

DIE REDUKTION VON PERCHLORAT DURCH BAKTERIEN—II. DIE IDENTITÄT DER NITRATREDUKTASE UND DES PERCHLORAT REDUZIERENDEN ENZYMS AUS *B. CEREUS**

E. HACKENTHAL

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg.

(Received 10 April 1965; accepted 21 May 1965)

Abstract—The reduction of nitrate and chlorine-36 labelled perchlorate by cellfree extracts obtained from nitrate-adapted cells of *Bacillus cereus* is described. The reduction of both anions is ascribed to the same enzyme because both activities are equally dependent on the hydrogen ion concentration, the incubation temperature and several electron donors and cofactors. There exists parallel inhibition of both activities by cyanide, azide and 2,4-dinitrophenol. The reduction of nitrate is inhibited by perchlorate in a competitive manner and vice versa.

The product of perchlorate reduction is chlorate. Chlorate itself is reduced by the same cellfree preparation. Inhibition by chlorate of perchlorate reduction seems to be competitive with respect to perchlorate, though deviations from linearity in the Lineweaver-Burk plots occur. The possible significance of this effect is discussed.

Nitrite at high concentration is inhibitory to both nitrate and perchlorate reduction in a non-competitive manner.

EINLEITUNG

IN EINER früheren Arbeit¹ wurde gezeigt, daß intakte Zellen verschiedener heterotropher Mikroorganismen Perchlorat reduzieren können. Dazu waren nur solche Keime in der Lage, die eine Nitratreduktase besitzen. Mehrfache Subkultivierung dieser Keime auf Perchlorat enthaltenden Medien führte zu Varianten, die weder Nitrat noch Perchlorat reduzierten. Schließlich wurde gezeigt, daß die Reduktion von Nitrat durch Perchlorat gehemmt wird und umgekehrt. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Perchlorat durch bakterielle Nitratreduktasen zu Chlorat reduziert wird. Andererseits gilt als sicher, daß Chlorat Substrat dieses Enzyms ist.^{2–5} Es handelt sich also um ein Enzym, bei dem das Reaktionsprodukt einer ersten Reaktion wiederum Substrat ist. Da dieser Fall bei der enzymatischen Umsetzung anorganischer Verbindungen selten ist, schien die Klärung von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wird nachgewiesen, daß die Nitratreduktase aus *B. cereus* Perchlorat zu Chlorat reduziert und Chlorat selbst Substrat dieses Enzyms ist.

MATERIAL UND METHODEN

Zellfreie Extrakte

Zur Bildung der adaptiven Nitratreduktase wurde *B. cereus* ATCC 8035 in Tryptikase-Soy-Broth (Baltimore Biological Laboratories) zunächst 5 Stunden aerob

* Die Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Strebel-Stiftung für Krebs- und Scharlachforschung.

kultiviert, dann nach Zugabe von KNO_3 (Endkonzentration 10^{-2} M) weitere 2 Stunden anaerob inkubiert. In dieser anaeroben Induktionsphase vermehrt sich die Nitrataktivität der Zellen auf mehr als das 100-fache der Aktivität aerob gewachsener Zellen. Die abzentrifugierten und mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0 gewaschenen Zellen wurden in gefrorenem Zustand (-25°) in einer hydraulischen Presse aufgeschlossen (X-Press, Fa. Biox Nacka Schweden) und die Nitratreduktase aus dem Rohextrakt durch zweimalige Ammonsulfatfällung mit 55 bzw. 50% Sättigung angereichert. Einzelheiten des Verfahrens sind an anderer Stelle beschrieben.¹

Nitrat- und Perchloratreduktion

Die Aktivität der Nitratreduktase wurde in evakuierten und Stickstoff gefüllten Thunberggefäßen bestimmt. Der Standardansatz enthielt im Hauptraum: 10 μMol KNO_3 , 0.5 μMol FMN, 0.1 ml Fermentlösung geeigneter Verdünnung, 100 μMol Phosphatpuffer pH 7.0, in der Retorte 1 μMol DPNH, Gesamtvolumen 1.0 ml.

Die Ansätze wurden 15 min bei 30° inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Bariumacetat wurde die Aufarbeitung und Nitritbestimmung wie kürzlich beschrieben⁶ Phosangeschlossen.

Das Enzympreparat enthält die Nitratreduktase mit einer spezifischen Aktivität von 1.0–1.8 $\mu\text{Mol NO}_2^-$ -Bildung/15 min/mg Kjeldahl-Stickstoff im DPNH-FMN-Standardansatz. Es enthält keine Nitrit reduzierende Aktivität.

Zur Bestimmung der Perchloratreduktion wurden die gleichen Ansätze verwendet. Nitrat wurde ersetzt durch 16.7 $\mu\text{Mol Cl}^{36}$ -Natriumperchlorat, dessen Herstellung aus Cl^{36} -Chlorid an anderer Stelle beschrieben ist.⁷ Die Perchloratansätze wurden mit Trichloressigsäure abgestoppt und gebildetes Chlorat mit einem Überschuß Nitrit in salpetersaurem Milieu zu Chlorid reduziert. Nach Zugabe von inaktivem Chlorid wurde eine Silbernitratfällung angeschlossen. Zur völligen Entfernung des radioaktiven Perchlorats wurde die Silberchloridfällung gewaschen, ammoniakalisch gelöst und nach Zusatz von inaktivem Perchlorat 2 mal umgefällt. In Abänderung dieses früher genau beschriebenen Verfahrens,^{7, 8} wurde das Chlorid nach der zweiten Umfällung wieder ammoniakalisch gelöst und direkt auf Präparateschälchen gefällt. Durch Zugabe von 1 ml 0.5% Rinderserum vor der Fällung wurde erreicht, daß die getrockneten Niederschläge einen gleichmäßigen, festen Belag auf dem Schälchen bildeten. Die Aktivität des Cl^{36} -Chlorid wurde nun mit einem Endfensterzählrohr FHZ 15b und dem Zählgerät FH 49 (Friessecke & Hoepfner, Erlangen) bestimmt.

Andere Methoden

Der Stickstoffgehalt der Präparate wurde mit einer Mikromethode nach Kjeldahl bestimmt.

Papierchromatographische Auftrennungen wurden auf Whatman No 1—Papier mit *n*-Butanol, Pyridin, 1.5 *n* Ammoniak 2:1:2 (v/v/v) als Laufmittel aufsteigend durchgeführt. Steighöhe ca 20 cm, Laufzeit 10 Stunden. Die getrockneten Papierchromatogramme wurden in einem Radiopapierchromatographen FH 452 (Friessecke & Hoepfner, Erlangen) auf ihre Aktivitätsverteilung ausgemessen, anschließend Autoradiographien auf ADOX-Röntgenfilm-Papier mit einer Belichtungszeit von 25 Tagen

Folgende Abkürzungen werden verwendet: DPNH = Diphosphopyridinnukleotid, TPNH = Triphosphopyridinnukleotid, FMN = Flavinadeninmononukleotid, FAD = Flavinadenindinukleotid, Vitamin K_3 = Menadionbisulfit-Na, MV = Methylviologen, BV = Benzylviologen.

angefertigt. Die chemische Identifizierung der auf den Chromatogrammen getrennten Substanzen wurde früher beschrieben.⁷

Die Messung der DPNH-Oxydation wurde in Stickstoff gefüllten Thunbergküvetten mit 1 cm Lichtweg bei 341 m μ im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II durchgeführt.

Verwendete Substanzen

DPNH, TPNH und FMN wurden von Boehringer Mannheim, FAD von Fluka-Schweiz, Methylviologen und Benzylviologen von Serva Heidelberg bezogen. Dr. J. W. Lightbown (Nat. Inst. for Med. Res., Mill Hill, London) stellte freundlicherweise eine reichliche Menge von 2-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-Oxyd zur Verfügung.

ERGEBNISSE

Enzymmenge, Zeit und Reaktionsgeschwindigkeit

Das Enzympräparat reduziert unter Standardbedingungen Nitrat und Perchlorat mindestens 25 min mit konstanter Geschwindigkeit und proportional der eingesetzten Enzymmenge. Dabei war die maximale Enzymmenge etwa 2·5 fach höher als die in den Standardtesten verwendete Menge.

pH-Abhängigkeit

Die Geschwindigkeiten der Nitrat- und Perchloratreduktion sind in gleicher Weise vom pH-Wert abhängig. (Abbildung 1)

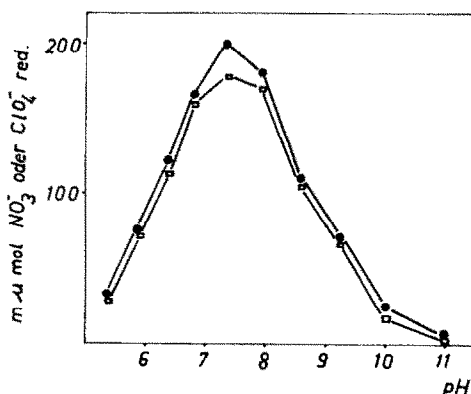


ABB. 1. pH-Abhängigkeit der Nitrat- und Perchloratreduktion. Standardenzymansätze wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Im Bereich von pH 5·4 bis 7·95 wurde 0·1 M Sörensen-Phosphatpuffer, von pH 8·6 bis 11·2 0·2 M Glycin-NaOH-Puffer⁹ verwendet. ●—● Nitratreduktion □—□ Perchloratreduktion. Die pH-Werte wurden in Vergleichsansätzen vor und nach der Inkubation kontrolliert.

Das pH-Optimum liegt bei pH 7·4. Gleiche Aktivitätsverteilung findet sich bei Verwendung von Acetat-Phosphat-Borat-Puffer (Britton-Robinson-Universalpuffer⁹). In Tris-Puffer⁹ pH 7·2 bis pH 8·4 war dagegen die Aktivität um etwa 30 % vermindert.

Elektronendonatoren und Cofermente

In einer früheren Arbeit⁶ wurde gezeigt, daß zellfreie Extrakte aus *B. cereus* Nitrat in Anwesenheit einer Reihe von Elektronendonatoren und Cofermenten mit verschiedener Geschwindigkeit reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden unter den

gleichen Bedingungen die Geschwindigkeiten der Perchloratreduktion bestimmt. Die Ergebnisse sind auf der Tabelle 1 verglichen.

Die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Reduktion beider Anionen stimmen in fast allen Elektronendonator- und Cofermentkombinationen überein. Eine Abweichung findet sich bei den reduzierten Farbstoffen MV und BV. Die relative Verminderung der Perchloratreduktion mit reduziertem BV kann dadurch erklärt werden, daß BV in reduzierter Form (nicht in oxydierter) im perchlorathaltigen

TABELLE 1. ELEKTRONENDONATOR- UND COFERMENTABHÄNGIGKEIT DER NITRAT- UND PERCHLORATREDUKTION

Cofaktoren und Elektronendonatoren	Relative Nitratreduktion (DPNH + FMN = 100)	Relative Perchloratreduktion (DPNH + FMN = 100)
DPNH + FMN	100	100
DPNH	5.7	4.1
TPNH	1.2	2.0
DPNH + FAD	88.2	89
TPNH + FAD	65.0	63.5
TPNH + FMN	70.0	72.0
DPNH + Vitamin K ₃	27.6	26.6
red. FMN	203	226
red. FAD	144	147
red. MV	850	1430
red. BV	594	334

Alle Ansätze wurden in evakuierten und mit Stickstoff gefüllten Thunberggefäßen unter Standardbedingungen inkubiert. Methylviologen, Benzylviologen, FAD und FMN wurden durch Zugabe einiger Körnchen Dithionit (<1 mg) aus der Retorte reduziert und dadurch die Reaktion gestartet. Vitamin K₃ wurde in wasserlöslicher Form als Menadionbisulfit-Natriumsalz verwendet. Konzentrationen: DPNH, TPNH, MV, BV, FAD red., FMN red. und Vitamin K₃ $1.0 \cdot 10^{-3}$ M. FAD und FMN als Cofaktor $0.5 \cdot 10^{-3}$ M.

Ohne Anwesenheit von MV, BV oder Flavin wurde durch Dithionit weder Nitrat noch Perchlorat reduziert. Unter den Versuchsbedingungen wurde durch Dithionit Nitrit nicht weiter reduziert. Aktivität der Standardansätze mit DPNH und FMN: Nitratreduktion $1.3 \mu\text{Mol}/15\text{min}/\text{mg}$ Kjeldahl-N, Perchloratreduktion $1.21 \mu\text{Mol}/15\text{min}/\text{mg}$ Kjeldahl-N, Enzymmenge 0.11 mg Kjeldahl-N/Ansatz.

Ansatz präzipitiert. Möglicherweise bildet reduziertes BV mit Perchlorat eine wenig wasserlösliche Komplexverbindung. Die relative Steigerung der Perchloratreduktion mit reduziertem MV kann nicht erklärt werden. Hypoxanthin, Xanthin und Acetaldehyd sind sowohl für die Nitrat- als auch die Perchloratreduktion als Elektronendonatoren unwirksam.

Inhibitoren

Die Reduktion von Nitrat und Perchlorat durch das Enzympräparat wird durch verschiedene Konzentrationen von Azid, Cyanid und 2,4-Dinitrophenol in vergleichbarem Maße gehemmt (Tabelle 2).

Da Ansätze mit reduziertem MV als Elektronendonator durch Azid und Cyanid ebenso gehemmt werden, muß der Angriffspunkt die Nitratreduktase selbst sein.

TABELLE 2. EINFLUß VERSCHIEDENER HEMMSTOFFE AUF DIE NITRAT- UND PERCHLORATREDUKTION

Hemmstoff	Endkonzentration	% Hemmung	
		Nitratreduktion	Perchloratreduktion
KCN	$5 \cdot 10^{-5}$ M	0	0
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	35	46
	$5 \cdot 10^{-3}$ M	86	94
NaN ₃	$5 \cdot 10^{-6}$ M	9	30
	$5 \cdot 10^{-5}$ M	52	78
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	87	97
2,4-Dinitrophenol	10^{-5} M	0	0
	10^{-4} M	20	18
	10^{-3} M	78	82

DPNH-FMN- Standardansätze unter Standardbedingungen. Die Hemmstoffe wurden 15 min vor Start der Reaktion mit dem Ferment inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der ungehemmten Reaktionen betragen 197 m μ Mol NO₂-Bildung bzw. 177 m μ Mol ClO₄-Reduktion/15 min mit 0.15 mg Protein-N.

Folgende Hemmstoffe beeinflussen weder die Nitrat- noch die Perchloratreduktion in DPNH-FMN-Standardansätzen: Kaliumfluorid, Monojodessigsäure, Thioharnstoff 10^{-3} M (Endkonzentration), Natriumsalizylat $5 \cdot 10^{-4}$ M Urethan $5 \cdot 10^{-3}$ M, Diäthylthiocarbamat $5 \cdot 10^{-3}$ M, 8-Hydroxychinolin und Salizyladoxim 10^{-3} M.

Temperaturabhängigkeit

Auf der Abbildung 2 ist die Abhängigkeit der Nitrat- und Perchloratreduktion von der Inkubationstemperatur im Bereich von 20°–30° dargestellt.

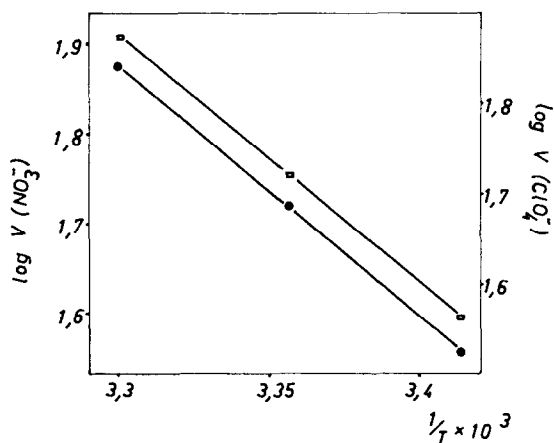


ABB. 2. Temperaturabhängigkeit der Nitrat- und Perchloratreduktion. Standardenzymansätze wurden unter Standardbedingungen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Aufgetragen sind die Logarithmen der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur. Die Aktivierungswärmen der Reaktionen wurden entsprechend der umgeformten Arrheniusgleichung¹⁰ aus der Steigung berechnet. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 4 Einzelversuchen. ●—● Nitratreduktion □—□ Perchloratreduktion. Die Ordinateneinteilung wurde für beide Anionen verschieden gewählt um die Ergebnisse anschaulicher zu machen.

Aus dem Diagramm berechnen sich die Aktivierungswärmen für die Nitratreduktion zu $\mu = -12500$ cal, für die Perchloratreduktion zu $\mu = -12250$ cal. Oberhalb 30 wird der Kurvenverlauf schnell flacher, das Temperaturoptimum für die Reduktion beider Anionen ist schon bei 40° erreicht.

Gegenseitige Hemmung

Bei Identität des Perchlorat und Nitrat reduzierenden Enzyms ist die gegenseitige kompetitive Hemmung der Reduktion beider Anionen zu fordern. Dieser Hemmungstyp ist nach den Abbildungen 3 und 4 vorhanden. Die aus den graphischen Darstellungen berechneten Michaeliskonstanten betragen für Nitrat $K_m = 5 \cdot 10^{-5}$ M (Mittelwert aus 10 Versuchen) für Perchlorat $K_m = 4 \cdot 10^{-4}$ M (Mittelwert aus 5 Versuchen).

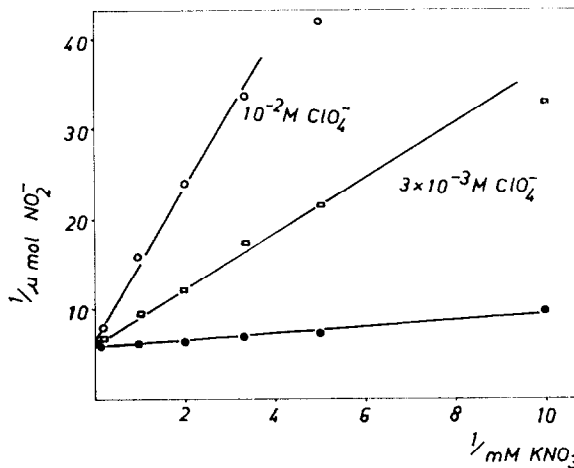


ABB. 3. Hemmung der Nitratreduktion durch Perchlorat. Standardenzymansätze mit variabler Nitratkonzentration wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Doppelt reziproke Darstellung der Ergebnisse nach Lineweaver und Burk.¹¹

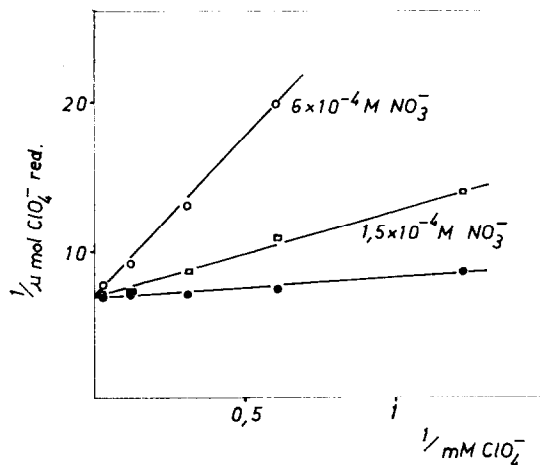


ABB. 4. Hemmung der Perchloratreduktion durch Nitrat. Standardenzymansätze mit variabler Cl^{36} -Perchloratkonzentration wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Doppelt reziproke Darstellung der Ergebnisse nach Lineweaver und Burk.

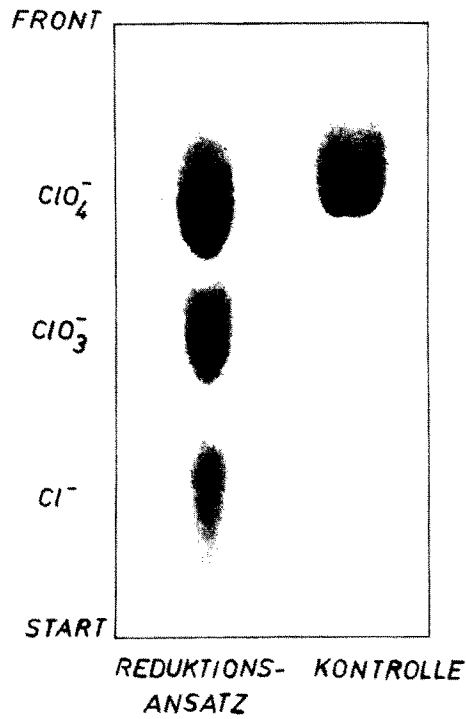


ABB. 5. Autoradiographische Demonstration der Reaktionsprodukte der Perchloratreduktion. Papierchromatographische Auftrennung eines Perchloratreduktionsansatzes und nachfolgende Autoradiographie. Experimentelle Details sind in der Methodik und im Text beschrieben.

Reaktionsprodukt der Perchloratreduktion

Bei der Perchloratreduktion intakter Zellen gelang es nicht, Chlorat als Zwischenprodukt nachzuweisen. Bei zellfreien Extrakten war jedoch der direkte chemische Nachweis möglich. Dazu wurden folgende Ansätze benutzt: Thunberggefäße enthielten: 100 μ Mol NaClO_4 , 0.4 ml Ferment (~ 3 mg N), 2 μ Mol FMN, 20 μ Mol DPNH, 67 μ Mol Phosphatpuffer pH 6.8, Gesamtvolumen 1.0 ml. Unter anaeroben Bedingungen inkubierte Ansätze wurden 20, 40, 60 min nach Start der Reaktion mit einer Tüpfelreaktion (Benzidinacetat- H_2SO_4) auf Chlorat geprüft. Nach 20 min war die Farbreaktion gering, nach 40 und 60 min schon stark positiv. Der Chloratgehalt war nach Vergleich mit Chloratlösungen bekannter Konzentration größer als 50 $\mu\text{g/ml}$.

Dieses Ergebnis konnte in Wiederholungen des Versuches mit Zugabe von radioaktivem Perchlorat gesichert werden: In oben beschriebenen Ansätzen oder solchen mit 5 μ Mol reduziertem Methylviologen als Elektronendonator wurde das inaktive Perchlorat durch 16.7 μ Mol Cl^{36} -Perchlorat ersetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 30° wurden je 50 μl des Reaktionsansatzes papierchromatographisch aufgetrennt. Eine repräsentative Autoradiographie eines solchen Papierchromatogramms ist in der Abbildung 5 dargestellt. Die Orte der Aktivitätsmaxima konnten durch Anfärbung chemisch als Perchlorat, Chlorat und Chlorid identifiziert werden. Die Radiochromatographische Ausmessung ergab eine Aktivitätsverteilung von Perchlorat : Chlorat : Chlorid wie ca 100 : 10 : 1.

Die Ergebnisse zeigen, daß Perchlorat zu Chlorat reduziert wird. Der geringe Anteil radioaktiven Chlorids kann einerseits durch nichtenzymatische Reduktion des Chlorat bei der Aufarbeitung entstanden sein. Andererseits wird Chlorat durch das Enzympräparat seinerseits reduziert, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

Die Reduktion von Chlorat.

Auf der Abbildung 6 ist die enzymatische DPNH-Oxydation unter Luftabschluß in Anwesenheit von Nitrat, Perchlorat oder Chlorat dargestellt. In einer ersten schnellen Reaktion, die auf der Abbildung nicht dargestellt ist, wird das vorhandene FMN vollständig reduziert. Eine weitere DPNH-Oxydation kann nur stattfinden, wenn durch Reduktion eines Acceptors wieder oxydiertes FMN als Elektronenacceptor zur Verfügung steht. Deshalb kommt die Reaktion in dem Ansatz ohne Elektronenacceptor praktisch zum Stillstand, während in Anwesenheit von Nitrat, Chlorat oder Perchlorat die DPNH-Oxydation mit konstanter Geschwindigkeit weiterläuft. Die Abbildung 6 zeigt, daß Nitrat und Perchlorat mit gleicher Geschwindigkeit, Chlorat dagegen etwa doppelt so schnell reduziert wird.

Hemmung der Perchloratreduktion durch Chlorat

Wie die Abbildung 6 demonstriert wird Chlorat durch zellfreie Extrakte aus *B. cereus* reduziert. Es gilt als sicher, daß Chlorat Substrat bakterieller Nitratreduktasen ist.²⁻⁵ Entsprechend ist eine kompetitive Hemmung der Reduktion anderer Substrate zu erwarten. In einer früheren Arbeit⁶ wurde dieser Hemmungstyp bei der Reduktion von Nitrat durch die *B. cereus*-Nitratreduktase beschrieben. Den Einfluß von Chlorat auf die Perchloratreduktion zeigt die Abbildung 7.

In der Darstellung nach Lineweaver-Burk treffen sich die Kurven für die gehemmten und ungehemmten Reaktionen auf der 1/v-Achse, was auf einen kompetitiven Hemmungsmechanismus hinweist. Die gehemmten Reaktionen zeigen jedoch bei kleineren

Perchloratkonzentrationen Abweichungen von der Linearität, die Reaktionsgeschwindigkeiten sind geringer als erwartet.

Um dieses Ergebnis enzymkinetisch diskutieren zu können, müssen andere Deutungen ausgeschlossen werden:

1 Da Chlorat bei etwa gleicher Affinität zur Nitratreduktase ($K_i = 0.13 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)

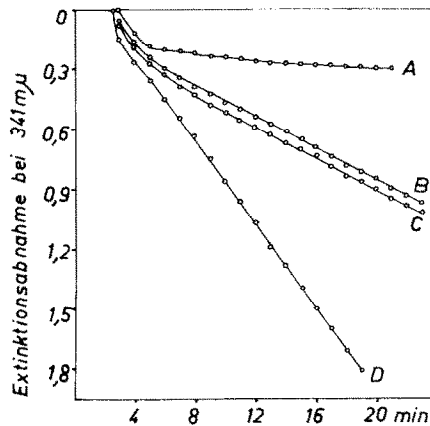


ABB. 6. Spektrophotometrische Bestimmung der Reduktion von Nitrat, Chlorat und Perchlorat. Die Geschwindigkeit der DPNH-Oxydation wurde in evakuierten und mit Stickstoff gefüllten Thunberg-Küvetten bei $341 \text{ m}\mu$ gemessen. Die Ansätze enthielten: $2.0 \mu\text{Mol}$ DPNH, $0.5 \mu\text{Mol}$ FMN, $20 \mu\text{Mol}$ des Anions, 0.15 ml Fermentlösung (1.1 mg Kjeldahl-N) und $250 \mu\text{Mol}$ Phosphatpuffer pH 7.0. Gesamtvolumen 2.5 ml . Die Reaktion wurde durch Zugabe von DPNH aus der Retorte gestartet. Die abgebildeten Extinktionsdifferenzen sind nach Ablauf der ersten schnellen Reaktion, in der FMN vollständig reduziert wird gemessen. Das Ferment war mit 2-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-Oxyd vorbehandelt, wie in der Legende zu Tabelle 3 beschrieben ist.

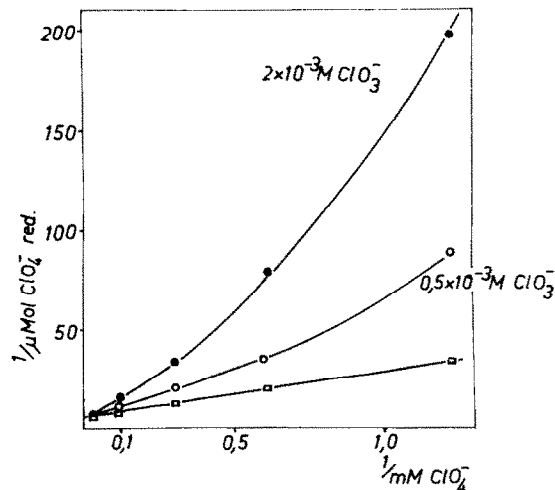


ABB. 7. Hemmung der Perchloratreduktion durch Chlorat. Standardenzymansätze mit variabler Cl^{36} -Perchloratkonzentration wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Nicht markiertes Chlorat wurde wie in der Abbildung angegeben zugesetzt. Doppelt reziproke Darstellung der Ergebnisse nach Lineweaver und Burk.

doppelt so schnell wie Perchlorat reduziert wird, ist bei kleinen Perchloratkonzentrationen mit einem schnellen Absinken der DPNH-Konzentration zu rechnen was zu verminderter Reaktionsgeschwindigkeit führt. Diesem Einwand wird dadurch begegnet, daß auch mit der $2\frac{1}{2}$ fachen DPNH-Konzentration des Standardansatzes der gleiche Hemmungstyp resultiert.

2. Als Reaktionsprodukt der Chloratreduktion ist Hypochlorit zu erwarten, welches durch nicht enzymatische Oxydationen zu irreversibler Hemmung insbesondere des empfindlichen Cytochromsystems führen kann.^{5, 12-15} Da bei kleiner Perchloratkonzentration der Anteil der Chloratreduktion hoch ist, kann hier dieser Mechanismus zur Wirkung kommen und würde zu verminderter Perchloratreduktion führen. Diese Möglichkeit läßt sich durch folgender Überlegungen ausschließen. Der Effekt sollte sich bei der Hemmung der Nitratreduktion durch Chlorat in gleicher Weise zeigen, was nicht der Fall ist.⁶ Die Reduktion von Chlorat müßte nach demselben Prinzip mit zunehmender Reaktionszeit durch sich selbst gehemmt werden. Die Abbildung 6 zeigt, daß die Chloratreduktion für mindestens 20 min mit gleichbleibender Geschwindigkeit abläuft. Schließlich ergibt sich bei der Umgehung des Cytochromsystems bei Elektronentransport von DPNH zum Nitrat mit FMN als Elektronenträger der selbe Hemmungstyp wie bei Beteiligung des Cytochromsystems mit Vitamin K₃ als Elektronenträger. Diese Ergebnisse und Betrachtungen machen es wahrscheinlich, daß der beobachtete Effekt enzymkinetisch zu deuten ist. Einige Aspekte sollen in der Diskussion besprochen werden.

Hemmung der Nitratreduktase durch Nitrit

Intakte Zellen von *B. cereus* können in Anwesenheit mehrerer Intermediärprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels als Elektronendonatoren Nitrit reduzieren.¹⁶ Die Geschwindigkeit der Nitritreduktion ist immer sehr viel geringer als die Nitratreduktion, sodaß es bei der Reduktion von Nitrat zur Ansammlung von Nitrit kommt. Da Nitrit in höheren Konzentrationen für die Zellen toxisch ist,¹⁷⁻¹⁹ wäre für die Zellen ein Mechanismus günstig, der bei höheren Nitritkonzentrationen die weitere Nitratreduktion hemmt. Ein solcher Mechanismus wurde bei in takten Zellen bei *E. coli* beschrieben, wo Nitrit die adaptive Synthese der Nitratreduktase hemmt.¹⁸

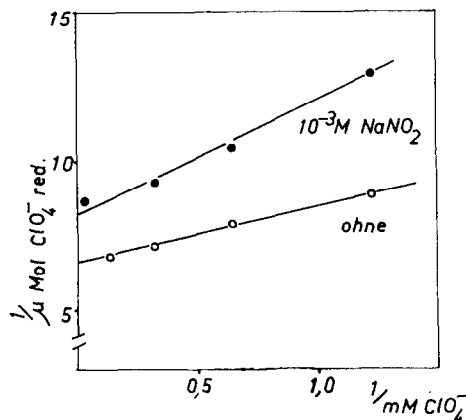


ABB. 8. Hemmung der Perchloratreduktion durch Nitrit. Standardenzymansätze mit variabler Cl^{36} -Perchloratkonzentration wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Doppelt reziproke Darstellung der Ergebnisse nach Lineweaver und Burk.

An zellfreien Extrakten von *B. cereus* wurde untersucht, ob Nitrit einen Einfluß auch auf die Aktivität der Nitratreduktase hat. Dazu wurde die Reduktion von Perchlorat benutzt, weil dabei das anwesende Nitrit die Messung der Reaktion nicht stört. Der Einfluß von Nitrit auf die Perchloratreduktion ist in der Abbildung 8 dargestellt. Sie zeigt den Typ einer nicht kompetitiven Hemmung. Hydroxylamin und Ammoniak haben in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-3}$ M keinen Einfluß auf die Perchloratreduktion. Hinweise auf den Angriffsort der Nitrihemmung sind in der Tabelle 3 enthalten.

TABELLE 3. EINFLUß VON NATRIUMNITRIT AUF DIE NITRATREDUKTION

A			B		
Nitrit	$\Delta E/\text{min}$	% Hemmung	Nitrit	$\Delta E/\text{min}$	% Hemmung
—	0.120	—	—	0.046	—
10^{-2} M	0.096	20	$5 \cdot 10^{-3}$ M	0.035	24
			10^{-2} M	0.029	37

A. Messung der Oxydationsgeschwindigkeit des DPNH mit FMN als Acceptor in Nitrat-abwesenheit (DPNH-dehydrogenaseaktivität) Ansätze: 1 μMol DPNH, 0.5 μMol FMN, 0.1 ml Fermentlösung (0.12 mg Kjeldahlstickstoff), 250 μMol Phosphatpuffer pH 7.0, Gesamtvolumen 2.5 ml.

B. Messung der DPNH-Oxydation mit FMN als Elektronenträger und Nitrat als Acceptor. (Nitratreduktaseaktivität) Ansätze 2.0 μMol DPNH, 0.5 μMol FMN, 0.2 ml Fermentlösung (1.2 mg Kjeldahlstickstoff), 10 μMol KNO_3 , 250 μMol Phosphatpuffer pH 7.0, Gesamtvolumen 2.5 ml. Die Reaktion wurde in Thunbergküvetten unter Luftabschluß bei 341 $m\mu$ gemessen.

Die Extinktionsdifferenzen der B-Ansätze wurden nach Ablauf der ersten schnellen Reaktion gemessen, in der das FMN vollständig reduziert wird. (Siehe auch Abbildung 6.) In Abwesenheit von FMN ist mit DPNH allein eine geringe Nitratreduktion möglich (siehe Tabelle 1). Dieser Anteil wurde in den Versuchen der Tabelle 3 durch Zusatz von 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 2-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-Oxyd zum Ferment völlig gehemmt.

Die Werte zeigen, daß sowohl die Reduktion von FMN durch DPNH in Nitratabwesenheit, als auch der Elektronentransport von reduziertem FMN auf Nitrat durch Nitrit gehemmt wird. Es ist allerdings fraglich, ob die beschriebene Hemmung eine physiologische Bedeutung hat, da die zur Hemmung notwendigen Nitritkonzentrationen sehr hoch sind.

DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Perchlorat und Nitrat durch zellfreie Extrakte aus Nitrat-adaptierten Zellen von *B. cereus* mit etwa gleicher Geschwindigkeit reduziert werden. Beide Aktivitäten sind in gleicher Weise von der Wasserstoffionenkonzentration, der Inkubationstemperatur sowie von verschiedenen Elektronendonatoren und Cofaktoren abhängig und werden durch Azid, Cyanid und 2,4-Dinitrophenol in gleichem Maße gehemmt. Die Reduktion eines Anions wird durch das andere kompetitiv gehemmt. Die aus den Neigungen der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm direkt berechneten K_m -Werte stimmen mit den K_i -Werten, berechnet aus der Hemmung des anderen Anions gut überein. Diese Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, daß Nitratreduktase und Perchlorat-reduzierendes Enzym identisch sind.

Andere Substrate der Nitratreduktase sind Chlorat und Bromat.²⁻⁵ Jodat ist zwar kompetitiver Hemmer der Nitratreduktase aus *E. coli*, wird aber selbst nicht reduziert.⁴ Taniguchi⁴ nimmt an, daß der grössere Atomabstand Halogen-Sauerstoff im Jodat gegenüber Chlorat und Bromat die Reduktion verhindert.

Daß Perchlorat ebenfalls durch Nitratreduktase reduziert werden kann, ist aus zwei Gründen von Interesse: Erstens ist das Perchloration in seiner tetraedrischen Struktur von den anderen Substrat-Anionen prinzipiell unterschieden, zudem ist es chemisch sehr viel stabiler als Chlorat und Bromat.

Zweitens entsteht dadurch die bemerkenswerte Situation, daß zwei aufeinanderfolgende enzymatische Zwei-Elektronentransferschritte (die Reduktion von Perchlorat zu Chlorat und die weitere Reduktion von Chlorat) durch ein Enzym katalysiert werden. Dies ist bei der enzymatischen Reduktion anorganischer Verbindungen bisher nur in einem Fall beobachtet worden, nämlich bei der Reduktion von Nitrit zu Ammoniak durch zellfreie Extrakte aus Nitratassimilierenden Zellen von *E. coli* (Lazzarini und Atkinson²⁰).

Die Autoren nehmen an, daß ein einzelnes Enzym drei aufeinanderfolgende Reduktionsschritte katalysiert, in denen Nitrit (Oxydationsstufe des Stickstoffs +3) über Intermediate mit den Oxydationsstufen +1 (unbekannt) und -1 (Hydroxylamin) zu NH_3 (-3) reduziert wird. Die Beweisführung stützt sich darauf, daß die Nitratreduzierende- und Hydroxylaminreduzierende Aktivität während der Fermentreinigung in gleichem Verhältnis angereichert wird und beide Aktivitäten gleiche Hitze- bzw. UV-Inaktivierung zeigen.

Es besteht jedoch ein prinzipieller Unterschied zu den Verhältnissen bei der Perchloratreduktion. Denn bei der beschriebenen Nitritreduktion ist kein freies Hydroxylamin als Zwischenprodukt nachzuweisen und Versuche mit N_{15} -markiertem Nitrit zeigten, daß während der Reduktion zu NH_3 keine Equilibrierung mit zugesetztem nicht markiertem Hydroxylamin auftrat. Die Autoren schließen daraus, daß die mehrstufige Reduktion von Nitrit zu NH_3 ohne Abdissoziation von Intermediaten stattfindet. Bei der Perchloratreduktion durch *B. cereus*-Nitrataase entsteht dagegen zunächst freies Chlorat (Abbildung 5), das entsprechend seiner Konzentration und Affinität seinerseits reduziert werden kann.

Danach ist zu fordern, daß zugesetztes nicht markiertes Chlorat mit Cl_{36} -Chlorat aus der Perchloratreduktion equilibriert.

Die Abweichungen vom Typ der kompetitiven Hemmung der Perchloratreduktion durch Chlorat (Abbildung 7) lassen allerdings vermuten, daß die Equilibrierung nicht vollständig ist. Die bisherigen Ergebnisse lassen keine zwingende Analyse des Effektes zu. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht jedoch darin, daß die Nitratreduktase die Disproportionierung von Chlorat zu Chlorid und Perchlorat katalysiert, wobei allerdings das aus der Perchloratreduktion entstehende Chlorat bevorzugt sein müßte. Eine Klärung dieses Problems soll in einer späteren Arbeit unternommen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Nitrat-adaptierten Zellen von *B. cereus* gewonnene zellfreie Extrakte katalysieren die Reduktion von Nitrat und Perchlorat mit etwa gleicher Geschwindigkeit. Die Reduktionsgeschwindigkeiten beider Anionen sind in gleicher Weise von der Wasserstoffionenkonzentration, der Inkubationstemperatur und verschiedenen Elektronendonatoren und Cofaktoren abhängig. Azid, Cyanid und 2,4-Dinitrophenol

hemmen beide Aktivitäten in gleichem Maße. Die Reduktion eines Anions wird durch das andere Anion im Sinne einer kompetitiven Hemmung beeinflusst. Diese Ergebnisse werden als beweisend dafür angesehen, daß Nitratreduktase und Perchlorat reduzierendes Enzym identisch sind.

Das Produkt der Perchloratreduktion ist Chlorat. Chlorat wird seinerseits durch die Nitratreduktase reduziert. In höherer Konzentration hemmt Nitrit sowohl die Nitrat- als auch die Perchloratreduktion.

LITERATUR

1. E. HACKENTHAL, W. MANNHEIM, R. HACKENTHAL und R. BECHER, *Biochem. Pharmac.* **13**, 195 (1964).
2. R. SATŌ, *Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism*, W. D. McELROY and B. GLASS Eds. p. 163. John Hopkins Press, Baltimore (1956).
3. C. A. FEWSON and D. J. D. NICHOLAS, *Biochim. biophys. Acta* **49**, 335 (1961).
4. S. TANIGUCHI, *Z. allg. Mikrobiologie* **1**, 341 (1961).
5. E. ITAGAKI, T. FUJITA and R. SATŌ, *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 389 (1963).
6. E. HACKENTHAL und R. HACKENTHAL, *Biochim. biophys. Acta*, im Druck.
7. E. HACKENTHAL, *Dissertation* (1961) Heidelberg.
8. O. EICHLER und E. HACKENTHAL, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **243**, 554 (1962).
9. H. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, p. 651. Springer, Heidelberg (1956).
10. J. L. WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors* Vol. 1, p. 792. Academic Press, London (1963).
11. H. LINEWEAVER and D. BURK, *J. Am. chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
12. D. B. CHARLTON and M. LEVINE, *J. Bact.* **30**, 163 (1935).
13. J. H. QUASTEL, M. STEPHENSON and M. D. WHETHAM, *Biochem. J.* **19**, 304 (1925).
14. H. LEES and J. H. QUASTEL, *Nature, Lond.* **155**, 276 (1945).
15. M. STEPHENSON, *Perspectives in Biochemistry*, J. NEEDHAM and D. E. GREEN Eds. p. 92. Cambridge (1937).
16. E. HACKENTHAL, nicht publizierte Ergebnisse.
17. H. STEPHENSON and L. H. STICKLAND, *Biochem. J.* **26**, 712 (1932).
18. B. P. EDDY, *Antonie van Leeuwenhoek* **24**, 81 (1958).
19. W. VERHOEVEN, *Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism*, W. D. McELROY and B. GLASS Eds. p. 61. Johns Hopkins Press, Baltimore (1956).
20. R. A. LAZZARINI and D. E. ATKINSON, *J. biol. Chem.* **236**, 3330 (1961).