

Isolierung und Charakterisierung Pyrazon-abbauender Bakterien

C. FRÖHNER, O. OLTMANN und F. LINGENS

Lehrstuhl für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim

Eingegangen am 10. Juli 1970

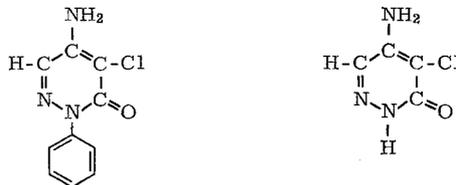
Isolation and Characterization of Bacteria, Growing on Pyrazon

Summary. Bacteria capable of growth on pyrazon as a sole carbon source were isolated from soil. Only cobalamin was required as a growth factor in a pyrazon-mineral salt medium. Pyrazon is metabolized to the dephenylated compound. The bacteria can grow on antipyrine, pyrimidone and pyruvate, too. They do not grow on glucose or other sugars. The bacteria are osmotically sensitive. Growth is not observed in media with the concentration of ingredients exceeding 1%. Possibly, the bacteria belong to the genus *Achromobacter*.

Zusammenfassung. Aus Bodenproben wurden in einem Anreicherungsverfahren mit Pyrazon-haltigem Mineralsalzmedium Bakterien isoliert, die mit Pyrazon als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können. Sie benötigen neben Nährsalzen und Pyrazon nur Cobalamin zum Wachstum. Pyrazon wird dabei in die entphenylierte Verbindung umgewandelt. Wachstum erfolgt auch mit Antipyrin, Pyrimidon und Pyruvat.

Die Bakterien sind osmotisch empfindlich. Sie wachsen nicht in Medien mit normaler Konzentration der Inhaltsstoffe (über 1%). In vielen Eigenschaften entsprechen sie Vertretern der Gattung *Achromobacter*.

Die Aktivsubstanz des selektiven Rübenerbizides Pyramin^{®1} ist 1-Phenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-(6), in Kurzform Pyrazon genannt. Die Toleranz der Rüben gegenüber Pyrazon beruht darauf, daß sie es langsamer aufnehmen als andere Pflanzen und schneller in eine Verbindung ohne herbizide Wirkung überführen (Stephenson u. Ries, 1967). Als mengenmäßig überwiegendes Abbauprodukt entsteht in den Rüben und durch mikrobiellen Abbau im Boden ein entphenyliertes Pyrazon, der Metabolit B, 4-Amino-5-chlor-pyridazon-(6). Diese Verbindung ist im Boden persistenter als Pyrazon und in den erntereifen



1 [®] = Registriertes Warenzeichen der BASF.

Rüben in einer Konzentration um 0,05 ppm vorhanden (Drescher u. Otto, 1969; Drescher, 1970). In dieser Arbeit wird über die Isolierung Pyrazon-abbauender Bakterien und deren Eigenschaften berichtet.

Material und Methoden

Medien. Kompletmedium: 1 g Bacto-Yeast Extract (Difco), 1 g Bacto-Pepton (Difco), 1000 ml deion. Wasser. Pyrazon-Mineralsalzmedium: 0,875 g KH_2PO_4 , 0,125 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl_2 , 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 mg H_3BO_3 , 0,04 mg $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg KJ, 0,2 mg $\text{FeCl}_3 + 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{MnSO}_4 + 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{ZnSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 0,1 mg Biotin, 0,03 mg Cyanocobalamin, 0,4 g Pyrazon, 1000 ml deion. Wasser. — Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf einen Wert zwischen 6,5 und 7,5 eingestellt. — Für feste Medien wurden 20 g/l Bacto-Agar (Difco) zugegeben.

Nachweis des Pyrazons und seiner Abbauprodukte. Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel mit Fluoreszenzindicator (Merck GF₂₅₄). Laufmittel: Benzol/Äthanol/Aceton (9:1:1, v/v/v). Pyrazon: R_f 0,42; Metabolit B: R_f 0,26; Verbindung „X“: R_f 0,15.

Tests für die Identifizierung. Die Methoden wurden im wesentlichen dem „Manual of Microbiological Methods (Society of American Bacteriologists)“ (1957) entnommen. Es zeigte sich, daß die isolierten Stämme auf den normalerweise in der Bakteriologie verwendeten Nährmedien wegen der zu hohen Konzentration der gelösten Stoffe nicht zu wachsen vermögen. Die Medien wurden deshalb so abgeändert, daß sie einerseits den Pyrazon-abbauenden Bakterien, andererseits auch den Vergleichsbakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* das Wachstum und positiven Ausfall der Testreaktionen ermöglichten. Gewöhnlich wurde als Grundnährlösung für die Testmedien 0,5% Pepton bzw. ein Pyrazon-Mineralsalzmedium mit Zusatz von je 0,1% Pepton und Hefeextrakt verwendet.

Ergebnisse

a) Anreicherung Pyrazon-abbauender Mikroorganismen

Bodenproben verschiedener Herkunft (Rothschwaige, Limburgerhof bei Ludwigshafen, Ecuador) wurden einige Wochen mit einer Pyrazonlösung getränkt und anschließend in Schüttelkulturen bei 30°C mit Pyrazon-Mineralsalzmedium inkubiert. Nach mehreren Tagen war das Pyrazon in dem Medium nicht mehr nachweisbar. Stets trat als Endprodukt des Abbaues der Metabolit B auf und intermediär eine Verbindung „X“, deren Struktur noch unbekannt ist². Nach häufigen Transfers wurde eine Bakterien-Mischkultur erhalten, die Pyrazon in einer Konzentration von 400 mg/l in 4–6 Tagen abbaute (Draeger et al., 1969).

b) Isolierung der Pyrazon-abbauenden Bakterien

Die Suspensionen wurden verdünnt und auf Pyrazon-Mineralsalzmedium, dem zunächst kein Cobalamin zugesetzt war, plattiert. Nach 2–3 Wochen traten auf diesen Platten neben größeren auch sehr kleine

² Anmerkung bei der Korrektur (22.9.1970). Die Verbindung „X“ ist 1-(2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyphenyl)-4-amino-5-chlor-pyridazon-(6) (E. de Frenne u. F. Lingens, unveröff.).

Kolonien auf. Unter diesen kleinen Kolonien wurden Pyrazon-abbauende Bakterien gefunden. Sie ließen sich jedoch auf diesem Medium nur sehr schlecht weiterzüchten.

Die Kultivierung der Bakterien gelang erst, nachdem dem (Cobalamin-freien) Pyrazon-Mineralsalzmedium 0,015% Hefeextrakt zugesetzt war. Der Hefeextrakt ließ sich durch Cobalamin ersetzen. Es wurde nicht geprüft, ob die Bakterien auch Biotin, das vom Beginn der Versuche in den Medien enthalten war, zum Wachstum benötigen.

Die Pyrazon-abbauenden Bakterien lassen sich auch auf einem Kompletmedium mit je 0,1% Hefeextrakt und Pepton kultivieren. Hohe Konzentrationen (über 1%) wirken hemmend auf das Wachstum. Diese Wirkung ist nicht stoffspezifisch.

c) Reinheit der Kulturen

Mehrmals nacheinander wurden Einzelkolonien suspendiert, plattiert und untersucht. Um die Möglichkeit eines „gemeinsamen Abbaues“ durch verschiedene Bakterienstämme auszuschließen, wurde wie folgt verfahren: Der Titer einer Suspension wurde mit einer Zählkammer bestimmt. Die Suspension wurde dann verdünnt und auf Pyrazon-Mineralsalzmedium plattiert, das Pyrazon in ungelöster Form (3 g/l) enthielt, so daß das Medium durch die Kristalle getrübt war. Nach 2 bis 3wöchiger Bebrütung waren alle Kolonien von einem klaren Hof umgeben (Abb.1). Die gefundene Koloniezahl stimmte mit der berechneten in jedem Fall überein. Die Ausgangskultur war also einheitlich und jede einzelne Zelle zum Pyrazonabbau befähigt.

Die Reinkulturen aus den Bodenproben Rothschaige, Limburgerhof und Ecuador wurden „Stamm R“, „Stamm L“ und „Stamm E“ genannt. Sie waren nach der Kolonie- und Zellform einander sehr ähnlich.

d) Charakterisierung der Pyrazon-abbauenden Bakterien

Stamm R und *L* wachsen auf dem angegebenen Kompletmedium und auf Pyrazon-Mineralsalzagar in 2–3 Wochen zu weißen, glänzenden, glatten, runden, ganzrandigen, viscosen Kolonien von 2–3 mm Durchmesser, die Kolonien des *Stammes E* haben einen geringeren Durchmesser und sind mattglänzend.

Morphologie: Zellen rund bis länglich (Abb. 2), etwa $0,3 \times 0,5 - 1,0 \mu\text{m}$, einzeln oder in Paaren und kurzen Ketten. Gelegentlich längere Zellen, bei denen eine Unterteilung angedeutet ist (Abb. 2). Die Zellen sind unbeweglich. Sporen oder Kapseln konnten nicht nachgewiesen werden. Färbung nach Gram: stets negativ.

Wachstum aerob; Trübung und Sediment in flüssigen Medien; kein Häutchen. Temperatur: Wachstum bei 20°C und 30°C. Kein Wachstum

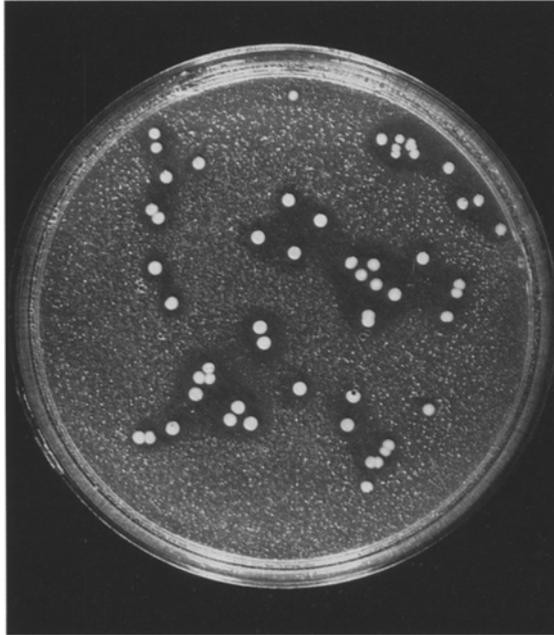


Abb.1. Kolonien von Pyrazon-abbauenden Bakterien (*Stamm L*) auf Mineralsalzmedium mit ungelöstem Pyrazon

bei 4°C. Bei 37°C sterben die Zellen innerhalb weniger Tage ab. Aufbewahrung im Kühlschrank mindestens 7 Wochen lang möglich.

pH-Wert: Wachstum zwischen pH 6,5 und 8,0. Kein Wachstum bei pH 4,0 und 9,0.

Hitze-Resistenz: keine Überlebenden nach 2 Std 80°C.

Gelatine: keine Verflüssigung (4 Wochen). Lackmusmilch: keine Veränderung (4 Wochen). Kartoffel: kein Wachstum. Indol: keine Indolbildung nach 1,3 und 7 Tagen. Voges-Proskauer: negativ nach 1,4 und 8 Tagen (dick beimpft); [da Glucose nicht verwertet wird (s.u.), war mit negativem Ausfall zu rechnen]. Nitrit aus Nitrat: negativ, auch bei starker Beimpfung und Austestung alle 2 Std. Jedoch gutes Wachstum auf Pyrazon-Mineralsalzmedium mit KNO_3 anstelle von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kein Wachstum auf Pyrazon-Mineralsalzmedium ohne Stickstoffquelle.

Stärke: kein Abbau. Cellulose: kein Abbau in 6 Wochen. Katalase: positiv, aber wesentlich schwächer als bei *E. coli* und *B. subtilis*.

Oxidase-Reaktion nach Kovacs (1956): positiv.

Fermentation: keine Säurebildung, kein Gas aus Zuckern und Alkoholen (s.u.) in Mineralsalzmedium mit 0,05% der Kohlenstoffquelle, mit und ohne Zusatz von 0,06% Pepton.

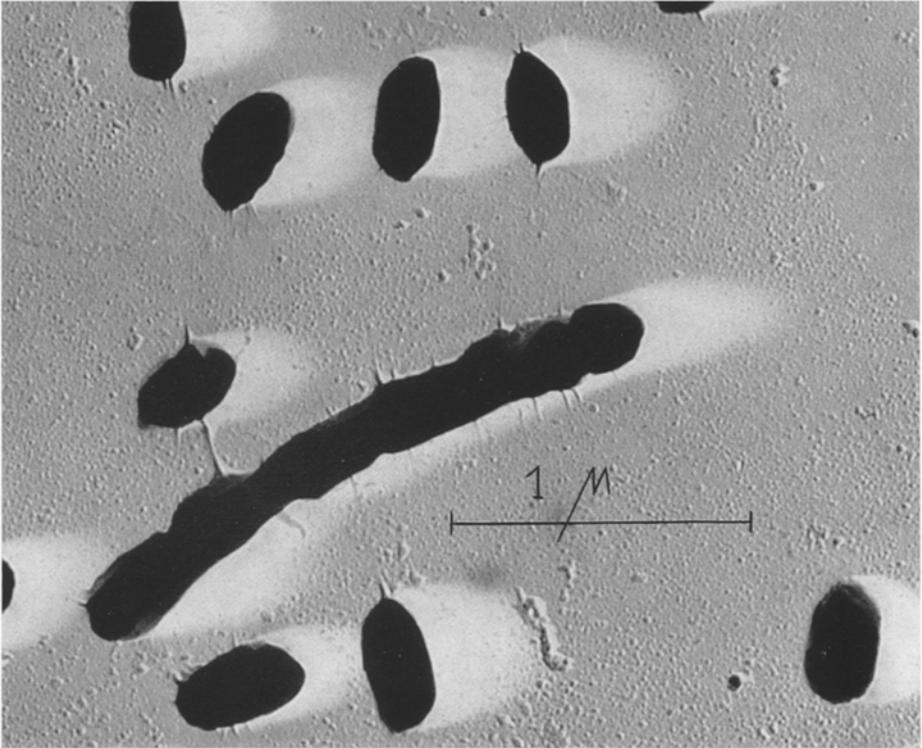


Abb.2. Pyrazonabbauende Bakterien (*Stamm R*) aus 3 Tage alter Schüttelkultur. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Platin-Iridium-Schrägbedampfung; Vergrößerung 18000fach)

Nutzung von Kohlenstoffquellen: Geprüft wurde das Wachstum auf festen Mineralsalzmedien mit je 0,05% der zu testenden Verbindung (etwa entsprechend der Löslichkeit von Pyrazon). Säuren wurden mit NaOH neutralisiert. Impfstrich mit einer Platinöse aus einer Saline-Suspension. Bebrütung 4 Wochen. Sterilisation der Kohlenstoffquellen separat und 15 min 1 atü.

Wachstum auf: Pyrazon +++++, Antipyrin +++++, Pyramidon +++ (nur *Stamm L*), Pyruvat +++, Succinat ++, Fumarat ++, Malat +, Glutamat ++, Glutamin +, Aspartat +, Phenylalanin ++. Für die Gewinnung von Zellmasse sind nur Pyrazon und Antipyrin, weniger gut Pyramidon und Pyruvat verwendbar.

Kein Wachstum auf: Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Mannit, Ribose, Arabinose, Saccharose, Lactose, Maltose, Inosit, Glycerin, Acetat, Oxalat, Lactat, Propionat, Malonat, Tartrat, Citrat, Adipat,

Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystin, Methionin, α -Aminoadipinsäure, Prolin, Lysin, Histidin, Arginin, Tryptophan, Tyrosin.

Weiterhin kein Wachstum mit: Na-Phenolat, Brenzkatechin, Resorcin, Benzoesäure, o-, m-, p-Hydroxybenzoesäure, Acetanilid, Anthranilsäure, Protocatechusäure, Gentisinsäure, 2,4-, 2,6-Dihydroxybenzoesäure; 1-o-Methylphenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, 1-m-Methylphenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, 1-p-Methylphenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, 1-p-Methoxyphenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, Cyclohexyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, 1(3-Propionsäure)-4-amino-5-chlor-pyridazon-6, N-Dimethyl-N-phenyl-harnstoff (Fenuron), Isopropyl-N-phenylcarbammat (IPC).

Wuchsstoffbedarf: Cobalamin (nur bei *Stamm R* geprüft). Biotin ?

Sensitivität gegen Antibiotica: (Lochtest).

Medium: Pyrazon-Mineralsalzmedium mit je 0,1% Hefeextrakt und Pepton.

Dosis/Loch	Penicillin	Streptomycin	Chloramphenicol
	2,5 IE	80 γ	100 γ
	Durchmesser der Hemmhöfe in cm		
<i>Ps. iodinum</i>	0	1	1
<i>Stamm R</i>	1	2,5	3
<i>Stamm L</i>	1	2,5	3,4
<i>Stamm E</i>	1	2,5	3
<i>Escherichia coli</i>	0	1,5	2

Konstanz der Fähigkeit zum Pyrazonabbau. — Der *Stamm R* behält auch nach mehreren aufeinanderfolgenden Transfers auf dem Pyrazon-freien Komplettmedium die Fähigkeit zum Pyrazonabbau. Hefeextrakt, Pepton oder Pyruvat hemmen den Abbau nicht, vorausgesetzt, die Gesamtkonzentration der Nährstoffe liegt nicht zu hoch (im Hemmbereich).

Diskussion

Die drei aus den verschiedenen Bodenproben isolierten Pyrazon-abbauenden Bakterienstämme weisen nach den bisherigen Untersuchungen keine wesentlichen physiologischen Unterschiede auf. In der Koloniemorphologie unterscheidet sich allerdings der *Stamm E* von den Stämmen *L* und *R* durch einen geringeren Durchmesser und einen weniger stark ausgeprägten Glanz der Kolonien. Da aber dieser Unterschied im äußeren

Erscheinungsbild nur geringfügig ist, halten wir es für gerechtfertigt, die drei Stämme der gleichen Art zuzuordnen.

Die Eigenschaften der Pyrazon-abbauenden Bakterien führen zu einer Einordnung in die Gattung *Achromobacter*, wenn man Bergey's Manual (Breed, Murray u. Smith, 1957) folgt. Für die Einordnung in diese Gattung spricht auch das Ergebnis des Hemmversuches mit Antibiotica (vgl. das Schema von Shewan et al., 1954).

Brizou u. Prévot (1954) stellten die nicht beweglichen kokkoiden Formen von *Achromobacter* in die neu geschaffene Gattung *Acinetobacter*. Die Pyrazon-abbauenden Bakterien passen recht gut in eine Untergruppe dieser Gattung *Acinetobacter* („Phenon 4/j“), zu der Thornley (1967) mit Hilfe der numerischen Taxonomie gelangt ist. Die Übereinstimmung der Pyrazon-abbauenden Bakterien mit den oben angeführten Gattungen beruht vor allem darauf, daß sie relativ wenige der üblichen Testreaktionen ausführen können. Es liegt auf der Hand, daß diese Übereinstimmung im Negativen keine befriedigende Basis für die Postulierung einer Verwandtschaft darstellt. Für eine weitere Klärung der systematischen Stellung ist vorgesehen, den (G+C)-Anteil der DNS zu bestimmen.

Auffallenderweise vermögen die Pyrazon-abbauenden Bakterien nach den bisherigen Untersuchungen nur gut mit Pyrazon, Antipyridin und Pyrimidin zu wachsen, abgesehen vom komplexen Hefeextrakt-Pepton-Medium. Die Frage, welche natürlichen Kohlenstoffquellen diese Bakterien im Erdboden verwenden können, läßt sich bis jetzt noch nicht beantworten. Offensichtlich werden nur ganz bestimmte aromatische Verbindungen metabolisiert. Durch nähere Untersuchung des Abbauweges, die in Angriff genommen worden ist, soll der Zusammenhang zwischen Struktur und Abbaumöglichkeit geklärt werden.

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung von Engvild u. Jensen (1969). Diese Autoren haben aus dänischer Erde Pyrazon-abbauende Bakterien isoliert, die in auffallend vielen der angegebenen Eigenschaften mit den von uns isolierten Bakterien übereinstimmen. Die vollkommene Übereinstimmung müßte in vergleichenden Untersuchungen erwiesen werden. Die bisherigen Befunde sprechen aber sehr dafür, daß in Böden verschiedener Länder ein- und dieselbe Bakterienart für den Pyrazonabbau verantwortlich ist.

Dank. Wir danken der BASF für die Überlassung größerer Mengen Pyrazon und den Herren Dr. H. Metzger, Dr. G. Scheuerer und Dr. N. Drescher, Landwirtschaftliche Abteilung der BASF, Limburgerhof, für Informationen und Diskussion. Frau Dr. Rentschler, Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Hohenheim, fertigte dankenswerterweise die elektronenmikroskopischen Aufnahmen an. Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Unterstützung dieser Arbeit. Fräulein A. Maier half uns bei einem Teil der Arbeit.

Literatur

- Breed, R. S., Murray, E. G. D., Smith, N. R.: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 7th ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1957.
- Brisou, J., Prévot, A.-R.: Études de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. *Annals Inst. Pasteur* **86**, 722—728 (1954).
- Draeger, E., Oltmanns, O., Lingens, F.: unveröffentlicht (1969).
- Drescher, N.: II. Internationale Tagung über selektive Unkrautbekämpfung im Rübenbau, Rotterdam, Vol. 1, p. 213 (1970).
- Otto, S.: Über den Abbau von 1-Phenyl-4-amino-5-chlor-pyridazon-6 (Pyrazon) im Boden. *Z. Pfl.-Krankh. Pfl.-Schutz* **76**, 27—33 (1969).
- Engvild, K. C., Jensen, H. L.: Microbiological decomposition of the herbicide pyrazon. *Soil. Biol. Biochem.* **1**, 295—300 (1969).
- Kovacs, N.: Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (Lond.)* **178**, 703 (1956).
- Shewan, J.M., Hodgkiss, W., Liston, J.: A method for the rapid differentiation of certain non-pathogenic, asporogenous bacilli. *Nature (Lond.)* **173**, 208—209 (1954).
- Society of American Bacteriologists in H. J. Conn: *Manual of microbiological methods*. New York: McGraw-Hill 1957.
- Stephenson, G. R., Ries, S. K.: The movement and metabolism of Pyrazon in tolerant and susceptible species. *Weed Res.* **7**, 51—60 (1967).
- Thornley, M. J.: A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J. gen. Microbiol.* **49**, 211—257 (1967).

Prof. Dr. F. Lingens
Institut für Mikrobiologie und
Molekularbiologie der Universität
D-7000 Stuttgart-Hohenheim
Kirchnerstr. 30