohlenstoffquelle verwendet [4–6]. Diese Bakterien (außer einem Stamm, der aus nordamerikanischer Erde isoliert wurde) können in entsprechender Weise auch den Benzolteil des Antipyrins verwerten und so mit Antipyrin wachsen [7].

Alle diese Bakterienstämme erwiesen sich untereinander als sehr ähnlich, waren aber taxonomisch noch nicht einzuordnen. In diesem Zusammenhang war es für uns von Interesse, anstelle von Chloridazon als Selektionsmittel Antipyrin einzusetzen und so direkt nach Bakterien mit der Fähigkeit zum Antipyrinabbau zu suchen. Dabei sollte vor allem geprüft werden, ob hierbei wiederum die gleichen Bakterien angereichert werden.

Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

Material und Methoden

Kulturmedien

Minimalmedium (Mineralsalzmedium): KH_2PO_4 0,875 g, K_2HPO_4 0,125 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, NaCl 0,1 g, $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g,

H_3BO_3 0,5 mg, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg, KJ 0,1 mg, $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg, $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg, Vitamin B_{12} 0,03 mg, deionisiertes Wasser 1000 ml. Das Medium wurde mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,8–7,0 eingestellt. Dem Mineralsalzmedium wurde die jeweilige Kohlenstoffquelle in Konzentrationen zwischen 0,05% bis 0,1% zugesetzt.

Komplettmedium A: Yeast Extract 5 g, Nutrient broth Difco 10 g, NaCl 5 g, deionisiertes Wasser 1000 ml. Komplettmedium B: Yeast Extract 1 g, Pepton 1 g, deionisiertes Wasser 1000 ml. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 1,5% Agar (Difco) zugesetzt. Sämtliche Medien wurden 20 min bei 121 °C sterilisiert; hitzelabile Substanzen wurden aseptisch zugesetzt.

Anreicherung und Isolierung der Bakterienstämme

300 g Erde wurde in einem Plastikblumentopf mit 300 mg Antipyrin vermischt und bei 30 °C mit deionisiertem Wasser feucht gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 6 Monaten wurden 5g Erde in 100 ml Mineralsalzmedium, das 50 mg Antipyrin enthielt, auf einer Schüttelmaschine bei 30 °C inkubiert. Nach etwa 5 Transfers, die zuletzt in immer kürzeren Abständen durchgeführt werden konnten, wurde die Zellsuspension auf Agarplatten ausgestrichen, die wiederum als einzige Kohlenstoffquelle Antipyrin enthielten. Durch mehrmaliges Überimpfen von Einzelkolonien wurden die Stämme in Reinkultur gebracht.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens, Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 20.



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.

Kultivierung der Stämme

Alle Stämme wurden wöchentlich auf Antipyrin-Mineralsalzagar überimpft, 3 Tage bei 30 °C inkubiert und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Überprüfung auf Kontaminationen

Da sämtliche bisher über Chloridazon oder Antipyrin selektierten Bakterienstämme nicht auf dem oben angegebenen Komplettnutrientmedium A wachsen, kann durch einen Ausstrich auf dieses Medium die Reinheit eines Stammes überprüft werden. Kontaminanten wachsen normalerweise auf diesem Komplettnutrientmedium und können so auf einfache Weise erkannt werden.

Antibiotika-Empfindlichkeit

Die Stämme wurden auf Antipyrin-Mineralsalzagar ausplattiert und bei 30 °C vorinkubiert. Nach 12 Stunden wurden mit verschiedenen Antibiotika getränkte Multidisk- und Einzelplättchen der Firma Oxoid, London, aufgelegt. Nach 4 Tagen wurden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen und verglichen.

Enzymtest

Die Aktivität der Metapyrocatechase wurde bestimmt, indem das nicht verbrauchte Substrat mit Nitrit-Molybdat-Reagenz [8] umgesetzt und die Extinktion des entstehenden, rot gefärbten Reaktionsprodukts spektrophotometrisch gemessen wurde.

Durchführung: 10–100 µl Enzymlösung werden mit 10 µl 0,005 M $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 ad 300 µl 5 min vorinkubiert. Dann werden 200 µl 10^{-3} M Substratlösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 30 °C wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 0,5 N HCl unterbrochen. Dann werden 0,5 ml Nitrit-Molybdat-Reagenz und 0,5 ml 1 N NaOH zugegeben und der rot gefärbte Komplex bei 512 nm gemessen.

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0,25 mm auf Glas) der Merck AG, Darmstadt, durchgeführt. Laufmittelsystem für den Nachweis des Brenzkatechinderivats des Chloridazons: Benzol/Äthanol/Aceton 9 : 2 : 1 (v/v). Laufmittelsystem für den Nachweis des Antipyrin-Heterocyclus: Essigester/Benzol/Triäthylamin 90 : 10 : 3 (v/v).

Ergebnisse

Isolierung der Stämme

Es wurden 13 verschiedene Bodenproben mit Antipyrin inkubiert; aus 5 Proben wurde je 1 Bakterienstamm in Reinkultur isoliert. Die Stämme A₆ und A₁₄ wurden aus Komposterde (Botanischer Garten, Stuttgart-Hohenheim), die Stämme A₁₂ und A₁₃ aus einer schlammhaltigen Erde eines Bachrandes (Bad Wimpfen) und der Stamm A₁₁ aus Walderde (Bad Wimpfen) isoliert.

Charakterisierung der Stämme

Alle Stämme wachsen langsam und bilden auf Antipyrin-Mineralsalzagar erst innerhalb von 2–3 Wochen Kolonien mit einem Durchmesser von 1–2 mm aus. Diese sind rund, ganzrandig, schwach konvex und weiß. Stamm A₁₂ bildet cremige, glänzende Kolonien, während die anderen Stämme feste, trockene, matte Kolonien ausbilden.

Morphologisch zeigen die Stämme A₆ und A₁₂ das für Chloridazon-abbauende * Bakterien typische Bild [2, 3]. Sie bilden kokkoide Formen bis Kurzstäbchen aus ($0,7 \times 1,0$ – $1,0 \times 1,8$ µ), die einzeln und in Paaren auftreten und – besonders bei Stamm A₁₂ – auch kurzgliedrige Ketten bilden. Vereinzelt können auch Stäbchen (bzw. Filamente) von unterschiedlicher Länge und Dicke auftreten. Selten sind eiförmige oder kugelige Cysten zu sehen.

Im Unterschied zu dem oben beschriebenen morphologischen Bild bestehen die Stämme A₁₁, A₁₃ und A₁₄ nur aus kokkoiden Formen, die kleiner sind (Durchmesser etwa 0,7 µm) als bei den übrigen Stämmen und meistens in Klumpen vorliegen. Bei allen 5 Stämmen sind Gram- und Ziehl-Neelsen-Färbung negativ. Das Wachstum ist aerob. Das Temperaturoptimum liegt bei 30 °C. N₂ wird nicht fixiert. Cytochromoxidase: bei allen Stämmen schwach positiv. Katalase: positiv bei den Stämmen A₆ und A₁₂, schwach positiv bei den Stämmen A₁₁, A₁₃ und A₁₄. Die Stämme A₆, A₁₂ und A₁₄ benötigen Vitamin B₁₂ als Wachstumsfaktor, während die Stämme A₁₁ und A₁₃ Vitamin B₁₂ selbst synthetisieren.

Alle Stämme wachsen nicht auf normal konzentrierten Komplettnutrientmedien. Das unter Material und Methoden angegebene Komplettnutrientmedium A wirkt geradezu hemmend auf das Wachstum der Stämme.

* In früheren Veröffentlichungen „Pyrazon-abbauende Bakterien“ genannt.

Deshalb erwies sich dieses Medium als sehr geeignet für eine Überprüfung auf Kontaminationen: Streicht man die Stämme auf Agarplatten mit diesem Komplettmedium aus und es tritt Wachstum auf, dann liegt mit Sicherheit eine Kontamination vor. Nur auf sehr stark verdünnten Komplettmedien (z. B. Komplettmedium B) kommt es nach etwa einer Woche zu geringem Wachstum. Zur Gewinnung von Zellmasse oder zur fortlaufenden Kultivierung dieser Stämme (z. B. in Stammsammlungen) sind Komplettmedien aber nicht geeignet.

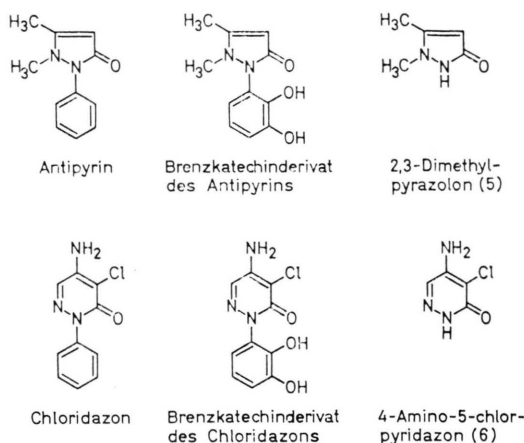
Einfache, definierte Verbindungen wie Zucker, Alkohole, Aminosäuren (außer L-Phenylalanin), Mono- und Dicarbonsäuren werden entweder gar nicht oder nur in ganz geringem Umfang als Kohlenstoffquellen genutzt.

Nur auf bestimmten aromatischen Verbindungen lassen sich diese Bakterien mit guter Zellausbeute züchten. So wachsen die Stämme A₆ und A₁₂ auf Antipyrin, Chloridazon, Aminoantipyrin, Phenyl-essigsäure und (mit einer lag-Phase von 2–4 Wochen) auf L-Phenylalanin. Die Stämme A₁₁, A₁₃ und A₁₄ wachsen auf Antipyrin, Aminoantipyrin, Pyramidon und L-Phenylalanin (mit einer lag-Phase von beinahe 5 Wochen), aber nicht auf Chloridazon und Phenyllessigsäure.

Im Gegensatz zu Antipyrin und strukturanalogen Verbindungen wird L-Phenylalanin von den Bakterien nicht nur als Kohlenstoffquelle, sondern auch als Stickstoffquelle genutzt.

Analog zu den bisher beschriebenen Abbau-schemata [4, 7] wird auch von allen 5 neu isolierten Stämmen nur der Benzolteil des Antipyrins verwertet. Der Heterocyclus des Antipyrins [2,3-Dimethylpyrazolon(5)] wird im Medium akkumuliert und nicht weiter abgebaut. Sämtliche Stämme sind osmotisch empfindlich, d. h., sie wachsen nicht in einem Minimalmedium, das eine Salzkonzentration >1,2% enthält (Substratkonzentration 0,1%).

Im Antibiotogramm sind alle 5 Stämme sensitiv gegenüber Ampicillin (10 µg), Tetracyclin (10 µg), Chloramphenicol (10 µg), Streptomycin (25 µg), Kanamycin (5 µg), Neomycin (10 µg) und Bacitracin (10 µg); alle Stämme sind resistent gegenüber Erythromycin (10 µg), Cloxacillin (5 µg), Methicillin (10 µg), Colistinsulfat (10 µg), Fusidinsäure (10 µg), Cephaloridin (5 µg), Lincomycin (2 µg) und Sulfafurazol (100 µg). Nur bei zwei der untersuchten Antibiotika ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse: gegenüber Penicillin (10 Einheiten) ist



nur Stamm A₁₄ sensitiv, gegenüber Novobiocin (5 µg) ist nur Stamm A₆ sensitiv, die anderen Stämme sind jeweils resistent.

Akkumulation des Brenzkatechinderivats des Chloridazons

Obwohl die Stämme A₁₁, A₁₃ und A₁₄ Chloridazon nicht abbauen, so ist doch in Chloridazon-Mineral Salzmedium ein geringfügiges Wachstum zu beobachten, das von einer Dunkelfärbung des Mediums begleitet wird. Da diese Braun-Schwarzfärbung auf phenolische Hydroxylgruppen schließen ließ, wurde mit Nitrit-Molybdat-Reagenz [8] auf ein Brenzkatechinderivat geprüft. Der Test verlief bei allen 3 Stämmen positiv.

Dünnschichtchromatographisch konnte das Brenzkatechinderivat des Chloridazons [5-Amino-4-chlor-2(2,3-dihydroxyphenyl)-3(2H)-pyridazinon] im Vergleich mit der authentischen Substanz nachgewiesen werden. Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß das Unvermögen der Stämme A₁₁, A₁₃ und A₁₄ auf Chloridazon zu wachsen, auf eine Veränderung der Metapyrocatechase (Catechol: oxygen 2,3-oxidoreductase, EC 1.13.11.2) [9] gegenüber den anderen Chloridazon-abbauenden Bakterien zurückzuführen ist. Daher wurden die Substratspezifitäten der Metapyrocatehasen aus Chloridazon-abbauenden Bakterien (Stamm E) und aus Antipyrin-abbauenden Bakterien (Stamm A₁₃) miteinander verglichen.

Wie Tab. I zeigt, spaltet die Metapyrocatechase aus Chloridazon-abbauenden Bakterien das Brenzkatechinderivat des Chloridazons nur wenig schlechter als das Brenzkatechinderivat des Antipyrins. Dagegen spaltet die Metapyrocatechase aus Antipyrin-abbauenden Bakterien das Derivat des Chloridazons

Tab. I. Substratspezifität der Metapyrocatechase aus Chloridazon-abbauenden Bakterien (Stamm E) im Vergleich zur Metapyrocatechase aus Antipyrin-abbauenden Bakterien (Stamm A₁₃).

Substrat	Stamm E	Stamm A ₁₃
2,3-Dimethyl-1-(2,3-dihydroxy-phenyl)-pyrazolon (5)	100%	100%
5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxy-phenyl)-3 (2H)-pyridazinon	64,3%	7,2%

sehr viel schlechter als das Derivat des Antipyrins. Diese Ergebnisse erklären, warum die Chloridazon-abbauenden Bakterien sowohl auf Chloridazon als auch auf Antipyrin wachsen, während die Stämme A₁₁, A₁₃ und A₁₄ nur auf Antipyrin wachsen. Dieser enzymatische Block läßt sich zur Herstellung größerer Mengen des Brenzkatechinderivats des Chloridazons ausnützen: In einem 10l-Fermentor (1 g Antipyrin/l) wird der Stamm A₁₁ gezüchtet, abzentrifugiert, gewaschen und unter „resting cells“-Bedingungen in 1 l Chloridazon-Mineralsalzmedium (1 g Chloridazon/l) inkubiert. Etwa 40% der eingesetzten Chloridazonmenge wird innerhalb von 12 Stunden in das entsprechende Brenzkatechinderivat umgewandelt.

Diskussion

Aus verschiedenen Erdproben konnten 5 Bakterienstämme isoliert werden, die mit Antipyrin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Diese Stämme sind untereinander sehr ähnlich; bei allen morphologischen und physiologischen Untersuchungen ergab sich auch eine weitgehende Übereinstimmung mit den Stämmen, die bisher über Chloridazon selektioniert worden waren. Das bedeutet, daß man die

sogenannten „Chloridazon-abbauenden“ Bakterien genauso gut mit der strukturanalogen Verbindung Antipyrin isolieren kann. Drei der so mit Antipyrin selektionierten Stämme wachsen zwar nicht auf Pyrazon; nach den bisherigen Untersuchungen beruht dieser Unterschied aber nur auf der Veränderung eines einzigen Enzyms, so daß sich auch diese Stämme nicht grundsätzlich von den übrigen Chloridazon-abbauenden Bakterien unterscheiden.

Wir nehmen an, daß es sich bei diesen Bakterien um eine noch nicht beschriebene, neue Gattung handelt, denn die Stämme lassen sich nicht mit Hilfe von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [10] einordnen. Dies ist leicht dadurch zu erklären, daß diese Bakterien mit den in der Mikrobiologie üblicherweise verwendeten Nährböden überhaupt nicht erfaßt werden können und bisher ausschließlich mit Chloridazon oder Antipyrin aus Erde selektioniert werden konnten. Dieses Bakterium scheint allerdings ubiquitär verbreitet zu sein, denn es wurde bereits aus Erdproben von 3 verschiedenen Erdteilen isoliert. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Boden vorher je mit Antipyrin oder Chloridazon behandelt wurde. Es stellt sich damit die Frage, welche Verbindungen dieses Bakterium an seinem natürlichen Standort als Kohlenstoffquelle verwertet. Eventuell handelt es sich um Phenylalanin und seine Abbauprodukte. Diese Verbindungen sind neben Chloridazon und Antipyrin bisher die einzigen bekannten Substrate, auf denen diese Bakterien gezüchtet werden können.

Fräulein B. Ballhause danken wir sehr für ihre Mithilfe bei dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

- [1] K. C. Engvild u. H. L. Jensen, *Soil Biol. Biochem.* **1**, 295–300 (1969).
- [2] C. Fröhner, O. Oltmanns u. F. Lingens, *Arch. Mikrobiol.* **74**, 82–89 (1970).
- [3] F. Lingens, R. Blecher, H. Blecher u. U. Koch, *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* **84**, 684–690 (1977).
- [4] E. De Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **33**, 357–363 (1973).
- [5] F. Blobel, J. Eberspächer, S. Haug u. F. Lingens, *Z. Naturforsch.* **31 c**, 756 (1976).
- [6] F. Blobel, J. Eberspächer u. F. Lingens, *Z. Naturforsch.* **31 c**, 757 (1976).
- [7] K. Sauber, R. Müller, E. Keller, J. Eberspächer u. F. Lingens, *Z. Naturforsch.* **32 c**, 557–562 (1977).
- [8] L. E. Arnow, *J. Biol. Chem.* **118**, 531–537 (1937).
- [9] R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 797–805 (1977).
- [10] R. E. Buchanan u. N. E. Gibbons (Hrsg.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. Auflage, Williams and Wilkins, Baltimore 1974.