

Die Bildung hydroxylierter Phenazine durch *Pseudomonas fluorescens* Y₄ bei Be²⁺-Zusatz zum Kulturmedium – ein Abwehrmechanismus? [1]

The Formation of Hydroxylated Phenazines by *Pseudomonas fluorescens* Y₄ upon Addition of Be²⁺ to the Culture Medium – a Defense Mechanism?

K. Taraz, E. M. Schaffner und H. Budzikiewicz

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, Greinstraße 4,
D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

H. Korth und G. Pulverer

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Köln,
Goldenfelsstraße 21, D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **46c**, 194–196 (1991); received July 9, 1990/February 1, 1991

Pseudomonas fluorescens, Phenazines, Be²⁺ Stress

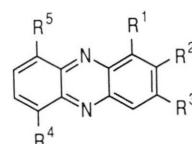
Pseudomonas fluorescens Y₄ grown in an iron deficient medium produces increased amounts of 2,9-di- and 2,3,9-trihydroxyphenazine-1-carboxylic acid when Be²⁺ is added to the culture. The significance of the formation of these compounds is discussed.

Einleitung

Bei unseren systematischen Untersuchungen der Bakteriengattung *Pseudomonas* sind wir auf einen Stamm (Y₄) von *Pseudomonas fluorescens* gestoßen, der durch erstaunlich hohe Be²⁺-Konzentrationen (~1,1 mmol/l) in seinem Wachstum kaum beeinträchtigt wird. Dies ist insofern ungewöhnlich, als sich in der Literatur Angaben finden, denen zufolge bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* deutliche Wachstumshemmungen bei ~0,01 mmol/l und ein Überleben nur weniger Zellen bei ~0,02 mmol/l beobachtet wurden (bei diesen Zellen konnte die Be²⁺-Verträglichkeit allerdings bis ~0,17 mmol/l gesteigert werden) [2–5]. Be²⁺ ist ein Zellgift, das bei Tieren die DNS-Replikation beeinflusst und eine Reihe von Enzymen hemmt. Es schien daher von Interesse zu untersuchen, wie der Stamm Y₄ auf Be²⁺-Zusatz zum Nährmedium reagiert.

Materialien und Methodik

Der Stamm Y₄, das Kulturmedium und die Anzucht von der auf Agar-Platten bei 5 °C aufbewahrten Stammkultur sind ebenso wie die Isolierung der Phenazinderivate **1–5** und deren Strukturermittlung in Ref. [6] beschrieben. Alle



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	H	H	H	H	H
2	COOH	H	H	H	H
3	COOH	H	H	COOH	H
4	COOH	OH	H	H	OH
5	COOH	OH	OH	H	OH

Zeitangaben in dieser Arbeit beziehen sich auf die durch das letztmalige Überimpfen erhaltenen 1-l-Kulturen. Da die Zucht unter Eisenmangelbedingungen erfolgte (bei Zusatz von 50 mg/l FeSO₄·7H₂O beobachtet man keine Phenazinbildung), wurde zur Prüfung, ob Siderophore gebildet werden, der durch Zentrifugieren vom Zellmaterial befreiten Kulturlösung bei pH 3,5, 5,0 und 6,0 Fe³⁺ zugesetzt. Absorptionsmessungen vor und nach Fe³⁺-Zusatz ergaben keine Unterschiede, insbesondere fehlten auch die für Fe³⁺-Komplexe typischen Charge-transfer-Banden oberhalb 400 nm [7]. Das Zellwachstum wurde durch Messung der scheinbaren Extinktion bei 675 nm verfolgt

Reprint requests to Prof. Dr. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939-5075/91/0300-0194 \$ 01.30/0



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 digitized 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.

(Abb. 1). Um sicherzustellen, daß die so bestimmte höhere Zelldichte bei Zusatz von Berylliumsalzen zum Kulturmedium nicht durch absorbierende Substanzen bzw. Salzfällungen nur vorgetäuscht wird, haben wir in einem Kontrollexperiment die effektiven Zellzahlen N durch Auszählen bestimmt. Die Kurven $\log_2 N/\text{Zeit}$ bei Zusatz von 0,50 und 150 mg/l $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ nehmen denselben Verlauf wie die Extinktionskurven Abb. 1.

Die Phenazinproduktion wurde bis zum Ausfallen eines roten Niederschlags von **4** und **5** durch Messung der Absorption bei 370 nm eines CHCl_3 -Extraktes der durch Zentrifugieren vom Zellmaterial befreiten angesäuerten Kulturlösung verfolgt (ausgefallene **4** und **5** lösen sich nur schlecht in organischen Lösungsmitteln). Die quantitative Bestimmung am Ende der jeweiligen Zuchtvorschüsse erfolgte durch Auswertung der HPLC-Diagramme der permethylierten Lösungsgemische nach Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit für die einzelnen Komponenten mittels authentischen Materials.

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt, daß gegenüber Normalbedingungen (Kurve 1) die Anlauf-(lag)-Phase verzögert ist, die Steigungen der Wachstumskurven in den exponentiellen (log-) Phasen etwa gleich sind, dafür aber die stationären Phasen bei Be^{2+} -Zusatz beträchtlich kürzer, die Zellproduktion insgesamt

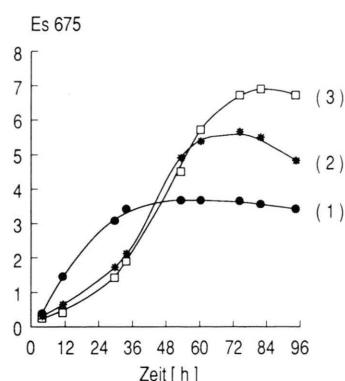


Abb. 1. Wachstumskurven bei pH 6,0–6,5 (1: ohne, 2: mit 50 mg/l, 3: mit 150 mg/l $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Zusatz). Bestimmung der Zelldichte durch Messung der scheinbaren Extinktion bei 675 nm.

aber höher ist. Während der Anfangsphasen wurde durch Extinktionsmessung parallel die Gesamtphenazinproduktion bestimmt. In Kulturansätzen ohne Be^{2+} beobachtete man nach ca. 10 h einen deutlichen Extinktionsanstieg, bei Be^{2+} -Zusatz erst nach ca. 24 h einen langsam ansteigenden entsprechend der verzögerten lag-Phase. Nach weiteren 12 h zeigte sich vermehrte Phenazinproduktion entsprechend der Konzentrationsreihe 0:50:150 mg/l $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Dies spiegelt sich auch in den Endwerten nach 96 h wider (s. Tab. I). Während der Absterbephase verringert sich wieder der Phenazingehalt.

Tab. I. Phenazinproduktion unter Be^{2+} -Einfluß.

pH	7,0–7,5			6,5–7,5			6,0–6,5			6,0–6,5		
Zeit [h]	96			96			96			180		
$\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	0	50	150	0	50	150	0	50	150	0	50	150
1 mg/l	0,3	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,5	0,2	0,3	0,0		
%	8,1	2,4	1,3	5,8	2,2	0,8	5,2	0,9	1,3	0,0		
2 mg/l	1,0	0,2	0,6	2,8	1,4	1,2	6,0	1,1	1,0	0,6		
%	27,0	4,9	7,7	40,6	15,4	8,7	61,9	5,2	3,9	6,1		
3 mg/l	0,0	0,4	0,5	0,0	0,9	1,0	0,2	1,6	2,3	0,0		
%	0,0	9,8	6,4	0,0	9,8	7,9	2,1	7,9	9,0	0,0		
4 mg/l	2,4	3,4	6,6	3,7	6,7	11,5	3,0	13,1	17,4	7,5		
%	64,9	83,0	84,6	53,6	72,8	83,3	30,9	63,3	68,0	75,8		
5 mg/l	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	4,5	1,8		
%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,5	17,6	18,2		
Summe [mg/l]	3,7	4,1	7,8	6,9	9,2	13,8	9,7	20,7	25,5	9,9		

Die Daten in Tab. I zeigen, daß die Phenazinproduktion am größten ist, wenn der pH-Wert der Kulturlösung unter 7,0 gehalten wird. Für die vorliegende Untersuchung wichtiger ist aber die Beobachtung, daß

(1) die Gesamtmenge an gebildeten Phenazinen mit steigendem Be²⁺-Gehalt der Lösung deutlich (auf das 2- bis 3fache gegenüber den Be²⁺-freien Kulturen), und zwar stärker als dem erhöhten Zellwachstum (Abb. 1) entspricht, zunimmt und daß

(2) mit steigender Be²⁺-Konzentration zunehmend die hydroxylierten Phenazine **4** und **5** gebildet werden, wobei **5** überhaupt nur in Gegenwart von Be²⁺ beobachtet wird.

Die Ergebnisse sind in Parallelversuchen innerhalb eines Kulturansatzes mit Schwankungen von weniger als 10 rel.-% reproduzierbar. Wiederholung der Messungen mit neu von der Agar-Stammkultur in einem frisch bereiteten Nährmedium gezüchteten Kulturen ergaben nur eine Verschiebung der Mengenverhältnisse **4** zu **5**, während die Summe der beiden Verbindungen gleich blieb.

Diskussion

Bei der Biogenese der Phenazinderivate wird **3** als Primärprodukt aus zwei Molekülen Shikimsäure gebildet [8], aus dem dann (soweit für die hier gefundenen Derivate relevant) durch Decarboxylierung **2** und daraus **4** entsteht [9]. Die wechselnden relativen Mengen von **4** und **5** weisen darauf hin, daß **4** letztlich zu **5** weiter hydroxyliert wird. Die Bildung von **4** und **5** bei Be²⁺-Zusatz läßt auf einen zweifachen Abwehrmechanismus schließen: Zum einen sind Salicylsäurederivate typische

Komplexbildner für Be²⁺ [10] und werden auch therapeutisch bei Berylliumvergiftungen verwendet [11]. Zum anderen ist Fe³⁺ ein Antagonist von Be²⁺ [5]. Der untersuchte Stamm Y₄ bildet unter Eisenmangelbedingungen zwar Phenazine, aber keine typischen Siderophore. 2,3-Dihydroxybenzoësäure ist das charakteristische Strukturelement der Catecholat-Siderophore [12] und ihr Derivat **5** könnte damit für einen vermehrten Eisentransport in die Zelle geeignet sein. Selbst Salicylsäurederivate (vgl. **4**) können als Transportmolekül fungieren [13]. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung erwähnenswert, daß Pseudomonaden bei Sauerstoffmangel vermehrt Hydroxyphenazine bilden [14], eine an sich verfehlte Reaktion, die man damit erklären könnte, daß bei Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen Sauerstoffmangel in der Zelle in der Regel nicht auf externen Sauerstoffmangel zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf das Fehlen von Eisen in der Atmungskette.

Die gebildeten Mengen an **4** und **5** (<0,1 mmol/l) reichen bei weitem nicht aus, um das gesamte zugesetzte Be²⁺ (0,35 bzw. 1,1 mmol/l) zu binden, könnten aber wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit eine Schutzschicht um die Zellen bilden. Die nur in Be²⁺-angereicherten Kulturmedien beobachtete Bildung des Brenzcatechinderivats **5** wäre dann der zweite Abwehrschritt. Über den Grund des verstärkten Zellwachstums kann nur spekuliert werden.

Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir für finanzielle Unterstützung bestens danken.

- [1] Teil XLIII der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“, Teil XLII: G. Mohn, K. Taraz und H. Budzikiewicz, Z. Naturforsch. **45b**, 1437 (1990).
- [2] J. MacCordick, J.-M. Hornsperger und B. Wurtz, C. R. Séances Soc. Biol. Strasbourg **169**, 417 (1975).
- [3] J. MacCordick, B. Wurtz und J.-M. Hornsperger, C. R. Séances Soc. Biol. Strasbourg **169**, 421 (1975).
- [4] J. MacCordick, M.-Th. Youinou und B. Wurtz, Naturwissenschaften **63**, 90 (1976).
- [5] J. MacCordick, M.-Th. Youinou und B. Wurtz, Folia Microbiol. **22**, 35 (1977).
- [6] K. Taraz, E. M. Schaffner, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, Z. Naturforsch. **45b**, 552 (1990).
- [7] J. B. Neilands, Structure and Bonding **58**, 1 (1984).
- [8] M. Podojil und N. N. Gerber, Biochemistry **9**, 4616 (1970).
- [9] G. S. Byng und J. M. Turner, Biochem. J. **164**, 139 (1977).
- [10] I. D. Pedrosa de Jesus, in: Comprehensive Coordination Chemistry (G. Wilkinson, Herausg.), **2**, Bd., S. 471, Pergamon, Oxford 1987.
- [11] W. Forth, D. Henschler und W. Rummel, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage, S. 774, B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim 1987.
- [12] A. Chimiak und J. B. Neilands, Structure and Bonding **58**, 89 (1984).
- [13] L. P. Macham und C. Ratledge, J. Gen. Microbiol. **89**, 379 (1975).
- [14] H. Korth, Arch. Microbiol. **77**, 59 (1971).