

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

99. Mitteilung*. Kirromycin

H. WOLF und H. ZÄHNER

Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, Universität Tübingen

Eingegangen am 22. November 1971

Metabolic Products of Microorganisms

99. Kirromycin

Summary. Kirromycin, a new yellow antibiotic, has been isolated from cultures of strain Tü 365 of *Streptomyces collinus*. It has been characterized by analytical, spectroscopic, and microbiological data.

Zusammenfassung. Aus Kulturen von *Streptomyces collinus* (Stamm Tü 365) wurde ein neues, gelbes Antibioticum isoliert und durch analytische, spektroskopische und mikrobiologische Daten charakterisiert.

Jeder Einsatz von Antibiotica in der Therapie bringt neben dem gewünschten Angriff auf die Krankheitserreger einen unerwünschten Eingriff in die Körperflora. Relativ häufig kommt es zur Ausbreitung von bedingt pathogenen Keimen, die nichts mit dem anfänglichen Krankheitserreger zu tun haben und die sich ohne Therapiemaßnahmen auch nicht ausbreiten könnten. Bekanntestes Beispiel sind die Candidainfektionen während einer längeren Tetracyclintherapie. Der Ausweg aus diesem Dilemma kann nicht in noch breiter wirkenden, z. B. auch Hefen treffenden Antibiotica liegen. Die Verringerung der Nebeneffekte muß durch den Einsatz von Antibiotica mit möglichst engem Wirkungsspektrum angestrebt werden. Die meisten der sog. „Engspektrum-Antibiotica“ hemmen aber noch den größten Teil der gram-positiven Bakterien. Stoffe, die nur eine engbegrenzte Gruppe von Bakterien stark und andere schwach oder gar nicht hemmen, sind bisher nur vereinzelt beschrieben worden. Es läßt sich vorläufig nicht entscheiden, ob dies durch die Screeningmethoden bedingt ist, oder ob tatsächlich nur geringe Unterschiede in der Sensibilität der Erreger resp. in den Wirkungsspektren von sog. „Engspektrum-Antibiotica“ bestehen. Um beurteilen zu können, ob hier ein Mangel in den Screeningmethoden vorliegt, haben wir besonders auf Antibiotica mit engem Spektrum geachtet.

* 98. Mitt.: Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A., Zähler, H.: *Helv. chim. Acta* 55, 224—239 (1972).

Im folgenden soll über ein gelbgefärbtes (kírrós) Antibioticum berichtet werden, das ein enges auf Actinomycetales und einzelne gram-positive Keime begrenztes Spektrum aufweist.

Methoden und Ergebnisse

Beschreibung des Stammes

Der Actinomycetales-Stamm Tü 365 wurde aus einer bei Kouroussa (Guinea) am Nigerufer gesammelten Erdprobe isoliert. Der Stamm ist der Gattung *Streptomyces* zuzuordnen und durch folgende Merkmale gekennzeichnet (Nomenklatur und Systematik nach Hütter, 1967):

1. Die Sporen sind ellipsoid, $0,6 \times 1,1 \mu$ groß mit glatter bis warziger Oberfläche. Die Sporen tragen weder Stacheln noch Haare.
2. Das Luftmycel ist anfangs kreideweiß und wird in ausgereiftem Zustand aschgrau bis graubraun (cinereus).
3. Das Luftmycel ist monopodial verzweigt und besitzt Seitenäste mit meist 3—5 engen Windungen (Spira-Typ a).
4. Auf Pepton-Eisen-Agar bildet der Stamm violettschwarzes Pigment.
5. Die Farbe des Substratmycels wechselt je nach Nährboden und Alter von Gelb über Hellbraun bis Dunkelbraun.

Der Stamm stimmt in allen artbestimmenden Merkmalen mit dem Typusstamm von *Streptomyces collinus* Lindenbein Stamm Ist 301 überein und ist daher dieser Art zuzuordnen.

Fermentation und Isolierung

Stamm Tü 365 wurde submers bei 27°C in 100 l Nährlösung (2% Fleischmehl, 2% Glucose, 0,5% Calciumcarbonat), angeimpft mit 10% Inoculum, unter einer nach der Sulfitmethode bestimmten Belüftung (Cooper et al., 1944) von ca. 40 mM Sauerstoff/Std/l angezogen. Nach 5 Tagen wurde 200—350 µg Kirromycin je Milliliter Kulturfiltrat bestimmt. Die Zellen enthielten nur geringfügige Mengen Antibioticum.

Nach 110 Std wurde die Kulturflüssigkeit unter Zusatz von 1% Celit filtriert, das Filtrat (100 l; pH 6) mehrmals mit insgesamt 30 l Äthylacetat extrahiert, der Extrakt bis auf 5 l eingeeengt, mit wenig 1%igem Natriumbicarbonat gewaschen und anschließend mit Calciumsulfat getrocknet. Der Essigester wurde im Vakuum abgedampft, übrig blieben 13 g hellgelbe Rückstände.

Die Isolierung des Antibioticums geschah durch Gegenstromverteilung (King u. Craig, 1962). Als System wurde ein Gemisch aus Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Methanol und Wasser verwendet (3:3:4:1,5). 5 g Rohprodukt wurden bei 50 ml Phasenvolumen über 100 Stufen verteilt, die Lösungen der Gefäße in 3 Fraktionen gesammelt:

- Gefäße 51—59: vorwiegend Kirromycin;
- Gefäße 60—63: Kirromycin;
- Gefäße 64—70: vorwiegend Kirromycin.

Die Fraktionen wurden jeweils am Vakuum bis zum wäßrigen Rückstand eingeeengt, die ausgefallenen Stoffe filtriert, mit Wasser gewaschen und über Phosphor-pentoxid getrocknet. Der pulverisierte, hellgelbe Rückstand der mittleren Fraktion lieferte 1,1 g chromatographisch einheitliche Substanz.

Physikalische und chemische Eigenschaften

Kirromycin wurde auf Aluminiumoxid und Kieselgel-Dünnschichtplatten chromatographiert. Die R_f -Werte in den verschiedenen Systemen sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. R_f -Werte für Kirromycin bei der Dünnschichtchromatographie an Aluminiumoxid und Kieselgel

Absorbens	Fließmittel	R_f -Wert
Kieselgel	Benzylalkohol	0,57
	Äthylacetat/Methanol (1:1)	0,80
	Äthylacetat/Methanol/Ameisensäure (17:2:1)	0,63
	Propanol-(1)/Wasser/konz. Ammoniak (7:2:1)	0,59
Aluminiumoxid	Äthylacetat/Methanol/Ameisensäure (17:2:1)	0,45
	Propanol-(1)/Wasser/konz. Ammoniak (7:2:1)	0,33

Kirromycin ist eine schwache Säure. Es löst sich nicht in 1%igem Natriumbicarbonat, dagegen leicht in 1%igem Natriumcarbonat.

Das lipophile Antibioticum ist gut löslich in Methanol, Äthanol, Propanol, Aceton, Äthylacetat, mäßig in Äther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, praktisch nicht in Wasser, 0,1 N HCl und Hexan.

Das Antibioticum ist instabil in 0,1 N HCl und lichtempfindlich.

Abb. 1 zeigt UV-Absorptionsspektren des Kirromycins.

Das IR-Absorptionsspektrum des Antibioticums mit starken Banden bei 3360, 2930 (OH-Region), 1640 (C=C- und C=O-Region), 1465 und 1100 cm^{-1} ist in Abb. 2 dargestellt.

Im Massenspektrum (Abb. 3) ist der Peak m/e 296 wahrscheinlich nicht der Molekularpeak.

Wirkungsspektrum

Die noch wirksamen Grenzkonzentrationen des Antibioticums wurden im Verdünnungstest gegen Bakterien (10^5 Keime/ml eingesät) bestimmt. Die Resultate sind in der Tab. 2 zusammengestellt.

Bei einer Konzentration von 3 mg/ml wurde im Agardiffusionstest (Anordnung s. Hütter et al., 1965) keine Hemmung gegen 33 Pilze aus den verschiedensten Gattungen beobachtet.

Hemmkonzentration in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Nährboden

Für *Streptomyces viridochromogenes* wurde die minimale Hemmkonzentration in komplexer und synthetischer Nährlösung bestimmt. Nach Versuchen im Verdünnungstest betrug diese beide Male 0,15–0,3 $\mu\text{g/ml}$.

Im Agardiffusionstest liegt die Nachweisgrenze unter 1 $\mu\text{g/ml}$. Der Test ist geeignet, den Gehalt an Kirromycin unreiner Präparate zu bestimmen.

Für *Bacillus brevis* wurden die Hemmkonzentrationen in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Nährboden im Biophotometer (Coulter u. Hutchison, 1962) ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 3 zusammengestellt.

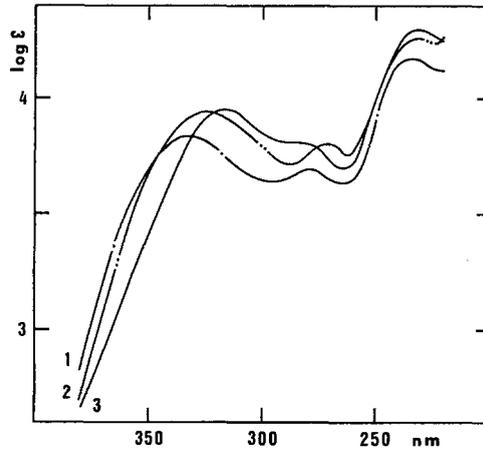


Abb. 1. UV-Absorptionsspektrum des Kirromycins, aufgenommen in 1 0,01 N HCl, 2 0,01 N NaOH und 3 Äthanol

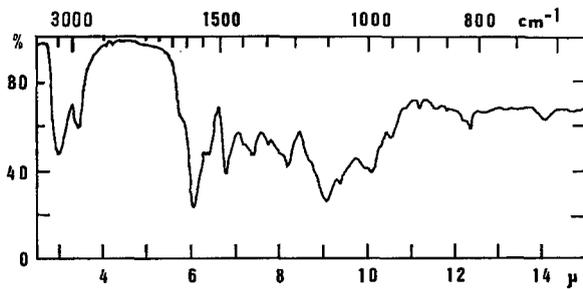


Abb. 2. IR-Absorptionsspektrum von Kirromycin in KBr

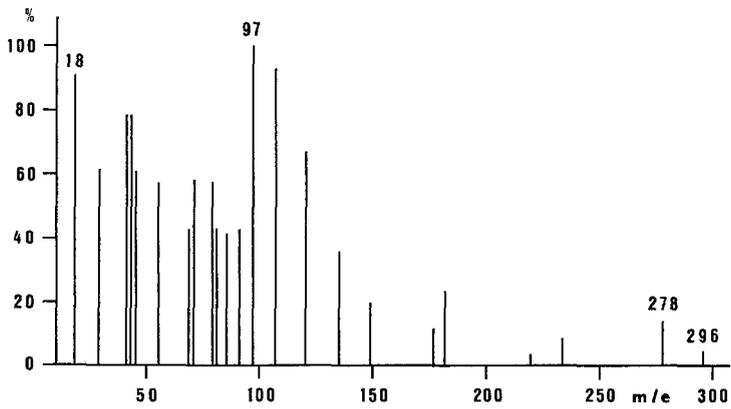


Abb. 3. Massenspektrum von Kirromycin

Tabelle 2. Minimale Hemmkonzentration des Kirromycins bei Bakterien

Stamm	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Pseudomonadales	
<i>Acetobacter aceti</i>	10–50
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	10–50
Eubacteriales	
<i>Achromobacter geminiani</i>	10–50
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 11095	5–10
<i>Alcaligenes viscolactis</i>	0,5–1
<i>Arthrobacter albidus</i> ATCC 15243	1–5
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 9999	0,18–0,36
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	100
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	50–100
<i>Chromobacterium violaceum</i>	5–10
<i>Corynebacterium poinsettiae</i> ATCC 9682	1–5
<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 15580	50–100
<i>Escherichia coli</i> K 12	> 100
<i>Lactobacillus casei</i>	50–100
<i>Microbacterium flavum</i>	5–10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 398	1–5
<i>Propionibacterium shermanii</i>	5–10
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 381	10–50
<i>Staphylococcus aureus</i>	50–100
Actinomycetales	
<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102	10–50
<i>Actinoplanes philippinensis</i> ATCC 12427	5–10
<i>Chainia</i> spec.	10–50
<i>Dermatophilus dermatonomus</i> ATCC 14640	10–50
<i>Microellobosporia cinerea</i> ATCC 15840	10–50
<i>Micromonospora</i> spec.	5–10
<i>Micropolyspora brevicatena</i> ATCC 15333	5–10
<i>Mycobacterium</i> 610	5–10
<i>Nocardia brasiliensis</i> NRRL 2962	0,5–1
<i>Promicromonospora citrea</i> ATCC 15908	5–10
<i>Streptomyces collinus</i> Tü 365	2,5–5
<i>Streptomyces fradiae</i>	5–10
<i>Streptomyces glaucescens</i>	0,3–0,6
<i>Streptomyces griseus</i>	20–40
<i>Streptomyces prasinus</i>	0,3–0,6
<i>Streptomyces ramulosus</i>	2,5–5
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	0,15–0,3
<i>Streptosporangium roseum</i> ATCC 12428	10–50
<i>Thermoactinomyces antibioticus</i> ATCC 14570	10–50
<i>Thermopolyspora glauca</i> ATCC 15345	10–50
<i>Waksmania rosea</i> ATCC 15334	5–10

Werden wachsende *Bacillus brevis*-Zellen mit Kirromycin in der minimalen Hemmkonzentration versetzt, das Antibioticum nach 30 min Einwirkdauer durch Waschen entfernt und in der Folge die Lebendkeimzahl bestimmt, so ist die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen vor und nach der Hemmung annähernd gleich groß. Die antibiotische Wirkung ist reversibel (bakteriostatisch).

Tabelle 3. *Minimale Hemmkonzentration des Kirromycins für Bacillus brevis in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Nährboden*

Titer	Wachstumsphase	MIC ^a (µg/ml)	MIC ^b (µg/ml)
1 × 10 ⁵ Sporen/ml		0,18—0,36	0,09—0,18
Zellen	lag-Phase	0,18—0,36	0,09—0,18
1 × 10 ⁷ Zellen/ml	log-Phase	1,4 —2,9	1,4 —2,9
2 × 10 ⁷ Zellen/ml	log-Phase	1,4 —2,9	—
Zellen	stationäre Phase	20 keine Lyse	20 keine Lyse

^a Komplexe Nährlösung.

^b Synthetische Nährlösung (Eikhom et al., 1963).

Die Empfindlichkeit von *Proteus mirabilis* und seiner stabilen L-Form gegen Kirromycin

Bacillus brevis ist sensibel gegen Kirromycin (MIC: 0,18—0,36 µg/ml), *Bacillus subtilis* hingegen resistent (MIC: > 100 µg/ml). Um einen Hinweis über den Mechanismus der natürlichen Resistenz zu erhalten, wurde die Empfindlichkeit der L-Form von *Proteus mirabilis* im Vergleich zum Wildstamm geprüft.

Die L-Form unterscheidet sich vom Wildstamm durch das Fehlen der Zellwand. Dies konnte für *Proteus mirabilis* IV, L-Form, durch den Mangel an Phagenreceptoren (Taubeneck u. Böhme, 1958; Taubeneck, 1961) und chemische Analyse (Kandler u. Kandler, 1960) gezeigt werden.

Die Resultate der Hemmversuche sind in Tab. 4 zusammengestellt, in die zum Vergleich auch Werte für Makrolid-Antibiotica (Taubeneck, 1962) aufgenommen wurden.

Tabelle 4. *Minimale Hemmkonzentration des Kirromycins auf Proteus mirabilis, Wildstamm und L-Form, im Vergleich zu der minimalen Hemmkonzentration von Makrolid-Antibiotica (Taubeneck, 1962)*

Antibioticum	MIC, Wildstamm (µg/ml)	MIC, L-Form (µg/ml)
Kirromycin	> 500	0,045—0,09
Erythromycin	≈ 1000	< 1
Angolamycin	> 1000	< 10
Oleandomycin	> 1000	< 10

Wildstamm und L-Form haben gleiche Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Oxytetracyclin sowie Paromomycin.

Diskussion

Das Kirromycin fiel im Screening durch seine außerordentlich gute Wirkung gegen *Streptomyces viridochromogenes* bei fehlender Wirkung auf *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* auf. Die Überprüfung des Wirkungsspektrums (Tab. 2) zeigte, daß die geprüften Stämme der Actinomycetales alle mittel bis hoch sensibel, alle Pilze dagegen völlig resistent sind. Große Unterschiede in der Kirromycinempfindlichkeit finden sich bei den Eubacteriales, wobei selbst zwischen verwandten Stämmen Unterschiede um den Faktor 300 und mehr auftreten. Die bei gram-negativen und gram-positiven Bakterien üblicherweise vorhandenen Unterschiede in der Sensibilität sind hier verwischt.

Dieses bei Eubacteriales „punktuelle“ Wirkungsspektrum des Kirromycins legte den Verdacht nahe, daß die Begrenzung des Spektrums über die Zellpermeabilität erfolgt und nicht über den Angriff auf ein nur bei den Actinomycetales vorhandenes oder nur dort lebensnotwendiges Enzymsystem. Für den Beweis dieser Hypothese — Spektrumsbegrenzung über Zellpermeabilität und nicht über Angriffsort — haben wir die von Taubeneck (1962) vorgeschlagene Methode des Vergleichs eines resistenten Keimes mit seiner L-Form verwendet (Tab. 4). Die L-Form von *Proteus mirabilis* ist 10^4 mal empfindlicher gegen Kirromycin als der Wildstamm. Kirromycin kann im Gegensatz zu Chloramphenicol die Zellwand nicht passieren. Die von Kirromycin gehemmte Zellfunktion ist auch in resistenten Keimen vorhanden, nur durch eine Kirromycin undurchlässige Zellwand geschützt.

Über die Untersuchung der Kirromycinwirkung in zellfreien Systemen von *Escherichia coli* soll in einer späteren Arbeit berichtet werden.

Von Stämmen der Art *Streptomyces collinus* sind eine ganze Reihe von Antibiotica bekannt (Hütter, 1967; Arai et al., 1970), doch unterscheidet sich das Kirromycin schon im Wirkungsspektrum deutlich von allen bisher beschriebenen Antibiotica aus dieser Art. Bei der Beschreibung eines neuen Antibioticums drängt sich immer die Frage nach einer Verwandtschaft mit bereits beschriebenen Stoffen auf. Anhand der vorliegenden Daten (UV- und IR-Spektren und Massenspektrum) läßt sich eine Identität mit gut beschriebenen Antibiotica ausschließen, aber noch keine Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe erkennen.

Literatur

- Arai, T., Mikami, Y., Koike, J.: Identification keys for antibiotics producing streptomycetes. 2. Antibacterial antibiotic producers. Ann. Report Inst. Food Microbiol., Chiba University **23**, 47—99 (1970).
- Copper, C. M., Fernstrom, G. A., Miller, S. A.: Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. **36**, 504—509 (1944).

- Coultas, M. K., Hutchison, D. J.: Metabolism of resistant mutants of *Streptococcus faecalis*. IV. Use of a biophotometer in growth-curve studies. *J. Bact.* **84**, 393—401 (1962).
- Eikhom, T. S., Jonsen, J., Laland, S., Refsvik, T.: On the biosynthesis of gramicidin. *S. Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **76**, 465—468 (1963).
- Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten. *Bibl. Microbiol.* **6**. Basel: Karger 1967.
- Keller-Schierlein, W., Nüesch, J., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitt. Scopamycine. *Arch. Mikrobiol.* **51**, 1—8 (1965).
- Kandler, O., Kandler, G.: Die L-Phase der Bakterien. *Ergebn. Mikrobiol. Immunitätsforsch.* **33**, 97—127 (1960).
- King, T. P., Craig, L. C.: Countercurrent distribution. *Meth. biochem. Anal.* **10**, 201—228 (1962).
- Taubeneck, U.: Die Phagenresistenz der stabilen L-Form von *Proteus mirabilis*. *Z. Naturforsch.* **16b**, 849—850 (1961).
- Susceptibility of *Proteus mirabilis* and its stable L-form to erythromycin and other macrolides. *Nature (Lond.)* **196**, 195—196 (1962).
- Böhme, H.: Der Einfluß von Bakteriophagen auf die L-Phase von *Proteus mirabilis*. *Z. Naturforsch.* **13b**, 471—472 (1958).

Prof. Dr. H. Zähler
Institut für Biologie
Lehrbereich Mikrobiologie
D-7400 Tübingen, Im Schönblick 47
Deutschland