

Antimikrobielle Inhaltsstoffe in Algen

4. Mitteilung

Wirkung der Acrylsäure auf Atmung und Makromolekülsynthese bei *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*

K.-W. GLOMBITZA und R. HEYSER*

*Pharmakognostisches Institut der Universität Bonn;
Bonn, Bundesrepublik Deutschland*

ABSTRACT: Antimicrobial components in algae. 4th contribution. Effect of acrylic acid on respiration and macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Among the simple unsaturated carbonic acids, acrylic acid is a comparatively specific inhibitor for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and other bacteria. Insignificant bactericidal action can only be observed at high concentrations and long incubation times of acrylic acid. In older *E. coli* cells, acrylic acid inhibits respiration more strongly than growth. On the other hand, in younger *E. coli* cells and in *St. aureus*, inhibition of growth is more pronounced than that of respiration. Antibacterial activities of acrylic acid against *E. coli* can be reduced by compounds with thiol groups; they can be increased by 2,4-dinitrophenol (DNP). The effect of acrylic acid and DNP is synergistic; such effects are very small in *St. aureus*. Incorporation of leucine into the protein of *E. coli* cells is less inhibited by acrylic acid than their growth rate; incorporation of thymidine into DNA is inhibited to the same extent as growth; incorporation of uracil into RNA is inhibited to a much higher extent right from the beginning of the experiment. DNP is capable of increasing the degree of inhibition of uracil incorporation caused by acrylic acid. Syntheses of r-RNA and s-RNA are inhibited to nearly the same extent; there seems to be no influence on the synthesis of m-RNA.

EINLEITUNG

Viele marine Grünalgen sowie einige Rotalgen enthalten z. T. beträchtliche Mengen freier oder freisetzbarer Acrylsäure (GLOMBITZA 1968). Acrylsäure ist, wie schon SIEBURTH (1960) für die Chrysophycee *Phaeocystis pouchetii* beweisen konnte, häufig die Ursache der antimikrobiellen Eigenschaften der Algen.

Die Acrylsäure (Acs) ist nach Befunden von BRISOU & RAUTLIN DE LA ROY (1964) bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wieder auswaschbar; die Hemmwirkung ist somit reversibel. Die Hemmintensität ist stark pH-abhängig (LÜCK 1959, SIEBURTH 1961). Sie nimmt mit steigender H^+ -Konzentration bis zum pK-Wert der Säure zu (HACKETT 1960).

* Teil der Dissertation von R. HEYSER, Bonn, 1970 (D5).

Vereinzelte Angaben zeigen, daß Acs an verschiedenen Stellen des Bakterienstoffwechsels wirksam werden kann. THIJSSSE (1964) fand, daß Acs besonders die Oxydation der Fettsäuren bei *Pseudomonas* hemmt. WHITLEY & ORDAL (1954) beobachteten, daß die Propionatbildung aus Pyruvat bei *Micrococcus lactilyticus* in Gegenwart von Acs verlangsamt ist. LÜCK (1959) berichtet über eine Hemmung der Katalase durch Acs, und MICHEL (1965) untersuchte den Einfluß der Acs auf die intestinalen Bakterien junger Schweine. Er fand eine Verstärkung der Milchsäurebildung und eine Hemmung des Abbaues von Harnstoff, L-Arginin und L-Lysin.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es festzustellen, inwieweit Störungen der Atmung und bei der Makromolekülsynthese für die bei *E. coli* und *St. aureus* beobachteten antimikrobiellen Wirkungen der Acs verantwortlich sein können.

MATERIAL UND METHODEN

Bakterien: *Staphylococcus aureus* SG 511, *Echerichia coli* G 1 (Wildstamm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9643, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Proteus vulgaris* (Wildstamm) und *Escherichia coli* G-1-Pyruvatstamm.

Anzucht und Keimzahlbestimmung: 100 ml Nährlösung (Difco Antibiotic Medium III oder Standard-I-Nährbouillon Merck) wurden mit einer Öse voll einer Schrägagarkultur beimpft und bei 37°C in Schüttelthermostaten bebrütet. Im Abstand von 30 bzw. 60 min wird in einer entnommenen Probe im Bausch & Lomb-Spectronic 20 die optische Dichte bei 600 nm gemessen und gegebenenfalls die Zahl der vermehrungsfähigen Keime/ml auf Difco-Antibiotic-Medium I (pH 7,0) nach dem KOCHSchen Plattenverfahren ermittelt (JANKE & DICKSCHEIT 1967). Aus dieser Anzuchtkultur wird soviel entnommen, wie notwendig ist, um in den Testansätzen eine Einsaat von 10^6 Keimen/ml zu erhalten.

Herstellen der Acrylsäurelösung: Die mit Hydrochinon stabilisierte Acs wird unmittelbar vor Gebrauch im Vakuum (K_{p11} , 39–40°C) destilliert und mit NaHCO_3 und 0,1 n NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Versuche zur Aufhebung der antibakteriellen Aktivität der Acrylsäure: Jeweils 5 Erlenmeyerkolben zu 300 ml werden mit je 90 ml Difco-Antibiotic-Medium III (pH 6,5) beschickt, beimpft und bei 37° in Schüttelthermostaten bebrütet. Sobald ein E_{600} von ca. 0,1—0,15 erreicht ist, gibt man in 4 Kolben Acs bzw. Acs zuzüglich den Testsubstanzen (Endkonzentration an Acs: 412 γ /ml bei *E. coli*, 33 γ /ml bei *St. aureus*) in 25 ml Pufferlösung. Man mißt in Abständen von 20 min die Extinktion bei 600 nm.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK): Die MHK wird mit Lösungen frisch destillierter und neutralisierter Acs, Methacrylsäure, Vinylessigsäure, Crotonsäure im Reihenverdünnungstest in der von KLEIN (1957) angegebenen Weise im Difco-Antibiotic-Medium III bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden bestimmt.

Untersuchung der Atmung im Warburg-Apparat: Die Atmung wurde in der mehrfach beschriebenen Weise im Warburg-Apparat bei 37° C, einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 Ausschlägen/min und Ableseintervallen von 5 oder

10 min bestimmt. Die zweiarmigen Gefäße mit Zentralzylinder enthielten z. T. im Zentralzylinder KOH (10 %, 0,2 ml auf Filterpapier), in einem Seitenarm die benötigte Menge Acs in konzentrierter Lösung (0,2 ml) im anderen HCl bzw. H₂O. 2 ml Nährlösung im Hauptraum enthielten zu Versuchsbeginn 10⁶ Keime/ml. Es wurden O₂-Verbrauch und CO₂-Entwicklung gemessen.

Einfluß von Acrylsäure auf den Einbau von ¹⁴C-Uracil und ¹⁴C-Thymidin bzw. ¹⁴C-Leucin: *E. coli*-Pyruvatstamm wird in Nährlösung pH 5,6 (REHM 1967, modifiziert) bis zu einer Dichte von E₆₀₀ 0,1 bzw. 0,5 kultiviert. Je 20 ml dieser Kultur werden mit 1 ml Acs-Lösung (Endkonzentrationen siehe Tabellen 5 und 6) versetzt und in Schüttelthermostaten bei 37°C inkubiert. Man mißt nach 5, 15, 25 und 35 Minuten die optische Dichte bei 600 nm. Nach 0, 10, 20 und 30 Minuten entnimmt man 3 Proben von je 1 ml und gibt sie in vorgewärmte Kölbchen, die entweder 0,5 µC ¹⁴C₍₂₎-Uracil oder 0,5 µC ¹⁴C₍₂₎-Thymidin oder 0,5 µC ¹⁴C_(u)-Leucin oder 0,1 µC ¹⁴C_(u)-Leucin + 6,8 γ unmarkiertes Leucin (für E₆₀₀ = 0,5) enthalten. Nach 5 min bei 37°C gibt man 1 ml 6prozentige Perchlorsäure zu, kühlt 30 min im Eisbad und nutsch die mit Uracil bzw. Thymidin inkubierten Proben auf Membranfiltern (Sartorius Membranfilter Kat.-Nr. 1311, Poren 0,01 µ) ab und wäscht mit 12 ml 3prozentiger kalter HClO₄. Die mit Leucin inkubierten Proben werden vor dem Abnutschen 20 min auf 90°C erhitzt. Die Filter werden auf Aluminiumschälchen aufgeklebt und im Methandurchflußzähler die Impulse ausgezählt.

Isolierung der RNS aus *E. coli*-Pyruvatstamm: *E. coli*-Pyruvatstamm wird in Pyruvatnährlösung bis zu E₆₀₀ 0,5 kultiviert. Zu 200 ml dieser Suspension gibt man 10 µC ¹⁴C₍₂₎-Uracil + 800 γ unmarkiertes Uracil (Kontrolle) bzw. 30 µC ¹⁴C₍₂₎-Uracil + 800 γ unmarkiertes Uracil + 50 mg Acs (gehemmte Probe). Man inkubiert 60 min in Schüttelthermostaten bei 37°C, fügt 40 mg unmarkiertes Uracil zu und inkubiert wiederum 10 min bei 37°C. Man kühlt rasch herunter, zentrifugiert bei 2750 × g kalt ab und wäscht zweimal mit 0,5prozentiger KCl/0,5-%-NaCl-Lösung. Die RNS wird nach der leicht modifizierten Methode von SIMON & PRAAG (1964) unter Anwendung von DNase und Extraktion mit Phenol isoliert. Die zuletzt mit Alkohol ausgefällte RNS wird in TM-Puffer (0,01-m-Tris-Puffer pH 8,0 mit 1 · 10⁻⁴ m MgCl₂) aufgenommen und am Saccharosegradienten aufgetrennt. Stufengradient mit Stufen von 1,5 % beginnend mit 20 %, endend mit 3 %; Zentrifugation 7 Stunden bei + 3° und 160 000 × g in der Spinco SW 50. Die Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen werden mit einer Kanüle angestochen und 52 bis 54 Fraktionen von je 5 Tropfen gesammelt. Jede zweite Fraktion wird mit 1 ml TM-Puffer pH 8,0 verdünnt und die optische Dichte bei E₂₆₀ bestimmt. Die übrigen Fraktionen werden mit 2 ml 0,25 m Perchlorsäure behandelt, über Membranfilter abgesaugt und die Impulse/min im Methandurchflußzähler bestimmt.

ERGEBNISSE

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Acrylsäure bei pH 6,5 liegt relativ hoch (Tab. 1). Andere mit Acs nahe verwandte bzw. homologe ungesättigte Säuren mit vergleichbaren pK-Werten, wie Methacrylsäure, Vinyllessigsäure und Crotonsäure, sind jedoch noch um Zehnerpotenzen weniger wirksam.

Tabelle 1

Minimale Hemmkonzentration für Acrylsäure und homologe Säuren (in mg/ml).
Messung der MHK im Reihenverdünnungstest bei pH 6,5 in Standkulturen

Säure	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Protens vulgaris</i>
Acrylsäure	0,195	0,780	0,050	25	0,78	3,1
Methacrylsäure	25	12,5	6,25	12,5	50	50
Vinyllessigsäure	12,5	12,5	6,25	12,5	25	12,5
Crotonsäure	12,5	25	12,5	12,5	25	25

Die Hemmwirkung scheint demnach auf einer für Acrylsäure relativ spezifischen Eigenschaft zu beruhen.

Nach BRISOU & RAUTLIN DE LA ROY (1964) hat Acs nur bakteriostatische Eigenschaften. Bestimmt man die Zahl der kultivierbaren Keime, so ist nach zweistündiger Einwirkungszeit der mehrfachen MHK keine und nach 24stündiger höchstens eine geringfügige Verminderung der Keimzahl feststellbar (Tab. 2).

Tabelle 2

Keimzahlbestimmung bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* nach unterschiedlicher Einwirkungszeit von Acrylsäure in Schüttelkulturen (Keime $\times 10^{-7}/\text{ml}$)

γ Acrylsäure/ml	<i>E. coli</i> Einwirkungszeit			<i>St. aureus</i> Einwirkungszeit		
	0 Std	2 Std	24 Std	0 Std	2 Std	24 Std
0	7,3	87	170	2,3	6,4	16
10	7,3	73	160	2,3	5,9	22
100	7,3	51	86	2,3	3,2	8,7
1 000	7,3	9,9	33	—	—	—
10 000	7,3	7,8	2,2	—	—	—

Die höhere Empfindlichkeit von *St. aureus* gegen Acs wie auch die starke pH-Abhängigkeit der zur Hemmung benötigten Dosis ließen sich nicht nur bei der Bestimmung der MHK, sondern auch der Hemmkonzentrationen bestätigen, die zur 50prozentigen bzw. 75prozentigen Hemmung (HK_{50} , HK_{75}) führten (Tab. 3).

Tabelle 3

HK_{50} und HK_{75} bei *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* in Abhängigkeit vom pH-Wert (in γ Acrylsäure/ml)

Hemm-konzentration	pH	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
HK_{50}	5,6	90	10
	7,5	820	70
HK_{75}	5,6	125	13
	7,5	1250	115

Die Werte der Tabelle 3 gelten jedoch nur, wenn die Acs zu Beginn der log-Phase zugesetzt wurde. Während der log-Phase sind höhere Acs-Mengen notwendig, um gleichartige Hemmungen zu erzielen.

Antagonisten der Wirkung der Acrylsäure

Die Wirkung der Acrylsäure wird bei *E. coli* in geringem Maße durch Nikotinsäureamid, Mg^{++} und sehr deutlich durch SH-haltige Verbindungen, wie Cystein, Penicillamin und Cysteamin, aufgehoben. Bei *St. aureus* liegen die Verhältnisse etwas anders. Hier haben Ca^{++} und Mg^{++} und Cysteamin eine schwach antagonistische Wirkung; Cystein und Penicillamin sind unwirksam, Pantothersäure verstärkt die Hemmung.

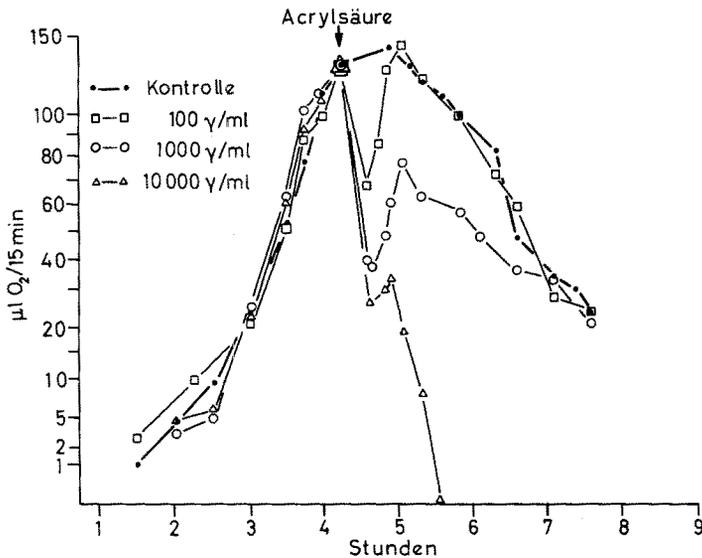


Abb. 1: O₂-Verbrauch von *Escherichia coli*-Zellen bei Zugabe von Acrylsäure (Pfeil) gegen Ende der logarithmischen Phase

2,4-Dinitrophenol wirkt bei *E. coli* sehr stark synergistisch, bei *St. aureus* ist der Effekt nicht so ausgeprägt. $5 \cdot 10^{-5}$ m DNP – ohne Acs – haben bei *E. coli* gar keine Hemmwirkung, bei *St. aureus* stören sie das Wachstum in gleichem Umfang wie 33 γ Acs/ml ($4,6 \cdot 10^{-4}$ m). $5 \cdot 10^{-4}$ m DNP hemmen bei beiden Organismen etwa ebenso stark wie die in den Versuchen zum Einsatz gekommene Acs-Menge (Tab. 4).

Die eingesetzte Acs-Menge entsprach etwa einer HK_{50} bei pH 6,5. Verfolgt man die Zunahme der optischen Dichte nach Acs-Zugabe, so beobachtet man bei *E. coli* eine rasche, fast ohne Latenzphase einsetzende Hemmung, von der sich die Kulturen je nach der Menge der zugegebenen Acs wieder erholen können. Die Ursache liegt nicht in einer Zerstörung des Hemmstoffes (GLOMBITZA 1970, unveröffentlichte Ergebnisse).

Tabelle 4

Einfluß verschiedener biologisch aktiver Substanzen auf die Wachstumshemmung bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* durch Acrylsäure. Die Prozentwerte beziehen sich auf die beschleunigte Zunahme (positive Werte) oder verlangsamte Zunahme (negative Werte) der optischen Dichte einer Schüttelkultur im Vergleich zur ebenfalls mit Acs gehemmten Kontrolle. Acrylsäure ($412 \mu\text{g/ml} = 5,7 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ bei *E. coli* und $33 \mu\text{g/ml} = 4,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ bei *St. aureus*) und zu prüfender Stoff wurden gleichzeitig zu Beginn der log.-Phase in einer solchen Konzentration zugegeben, daß in der Nährlösung die in Molaritäten angegebenen Konzentrationen erreicht wurden (pH 6,5)

Steigerung bzw. Verminderung des Wachstums in % zur gehemmten Kontrolle bei		<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>	
		0-60	60-120	0-60	60-120
Alanin	$5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0	0	0	0
Biotin	$5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0	0	0	0
Ca-Pantothenat (+ 20 mg Na-citrat)	$5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	0	0	- 2	0
	$5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	0	0	- 6	- 13
	$5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0	0	- 12	- 26
Nikotinsäureamid	$8,2 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	—	—	0	0
	$4,1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	—	—	0	0
	$8,2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	2	8	0	4
	$4,1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	6	11	—	—
	$8,2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	12	16	—	—
CaCl ₂	$5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	0	0	18	10
	$5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	11	- 10	29	29
MgSO ₄	$5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	0	- 5	10	3
	$5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	0	25	10	3
	$5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	5	33	- 8	- 13
Cystein	$8,2 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	—	—	7	- 2
	$4,1 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	—	—	- 5	- 3
	$8,2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	23	65	- 5	- 3
	$4,1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	20	67	—	—
	$8,2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	—	31	—	—
Penicillamin	$6,7 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	—	—	- 10	5
	$3,3 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	—	—	- 4	7
	$6,7 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	21	100	—	—
	$3,3 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	27	93	—	—
	$6,7 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	19	158	—	—
Cysteamin	$1,3 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	—	—	0	2
	$6,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	—	—	5	5
	$3,2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	5	62	—	—
	$6,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	—	—	11	14
	$1,3 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	20	131	—	—
	$6,5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	41	154	—	—
DNP	$5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$	- 11	- 5	—	—
	$5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$	- 11	- 9	- 6	8
	$5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	- 77	- 90	- 39	- 29

Einfluß der Acrylsäure auf die Atmung

Mißt man im Warburg-Apparat den O₂-Verbrauch einer *E. coli*-Kultur mit Acs-Zusatz, so beobachtet man zunächst eine abrupte Abnahme der O₂-Aufnahme, der bei

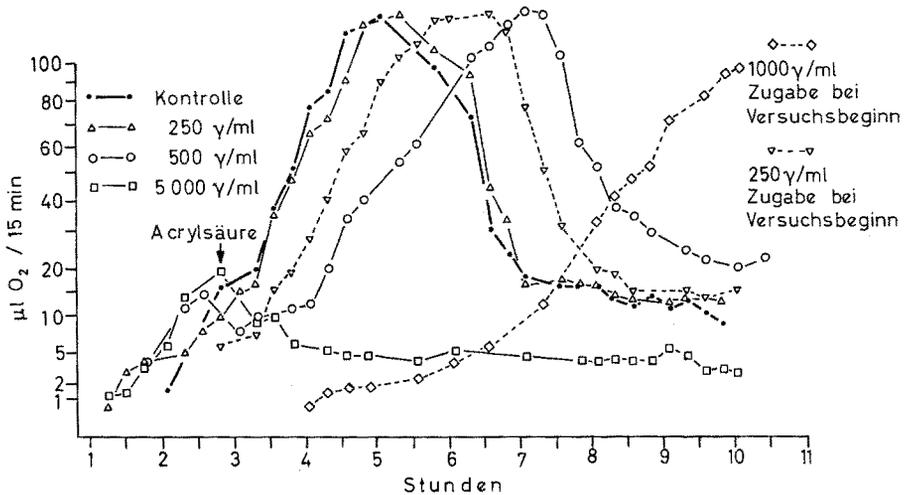


Abb. 2: O₂-Verbrauch von *Escherichia coli*-Zellen bei Zugabe von Acrylsäure (Pfeil) zu Beginn der logarithmischen Phase oder bei Start des Versuches (250 γ/ml und 500 γ/ml)

niedrigen Acs-Konzentrationen eine teilweise oder völlige Erholung der Kultur folgt. Das Bild ähnelt somit den Beobachtungen bei der Messung der optischen Dichte der Kultur. Sehr hohe Acs-Dosierungen bringen die Atmung jedoch völlig zum Erliegen. Setzt man die Acs nicht zu Ende, sondern zu Anfang der log-Phase zu, so führen selbst sehr hohe Acs-Konzentrationen nicht zu einem völligen Abbruch des O₂-Verbrauchs (Abb. 1 und 2). Impft man die Bakterien direkt in eine Acs-haltige Lösung, so beobachtet man eine Verlängerung der vorlogarithmischen Phase, und der Anstieg der Atmungskurven ist bei sehr hohen Acs-Konzentrationen etwas flacher.

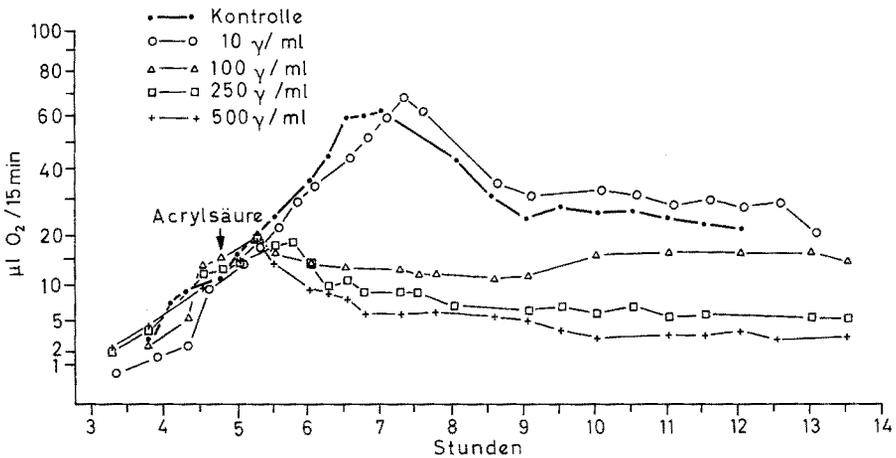


Abb. 3: O₂-Verbrauch von *Staphylococcus aureus*-Zellen bei Zugabe von Acrylsäure (Pfeil) zu Beginn der logarithmischen Phase

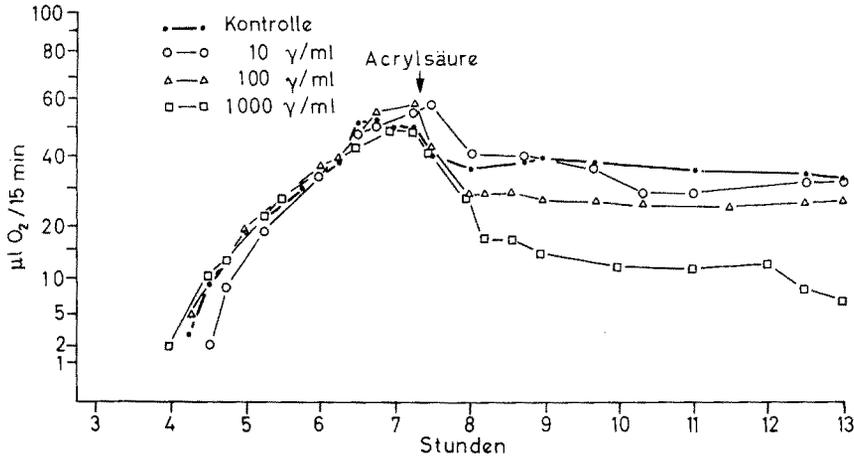


Abb. 4: O₂-Verbrauch von *Staphylococcus aureus*-Zellen bei Zugabe von Acrylsäure (Pfeil) bei Ende der logarithmischen Phase

Besonders bei jungen Kulturen ist die Wachstumshemmung sehr viel stärker als der Einfluß auf den O₂-Verbrauch. Ab Mitte der log-Phase liegen die Werte in der gleichen Größenordnung (HEYSER & GLOMBITZA 1971).

Auch bei *St. aureus* hemmt Acs die Atmung. Im Gegensatz zu *E. coli* ist jedoch kein abrupter Abfall des O₂-Verbrauches unmittelbar nach Acs-Zugabe zu beobachten (Abb. 3 und 4). Eine einmal wirksam gewordene Hemmung kann auch nicht wieder kompensiert werden. Der O₂-Verbrauch stagniert oder sinkt sogar geringfügig ab. Der unterschiedliche Einfluß der Acs auf die Atmung der beiden Bakterienstämme spiegelt sich auch im Einfluß der Acs auf die aerobe Glykolyse wider (HEYSER & GLOMBITZA 1971).

Der respiratorische Quotient wird durch Acs bei keinem der Versuchsorganismen beeinflusst. Er schwankt bis zum 15fachen der MHK innerhalb der Fehlergrenzen des Versuches von 0,98 bis 1,03 (ohne Acs 1,00).

Einfluß der Acrylsäure auf die Makromolekülsynthese

Die Synthese der Makromoleküle wurde an Hand der Einbaurate von ¹⁴C₍₂₎-Uracil, ¹⁴C₍₂₎-Thymidin und ¹⁴C₍₁₁₎-Leucin untersucht. Die markierten Vorstufen wurden nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer von Acs für je 5 Minuten zugegeben, um die momentanen Syntheseraten zu erfassen. Es wurde ein *E. coli*-Stamm benutzt, der im Hinblick auf weitere Untersuchungen (HEYSER & GLOMBITZA 1971) an Pyruvat adaptiert worden war (*E. coli*-Pyruvat-Stamm).

75 γ Acs/ml entsprechen bei einer jungen Kultur vom Beginn der log-Phase (E₆₀₀ 0,1) einer HK₂₅ (Tab. 5). Der Einbau von ¹⁴C-Thymidin in DNS wird etwa in gleichem Maße wie das Wachstum gehemmt. Die Schwankungen erklären sich aus der niedrigen Gesamteinbaurate von nur 300–600 Imp./min. Die Proteinsynthese läuft

während der ersten 35 min unvermindert weiter. Da die Zahl der Keime/ml in der gehemmten Probe zumindest nach 35 min kleiner ist als in der Kontrolle, resultiert daraus sogar eine verstärkte Proteinsynthese jeder einzelnen Zelle. Der Einbau von Uracil in RNS wird jedoch von Anfang an sehr viel stärker als alle anderen Vorgänge blockiert.

Tabelle 5
Wirkung der Acrylsäure auf die Makromolekülsynthese

Konzentration	Minuten nach Versuchsbeginn	beim Wachstum	Hemmung in % zur Kontrolle beim Einbau von		
			¹⁴ C-Uracil (RNS)	¹⁴ C-Thyminidin (DNS)	¹⁴ C-Leucin (Protein)
75 γ Acs/ml <i>E. coli</i> vom Beginn der log-Phase E ₆₀₀ 0,1	0- 5		73	0	0
	10-15	25	68	26	0
	20-25	24	72	41	0
	30-35	27	71	32	0
250 γ Acs/ml <i>E. coli</i> aus der Mitte der log-Phase E ₆₀₀ 0,5	0- 5	48	90	8	5
	10-15	52	91	30	38
	20-25	50	92	39	41
	30-35	50	92	46	28

Diese Befunde lassen sich auch bei älteren Kulturen aus der Mitte der log-Phase (E₆₀₀ ca. 0,5) bestätigen, die mit einer Acs-Menge versetzt wurden, die etwa einer HK₅₀ entsprach. Hierbei zeigt sich in Übereinstimmung mit den im Vorhergehenden geschilderten Ergebnissen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit – gemessen an der Zunahme der optischen Dichte – ohne Latenzphase von Anfang an gehemmt wird. Das gleiche gilt auch für den Uracil-Einbau, während bei Thyminidin und Leucin die Einbauraten erst nach 15 Minuten deutlich absinken.

DNP hat – ähnlich wie Acs – einen hemmenden Einfluß auf die RNS-Synthese (SIMON 1966). In *E. coli*-Pyruvat-Zellen aus der Mitte der logarithmischen Phase wird die RNS-Synthese durch $5 \cdot 10^{-5}$ m DNP kaum gestört. 150 γ Acs/ml (ca. $2 \cdot 10^{-3}$ m) stören das Wachstum kaum (Tab. 6), vermindern jedoch den Uracil-Einbau sehr stark.

Tabelle 6
Hemmung des Uracil-Einbaues bei *Escherichia coli*-Pyruvatstamm in Gegenwart von Acrylsäure und DNP. *E. coli*-Pyruvatstamm aus der Mitte der log-Phase E₆₀₀ 0,5

Minuten nach Versuchsbeginn	Hemmung des Einbaues von ¹⁴ C-Uracil in % zur Kontrolle bei		
	5 · 10 ⁻² μ Mol DNP/ml	150 γ Acs/ml	5 · 10 ⁻² μ Mol DNP + 150 γ Acs/ml
0- 5	6	68	86
10-15	1	43	73
20-25	5	46	68
30-35	1	32	66
Hemmung des Wachstums nach 35 min	1	7	20

Beide Substanzen zusammen wirken stark synergistisch hemmend auf das Wachstum und reduzieren den Uracil-Einbau noch einmal bis auf etwa die Hälfte.

Bei einer Fraktionierung der s-RNS und r-RNS am Saccharose-Gradienten – m-RNS wird unter den angewandten Versuchsbedingungen nicht miterfaßt – ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Sedimentationsprofil gehemmter und ungehemmter Kulturen feststellen. Der Einbau von ^{14}C -Uracil scheint in allen Fraktionen in gleicher Weise gehemmt zu sein. Eine Identifizierung der verschiedenen Peaks wurde nicht versucht. Normalerweise werden die drei ersten Peaks der r-RNS und der vierte der s-RNS zugeschrieben. Die Herkunft und Einheitlichkeit besonders der löslichen Anteile ist jedoch stark von den Versuchsbedingungen abhängig (SIMON & PRAAG 1964, CLICK & HACKETT 1966).

DISKUSSION

Bereits in der Einleitung wurde gesagt, daß Acrylsäure bei unterschiedlichen Bakterienstämmen sehr verschiedenartige Stoffwechselschritte zu hemmen vermag. Diese Erfahrung konnte auch für *E. coli* und *St. aureus* bestätigt werden. Während der O_2 -Verbrauch bei *St. aureus* nicht nennenswert stärker als das Wachstum gehemmt wurde, sinkt er bei *E. coli* bei höheren Acs-Konzentrationen so rapide ab, wie wir es meist nur bei bakteriziden Hemmstoffen sehen. Die Zahl der kultivierbaren Keime nimmt jedoch in der gleichen Zeitspanne von wenigen Minuten nicht ab; zudem wird der durch niedrige Acs-Gaben gesetzte Schaden bei *E. coli* rasch wieder behoben, während er bei *St. aureus* zeitabhängig verstärkt wird. Bei keinem Organismus wird der respiratorische Quotient im Vergleich zur Kontrolle verändert. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß der bei *E. coli* normalerweise vorherrschende aerobe Substratabbau auf anaerobe Energiegewinnungsprozesse umgestellt wird. Es ist wahrscheinlicher, daß der Substratabbau an einer Stelle unterbrochen wird und daß es so lange zur Anhäufung einer Zwischenstufe kommt, bis der aufgebaute Vorrat die offensichtlich reversible Hemmung überspielt. Es bleibt zu untersuchen, welche Reaktion gestört wird.

Einen ersten Hinweis gibt die Beobachtung, daß besonders SH-haltige Verbindungen Antagonisten der Acs bei *E. coli* sind, während alle anderen biologisch aktiven Substanzen keinen oder nur einen geringen Einfluß haben. Die Wirkung SH-haltiger Verbindungen kann einmal so erklärt werden, daß sie SH-Gruppen in Enzymen schützen, und zum anderen dadurch, daß die Acs durch Addition des R-SH an die Doppelbindung inaktiviert wird. Gegen den letzten Mechanismus spricht, daß alle diese Verbindungen bei *St. aureus* gar keinen oder nur einen geringen Einfluß haben.

Es ist auffallend, daß die Atmungshemmung besonders gegen Ende des logarithmischen Wachstums sehr stark ist; im Anfang der logarithmischen Phase ist die Wachstumshemmung stärker ausgeprägt als die Verminderung der Atmung. Diese Beobachtung findet ihre Erklärung darin, daß zu Beginn der logarithmischen Phase die Syntheseleistungen die Atmungsvorgänge überwiegen. Der Einbau von Thymidin in die DNS wachsender Zellen wird insgesamt nur etwa ebenso stark gehemmt wie das Wachstum. Der Einbau von Uracil in die RNS wird jedoch sehr viel stärker unterbunden als die Zunahme der optischen Dichte. Dies könnte einmal auf Störungen der

Uracil-Aufnahme und zum anderen auf Störungen des Uracileinbaues zurückzuführen sein. Da jedoch die RNS-Synthese auch in Zellen gehemmt ist (GLOMBITZA 1970), denen Uracil nicht über die Nährlösung zugeführt wurde, scheint Acs weder die Uracil-Synthese noch die Uracil-Aufnahme, sondern nur den Einbau in RNS zu stören. Eine Störung der m-RNS-Synthese würde sehr bald auch die Proteinsynthese mit beeinträchtigen. Der Einbau von Leucin wird jedoch gar nicht oder sehr viel weniger als das Wachstum beeinflusst.

Einen ähnlichen Einfluß auf die Synthese der Makromoleküle haben bei *E. coli* die Hemmstoffe Levorphanol (SIMON & PRAAG 1964) und DNP (SIMON et al. 1966). In stärkerem Maße als die Zunahme der optischen Dichte hemmen Acs und DNP den Einbau von Uracil in *E. coli*. Es wird vermutet, daß die synergistische Hemmung der RNS-Synthese auch die Ursache der synergistischen Wachstumshemmung ist.

DNP hemmt selektiv die Synthese der r-RNS (SIMON et al. 1966). Die gesamte RNS einer Zelle besteht zu einem sehr hohen Prozentsatz aus r-RNS. Acs scheint ebenfalls in die r-RNS-Synthese einzugreifen. Diese Vermutung wird besonders durch das Sedimentationsprofil gestützt. Die Hemmung der r-RNS scheint jedoch im Gegensatz zu der Wirkung des DNP nicht selektiv zu sein, da in gleichem Maße der Einbau in die lösliche Fraktion vermindert ist. Die Feststellung des genauen Angriffspunktes der Acs im RNS-Stoffwechsel muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Acrylsäure ist innerhalb der einfachen ungesättigten Carbonsäuren ein relativ spezifischer Hemmstoff für *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und andere Bakterien.
2. Acrylsäure hat nur in sehr hohen Konzentrationen bei sehr langen Inkubationszeiten schwach bakterizide Eigenschaften.
3. Sie hemmt besonders bei älteren *E. coli*-Zellen die Atmung sehr viel stärker als das Wachstum. Bei jungen *E. coli*-Kulturen und bei *St. aureus* sind Wachstums- und Atmungshemmung etwa gleich stark.
4. Die antibakteriellen Eigenschaften der Acrylsäure gegen *E. coli* werden durch SH-haltige Verbindungen aufgehoben. 2,4-Dinitrophenol wirkt dagegen stark synergistisch. Bei *St. aureus* sind diese Wirkungen nur schwach ausgeprägt.
5. Der Einbau von Leucin in Protein wird durch Acrylsäure bei *E. coli* weniger als das Wachstum, der Einbau von Thymidin in DNS fast ebenso stark wie das Wachstum und der Einbau von Uracil in RNS von Anfang an sehr viel stärker gestört. DNP steigert die Hemmung des Uracil-Einbaues durch Acrylsäure.
6. Die Synthese der r-RNS und s-RNS wird in etwa gleichem Umfang gestört; die Synthese der m-RNS scheint nicht beeinflusst zu werden.

Danksagungen. Herrn Prof. Dr. M. STEINER danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit mit Sachmitteln des Institutes, Fr. A. WAGNER für ihre sorgfältige Mitarbeit und der DFG für eine Sachbeihilfe. Wir danken ferner Herrn Prof. Dr. W. ESCHRICH, Göttingen, für die Möglichkeit, seine Spinco SW 50 zu benutzen, und Herrn Dr. Sous von der Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg, für die Überlassung der Bakterienstämme.

ZITIERTE LITERATUR

- BRISOU, J. & DE RAUTLIN DE LA ROY, J., 1964. Action de l'acide acrylique sur *St. aureus* et quelques coliformes. C. r. Séanc. Soc. Biol. **158**, 642–645.
- CLICK, R. E. & HACKETT, P. D., 1966. The isolation of ribonucleic acid from plant, bacterial or animal cells. Biochim. biophys. Acta **129**, 74–84.
- GLOMBITZA, K.-W., 1968. Antimikrobielle Inhaltsstoffe in Meeresalgen. Habilitationsschrift, Bonn.
- 1969. Antibakterielle Inhaltsstoffe in Algen. 1. Mitteilung. Helgoländer wiss. Meeresunters. **19**, 376–384.
- HACKETT, D. P., 1960. Respiratory inhibitors. Handb. PflPhysiol. **12** (2), 21–41.
- HEYSER, R. & GLOMBITZA, K.-W., 1971 (In Vorbereitung).
- JANKE, A. & DICKSCHEIT, R., 1967. Handbuch der mikrobiologischen Laboratoriumstechnik. Steinkopff, Dresden, 500 pp.
- KLEIN, P., 1957. Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer, Berlin, 210 pp.
- LÜCK, H., 1959–1960. Einfluß von Konservierungsmitteln auf Häminenzyme. 2. Mitt. Untersuchungen über die Korrelation zwischen dem Konservierungseffekt organischer Säuren und ihrer Katalasehemmung. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. **111**, 190–198.
- MICHEL, M. C., 1965. Comparison de l'action de l'acrylate de sodium et de la chlortetracycline sur la flore intestinale du porc. Anns Biol. anim. Biochim. Biophys. **5** (2), 223–236.
- REHM, H. J., 1967. Zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der Sorbinsäure. 6. Mitt. Die Wirkung der Sorbinsäure auf den Kohlehydratstoffwechsel von *Escherichia coli*. Zentbl. Bakt. ParasitKde. (Abt. 2) **121**, 491–502.
- SIEBURTH, J. MC. N., 1960. Acrylic acid, an "antibiotic" principle in *Phaeocystis* blooms in antarctic waters. Science, N.Y. **132**, 676–677.
- 1961. Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of polar marine animals. J. Bact. **82**, 72–79.
- SIMON, E. J. & PRAAG, D. VAN, 1964. Inhibition of RNA synthesis in *Escherichia coli* by levorphanol. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. **51**, 877–883.
- — & ARONSON, F. L., 1966. The selective inhibition of ribosomal RNA synthesis in *Escherichia coli* by 2,4-Dinitrophenol. Molec. Pharmac. **2**, 43–49.
- THIJSE, G. J. E., 1964. Fatty-acid accumulation by acrylate inhibition of β -oxidation in an alkane-oxidizing *Pseudomonas*. Biochim. Biophys. Acta **84**, 195–197.
- WHITLEY, H. R. & ORDAL, E. J., 1957. Fermentation of α -keto-acids by *Micrococcus lactilyticus*. J. Bact. **74**, 331–336.

Anschrift des erstgenannten Autors: Prof. Dr. K.-W. GLOMBITZA
Pharmakognostisches Institut
der Universität Bonn
53 Bonn
Nußallee 6
Bundesrepublik Deutschland