

## DIE REDUKTION VON PERCHLORAT DURCH BAKTERIEN. I.\* UNTERSUCHUNGEN AN INTAKTEN ZELLEN

E. HACKENTHAL, W. MANNHEIM, R. HACKENTHAL und R. BECHER

Pharmakologisches Institut und Hygiene-Institut der Universität Heidelberg

(Received 9 July 1963; accepted 29 August 1963)

**Abstract**—The reduction of perchlorate by several species of heterotrophic bacteria is demonstrated with the use of chlorine-36 labelled perchlorate. The final product of reduction is chloride. The intermediary stages could not be detected. They are supposed to be chlorate, chlorite and hypochlorite. The reduction of perchlorate is strictly bound to the presence of the bacterial nitrate reductase. Repeated subcultures of several perchlorate reducing strains in media with increasing content of perchlorate resulted in partial or total loss of either nitrate and perchlorate reducing capacity. Perchlorate reduction of *Staph. epidermidis* in complex media is inhibited by nitrate. Nitrate reduction of resting cells of *Bac. cereus* is inhibited by perchlorate in a non-competitive manner. Anaerobic preincubation of *Bac. cereus* in complex media with nitrate resulted in enhanced reduction rates for nitrate and decreased reduction rates for perchlorate and vice versa.

The results suggest the two anions to be substrates to the same enzyme, theni trate reductase. The effects of preincubation are interpreted as adaptive changes in a permeability controlling system for nitrate and perchlorate.

AUS DER Reihe der chemisch stabilen anorganischen Sauerstoffsäuren Nitrat, Sulfat, Phosphat und Perchlorat kann Nitrat von zahlreichen Bakterienstämmen, Hefen, Pflanzen und Geweben höher organisierter Tiere reduziert werden.<sup>1</sup> Weniger weit verbreitet ist die Sulfatreduktion.<sup>2, 3</sup> Angaben über die Phosphatreduktion durch Stäbchen, die aus Humus isoliert wurden,<sup>4, 5</sup> ist widersprochen worden,<sup>6</sup> sowohl aus Erwägungen über den zur Reduktion notwendigen hohen thermochemischen Energieaufwand, als auch wegen der Unreproduzierbarkeit der Ergebnisse. Quastel u. Mitarb.<sup>7</sup> konnten bei *B. coli* und *B. pyocyaneum* keine Perchloratreduktion finden. Auch bei Menschen und Ratten gelang der Nachweis einer Perchloratreduktion nicht.<sup>8–11</sup>

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass verschiedene heterotrophe Bakterienstämme in der Lage sind, Perchlorat zu reduzieren. Einige Bedingungen dieser Reduktion, sowie Hinweise auf die Identität des umsetzenden Enzyms werden beschrieben.

### MATERIAL UND METHODEN

Der grösste Teil der verwendeten Stämme sind Laborstämme des Hygiene-Institutes, einige sind internationalen Stammsammlungen (*Staph. aureus* SG 511, *Bac. cereus*

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

ATCC 8035) entnommen. Eine für die Versuche ausreichende Zellmasse wurde durch aerobe Kultur auf Trypticase-Soy-Agar (Baltimore Biological Laboratories) 14 Stunden bei 37° gewonnen, die Zellen dann mit 0,067m Phosphatpuffer pH 6,8 abgeschwemmt und bei 4° und 6000 g abzentrifugiert, zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und in diesem in geeigneter Zelldichte suspendiert.

Varianten mit erhöhter Perchlorattoleranz wurden durch mehrere (bis zu 40) von den Wildstämmen ausgehende Subkulturen in flüssigen Caseinhydrolysat-Nährböden (Aminovit Boehringer) mit allmählich ansteigendem, subinhibitorischem Perchloratgehalt gewonnen. Hierbei findet eine Selektion von Varianten mit geringerer Perchloratsensibilität statt, die, wenn auch nur eine Toleranzerhöhung um das 2–4 fache gegenüber den Wildstämmen erzielt wurde, mit Vorgängen bei der Resistenzbildung gegen Antibiotika vergleichbar ist. Daher werden die durch Passagen in perchlorathaltigen Medien gewonnenen Varianten kurz als perchloratresistent bezeichnet.

Die Perchloratreduktion wurde mit Hilfe von Cl-36 markiertem Perchlorat (spez. Aktivität ca. 0,04  $\mu\text{C}/\text{mg}$ ) als Chlorid-36 bestimmt.\* Einzelheiten dieser Methode sind an anderer Stelle beschrieben,<sup>10, 12</sup> sodass hier nur das Prinzip angegeben sei:

Zum Überstand der mit Trichloressigsäure versetzten und abzentrifugierten Inkubationsansätze wurde Natriumnitrit zugeetzt, um etwa vorhandenes Chlorat oder Chlorit zu Chlorid zu reduzieren. Nach Zugabe von inaktivem NaCl als Träger schloss sich eine Silbernitratfällung in salpetersaurem Milieu an. Diese Fällung blieb mehrere Stunden im Dunkeln stehen. Der Silberchloridniederschlag wurde dreimal mit einer Silbernitrat enthaltenden Waschlösung gewaschen, dann ammoniakalisch gelöst, inaktives Perchlorat zugesetzt, um in den Niederschlag eingeschlossenes Perchlorat zu 'verdünnen', dann wieder durch Ansäuern ausgefällt. Diese Umfällung mit dreimaligem Waschen wurde anschliessend wiederholt, um Reste von radioaktivem Perchlorat sicher aus der Probe zu entfernen. Die endgültige Fällung wurde wieder ammoniakalisch gelöst und in einem Flüssigkeitszählrohr FHZ 44 mit dem Zählgerät FH 49 (Frieske + Hoepfner) die Radioaktivität der Probe gemessen.

Eine Kontrolle des Reinigungsprozesses wurde dadurch erhalten, dass eine Probe der Ausgangsperchloratlösung (mit ca. 50 facher Aktivität gegenüber den Versuchsansätzen) diesem Reinigungsprozess unterworfen und danach keine messbare Aktivität vorgefunden wurde, womit zugleich die Sicherheit gegeben war, dass die verwendete Ausgangslösung radiochemisch rein war. Diese Kontrolle wurde während der Versuchszeit mehrfach wiederholt.

Die *Veratmung* verschiedener Substrate wurde in der üblichen Weise in der Warburg-Apparatur gemessen. Inkubationsansätze: 1 ml Zellsuspension (1–2 mg Trocken-gewicht), 50  $\mu\text{mol}$  Substrat, Ringerphosphat pH 6,8 ad 1,9 ml. Im Zentralgefäß 0,1 ml 20% KOH, Gasphase Sauerstoff, 37°, Schüttelfrequenz 98/min.

### Katalasebestimmungen

Zur Bestimmung der Katalaseaktivität diente die manganometrische Methode mit Perborat als Substrat nach Feinsten.<sup>13</sup> Eine empirische Katalaseeinheit entspricht

\* Für die Herstellung des markierten Perchlorates aus Chlorid-36 danken wir Herr Priv. Doz. Hans Peter Boehm (Anorganisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg).

0,05 Milliäquivalent zersetzten Perborats/mg Trockengewicht in 5 min bei 37° in 0,067 m Phosphatpuffer pH 6,8.

Die *Nitritbildung* aus Nitrat wurde mit dem Griess-Ilosvay-Reagens nachgewiesen und nach demselben Prinzip quantitativ bestimmt: Nach Abstoppen der Reaktionsansätze durch Einstellen der Inkubationsgefäße in Eiswasser wurden die Zellen abzentrifugiert und 2 ml des Überstandes nach passender Verdünnung mit Wasser mit 1 ml Reagens I (1 % Sulfanilsäure in 0,1 nHCl) und 1 ml Reagens II (0,02 %  $\alpha$ -Naphthylamin in 0,1 nHCl) versetzt. Der Farbanatz blieb im Dunkeln stehen um nach genau 45 min bei 500 m $\mu$  im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in 2 cm Küvetten gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen zu werden.

Nitrat wurde durch Überführung in Nitrosalizylat und Extinktionsmessung bei 410 m $\mu$  bestimmt.<sup>14</sup>

Die *Absorptionsspektren* wurden an dichten Suspensionen lebender Keime von Staph. epidermidis nach Zugabe von Natriumdithionit in 1 cm Küvetten im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II aufgenommen. Bei Vergleich zweier Suspensionen wurden diese durch entsprechende Verdünnung mit Phosphatpuffer pH 6,8 auf gleiche Suspensionsdichte, gemessen an gleicher Extinktion bei 600 m $\mu$  eingestellt.

#### ERGEBNISSE

Perchloratreduktion: 8 von 11 geprüften Keimen reduzierten unter den angegebenen Bedingungen Perchlorat (Tabelle 1). Chlorat als mögliches erstes Folgeprodukt der Reduktion liess sich bei mehrmaliger Prüfung während der Inkubation nicht nachweisen (Tüpfelreaktion: Benzidinacetat—konz. Schwefelsäure, Nachweisgrenze 1  $\mu$ g/Probe).

TABELLE 1. REDUKTION VON NaClO<sub>4</sub>. 5 ml CASEINHYDROLYSAT-NÄHRBÖDEN MIT 0,1 % NaClO<sub>4</sub> WURDEN MIT EINEM KLEINEN INOKULUM DES BETR. KEIMES 48 STUNDEN BEI 37° BEBRÜTET. PRÜFUNG DER PERCHLORATREDUKTION SIEHE METHODIK

Spezies	Stamm Nr.	Perchloratreduktion
Staphylococcus aureus	SG 511	+
Staphylococcus epidermidis	Laborstamm PT 75/7	+
Micrococcus sp.	Laborstamm PT 75/3	+
Sarcina sp.	Laborstamm PT 75/3	+
Bac. cereus	ATCC 8035	+
Escherischia coli	Laborstamm 992/51	+
Pseudomonas aeruginosa	Laborstamm 'v'	+
Serratia marcescens	727/61	+
Streptococcus pyogenes	Laborstamm PT 75/7	—
Streptococcus faecalis	Laborstamm 'v'	—
Flavobacterium sp.	3102/60	—

Perchloratresistente Varianten: In Tabelle 2 werden Reduktionsleistungen perchloratresistenter Varianten im Vergleich zu denen der Wildstämme wiedergegeben.

Aus den Daten dieser Tabelle sind neben der unterschiedlichen Depression der Perchloratreduktion durch die Sauerstoffatmosphäre zwei Ergebnisse zu entnehmen: 1. Die Resistenzzüchtung, die ursprünglich mit dem Ziel begonnen wurde, Varianten mit grösserem Perchloratumsatz zu erhalten, führte zu Varianten, die die Fähigkeit Perchlorat zu reduzieren fast oder ganz verloren hatten. 2. Es besteht eine strenge

Parallelität zwischen Perchlorat und Nitratreduktion, die auch bei den in der Tabelle 1 aufgeführten Keimen zu finden ist: Die nicht perchloratreduzierenden Spezies besitzen keine Nitratreduktase, die nicht perchloratreduzierenden Varianten reduzierender Wildstämme setzen auch Nitrat nicht um. Ein abweichendes Verhalten zeigt *Pseudomonas aeruginosa*, deren Varianten mehr Perchlorat umsetzen als der Wildstamm.

TABELLE 2. PERCHLORATREDUKTION VERSCH. STÄMME UND IHRER PERCHLORATRESISTENTEN VARIANTEN

Stamm	Red.m $\mu\text{mol ClO}_4^-/\text{mg Trock. gew.}$		Nitritbildung aus Nitrat	
	$\text{O}_2$	$\text{N}_2$		
Staph. epidermidis PT 75/7	W R	1,1 1,6	192 1,7	+++ (+)
Staph. aureus SG 511	W R	Spuren 0	67,3 0,5	+++ (+)
Bac. cereus ATCC 8035	W R	172 Spuren	228 0,3	+++ 0
Pseudomonas aeruginosa 'v'	W R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	8 14 17	4 17 6	++ +++ +++
Serratia marcescens Nr. 727/61	W R	54 2	172 0	+++ 0
Esch. coli 992/51	W R	15 Spuren	266 Spuren	+++ (+)
Flavobact. sp. Nr. 3102/60	W R	0 0	0 0	0 0

Ansätze: 1 ml Zellsuspension (6–12 mg Trockengewicht), 1 ml Aminovit 10%, 2 ml 0,067 m Phosphatpuffer 8,0, 20 oder 25  $\mu\text{mol NaClO}_4$ . Inkubation 8 Stunden (Staph. epidermidis 24 hr) bei 37° unter Stickstoff bzw. Sauerstoffatmosphäre. Nitritbildung anaerob in Aminovitröhrchen mit 0,1%  $\text{KNO}_3$  nach 24 hr Bebrütung bei 37° grob abstufend (visuell) beurteilt. W = Wildstamm, R = Perchloratresistente Variante.

### Häminfermente

In der Elektronentransportkette vom physiologischen Substrat zum Nitrat in der intakten Zelle ist neben der Nitratreduktase auch ein Cytochromsystem beteiligt.<sup>1</sup> Gleiche Bedingungen könnten für die Perchloratreduktion gelten. Bei der Resistenzbildung von Mikroorganismen gegen Antibiotika wurde neben anderen biochemischen Defekten in einigen Fällen<sup>15–18</sup> ein Verlust der Nitratreduktion beobachtet, der als unspezifische Störung des empfindlichen Elektronentransportsystems aufzufassen ist. Dem entsprechend wurden auch Unterschiede in der Fermentation und Veratmung verschiedener Kohlenhydrate zwischen Wildstämmen und ihren Antibiotikaresistenten Mutanten beschrieben.<sup>15–17</sup> Um in den vorliegenden Fällen des Nitrataseverlustes bei perchloratresistenten Varianten eine ähnliche unspezifische Störung des Elektronentransportsystems auszuschliessen, wurden einige häminfermentabhängige Leistungen dieser Varianten mit denen ihrer Wildstämme verglichen.

Der Sauerstoffverbrauch von *Staphylococcus epidermidis* mit verschiedenen Substraten im Warburgversuch ist auf der Tabelle 3 angegeben.

Wildstamm und Variante haben bei gleichem Substrat den gleichen Sauerstoffverbrauch, die Anwesenheit von Perchlorat im Ansatz hatte keinen Einfluss.

Auch die Katalaseaktivitäten (Tabelle 4) fast aller untersuchten perchloratresistenten Varianten unterscheiden sich nicht von denen ihrer Wildstämme. Zwei Stämme jedoch, *Staph. aureus* und *Flavobact.* haben nach der Resistenzzüchtung ihre Katalaseaktivität beinahe vollständig eingebüßt.

TABELLE 3.  $QO_2$ -WERTE VERSCH. SUBSTRATE.

ATMUNG VON *STAPH. EPIDERMIDIS* (WILDSTAMM UND PERCHLORATRESISTENTE VARIANTE) MIT UND OHNE PERCHLORAT.

Warburgansätze: 1 ml Zellsuspension (1–2 mg Trockengewicht), 50  $\mu$ mol Substrat, Ringerphosphat pH 6,8 ad 1,9 ml. Perchloratzusatz: 0,33 mmol. Zentralgefäß 0,1 ml 20% KOH. Temp. 37°, Gasphase:  $O_2$ , Schüttelfrequenz 98/min. Werte der Tabelle in  $QO_2 = \mu L O_2/mg$  Trockengewicht/Stunde. Die Tabellenwerte sind Mittelwerte von 3–8 Einzelbestimmungen.

Substrat	Wildstamm		Variante	
	—	+ $NaClO_4$	—	+ $NaClO_4$
Pyruvat	30,3	28,2	30,6	28,3
Glukose	43,0	38,3	39,4	39,1
Succinat	44,1	39,6	40,9	37,9
Fumarat	13,1	13,0	14,8	15,1

TABELLE 4.

Katalaseaktivitäten versch. Wildstämme und deren perchloratresistenter Varianten. Katalasebest. nach Feinstein. 1 emp. Katalaseeinheit entspricht 0,05 Milliäquivalent zersetztem Perborat/mg Bakterientrockengewicht/5 min bei 37°.

Stamm	Katalaseaktivität (emp. Einheiten)	
	Wildstamm	Variante
<i>Staph. epidermidis</i>	13,1	13,8
<i>Staph. aureus</i>	44,0	3,6
<i>Esch. coli</i>	7,3	6,4
<i>Flavobact.</i>	40,0	2,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22,0	27,0
<i>Bac. cereus</i>	3,1	2,0

Die Absorptionsspektren dichter Suspensionen intakter Zellen von *Staph. epidermidis* zeigten keinen Unterschied zwischen Variante und Wildstamm. Es fanden sich in beiden Fällen scharfe Absorptionsmaxima bei 554 und 442  $m\mu$ , angedeutete Banden bei 525 und 440  $m\mu$ , die den Cytochrombanden dieser Keimgruppe unter anaeroben Bedingungen entsprechen.<sup>19</sup> Die schärfsten Banden wurden mit Natriumdithionit, weniger ausgeprägte mit CO oder Cyanid, keine Banden mit unbehandelten Suspensionen erhalten.

#### ZUR IDENTITÄT VON PERCHLORAT—UND NITRATREDUKTASE

Die oben mitgeteilten Ergebnisse lassen vermuten, dass Nitrat und Perchlorat Substrate eines Enzyms sind. Im folgenden werden einige Versuche zur Klärung dieser Frage beschrieben.

Auf der Abb. 1 ist der zeitliche Verlauf der Perchloratreduktion in einer dichten Zellsuspension von *Staph. epidermidis* (15,5 mg Trockengewicht/ml) in komplexem Milieu unter anaeroben Bedingungen wiedergegeben. Die Perchloratreduktion setzt mit einer Verzögerung von ca. 1 Stunde nach Inkubationsbeginn ein, was auf die induktive Natur des umsetzenden Fermentes schliessen lässt. Die Induktivität der

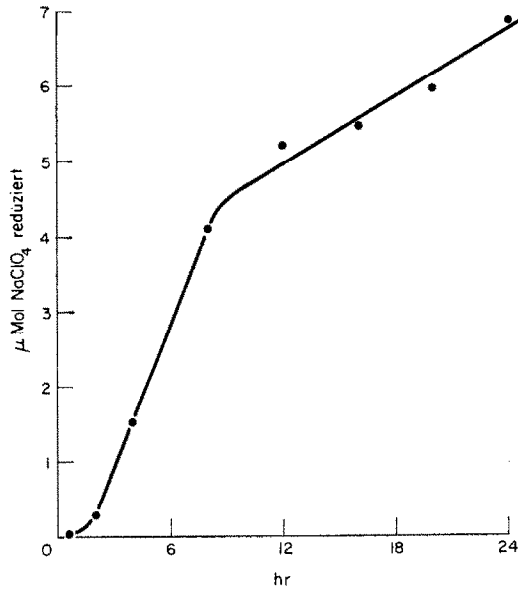


ABB. 1. Zeitabhängigkeit der Perchloratreduktion durch *Staph. epidermidis*. Jeder Ansatz enthielt: 1 ml Zellsuspension (15,5 mg Bakterientrockengewicht), 1 ml 10% Aminovit (Boehringer), 2 ml 0,013 M Ringer-Phosphat pH 6,8, 15 mg Glukose und 50 μMol Cl<sup>36</sup>-NaClO<sub>4</sub>. Inkubation bei 37°C. unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Bestimmung der Perchloratreduktion siehe Methodik.

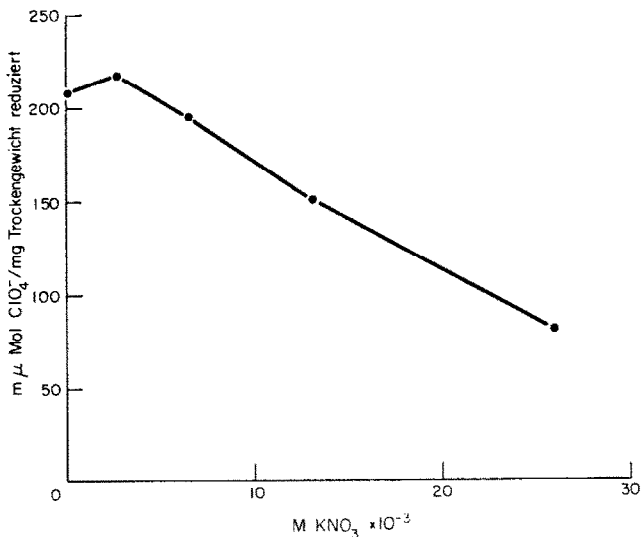


ABB. 2. Einfluss von Nitrat auf die Perchloratreduktion von *Staph. epidermidis*. Jeder Ansatz enthielt: 1 ml Zellsuspension (21 mg Bakterientrockengewicht), 1 ml 10% Aminovit (Boehringer), 3 ml 0,013 M Ringer-Phosphat pH 6,8, 10 mg Glukose, 50 μMol Cl<sup>36</sup>-NaClO<sub>4</sub>, variable Nitratkonzentration. Inkubation 24 hr unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C.

Nitratreduktase ist seit langem bekannt.<sup>20-22</sup> Die Perchloratreduktion in komplexem Milieu wird durch Nitratzusatz in Abhängigkeit von dessen Konzentration gehemmt, wie die Abb. 2 zeigt. Wegen der geringen spezifischen Aktivität des verwendeten Perchlorates konnte dieser Effekt zunächst nicht unter definierten Bedingungen (kürzere Inkubationszeiten, synthetisches Medium) untersucht werden. Die Einhaltung solcher Bedingungen war dagegen bei der Untersuchung des Perchlorateinflusses auf die Nitratreduktion möglich. Die Ergebnisse sind auf der Abb. 3 wiedergegeben, auf der Abb. 4 in der Darstellung nach Lineweaver-Burke. Die Abbildungen zeigen, dass

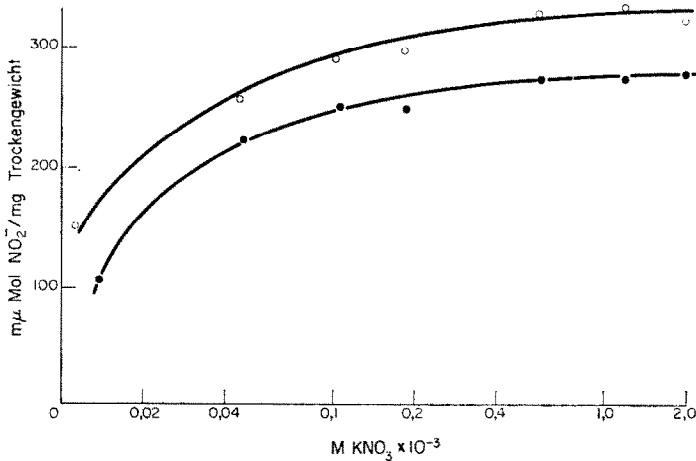


ABB. 3. Einfluss von Natriumperchlorat auf die Nitratreduktion ruhender Zellen von *Bac. Cereus*. Jeder Ansatz enthielt: 1 ml Zellsuspension (0,58 mg Bakterientrockengewicht), 3 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH 6,8, 1 ml Ringer-Phosphat pH 6,8, 100 µMol Natriumpyruvat, variable Nitratkonzentration. Inkubation 30 min. bei 37°C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

○—○ ohne Zusatz. ●—● mit 20 µMol NaClO<sub>4</sub>/Ansatz

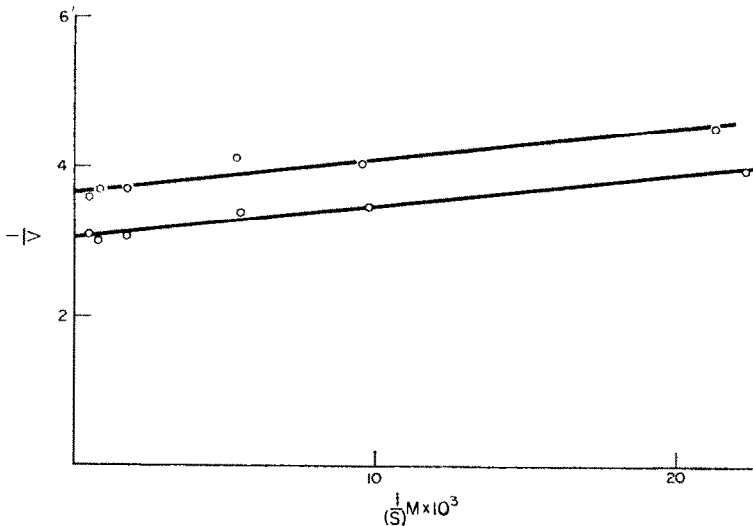


ABB. 4. Lineweaver und Burke-Darstellung der Werte von Abbildung 3.  
v µMol KNO<sub>3</sub> reduziert/mg Bakterientrockengewicht  
(S) = Nitratkonzentration in µM.

Perchlorat die Reduktion von Nitrat durch ruhende Zellen von *Bac. cereus* in nicht kompetitiver Weise hemmt.

Die aerob gewachsenen Zellen von *Bac. cereus* wurden in den meisten Fällen zur Erreichung höherer Nitrataktivitäten einer anaeroben Vorinkubation in komplexem Milieu mit Nitrat als Induktor unterworfen. Bei systematischer Untersuchung der Aktivitätssteigerung nicht nur mit Nitrat, sondern parallel dazu mit Perchlorat als 'Induktor' ergab sich ein regelmässiges Verhalten, von dem in der Tabelle 5 ein repräsentatives Beispiel wiedergegeben ist.

TABELLE 5.

Einfluss der Vorinkubation auf Nitrat- und Perchloratreduktion ruhender Zellen von *Bac. cereus*, Vorinkubation: 14 ml Zellsuspension (26 mg Bakterientrockengewicht/ml), 10 ml 10% Aminovit, 10 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 8,0, 0,2 g Glukose, 0,34 mmol  $\text{KNO}_3$  bzw. 0,17 mmol  $\text{NaClO}_4$  (Endkonzentration  $10^{-2}$  mol. bzw.  $5 \cdot 10^{-3}$  molar). Inkubation 3 Stunden bei  $37^\circ$  unter  $\text{N}_2$ . Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, 3 mal mit Phosphatpuffer gewaschen und in diesem resuspendiert. Ansätze zur Bestimmung der Nitrat- und Perchloratreduktion ruhender Zellen vor und nach Vorinkubation: 1 ml Zellsuspension, 3 ml 0,067 m Phosphatpuffer pH 6,8, 1 ml Ringerphosphat, 100  $\mu\text{mol}$  Natriumpyruvat, 60  $\mu\text{mol}$   $\text{KNO}_3$  bzw. 30  $\mu\text{mol}$   $\text{NaClO}_4$ . Inkubation 1 bzw. 3 Std. bei  $37^\circ$  unter  $\text{N}_2$ .

	m $\mu\text{mol}$ $\text{ClO}_4^-$ /mg Trockengew. in 3 Std. red.	m $\mu\text{mol}$ $\text{NO}_3^-$ /mg Trockengew. in 1 Std. red.
Ohne Vorinkubation	106	334
Vorinkubiert mit Nitrat	50	945
Vorinkubiert mit Perchlorat	248	190

Die Umsatzrate desjenigen Substrates, mit dem vorinkubiert wurde, ist gegenüber den nicht vorinkubierten Zellen erhöht, die des anderen vermindert. Die Umsatzwerte für Nitrat in der Tabelle 5 sind aus der gebildeten Nitritmenge berechnet. Eine Fehldeutung der Ergebnisse wäre dann möglich, wenn in verschiedenem Umfange das gebildete Nitrit weiter reduziert worden wäre. Diese Möglichkeit konnte durch Nitratbestimmungen im gleichen Ansatz, die eine vollständige Bilanz des eingesetzten Nitrates ergab, ausgeschlossen werden.

#### DISKUSSION

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene heterotrophe Mikroorganismen in der Lage sind, Perchlorat zu reduzieren. Thermochemisch ist dieser Befund durchaus nicht auffällig, wenn man die Wärmetönungen der Bildung der in diese Gruppe gehörenden anorganischen Sauerstoffsäuren vergleicht.<sup>28</sup>

	+0		
$\text{ClO}_3^-$	$\rightarrow$	$\text{ClO}_4^-$	-20,2 kcal
$\text{NO}_2^-$	$\rightarrow$	$\text{NO}_3^-$	-24,3 kcal
$\text{SO}_3^{--}$	$\rightarrow$	$\text{SO}_4^{--}$	-65,0 kcal
$\text{PO}_3^{--}$	$\rightarrow$	$\text{PO}_4^{--}$	-76,0 kcal

Perchlorat hätte hiernach noch etwas günstigere Bedingungen zur Reduktion als Nitrat. Chemisch ist Perchlorat dagegen stabiler als Nitrat.

Auf die Möglichkeit, dass Perchlorat durch die bakterielle Nitratreduktase reduziert wird, wurde bereits hingewiesen. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung,



dass die Perchloratreduktion strikt an die Anwesenheit der Nitratreduktase gebunden ist. Bei den perchloratresistenten Keimen geht dieses gemeinsame Auftreten von Perchloratreduktion und Nitratase über eine rein passive Korrelation hinaus. Dies lässt sich in folgender Weise begründen: Als Folgeprodukt der Perchloratreduktion ist zunächst Chlorat zu erwarten. Dieses konnte unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden, was dadurch zu erklären ist, dass Chlorat sehr schnell umgesetzt werden kann,<sup>7</sup> während die Nitratreduktion bei der überwiegenden Zahl der untersuchten Keime zur Anhäufung von Nitrit führt. Die weiteren Reduktionsprodukte sind ebenfalls nicht bekannt. Als Endprodukt erscheint Chlorid. Dazwischen ist aber mit dem Auftreten von Chlorit und/oder Hypochlorit rechnen, deren hohe Toxizität für die Bakterienzelle bekannt ist (z.B. 7, 23, 24). Diese Stoffe sind ausserordentlich labil. Es ist daher zu erwarten, dass sie ausschliesslich in der Zelle, in der sie entstanden sind, zur Wirkung kommen, und keine nennenswerten Mengen in das umgebende Medium gelangen. Die Perchloratreduktion wird also, wenn nur der Umsatz genügend gross ist, zu einer Zellschädigung führen, über deren Lokalisation und Umfang nichts bekannt ist. Diese Schädigung reicht aus, solchen Varianten, die primär keine Fähigkeit zur Perchloratreduktion haben, in perchlorathaltigen Medien einen Selektionsvorteil zu verschaffen, der zu einer Population perchloratresistenter Keime führt, die diese Eigenschaft auch nach mehreren Subkulturen auf perchloratfreien Medien behält. Der Verlust auch der Nitratreduktase, der das charakteristischste gemeinsame Merkmal der resistenten Varianten ist, kann dann nur so erklärt werden, dass Perchlorat durch die Nitratreduktase reduziert wird, also nitratase-negative Varianten selektiert werden. Eine Unterstützung erfährt diese Hypothese durch die Beobachtung von Becher,<sup>25</sup> dass in den Populationen einiger untersuchter Wildstämme vornehmlich der grampositiven Spezies ein beträchtlicher Anteil primär nitratase-negativer Keime vorhanden ist.

In Widerspruch dazu scheint folgende Beobachtung (Mannheim, unpubl.) zu stehen: Werden Zellen von *Esch. coli* und *Staph. aureus* einer 96 stündigen Kulturpassage in Caseinhydrolysatnährböden mit 5% Chlorat unterworfen, darauf einer Subkultur in chloratfreiem Medium, so reduzieren sie Nitrat nicht mehr. *Esch. coli* zeigt nach 4 weiteren Passagen in chloratfreien Medien nur eine ganz geringe Nitritbildung. Bei Verringerung der Chloratpassagedauer und/oder der Chloratkonzentration ist die Nitritbildung aus Nitrat nicht oder nur wenig geringer als die der Kontrollen in chloratfreien Medien.

Diese Befunde lassen sich in das oben dargestellte Schema der Resistenzbildung nicht zwanglos einordnen, da dies sowohl eine Parallelität Nitrat-Perchlorat, als auch eine Parallelität Nitrat-Chlorat voraussetzte, das hiesse, alle drei Anionen als Substrate eines Enzymes, der Nitratreduktase, anzusehen.

An dieser Stelle ist das Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* zu erwähnen, deren Varianten nach Perchloratsubkultivierung einen erhöhten Perchloratumsatz zeigen. Dieses abweichende Verhalten könnte so erklärt werden, dass der Wildstamm von *Pseudomonas* eine sehr viel kleinere Umsatzrate für Perchlorat als die übrigen untersuchten Keime besitzt, und dadurch die intrazellulär auftretenden Konzentrationen toxischer Abbauprodukte nicht ausreichen, um den beschriebenen Selektionsvorgang wirksam werden zu lassen.

Der Vergleich häminfermentabhängiger biochemischer Leistungen zeigte ebenso wie die Absorptionsspektren der Zellsuspensionen keinen prinzipiellen Unterschied

zwischen Variante und Wildstamm von *Staph. epidermidis*. Dieses Ergebnis lässt wohl einen Cytochromdefekt als Ursache des Verlustes des Nitrat und Perchloratreduktionsvermögens ausschliessen. Die erhebliche Verminderung der Katalaseaktivitäten von *Staph. aureus* und *Flavobact.* kann als unspezifische Wirkung des intakten Perchlorations angesehen werden, da dem *Flavobacterium* das Perchloratreduktionsvermögen von vornherein fehlt. Diesen Einzelfällen kommt daher im Zusammenhang der vorliegenden Untersuchung keine Bedeutung zu. Weitere Abweichungen perchloratresistenter Varianten im kulturmorphologischen und biochemischen Verhalten, die nicht auf die Perchloratreduktion zurückzuführen sind, wurden von Becher<sup>25</sup> untersucht und beschrieben.

Einer Diskussion bedürfen dagegen die Ergebnisse der gegenseitigen Beeinflussung der Perchlorat- und Nitratreduktion, sowie die Bedeutung der Vorinkubation. Postgate<sup>26</sup> gelang es, an intakten Zellen von *Desulfovibrio desulfuricans* eine kompetitive Hemmung der Sulfatreduktion durch Selenat und Monofluorophosphat nachzuweisen. Aus den Versuchsergebnissen ist nicht zu entnehmen, ob diese Konkurrenz beim Eintritt der Anionen in die Zelle, oder aber bei der reversiblen Enzym-Substratbindung (Sulfatreduktase-Sulfat) zur Wirkung kommt. Die physikochemischen Erwägungen des Autors zugunsten der Sulfatreduktase als Stelle der kompetitiven Hemmung sind natürlich auch für andere Orte, in diesem Fall z.B. die Permeabilitätsschranke, gültig. In unseren Versuchen fanden wir eine nicht kompetitive Hemmung der Nitratreduktion durch Perchlorat bei ruhenden intakten Zellen von *Bac. cereus*. Auch in diesem Falle ist es nicht möglich, aus den Versuchsdaten auf den Ort dieser Hemmung—Permeabilitätsschranke oder Nitratreduktase—zu schliessen. Setzen wir aber voraus, dass Nitrat und Perchlorat Substrate eines Enzyms sind, sich also gegenseitig kompetitiv hemmen, so folgt daraus, dass der Ort der beobachteten nicht kompetitiven Hemmung eine Permeabilitätsschranke sein wird. Diese dazu notwendige Voraussetzung ist nun tatsächlich erfüllt. In einer späteren Veröffentlichung über Untersuchungen an zellfreien Extrakten von *Bac. cereus* wird gezeigt werden, dass Nitrat und Perchlorat Substrate der Nitratreduktase sind.

Die oben vorgetragene Formulierung beschränkt sich bewusst auf die beiden Lokalisationsmöglichkeiten der nicht kompetitiven Hemmung, obwohl prinzipiell weitere Deutungen möglich sind, z.B. die toxischen Wirkungen der Reduktionsprodukte des Perchlorates u.a. auf die Nitratreduktase. Zu dieser Beschränkung berechtigen die Ergebnisse der Vorinkubation (Tabelle 5). Nach 3-stündiger anaerober Vorinkubation mit Nitrat ist der Nitratumsatz vermehrt, der Perchloratumsatz vermindert und umgekehrt. Die in Abb. 3 und 4 dargestellte nicht kompetitive Hemmung findet sich auch nach einer solchen Vorinkubation mit Nitrat oder Perchlorat, nur dass die absoluten Umsätze dann entsprechend vermehrt oder vermindert sind. Dieses Ergebnis kann bei Berücksichtigung der Identität von Perchlorat- und Nitratreduktase nur als adaptive Änderung der Permeabilität gedeutet werden. Unspezifische Wirkungen toxischer Abbauprodukte der Perchloratreduktion schliessen sich aus, da durch sie der Nitrat- und Perchloratumsatz in gleicher Weise betroffen sein müsste. Diese Deutung erfährt eine Unterstützung durch Untersuchungen von Farkas-Himsley und Artman.<sup>27</sup> Sie fanden, dass Zellen von *Esch. coli*, die in komplexem Medium mit Nitrat gewachsen waren, einen hohen Nitratumsatz hatten, während Zellen in gleichem Medium ohne Nitrat gewachsen, nur wenig Nitrit bildeten. Zellfreie Extrakte dagegen dieser beiden Populationen

hatten gleich hohe Nitrataktivität. Die Anwesenheit von Nitrat während des Wachstums in komplexem Medium hatte also keinen Einfluss auf die Synthese der Nitratreduktase, wohl aber auf die Nitratpermeabilität, die sich in adaptiver Weise änderte. In unseren Versuchen ist die Alternative- mit oder ohne Nitrat- durch die Alternative-Nitrat oder Perchlorat- ersetzt (neben anderen Inkubationsbedingungen). Dadurch wird die sonst notwendige Aufschliessung der Zellen, deren Einfluss auf die Nitrataktivität nicht sicher kontrollierbar ist, umgangen. Die Ergebnisse machen wahrscheinlich, dass nicht nur für Nitrat, sondern auch für Perchlorat, das wohl als unphysiologisches Substrat gelten kann, ein die Permeation kontrollierendes System existiert. Unklar bleibt, wie dieses System beschaffen ist.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Vertreter mehrerer heterotropher Bakterienarten vermögen Perchlorat zu reduzieren. Die Art und Folge der Reduktionsprodukte ist nicht bekannt.
2. Die Fähigkeit, Perchlorat zu reduzieren ist immer an das Vorhandensein von Nitratreduktase gebunden.
3. Durch mehrfache Subkultivierung in perchlorathaltigen Medien gelingt es, sowohl Nitrat als auch Perchlorat nicht mehr reduzierende Varianten zu erhalten.
4. Nitrat hemmt die Perchloratreduktion, die Zugabe von Perchlorat hemmt die Nitratreduktion ruhender Zellen von *Bac. cereus* in nicht kompetitiver Weise.
5. Eine Vorinkubation unter anaeroben Bedingungen in komplexem Milieu mit Nitrat oder Perchlorat erhöht die Reduktionsfähigkeit der Keime für dasjenige Substrat, mit dem vorinkubiert wurde, das andere wird in geringerem Masse umgesetzt.
6. Diese Befunde werden als Veränderungen einer für beide Anionen getrennt adaptiv veränderlichen Permeabilität gedeutet.

### LITERATUR

1. S. TANIGUCHI, *Z. Allg. Mikrobiologie* **1**, 341–375 (1961).
2. J. R. POSTGATE, *Annu. Rev. Microbiol.* **13**, 505–520 (1959).
3. H. D. PECK, *J. Bact.* **82**, 933–939 (1961).
4. K. J. RUDAKOV, *Zbl. Bakt.* II **70**, 202 (1927).
5. K. J. RUDAKOV, *Zbl. Bakt.* II **79**, 229 (1929).
6. F. LIEBERT, *Zbl. Bakt.* II **72**, 369 (1927).
7. J. H. QUASTEL, M. STEPHENSON and M. D. WHATHAM, *Biochem. J.* **19**, 304 (1925).
8. J. DURAND, *Bull. Soc. chim. biol., Paris* **20**, 423 (1938).
9. O. EICHLER, Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **144**, 251 (1930).
10. O. EICHLER und E. HACKENTHAL, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **243**, 554 (1962).
11. M. S. ANBAR, S. GUTMAN and Z. LEWITUS, *Int. J. appl. Rad. Isotop.* **7**, 87 (1959).
12. E. HACKENTHAL, Dissertation, 1961, Heidelberg.
13. R. N. FEINSTEIN, *J. biol. Chem.* **180**, 1197 (1949).
14. J. MÜLLER und O. WIDEMANN, *J. v. Wasser* **22**, 249 (1955).
15. W. D. BELLAMY and J. W. KLIMEK, *J. Bact.* **55**, 153–160 (1948).
16. J. McVEIGH and C. J. HOBODY, *Amer. J. Bot.* **39**, 352–359 (1952).
17. H. FARKAS-HIMSLEY, *Proc. Soc. exp. Biol.* **96**, 698–701 (1957).
18. L. W. HEDGECOCK and R. C. COSTELLO, *Bact. Proc.* p. 55 (1960).
19. LUCILE SMITH, *Bact. Rev.* **18**, 106 (1954).

20. M. R. POLLOCK, *Brit. J. exp. Path.* **27**, 419 (1946).
21. S. D. WAINWRIGHT and M. R. POLLOCK, *Brit. J. exp. Path.* **30**, 190 (1949).
22. S. D. WAINWRIGHT, *Brit. J. exp. Path.* **31**, 495–506 (1950).
23. D. B. CHARLTON and M. LEVINE, *J. Bact.* **30**, 163 (1935).
24. M. DIÉNERT, *Ann. d'hyg. publ. industr.* **5**, 728 (1927). zit. bei O. Eichler, *Die Pharmakologie Anorganischer Anionen* S.293 (1950). Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg.
25. R. BECHER, Dissertation in Vorbereitung.
26. J. R. POSTGATE, *J. gen. Microbiol.* **6**, 128–142 (1952).
27. H. FARKAS-HIMSLEY and M. ARTMAN, *J. Bact.* **74**, 690 (1957).
28. Daten aus: *Handbook of Chemistry and Physics* 39. Ed. 1958 Edit: C. H. Hodgeman. Chemical Rubber Publ. Co. Cleveland, Ohio.