

Diss ETH 6446

Mikrobieller Abbau von s-Triazin-Derivaten

Abhandlung  
zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

• ZUERICH

vorgelegt von

ZEYER JOSEF

dipl. Natw. ETH

geboren am 18. April 1950

von Ettiswil (Kt. Luzern)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. R. Hütter, Referent

Prof. Dr. K. Wuhrmann, Korreferent

## Dank

Herrn Prof. Dr. R. Hütter, unter dessen Leitung diese Arbeit ausgeführt wurde, danke ich herzlich für die vielen anregenden und ermutigenden Diskussionen und für die Förderung, die er mir zuteil werden liess.

Besonderer Dank gebührt Frl. Jenny Bodmer, ohne deren tatkräftige Mithilfe die vorliegende Arbeit wohl um einige Tabellen und Figuren ärmer wäre.

Herrn Dr. H. O. Esser und Herrn Dr. P. Mayer von der Ciba-Geigy AG danke ich herzlich für die wertvollen Ratschläge und für die grosszügige Belieferung mit Triazin-Derivaten.

Herrn Prof. Dr. K. Wuhrmann danke ich für das Interesse und das Wohlwollen, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Im weiteren möchte ich auch allen Angehörigen des Institutes und vor allem den Mitarbeitern der Forschungsgruppe "Biodegradation" für die vielen wissenschaftlichen und humoristischen Beiträge danken.

# Inhaltsverzeichnis

---

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Struktur, Wirkung und Synthese der Triazinherbizide	1
1.2 Mikrobieller Abbau der Triazinherbizide	2
1.3 Problemstellung der vorliegenden Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Organismen	10
2.1.1. Organismen aus Abwasser- und Bodenproben	10
2.1.2. Organismen aus Stammsammlungen	10
2.2. Züchtung	11
2.2.1. Medien	11
2.2.2. Aufbewahren der Stämme	12
2.2.3. Züchtungsbedingungen	12
2.2.4. Bestimmung des Wachstums mit Hilfe der OD <sub>546</sub>	12
2.2.5. Bestimmung des Wachstums mit Hilfe des Trockengewichtes	13
2.3. Herstellung von Zellsuspensionen	13
2.4. Analyse von <sup>14</sup> C-Triazin-Derivaten mit Hilfe von TLC	13
2.4.1. Auftragen und Auftrennen der Proben	13
2.4.2. Identifikation der aufgetrennten Verbindungen	14
2.4.3. Quantitative Bestimmung der aufgetrennten Verbindungen	15
2.5. Analyse von <sup>14</sup> C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"	15
2.6. Analyse der <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -Entwicklung	16
2.7. Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler	17
2.8. Chemikalien	17
3. Resultate	19
3.1. Anreicherung und Isolation von Mikroorganismen aus Abwasser- und Bodenproben und erste Abbauversuche	19
3.1.1. Mikroorganismen aus Abwasserproben	19
3.1.2. Mikroorganismen aus Bodenproben	23
3.1.3. Zusammenfassende Kommentare zu den ersten Abbauversuchen	25

3.2. Experimente im Bereich der Abbausequenz	
Cyanursäure $\longrightarrow$ CO <sub>2</sub> und NH <sub>3</sub>	26
3.2.1. Abbau von Cyanursäure durch verschiedene Stämme	26
3.2.2. Wachstumseigenschaften von <u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	31
3.2.3. Spezifische Abbauleistung gegenüber Cyanursäure von wachsenden Zellen von <u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	33
3.2.4. Spezifische Abbauleistung gegenüber Cyanursäure von ruhenden Zellen von <u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	39
3.2.5. Abbau von Cyanursäure durch <u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2 in Anwesenheit von fremden Zellen, Ammelin und Ammelid	46
3.2.6. Wachstum und Cyanursäureabbau von <u>Sporothrix</u> <u>schenkii</u> Stamm 6.2 in Anwesenheit von Mutter- lauge aus einer Atrazin-Produktionsanlage	48
3.3. Experimente im Bereich der Abbausequenz	
Ammelin $\longrightarrow$ Ammelid $\longrightarrow$ Cyanursäure	50
3.3.1. Abbau von Ammelin durch verschiedene Stämme	50
3.3.2. Bestimmung des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes beim Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch <u>Rhizopus stolonifer</u> und durch den Stamm 123B	53
3.3.3. Abbau von Ammelin durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Wachstum auf verschiedenen Medien	56
3.3.4. Abbau von Ammelin durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Wachstum auf Komplexmedien mit ver- schiedenen Konzentrationen von Ammelin und Cyanursäure	60
3.3.5. Spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin von wachsenden Zellen des Stammes 123B	62
3.3.6. Spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin von ruhenden Zellen des Stammes 123B	65
3.3.7. Wachstum und Ammelinabbau des Stammes 123B auf Minimalmedien mit verschiedenen N-Quellen bei einem Zusatz von Thiamin	67

3.4. Totalabbau von Ammelin und Ammelid zu CO <sub>2</sub> und NH <sub>3</sub>	71
3.4.1. Abbau von Ammelin durch <u>Stachybotrys chartarum</u> und <u>Sporothrix schenkii</u>	71
3.4.2. Abbau von Ammelin und Ammelid durch eine Mischkultur von Stamm 123B und <u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	74
3.5. Experimente im Bereich der Abbausequenz Atrazin/OH-Atrazin → Ammelin/Ammelid	77
3.5.1. Abbau von Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelin und N-Isopropylammelin durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Minimalmedium	77
3.5.2. Abbau von Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelin und N-Isopropylammelin durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Komplexmedium	81
3.5.3. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch <u>Asper- gillus fumigatus</u> bei Wachstum auf verschiedenen Medien	83
3.5.4. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch <u>Asper- gillus fumigatus</u> bei tiefen pH's	84
3.5.5. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch Enzym- präparate von <u>Aspergillus fumigatus</u>	86
3.5.6. Abbau von Methoxy-Triazinen und reduzierten Triazinen durch <u>Aspergillus fumigatus</u>	87
4. Diskussion	89
4.1. Dealkylierung von Triazin-Derivaten	89
4.2. Einfluss von Ammoniumionen auf die Deaminierung von Triazin-Derivaten und auf den Abbau von Cyanursäure	91
4.3. Enzymatik und Regulation des Abbaus innerhalb der Abbau- sequenz Ammelin → CO <sub>2</sub> und NH <sub>3</sub>	93
4.4. Triazin-Derivate als C- oder N-Quelle für Mikroorganismen.	94
5. Zusammenfassung	96
6. Summary	99
7. Literatur	101

## Abkürzungen und Begriffe

---

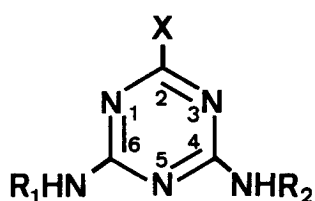
BOD <sub>5</sub>	Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
COD	Chemischer Sauerstoffbedarf
cpm	Impulse pro Minute
dpm	Zerfälle pro Minute
GS	Glukose/Saccharose-Mischung (1:1)
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
Ma	Mineralsalzmedium ohne C- und N-Quelle
MaN	Mineralsalzmedium mit NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> als N-Quelle
n.b.	Nicht bestimmt
OD <sub>546</sub>	Optische Dichte bei 546 nm
OD <sub>max</sub>	Maximale optische Dichte bei 546 nm
PO <sub>4</sub>	Phosphatpuffer
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-Phenyl-Oxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
ppm	1 Teil in 1 Million (u.a. mg/l)
SA	Spezifische Abbauleistung
TLC	Dünnschichtchromatographie
TOC	Totaler organischer Kohlenstoff
Tris	Tris-Puffer (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)
YE	Hefeextrakt
μ	exponentielle Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )
μ <sub>max</sub>	maximale exponentielle Wachstumsrate
OH-Atrazin	2-Hydroxy-4-Isopropylamino-6-Aethylamino-s-Triazin
OH-Simazin	2-Hydroxy-4,6-Diaethylamino-s-Triazin
OH-Prometryn	2-Hydroxy-4,6-Diisopropylamino-s-Triazin
N-Aethylammelid	2-Hydroxy-4-Aethylamino-6-Amino-s-Triazin
N-Aethylammelid	2-Hydroxy-4-Aethylamino-6-Hydroxy-s-Triazin
Deaethyl-Atrazin	2-Chlor-4-Amino-6-Isopropylamino-s-Triazin
Deisopropyl-Atrazin	2-Chlor-4-Amino-6-Aethylamino-s-Triazin
Abbauleistung	Abbau pro Zeit (ppm/h)
spezifische Abbauleistung	Abbau pro Zeit und Zellmasse (mg/h.gTG)

# 1. Einleitung

## 1.1. Struktur, Wirkung und Synthese der Triazinherbizide

In der Landwirtschaft werden s-Triazine (im Folgenden stets nur Triazine genannt) seit rund 25 Jahren als Herbizide eingesetzt. Verschiedene Aspekte der Triazine (u. a. Synthese, Wirkung, Anwendung, Verhalten in der Umwelt, chemische und physikalische Eigenschaften) sind in mehreren Uebersichtsartikeln beschrieben worden (1 - 5). In Fig. 1 sind einige der gebräuchlichsten Triazinherbizide dargestellt.

Fig. 1: Name, Struktur und Selektivität einiger Triazinherbizide



X = Cl : Chlor-Triazine  
 OCH<sub>3</sub> : Methoxy-Triazine  
 SCH<sub>3</sub> : Methylthio-Triazine  
 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> : Alkylgruppen

Name	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Wichtigste Anwendungsgebiete
Atrazin	Cl	Aethyl	Isopropyl	Mais, Hirse, Zuckerrohr
Simazin	Cl	Aethyl	Aethyl	Mais, Obst- und Weinbau
Propazin	Cl	Isopropyl	Isopropyl	Rüben
Atraton	OCH <sub>3</sub>	Aethyl	Isopropyl	Kaffee, Zuckerrohr
Prometon	OCH <sub>3</sub>	Isopropyl	Isopropyl	Allgemeine Unkrautkontrolle (nicht selektiv)
Ametryn	SCH <sub>3</sub>	Aethyl	Isopropyl	Ananas, Zuckerrohr
Prometryn	SCH <sub>3</sub>	Isopropyl	Isopropyl	Baumwolle

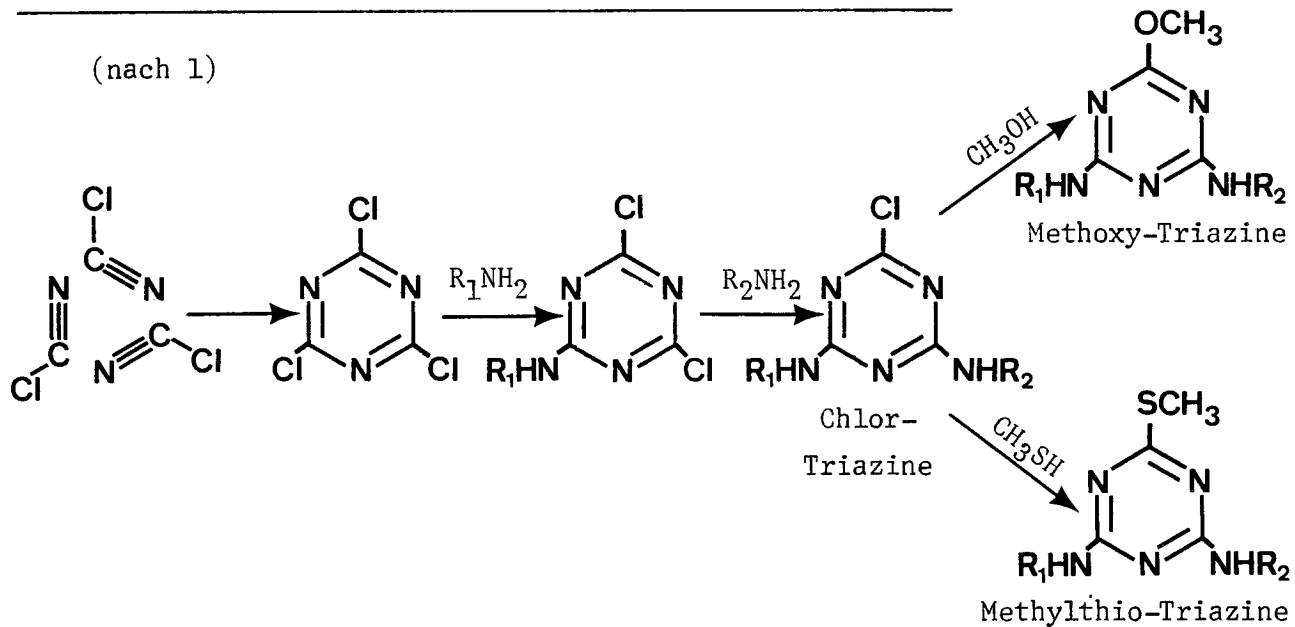
Bei der Hydrolyse des C2-Substituenten oder der Dealkylierung beider N-Alkylgruppen geht die herbizide Wirkung verloren (2).

Die herbizide Wirkung der Triazine beruht auf der Hemmung der Photosynthese (2, 6). Die Selektivität wird im allgemeinen durch physikalische und physiologische Eigenschaften der Pflanzen bedingt, kann aber auch u. a. durch Witterung, Eigenschaften des Bodens, Applikationszeit und Formulierung wesentlich beeinflusst werden (1, 4, 7). Beispielsweise verfügt Mais über ein System zur hydrolytischen Dechlorierung von Atrazin. Empfindliche Unkräuter

hingegen können Atrazin nicht inaktivieren (1).

Die Synthese der Triazine ist in Fig. 2 schematisch dargestellt.

Fig. 2: Schematische Darstellung der Synthese der Triazine



Das bei der Triazin-Fabrikation anfallende Abwasser enthält neben grösseren Mengen Kochsalz verschiedene Zwischen-, End- und Nebenprodukte der in Fig. 2 vereinfacht dargestellten Synthesewege. Die Zusammensetzung des Abwassers ist sehr stark von der Art der Prozessführung abhängig. In Tab. 1 ist ein Beispiel für die Zusammensetzung eines unbehandelten Abwassers aus einer Atrazin-Produktionsanlage aufgezeichnet. Durch geeignete chemische und physikalische Verfahren (u. a. Neutralisation, Fällung mit Aluminiumsalzen, Adsorption an Aktivkohle) können die Triazin-Derivate nahezu vollständig aus dem Abwasser eliminiert werden. Die genannten Verfahren werden gross-technisch angewendet. In der biologischen Stufe der Kläranlagen wurde jedoch praktisch kein Abbau der Triazin-Derivate beobachtet.

## 1.2. Mikrobieller Abbau der Triazinherbizide

Der Abbau der Triazinherbizide in Böden, Tieren und Pflanzen ist mehrfach untersucht und in einigen Uebersichtsartikeln dargestellt worden (1 - 4). Für die vorliegende Arbeit ist in erster Linie der mikrobielle Abbau der Triazinherbizide von Interesse.



Tab. 1: Beispiel für die Zusammensetzung eines unbehandelten  
Abwassers einer Atrazin-Produktionsanlage

(H. Pfenninger, Ciba-Geigy AG, persönliche Mitteilungen)

Parameter	Mittlere Konzentration (ppm)	
BOD <sub>5</sub> (Biologischer Sauerstoff- bedarf in 5 Tagen)	0	
Ammoniumionen	11	
Nitrat, Nitrit	0	
Phosphor	0	
Sulfat, Sulfit	0	
Verschiedene Metallionen	4.4	
davon Aluminium, Nickel, Kupfer	4.2	
Chlorid	11'000	
Aethylamin, Isopropylamin	16.4	
Organische Lösungsmittel	2.6	
Triazin-Derivate	325	(100 %)
davon: Atrazin	28	( 9 %)
2,4-Diaethylamino-6-Iso- propylamino-Triazin	29	( 9 %)
N-Isopropylammelid	174	( 53 %)
OH-Atrazin	27	( 8 %)
Cyanursäure	67	( 21 %)

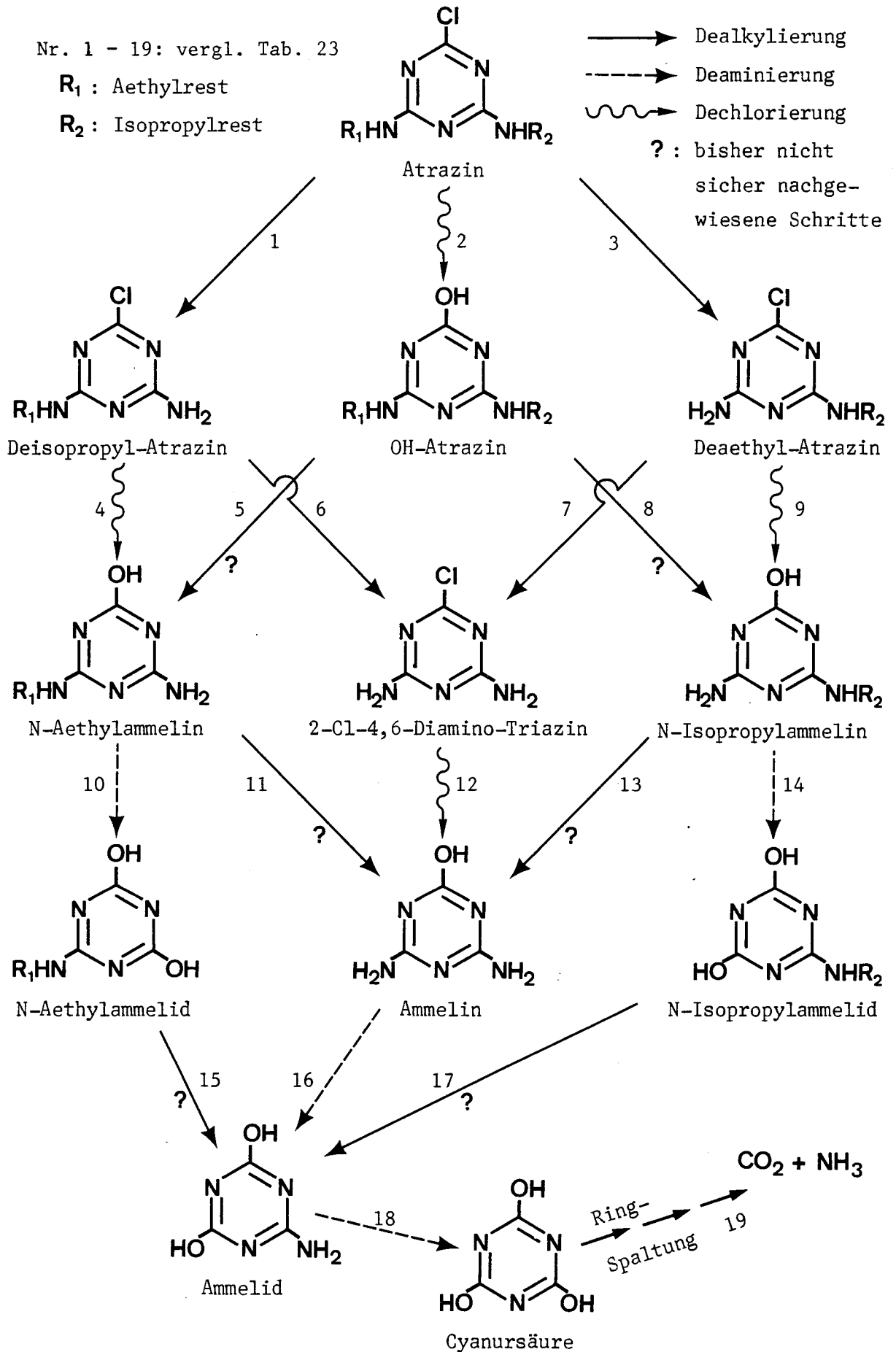
In einigen Publikationen wird der direkte Abbau von  $^{14}\text{C}$ -ringmarkiertem Atrazin und OH-Atrazin zu  $\text{CO}_2$  im Boden beschrieben. Skipper (8, 9) konnte innerhalb einer Inkubationszeit von 13 Tagen rund 0.1 - 0.5 %  $\text{CO}_2$  aus Atrazin und 1.5 - 3.0 %  $\text{CO}_2$  aus OH-Atrazin nachweisen. Wolf (10) fand, dass innerhalb eines Jahres in aeroben Böden rund 14 % und in anaeroben Böden rund 0.6 % Atrazin zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt wurde. Goswami (11) wies nach, dass innerhalb von 30 Tagen unter aeroben Bedingungen 0.6 % Atrazin und 3.2 % OH-Atrazin zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt wurde, während unter anaeroben Bedingungen kein  $\text{CO}_2$  gebildet wurde. Hance (12) untersuchte den Abbau von Atrazin und OH-Atrazin in Böden und Seesedimenten unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Innerhalb von 12 Wochen fand er, bei einer allerdings sehr unzuverlässigen Experimentieranordnung, in allen Proben rund 6 - 12 %  $\text{CO}_2$ . Kaufman (13, 14) und Kearney (15) fanden, dass Aspergillus fumigatus aerob, Atrazin und Simazin vermutlich zu Ammelid, nie jedoch zu  $\text{CO}_2$  umsetzte.

Diese Daten belegen, dass Atrazin und OH-Atrazin im Boden zu  $\text{CO}_2$  abgebaut werden können. Die einzelnen (zum Teil hypothetischen) Abbau-schritte, die schliesslich zur Bildung von  $\text{CO}_2$  führen, sind in Fig. 3 dargestellt und werden im Folgenden detailliert beschrieben.

- Hydrolyse des C2-Substituenten ( $\text{C-Cl} \rightarrow \text{C-OH}$ ):

Bei vielen Triazinherbiziden stellt die Bildung des entsprechenden Hydroxy-Derivates die hauptsächlichste Inaktivierungsreaktion dar (8, 9, 11, 16, 17, 18). Bei den Methylthio-Triazinen treten bei der Abspaltung der Methylthiogruppe Sulfoxyde als Zwischenprodukte auf (19). Inwieweit an der hydrolytischen Abspaltung des C2-Substituenten rein chemische und/oder enzymatische Mechanismen beteiligt sind, bleibt unklar. Einerseits werden nämlich im Boden Chlor-Triazine auch in Anwesenheit von 200ppm Natriumazid oder bei  $95^\circ\text{C}$  dechloriert (18) und vermutlich katalysieren auch das Tonmineral Montmorillonit und organisches Material die Dechlorierung (18, 20). Andererseits aber wurde beobachtet, dass der Pilz Fusarium roseum Atrazin zu OH-Atrazin dechlorieren kann (21). Ein Enzym, das die hydrolytische Dechlorierung von Chlor-Triazinen katalysiert, wurde bisher nie beschrieben. Die enzymatische Dechlorierung (oxydativ oder reduktiv) von andern Pestiziden wurde jedoch mehrfach nachgewiesen (22, 23).

Fig. 3: Abbau von Atrazin durch Mikroorganismen (nach 44)



- Dealkylierung der N-Alkylgruppen ( $\text{-NH-R} \longrightarrow \text{-NH}_2$ ):

Dealkylierungen konnten sowohl im Boden (8, 9, 11, 16, 17, 24) als auch in Reinkulturen von Mikroorganismen (8, 13, 14, 15, 25) beobachtet werden. Bei der Dealkylierung von Aethyl- und Isopropylgruppen konnten nie irgendwelche Zwischenprodukte erfasst werden; als Produkte wurden zum Beispiel in der Chlor-Triazin-Reihe stets 2-Chlor-4-Alkylamino-6-Amino-Triazine (einfach dealkyliert) und/oder 2-Chlor-4,6-Diamino-Triazine (doppelt dealkyliert) gefunden. Der Mechanismus der Dealkylierung ist nicht bekannt, doch dürfte es sich um eine oxydative Spaltung der N-C-Bindung handeln, die wahrscheinlich durch eine unspezifische Monooxygenase katalysiert wird. Die Alkylgruppe wird dabei vermutlich als Aldehyd freigesetzt (vergl. 23, 26, 27). Simazin und Atrazin werden unter anderem durch Aspergillus fumigatus und Rhizopus stolonifer dealkyliert. Atrazin wird von A. fumigatus vorallem deaethyliert und von R. stolonifer vorallem deisopropyliert. Neben den einfach dealkylierten Triazin-Derivaten wurden noch geringe Mengen von weiteren Produkten beobachtet, die jedoch nicht genau identifiziert werden konnten. Vermutlich handelt es sich um 2-Chlor-4,6-Diamino-Triazin, N-Alkylammelid, N-Alkylammelid, Ammelin und Ammelid. Eine Ringspaltung konnte nicht nachgewiesen werden. Es ergaben sich Hinweise, dass Aspergillus fumigatus die abgespaltenen Alkylgruppen als C-Quelle verwerten kann (13, 14, 15, 21, 25).

Während auf Grund von Rückstandsanalysen im Boden angenommen werden darf, dass dealkylierte Produkte von Atrazin und Simazin noch dechloriert werden (17), konnte bisher ein direkter Nachweis für eine Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten nicht erbracht werden.

- Deaminierung ( $\text{C-NH}_2 \longrightarrow \text{C-OH}$ ):

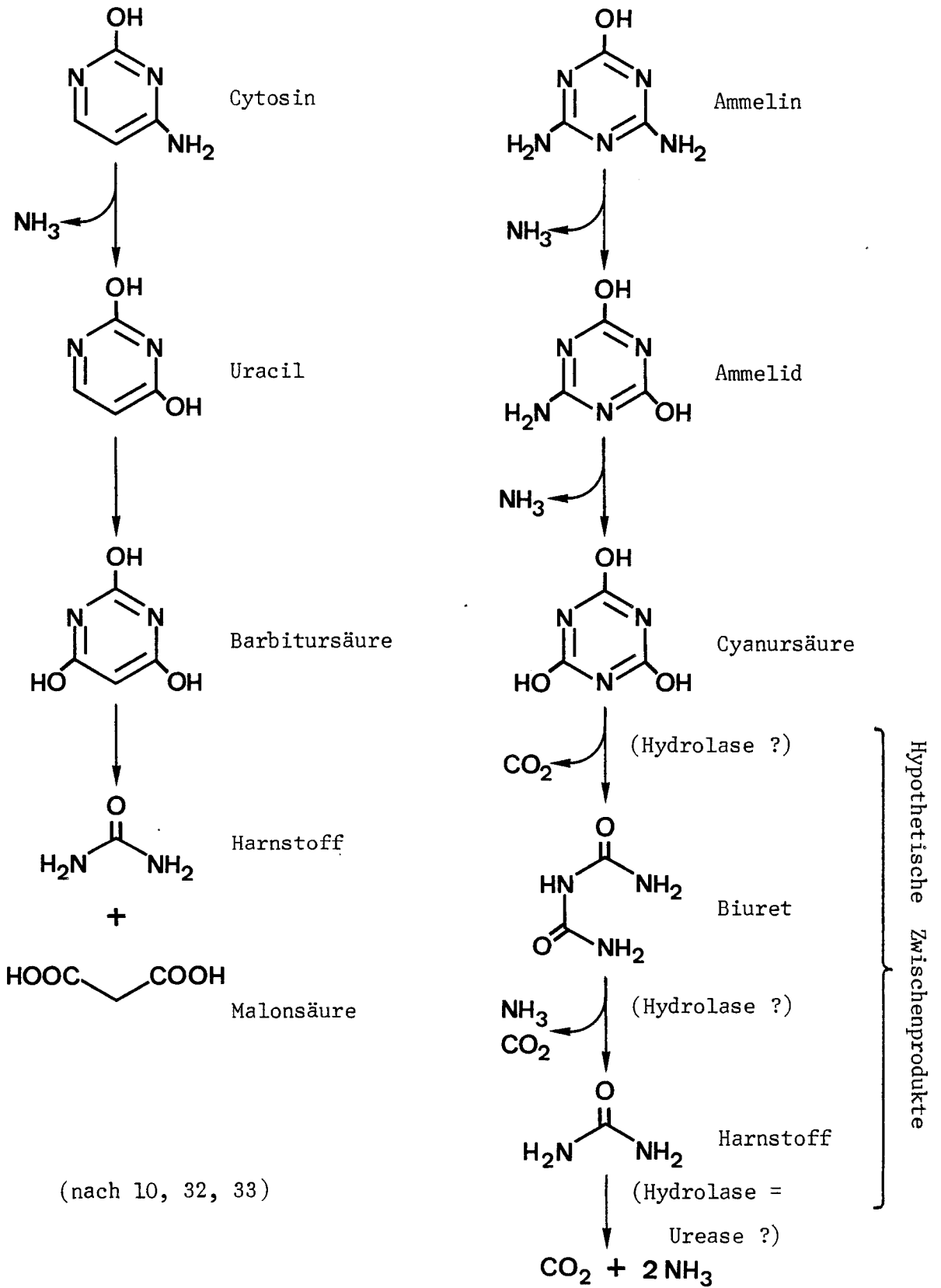
N-Aethylammelid und N-Isopropylammelid werden im Boden zu N-Aethylammelid resp. N-Isopropylammelid deaminiert (1). Auch Ammelin wird im Boden zu Ammelid und weiter zu Cyanursäure deaminiert (28). Eine Deaminierung von Triazin-Derivaten durch Reinkulturen von Mikroorganismen ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

- Spaltung des Triazinrings:

Wolf (10) fand, dass  $^{14}\text{C}$ -ringmarkiertes 2-Chlor-4,6-Diamino-Triazin und  $^{14}\text{C}$ -ringmarkierte Cyanursäure im Boden innerhalb von 6 Monaten zu rund 30 resp. 100 % zu  $\text{CO}_2$  abgebaut werden. Hauck (29) beobachtete, dass der Stickstoff von Ammelin, Ammelid und Cyanursäure im Boden innerhalb von 6 Monaten zu rund 50 - 90 % nitrifiziert wird. Beide Arbeiten belegen, dass eine Spaltung des Triazinrings möglich ist. Saldick (30) beschreibt einen vollständigen Abbau von Cyanursäure durch anaeroben Klärschlamm und in praktisch anaeroben Böden zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$ . Die maximale spezifische Abbauleistung des Klärschlammes beträgt dabei rund 2 mg/h · gTG. Der Abbau von Cyanursäure durch Reinkulturen von Mikroorganismen wurde von Jensen (31) und von Wolf (10) untersucht. Penicillium varians, Penicillium armillatum und ein Stamm der Gattung Hormodendrum vermögen auf Cyanursäure (und u. a. auf Biuret, Harnstoff und Ammoniumsulfat) als einziger N-Quelle zu wachsen. Die spezifische Abbauleistung der drei Stämme beträgt rund 1 mg/h · gTG (31). Hendersonula toruloidea und Stachybotrys chartarum bauen bei Wachstum auf einem Komplexmedium innerhalb von 8 Wochen rund 15 resp. 100 % Cyanursäure zu  $\text{CO}_2$  ab; die spezifische Abbauleistung lässt sich jedoch auf Grund der angegebenen Daten nicht abschätzen (10).

Ueber den genauen Mechanismus des Abbaus von Ammelin zu Cyanursäure und weiter zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  ist nichts bekannt. Da zumindest Ammelin und Ammelid normalerweise im Stoffwechsel der Mikroorganismen nicht vorkommen, verfügen die Mikroorganismen wohl kaum über ein spezielles enzymatisches System zum Abbau von Ammelin und Ammelid. Wolf (10) äussert die Vermutung, dass möglicherweise einige Triazin-Derivate durch Enzyme des oxydativen Pyrimidin-Katabolismus (vergl. 32, 33) abgebaut werden, die über eine breite Substrat-Spezifität verfügen könnten (vergl. Fig. 4). Auf derselben Idee beruht auch ein Bericht von Temperle (34), wonach geringe Mengen von Triazin-Derivaten in die DNS und RNS eingebaut werden können. Mücke (35) konnte jedoch später bei derselben Thymin- und Uraciluxotrophen Mutante von Escherichia coli selbst bei Wachstum auf einem un-supplementierten Medium keinen Einbau von Triazin-Derivaten in die DNS und RNS feststellen. Unter der Annahme, die Spaltung der Cyanursäure zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  werden durch eine oder mehrere Hydrolasen (vergl. anaerober Abbau bei Saldick, 30) katalysiert,

Fig. 4: Oxydativer Pyrimidinabbau im Vergleich zum Ammelinabbau



kann die Bildung der Zwischenprodukte Biuret und Harnstoff postuliert werden. Nicht auszuschliessen ist jedoch auch ein Abbau durch Hydroxylasen, was zur kurzfristigen Bildung von hydroxylierten Derivaten von Biuret und Harnstoff führen könnte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Boden ein langsamer Abbau von Triazinherbiziden zu  $\text{CO}_2$  möglich ist, dass jedoch die einzelnen Abbauschritte nur unvollständig untersucht worden sind. Insbesondere über den Abbau von Triazin-Herbiziden durch Reinkulturen von Mikroorganismen liegen nur wenige Daten vor. Nicht beschrieben ist bisher eine direkte Dealkylierung oder Deaminierung von Hydroxy-Derivaten von Triazin-Herbiziden durch Reinkulturen von Mikroorganismen.

### 1.3. Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Es sollen Mikroorganismen gesucht werden, die fähig sind, verschiedene Triazin-Derivate effizient abzubauen. Derivate, die im Abwasser von Triazin-Produktionsanlagen vorkommen können, sollen dabei besonders berücksichtigt werden. Dazu wurde die Arbeit in verschiedene Bereiche aufgeteilt:

- Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen
- Identifizierung der entstehenden Zwischen- und Endprodukte
- Charakterisierung der für den Abbau günstigen Bedingungen (u. a. Medium, Konzentration des Substrates, zusätzliche C- und N-Quellen)

Die Arbeiten haben sich auf den Abbau von Atrazin und dessen Hydroxy-Derivate konzentriert.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert (59, 60)

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Organismen

#### 2.1.1 Organismen aus Abwasser- und Bodenproben

Insgesamt wurden 200 Mikroorganismen aus Abwasser- und Bodenproben isoliert. Diese Organismen wurden nicht bestimmt, sondern nur mit Nummern bezeichnet. Eine Ausnahme bildet Stamm 6.2, der als Sporothrix schenkii identifiziert wurde. Die folgenden Stämme zeigten positive Abbaueigenschaften gegenüber Triazin-Derivaten und werden in der vorliegenden Arbeit mehrfach erwähnt:

Stämme Nr. 2.2, 6.1, 6.22 und 8.1	}	Pilze
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2		
Stämme Nr. 2.20, 6.15, 1, 44, 118B und 123B	}	Bakterien

#### 2.1.2. Organismen aus Stammsammlungen

In der Literatur (vergl. Kap. 1.2) wird der Abbau einzelner Triazin-Derivate durch Reinkulturen von Mikroorganismen beschrieben. Es war somit von Interesse, das Abbauverhalten dieser Stämme gegenüber verschiedenen Triazin-Derivaten zu untersuchen. Leider konnten nur Stachybotrys chartarum und Hendersonula toruloidea bei den entsprechenden Autoren beschafft werden. Da in eigenen Experimenten gefunden wurde, dass Sporothrix schenkii Stamm 6.2 Cyanursäure gut abbaut, wurden noch zwei weitere Vertreter dieser Art untersucht. Insgesamt wurde mit folgenden Organismen aus Stammsammlungen gearbeitet:

<u>Sporothrix schenkii</u> CBS 359.36 und CBS 472.48	}	2 Stämme aus CBS-Stamm- sammlung, Baarn, NL
<u>Rhizopus stolonifer</u> M 2669, M 2670, M 2679 und M 2875		
<u>Aspergillus fumigatus</u> M 429, M 475 und M 8809	}	8 Stämme aus der Mykothek des Institutes für spezielle Botanik der ETH, Zürich (erhalten von Prof. Dr. E. Müller
<u>Penicillium notatum</u> M 2544		



<u>Stachybotrys chartarum</u>	}	Stamm von K. Haider, Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig, BRD (vergl. 10, 36, 37)
<u>Stachybotrys chartarum</u>		
<u>Hendersonula toruloidea</u>		

## 2.2. Züchtung

### 2.2.1. Medien

Ma-Medium: (Mineralsalzmedium ohne C- und N-Quelle)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.30 g/l $\text{H}_2\text{O}$ dest.
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2.00 g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g/l
	Diverse Spurenelemente	3.35 mg/l
	(davon: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ : 1 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ : 1, $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_4$ : 0.25, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ : 0.25, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ : 0.25, $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ : 0.25, $\text{ZnCl}_2$ : 0.25 $\text{NH}_4\text{VO}_3$ : 0.1)	
MaN-Medium: (Mineralsalzmedium mit $\text{NH}_4\text{NO}_3$ als N-Quelle)	Ma-Medium + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	(0.6 g/l)

Der pH der Medien wurde stets mit einer NaOH- resp. HCl-Lösung auf 6.8 - 7.2 eingestellt (Ausnahme vergl. Kap. 3.5.4)

Feste Medien enthielten 2 % Agar

Zusätze von C- und N-Quellen, Hefeextrakt ("YE"), markierten und unmarkierten Triazin-Derivaten, Vitaminen und Antibiotika werden im Text stets erwähnt. Vielfach wurden den Medien eine Mischung von Glukose und Saccharose (1:1) zugegeben. Diese Zugabe wird im Text als "GS" bezeichnet. Der Begriff "Zucker" wird im Text als Oberbegriff für Glukose, Saccharose und GS verwendet. Oft enthielten die Medien 5 ppm YE als mögliche Aminosäuren- und Vitamin-Quelle. Enthalten die Medien genau definierte Zusätze oder

nur 5 ppm YE, so wird im Text von Minimalmedien gesprochen, bei Zugabe von 5000 ppm (= 0.5 %) YE jedoch von Komplexmedien.

### 2.2.2. Aufbewahren der Stämme

Sämtliche Stämme wurden auf Schrägagarröhrchen mit dem Medium MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt und von Zeit zu Zeit zu Einzelkolonien ausgestrichen. Zusätzlich wurden auch sämtliche Stämme in lyophilisierter Form aufbewahrt.

### 2.2.3. Züchtungsbedingungen

Alle Experimente mit flüssigen Kulturen oder Zellsuspensionen wurden in Reagensgläsern (maximal mit 6 ml gefüllt) oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Fassungsvermögen höchstens zu 35 % ausgenützt) durchgeführt. Die Kulturen und Suspensionen wurden dabei auf einer Rotationschüttelmaschine (rund 200 Rotationen pro Minute) oder in einem Schüttelwasserbad (Schüttelfrequenz: rund 100 Hertz) inkubiert.

Falls nichts anderes erwähnt, betrug die Inkubationstemperatur 28 - 30°C.

### 2.2.4. Bestimmung des Wachstums mit Hilfe der OD<sub>546</sub>

Das Wachstum der Bakterien und von Sporothrix schenkkii Stamm 6.2 wurde meistens mit Hilfe der OD<sub>546</sub> (Optische Dichte bei 546 nm, gemessen mit Eppendorf-Spektralphotometer) bestimmt. Die exponentielle Wachstumsrate  $\mu$  wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad \text{wobei } x_1 \text{ und } x_2 \text{ die OD}_{546} \text{ der Kultur zu den Zeitpunkten } t_1 \text{ resp. } t_2 \text{ darstellen}$$

Die mittlere OD<sub>546</sub> (bei exponentiellem Wachstum!) innerhalb eines beliebigen Zeitintervalls wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{mittlere OD}_{546} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} x_1 \cdot e^{\mu(t_2 - t_1)} \cdot dt}{t_2 - t_1} = \frac{x_2 - x_1}{\ln x_2 - \ln x_1}$$

Bei Inkubationsintervallen von weniger als einer Generationszeit, kann diese Formel ersetzt werden durch:

$$\text{mittlere OD}_{546} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

Die dabei entstehende Abweichung von der mathematisch korrekten Berechnungsweise beträgt weniger als 4 %.

#### 2.2.5. Bestimmung des Wachstums mit Hilfe des Trockengewichtes

Eine bestimmte Menge der Kultur wurde filtriert. Die Filter wurden vor und nach der Filtration bei rund 100 - 160°C getrocknet und gewogen. Aus der Gewichts-differenz und der filtrierten Menge liess sich das Trockengewicht der Kultur (mg/ml) berechnen. Für Pilze wurden GF/C-Glasfiberfilter (Whatman) und für Bakterien Metrigard-Glasfiberfilter (Gelman) verwendet.

#### 2.3 Herstellung von Zellsuspensionen

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Kühlzentrifuge, RC-2B) geerntet (Stamm 123B: 4000g, 30 min; Sporothrix schenkkii Stamm 6.2: 4000g, 15 min), 3x mit Puffer gewaschen und in demselben Puffer suspendiert.

Der verwendete Phosphatpuffer ist wie folgt zusammengesetzt:

3.40 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 5.71 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  + 1.0 l  $\text{H}_2\text{O}$  dest (= 0.05 M)  
(pH mit einer NaOH-Lösung auf 7.0 eingestellt)

#### 2.4 Analyse von $^{14}\text{C}$ -Triazin-Derivaten mit Hilfe von TLC

##### 2.4.1. Auftragen und Auftrennen der Proben

Eine Probe (meistens 0.5 - 1.0 ml) des Inkubationsgemisches (= Kultur resp. Zellsuspension mit  $^{14}\text{C}$ -Triazin-Derivat, meistens 5000 - 30000 dpm/ml) wurde mit derselben Menge Methanol vermischt, einige Stunden geschüttelt und zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge, 4000g, 30 min). Der Ueberstand wurde mit einem Rotationsverdampfer (Büchi, Flawil, SG) eingedampft und in Methanol/Wasser (1:1, meistens 100 - 300 µl) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden verschiedene Mengen mit dem Probeauftragegerät Linomat III (Camag, Muttenz, BL) auf eine TLC-Platte (DC-Fertigplatten, Kieselgel, 60F-254, Merck) aufgetragen. Die Proben wurden mit folgenden Flussmitteln

aufgetrennt (Laufdistanz stets 15 cm):

Nr. 1: n-Propanol/Aethylacetat/Chloroform/Benzol (17:33:17:33)

(für apolare Verbindungen wie Atrazin oder dealkyliertes Atrazin)

Nr. 2: Aethylacetat/Essigsäure/Methanol/Wasser (5:1:1:1)

(für polare Verbindungen wie OH-Atrazin, Ammelin oder Ammelid)

Nr. 3: Chloroform/Methanol/Ameisensäure/Wasser (75:20:4:2)

(ebenfalls für polare Verbindungen)

(weitere Flussmittel vergl. 15, 18, 25, 38)

Zur Lokalisierung der aufgetrennten Verbindungen wurden die TLC-Platten in einer Kassette (Ilford) für rund eine Woche unter einen Röntgenfilm (Kodirex X-ray film, Kodak) gelegt, der anschliessend entwickelt wurde (Phenisol-DK 50 Entwickler, Kodak und Hypam-rapid-fixier, Ilford). Flecken mit einer Radioaktivität von  $>200$  dpm waren dabei gut nachweisbar.

Hohe Zusätze von Zucker und YE im Medium fördern die Bildung von organischem Material, das die Qualität der Auftrennung auf TLC-Platten reduziert. Diese Qualitätseinbusse kann jedoch durch eine gleichzeitige Erhöhung der Radioaktivität im Medium (bis 30'000 dpm/ml) weitgehend eliminiert werden, weil dadurch kleinere Medienproben analysiert werden können.

#### 2.4.2. Identifikation der aufgetrennten Verbindungen

Zur Identifikation einzelner Verbindungen wurde dem Inkubationsgemisch nochmals eine Probe entnommen und gleich wie in Kap. 2.4.1. behandelt. Vor dem Eindampfen wurde der Probe jedoch rund 100 µg desjenigen unmarkierten Triazin-Derivates zugegeben, das der zu identifizierenden Verbindung am ehesten entsprechen konnte. Nach dem Entwickeln des Röntgenfilms wurde die unmarkierte Verbindung auf der TLC-Platte wie folgt angefärbt:

- Besprühen mit einer 10 %igen Lösung von tertiärem Butylhypochlorit in Hexan
- Nach rund 10 min Besprühen mit folgender Lösung: 16 mg o-Tolidin + 3 ml Essigsäure + 100 mg Kaliumjodid + 50 ml Wasser

Triazin-Derivate werden dabei orange-violett angefärbt. Liess sich nun der angefärbte Flecken auf der TLC-Platte mit der Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm genau zur Deckung bringen, so entsprach die zu

identifizierende Verbindung dem zugegebenen Triazin-Derivat.

In Zweifelsfällen wurde eine zweidimensionale Chromatographie (mit zwei verschiedenen Flussmitteln) durchgeführt. Rf-Werte erwiesen sich zur Identifikation als ungünstig, da sie bei unreinen Proben stark variieren können. Bei Abbaubersuchen mit unmarkierten Triazin-Derivaten wurden die Verbindungen stets nur mit Hilfe des Anfärbens nachgewiesen.

#### 2.4.3. Quantitative Bestimmung der aufgetrennten Verbindungen

Die Bezirke auf der TLC-Platte, die den Röntgenfilm schwarz färbten, wurden einzeln ausgekratzt und im Scintillationszähler ausgezählt. Auf Grund der cpm-Werte liess sich die prozentuale Verteilung des Eduktes und der Produkte berechnen.

#### 2.5. Analyse von $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

Dem Inkubationsgemisch, in dem allfällige  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure nachgewiesen werden soll, wurde eine Probe von 1 ml entnommen und autoklaviert. Die Probe wurde mit 1.5 ml einer wachsenden Kultur von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 (Medium: MaN + 1.0 % GS,  $\text{OD}_{546}$  von rund 0.1) beimpft und anschliessend inkubiert (vergl. Kap. 3.2.5). Beim Inkubationsbeginn und nach 2 Tagen wurde je eine Probe von 1 ml im Scintillationszähler ausgezählt. Aus der Differenz der cpm-Werte liess sich der prozentuale Anteil von Cyanursäure berechnen.

Die Radioaktivität (2 - 4 %, vergl. Kap. 3.2.1.), die beim Cyanursäureabbau durch S. schenkii Stamm 6.2 in die Zellmasse eingebaut wird, wurde beim "6.2-Test" nicht berücksichtigt. Somit darf also ein Abbau von Ammelin zu Cyanursäure von mehr als 95 % (mit "6.2-Test") praktisch als vollständig angesehen werden.

## 2.6. Analyse der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung

---

Das beim  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäureabbau (zum Teil auch beim  $^{14}\text{C}$ -Ammelinabbau, vergl. Kap. 3.4) entstehende  $^{14}\text{CO}_2$  entweicht aus dem Inkubationsgemisch und bewirkt somit eine Abnahme der Radioaktivität. Die  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung kann folglich mit 2 verschiedenen Methoden nachgewiesen werden:

- Dem Inkubationsgemisch werden Proben entnommen, die im Scintillationszähler ausgezählt werden. Die Abnahme der Radioaktivität entspricht dem Abbau von Cyanursäure (resp. Ammelin)
- Das gebildete  $^{14}\text{CO}_2$  wird mit Hilfe der von Flückiger (39) entworfenen Radiorespirometrie-Apparatur in einer basischen Lösung (Methanol/Aethanolamin, 4:1) aufgefangen und im Scintillationszähler ausgezählt. Diese Methode eignet sich jedoch nur für das Auffangen von  $\text{CO}_2$  über relativ kurze Zeit (einige Stunden), da insbesondere Methanol schnell verdunstet. Für das Auffangen von  $\text{CO}_2$  über längere Zeit (einige Tage), wurde eine praktisch analoge Apparatur, jedoch mit 0.1N NaOH als Auffanglösung verwendet. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Auffanglösung mit HCl stark angesäuert, das  $\text{CO}_2$  in Methanol/Aethanolamin (4:1) überführt und im Scintillationszähler ausgezählt.

Die spezifische Abbauleistung von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 gegenüber Cyanursäure wurde (mit Ausnahme von Fig. 12) wie folgt berechnet: Zu Beginn der Inkubationszeit wurde eine Probe des Inkubationsgemisches (mit bekannter  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäurekonzentration) im Scintillationszähler ausgezählt. Aus dem dpm-Wert des innerhalb eines bestimmten Inkubationsintervalls (meistens 1 Stunde) aufgefangenen  $^{14}\text{CO}_2$  liess sich sodann die Abbauleistung (ppm/h oder mg/l·h) berechnen. Wurde diese Abbauleistung mit dem innerhalb des Inkubationsintervalls mittleren Trockengewichtes (vergl. Kap. 3.2.2) dividiert, so ergab sich die spezifische Abbauleistung (mg/h·gTG). Zur Kontrolle diente jeweils eine Bestimmung des dpm-Wertes des Inkubationsgemisches am Ende der Inkubationszeit. Die totale Abnahme der Radioaktivität im Inkubationsgemisch muss mit der Summe der dpm-Werte des total aufgefangenen  $^{14}\text{CO}_2$  übereinstimmen.

## 2.7. Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler

---

Je nach Art der Probe wurde die Radioaktivität im Scintillationszähler (Beckmann LS 250) verschieden bestimmt:

- Proben von Methanol/Aethanolamin (vergl. Kap. 2.6):

Je 10 ml Methanol/Aethanolamin wurden mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (1.0 l Toluol + 4 g PPO + 0.25 g POPOP) versetzt und ausgezählt

- Proben von Silicagel (vergl. Kap. 2.4.3.) und Zellsedimenten:

Das Silicagel resp. Zellsediment wurde in 5 ml Wasser suspendiert, mit 10 ml Insta-Gel (Packard) versetzt und ausgezählt

- Proben von Kulturen und Zellsuspensionen:

Je ml der Kultur resp. Zellsuspension wurde mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (1.0 l Toluol + 500 ml Triton-X-100 + 4 g PPO + 0.1 g POPOP) versetzt und ausgezählt.

## 2.8. Chemikalien

---

<sup>14</sup>C-ringmarkierte Triazin-Derivate (erhalten von Ciba-Geigy AG, Basel):

Atrazin (0.89 µCi/mg), 2-Hydro-4-Aethylamino-6-Isopropylamino-Triazin (=reduziertes Ametryn, 2.5), OH-Atrazin (1.8), OH-Simazin (2.0), OH-Prometryn (2.0), N-Aethylammelid (2.0), N-Isopropylammelid (2.0), N-Isopropylammelid (1.9), Ammelin (2.0), Ammelid (2.0), Cyanursäure (13.5)

Je nach Bedarf wurde die spezifische Radioaktivität dieser Verbindungen durch Zugabe von unmarkierten Triazin-Derivaten reduziert.

Unmarkierte Triazin-Derivate (erhalten von Ciba-Geigy AG, Basel):

Atrazin, Simazin, Prometryn, Ametryn, Atraton, OH-Atrazin, OH-Simazin, OH-Prometryn, N-Aethylammelid, N-Isopropylammelid, N-Aethylammelid, Deaethyl-Atrazin, Deisopropyl-Atrazin, 2-Hydro-4-Aethylamino-6-Isopropylamino-Triazin (= reduziertes Ametryn), 2-Hydro-4-Amino-6-Isopropylamino-Triazin, 2-Hydro-4-Amino-6-Aethylamino-Triazin, Deisopropyl-Atraton, Deaethyl-Atraton, Deisopropyl-Ametryn, Ammelin, Ammelid, Cyanursäure.

Viele dieser Verbindungen wurden nur zur Identifikation von Abbauprodukten eingesetzt (vergl. Kap. 2.4.2.)

Diverse Verbindungen:

- Fluka, Buchs: Cytosin, Uracil, Adenin, Barbitursäure, Biuret, Guanidin, Thiamin, Harnstoff, N-Aethylharnstoff, Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, Aethylacetat, Glukose, Saccharose,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , KJ
- Merck, Darmstadt: Aethanolamin, Ameisensäure, Essigsäure, Benzol, Chloroform, Methanol, Toluol, n-Propanol, PPO, POPOP, NaOH, HCl,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
- Serva, Heidelberg: Triton-X-100, o-Tolidin, tertiäres Butylhypochlorit
- Difco, Detroit: Hefeextrakt, Agar
- Sigma, St. Louis: Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
- Parke-Davis, London: Chloramphenicol



### 3. Resultate

#### 3.1 Anreicherung und Isolation von Mikroorganismen aus Abwasser- und Bodenproben und erste Abbauersuche

##### 3.1.1. Mikroorganismen aus Abwasserproben

An verschiedenen Stellen der Fabrikationsgebäude und der Kläranlagen der Triazin-Fabriken der Ciba-Geigy AG in Kaisten (Aargau) und Schweizerhalle (Baselland) wurden insgesamt 12 Abwasserproben entnommen. Da in diesen Fabriken Atrazin, Simazin, Prometryn und Ametryn produziert wird, sind allfällig vorhandene Mikroorganismen vermutlich einem hohen Selektionsdruck durch Triazin-Derivate ausgesetzt. Diese Mikroorganismen haben möglicherweise die Fähigkeit, einzelne Triazin-Derivate abzubauen. Die Mikroorganismen dieser Abwasserproben wurden im Laboratorium nochmals über mehrere Monate auf Triazinhaltigen Medien angereichert. Das Abbauverhalten der Mikroorganismen in diesen Anreicherungskulturen gegenüber Triazin-Derivaten wurde von Zeit zu Zeit geprüft (Fig. 5).

Fig. 5: Anreicherung von Mikroorganismen aus Abwasserproben

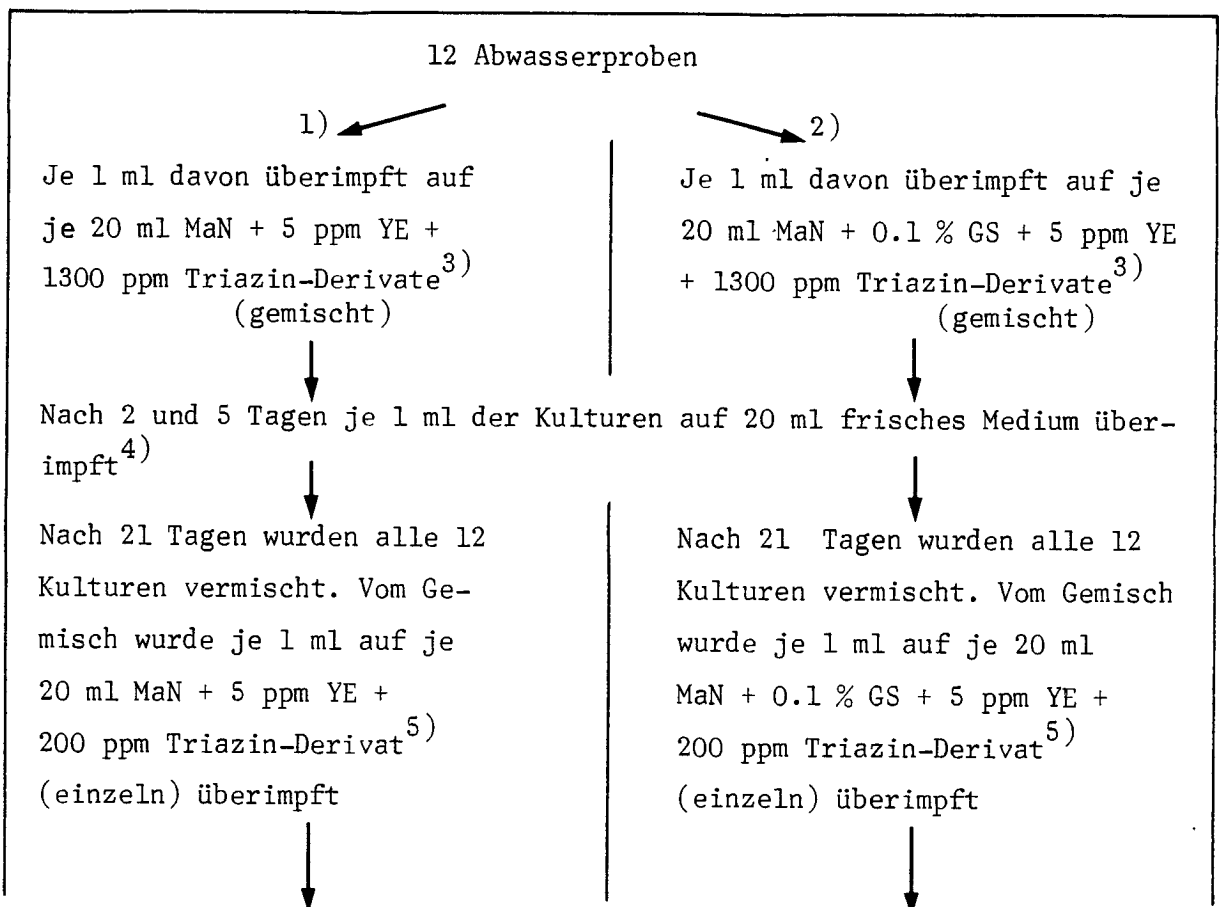
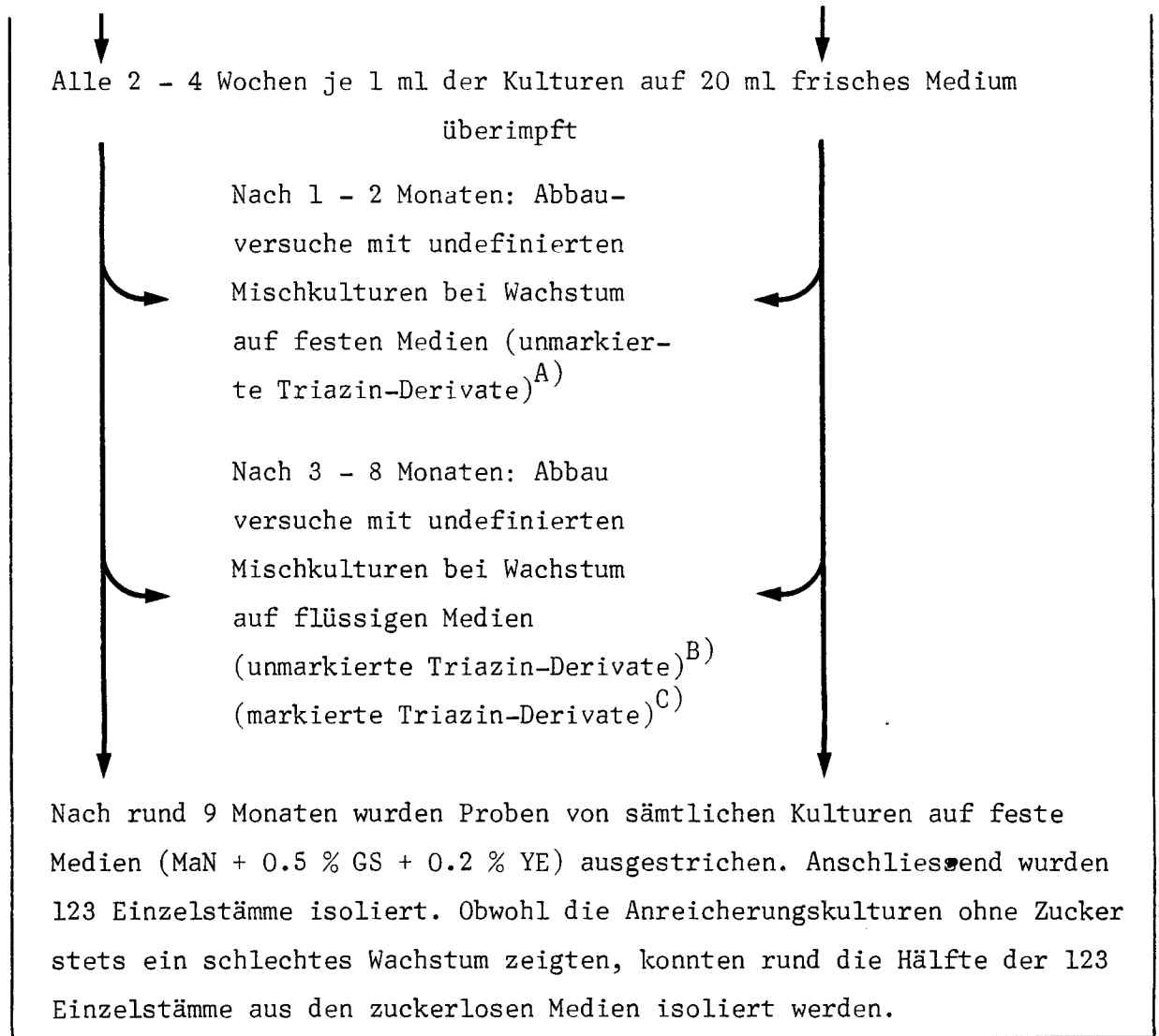


Fig. 5: (Fortsetzung)



Bemerkungen:

- 1) Ueberimpfen auf Medien ohne Zucker: Zur Anreicherung von Organismen, die Triazin-Derivate als einzige C- und Energie-Quelle verwerten.
- 2) Ueberimpfen auf Medien mit Zucker: Zur Anreicherung von Organismen, die Triazin-Derivate nur in Anwesenheit einer zusätzlichen C- und Energie-Quelle abbauen.
- 3) Der Zusatz von 1300 ppm Triazin-Derivaten bestand aus einem Gemisch von je 100 ppm Atrazin, Simazin, Ametryn, Prometryn, Deaethyl-Atrazin, Deisopropyl-Atrazin, OH-Atrazin, OH-Simazin, OH-Prometryn, N-Aethylammelmin, N-Isopropylammelmin, Ammelin und Cyanursäure (andere Triazin-Derivate standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung).

- 4) Die Konzentration von allfälligen toxischen Stoffen (u. a. Schwermetallen) in den Abwasserproben konnte dadurch schrittweise herabgesetzt werden.
- 5) Die unter 3) genannten Verbindungen wurden einzeln zugegeben; es ergaben sich somit 13 verschiedene Medien. Dadurch konnte verhindert werden, dass ein allfälliger Abbau einer Verbindungen durch ein anderes Triazin-Derivat gehemmt wird.

#### Abbauversuche und Ergebnisse:

- A) Das Abbauverhalten der Organismen wurde mit einer Methode getestet, die von Fröhner (40, 41) zur Ueberprüfung des mikrobiellen Pyrazonabbaus verwendet wurde. Zu 20 ml MaN + 5 ppm YE + 2 % Agar resp. MaN + 0.1 % GS + 5 ppm YE + 2 % Agar wurden bei 80°C (vor der Verfestigung) 1000 ppm einzelne Triazin-Derivate (dieselben wie unter Bemerkung 3) genannt) zugegeben. Anschliessend wurden die Medien in Petrischalen gegossen. Nach der Verfestigung der Medien bildeten die Triazin-Derivate eine feinkörnige Suspension im Agar. Anschliessend wurden Proben aus den entsprechenden Anreicherungskulturen auf diese festen Medien überimpft und mehrere Wochen inkubiert. Es wurde erwartet, dass sich die feinkörnige Suspension im Bereiche von Kulturen, die die vorgegebenen Triazin-Derivate abbauen, auflöst. Dies war jedoch nur auf dem Medium MaN + 0.1 % GS + 5 ppm YE + 2 % Agar + 1000 ppm Ammelin der Fall. Auf allen andern Medien konnte kein Abbau festgestellt werden. Zudem erwies sich die Methode als ungünstig, da die Medien schnell eintrockneten, einzelne Pilze die Platten schnell überwuchsen, hohe Konzentrationen von Triazin-Derivaten verwendet werden mussten und geringe Abbauleistungen kaum erfasst werden konnten.
- B) Je 100 ml MaN ± 0.5 % GS + 5 ppm YE + 10 ppm Atrazin, Simazin, Ametryn resp. Prometryn (alle unmarkiert) wurden mit Proben aus den entsprechenden Anreicherungskulturen beimpft und inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Monat konnten in allen Medien, die 0.5 % GS enthielten, bei allen Triazinherbiziden die entsprechenden hydroxylierten und dealkylierten Produkte nachgewiesen werden (mit TLC und Anfärben). Quantitative Angaben können bei dieser

Methode jedoch nicht gemacht werden. Bei diesem Experiment wurde auch versucht, den Abbau des aktiven Triazinherbizides mit dem Kressewurzelttest (42) nachzuweisen. Diese Methode erwies sich als sehr arbeitsintensiv. Zudem ergeben sich keine Hinweise über die Art der entstehenden Metabolite. Diese Methode wurde später nicht mehr verwendet.

- C) Je 5 ml MaN  $\pm$  0.5 % GS + 5 ppm YE + 2-5 ppm OH-Atrazin, OH-Simazin, OH-Prometryn, N-Aethylammelid, N-Isopropylammelid resp. Ammelin (alle  $^{14}\text{C}$ -ringmarkiert, weitere  $^{14}\text{C}$ -Triazin-Derivate standen zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung) wurden mit Proben aus den entsprechenden Anreicherungskulturen beimpft und inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Monat konnten in Medien, die 0.5 % GS enthielten, ein partieller Abbau von N-Aethylammelid zu N-Aethylammelid (rund 15 %) und von Ammelin zu Cyanursäure (rund 30 %) nachgewiesen werden (mit TLC und Autoradiographie). Bei allen andern Verbindungen und in allen Medien ohne Zucker konnte auch nach einer Inkubationszeit von 4 Monaten kein Abbau beobachtet werden. Die Werte von 15 und 30 % beim Abbau von N-Aethylammelid resp. Ammelin waren schlecht reproduzierbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die Zusammensetzung einer undefinierten Mischkultur laufend ändert.

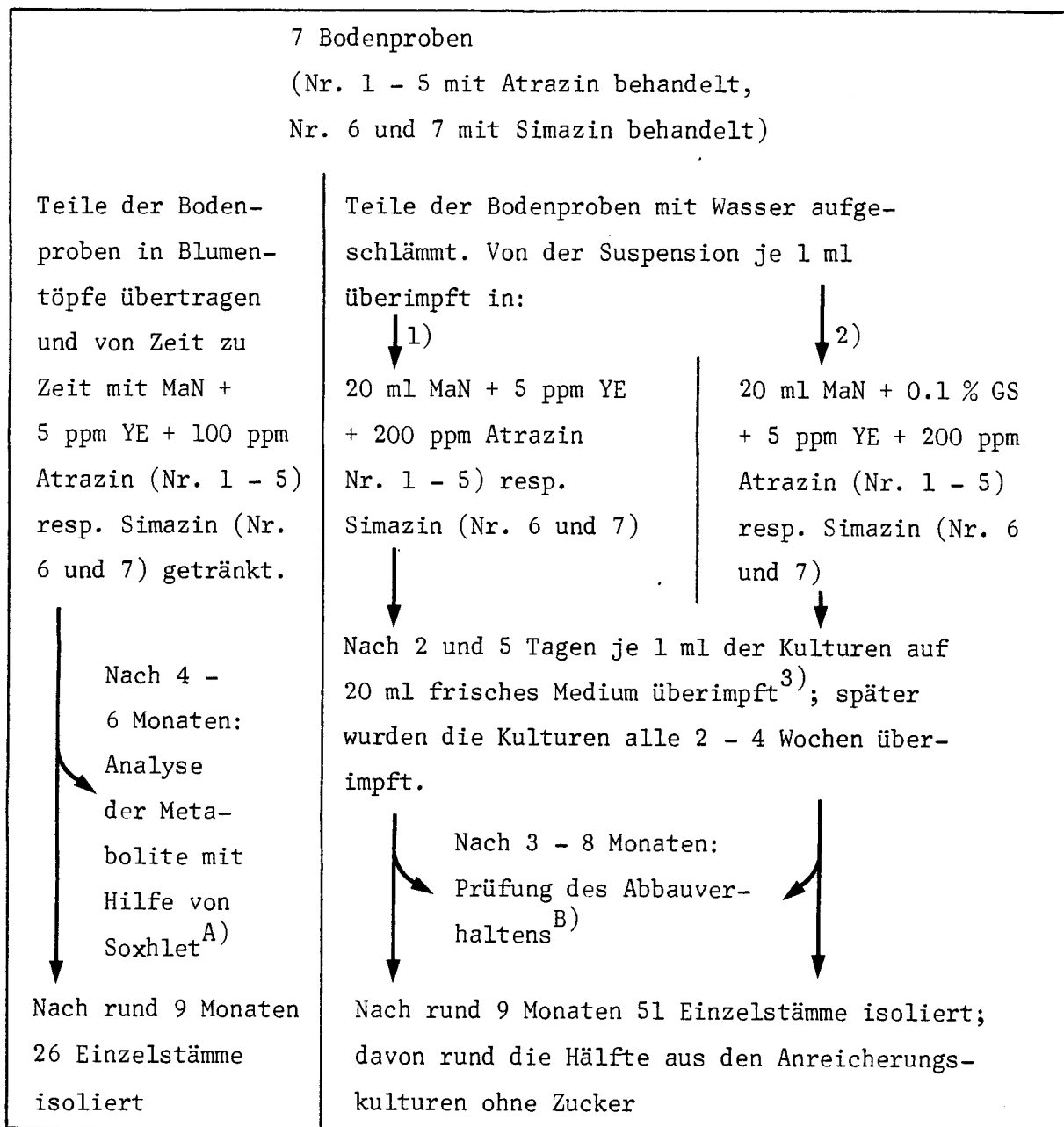
Die Triazin-Derivate OH-Atrazin, OH-Simazin und OH-Prometryn wurden auch bei einer Erhöhung der Zuckerkonzentration auf 2.0 % innerhalb von 4 Monaten nicht abgebaut.

Bei diesen Experimenten wurde auch versucht, die Metabolite auf der TLC-Platte nicht mit einem Autoradiographie-Film, sondern mit Hilfe eines  $^{14}\text{C}$ -Scanners nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass diese Methode sehr zeitraubend ist und die Daten schwieriger zu interpretieren sind als die Schwarzfärbungen auf einem Film. Auch die Auswertung der Filme mit Hilfe eines Densitometers erwies sich als ungeeignet, da selbst geringfügige Beschädigungen des Films die Daten stark beeinträchtigen. Beide Methoden wurden später nicht mehr verwendet.

### 3.1.2. Mikroorganismen aus Bodenproben

Von verschiedenen Versuchsfeldern der Ciba-Geigy AG, die jahrelang mit hohen Konzentrationen von Atrazin und Simazin behandelt worden waren, wurden insgesamt 7 Bodenproben entnommen. Diese Bodenproben und die daraus isolierten Mikroorganismen wurden im Laboratorium nochmals über mehrere Monate einem hohen Selektionsdruck durch Simazin und Atrazin ausgesetzt (zur Methode vergl. 40, 41). Das Abbauverhalten der Mikroorganismen in diesen Anreicherungskulturen gegenüber Triazin-Derivaten wurde von Zeit zu Zeit geprüft (Fig. 6).

Fig. 6: Anreicherung von Mikroorganismen aus Bodenproben



Bemerkungen:

- 1), 2) vergl. Bemerkungen 1) und 2) zu Fig. 5
- 3) Der Gehalt an Erdrückständen und allfälligen toxischen Verbindungen (u. a. Düngern) konnte dadurch relativ schnell herabgesetzt werden.

Abbauversuche und Ergebnisse:

A) Teile der Bodenproben wurden von Zeit zu Zeit mit Hilfe einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Die Extrakte wurden bezüglich Metabolite analysiert (mit TLC und Anfärben). In allen Proben konnten die entsprechenden hydroxylierten und dealkylierten Produkte von Atrazin resp. Simazin nachgewiesen werden. Die Soxhlet-Methode ist jedoch sehr arbeitsintensiv und somit für Reihenuntersuchungen wenig geeignet; sie wurde später nicht mehr verwendet. Zudem ist der Metabolismus im Boden von vielen, schwer kontrollierbaren Parametern abhängig (u. a. Feuchtigkeit, Gehalt an organischem Material, Adsorption)

B) Das Abbauverhalten der Mikroorganismen wurde mit denselben Methoden und Triazin-Derivaten geprüft, wie sie schon in Fig. 5 unter A), B) und C) erwähnt wurden. Zum Beimpfen der festen und flüssigen Medien wurden jeweils Gemische der zuckerlosen resp. der zuckerhaltigen Anreicherungskulturen verwendet.

Auch in diesen Experimenten konnten, wie schon bei den Versuchen mit Mikroorganismen aus Abwasserproben, folgende Abbauleistungen beobachtet werden:

- Abbau von Atrazin, Simazin, Ametryn und Prometryn zu den entsprechenden hydroxylierten und dealkylierten Produkten in flüssigen Medien mit 0.5 % GS
- Partieller Abbau von N-Aethylammelid zu N-Aethylammelid und von Ammelin zu Cyanursäure in flüssigen Medien mit 0.5 % GS
- Auflösung der feinkörnigen Suspension von Ammelin in festen Medien mit 0.1 % GS

### 3.1.3. Zusammenfassende Kommentare zu den ersten Abbauprobungen

---

In Medien mit Zucker konnte ein Abbau von Atrazin, Simazin, Ametryn, Prometryn, N-Aethylammelín und Ammelín nachgewiesen werden, während in zuckerfreien Medien nie ein Abbau beobachtet wurde. In den folgenden Experimenten wurde deshalb stets mit einem Zusatz von Zucker gearbeitet. Hohe Konzentrationen von Zucker beeinträchtigen jedoch die Qualität der Metaboliten-Trennung auf TLC-Platten. Eine Konzentration von 0.5% Zucker erwies sich bezüglich Organismen-Wachstum und Metaboliten-Trennung als optimal (Daten nicht aufgezeichnet).

Undefinierte Mischkulturen ergeben schwer reproduzierbare Abbauleistungen. In den folgenden Experimenten wurde deshalb stets mit Einzelstämmen gearbeitet (Mit Ausnahme von Kap. 3.4.2.).

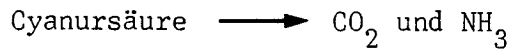
Abbauprobungen in Bodenproben oder festen Medien sind sehr arbeitsintensiv oder liefern ungenaue Resultate. Im Folgenden wurden deshalb stets flüssige Medien verwendet.

In Kulturen können unmarkierte Triazin-Derivate nur mit einem beträchtlichen apparativen Aufwand (u. a. UV-Scanner, Hochdruck-Flüssig-Chromatographie) quantitativ nachgewiesen werden. Deshalb wurde in den folgenden Abbauprobungen stets mit <sup>14</sup>C-ringmarkierten Triazin-derivaten gearbeitet, die qualitativ und quantitativ gut nachweisbar sind.

Um ein konzentriertes Vorgehen zu ermöglichen, beschränkten sich die Arbeiten im Folgenden auf den Abbau von N-Aethylammelín, N-Isopropylammelín, Ammelín und Cyanursäure (alles potentielle Metabolite von Atrazin). Der Abbau von Atrazin und OH-Atrazin wurde nur bei wenigen Stämmen geprüft. Der Abbau von Simazin, Prometryn und Ametryn wurde nicht mehr weiter untersucht.

Die Daten sind in den folgenden Darstellungen nicht mehr chronologisch (wie bisher), sondern nach Reaktionssequenzen geordnet.

3.2. Experimente im Bereich der Abbausequenz



3.2.1. Abbau von Cyanursäure durch verschiedene Stämme

Bei rund 150 der insgesamt 200 isolierten Stämme (vergl. Fig. 5 und 6) und bei den in Kap. 2.1.2. erwähnten Sammlungsstämmen wurde das Abbauverhalten gegenüber Cyanursäure bei Wachstum auf einem Minimalmedium geprüft (Tab. 2).

Tab. 2: Abbau von Cyanursäure durch verschiedene Stämme

Medium: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 0.2-0.5 ppm <sup>14</sup>C-Cyanursäure

Analytik: Bestimmung der im Medium verbliebenen Radioaktivität

Stamm	Inkubationszeit (Tg)	Abbau (%)
2.2, 2.20, 6.1, 6.15, 6.22, 8.1 1, 44, 118B, 123B	} 27	0
<u>Rhizopus stolonifer</u> Stamm M 2669		
<u>Rhizopus stolonifer</u> Stamm M 2670	} 41	0
<u>Rhizopus stolonifer</u> Stamm M 2679		
<u>Rhizopus stolonifer</u> Stamm M 2875		
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 429		
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 475	} 56	86
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 8809		
<u>Penicillium notatum</u> Stamm M 2544		
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Haider		
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Martin	56	53
<u>Hendersonula toruloidea</u> Stamm Martin	56	6
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm CBS 472.48	26	51
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm CBS 359.36	26	0
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	2	96

Von allen untersuchten Stämmen (in Tab. 2 nur ein Teil davon aufgezeichnet) zeigten nur 5 Stämme einen eindeutigen Cyanursäureabbau. Die Abbauleistungen von Stachybotrys chartarum und Hendersonula toruloidea entsprechen mehr oder weniger den Literaturwerten (10).



Bei allen in Tab. 2 erwähnten Stämmen wurde zusätzlich zum Cyanursäureabbau geprüft, ob möglicherweise Radioaktivität in die Zellmasse eingelagert wird. Dazu wurden die Stämme auf dem Medium MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 0.5 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure inkubiert. Nach 10 Tagen wurde eine Probe der Kultur zentrifugiert und das Sediment wurde (Nach dem Waschen mit einer 0.8 %igen NaCl-Lösung) im Scintillationszähler ausgezählt. Dabei zeigte nur Sporothrix schenkii Stamm 6.2 2-4 % der eingesetzten Radioaktivität im Sediment; bei allen andern Stämmen lagen die Werte unter 2 % (Daten nicht aufgezeichnet).

Um abzuklären, ob Barbitursäure den Cyanursäureabbau fördert (vergl. Fig. 4), wurden die Stämme 2.2, 2.20, 6.1, 6.15, 6.22, 8.1, 1, 44, 118B, 123B und die Rhizopus stolonifer Stämme M 2669, M 2670, M 2679 und M 2875 auf dem Medium Ma + 1.0 % GS + 5 ppm YE + 0.1 % Barbitursäure + 0.15 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure inkubiert. Dabei wurde innerhalb einer Inkubationszeit von 9 Tagen kein Cyanursäureabbau festgestellt (Daten nicht aufgezeichnet).

Der in Tab. 2 erwähnte Abbau von Cyanursäure durch Stachybotrys chartarum, Hendersonula toruloidea und Sporothrix schenkii wurde bei Wachstum auf drei verschiedenen Medien (Minimalmedium und Komplexmedium mit und ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) und bei zwei verschiedenen Cyanursäurekonzentrationen 0.25 und 40 ppm) weiter untersucht (Fig. 7). Hendersonula toruloidea Stamm Martin und Sporothrix schenkii Stamm CBS 359.36 zeigten nie einen signifikanten Abbau und wurden deshalb in Fig. 7 nicht aufgezeichnet. Die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin bauen auf den beiden Komplexmedien Cyanursäure wesentlich schneller ab als auf dem Minimalmedium. Der Abbau von Cyanursäure durch Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 wird durch  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gehemmt (vergl. Abbau auf den Medien II und III). Sporothrix schenkii Stamm 6.2 baut innerhalb eines Tages auf allen Medien Cyanursäure praktisch vollständig ab. Auf dem Minimalmedium scheint die Abbauleistung der Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und von Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 von der Cyanursäurekonzentration abhängig zu sein. Diese mögliche Konzentrations-Abhängigkeit wurde genauer untersucht, indem der Cyanursäureabbau der Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und der Sporothrix

Fig. 7: Abbau von Cyanursäure durch Stachybotrys chartarum und Sporothrix schenkii bei Wachstum auf Minimal- und Komplexmedien

Stämme: Stachybotrys chartarum:

○ Stamm Martin, ● Stamm Haider

Sporothrix schenkii:

□ Stamm CBS 472.48, ■ Stamm 6.2

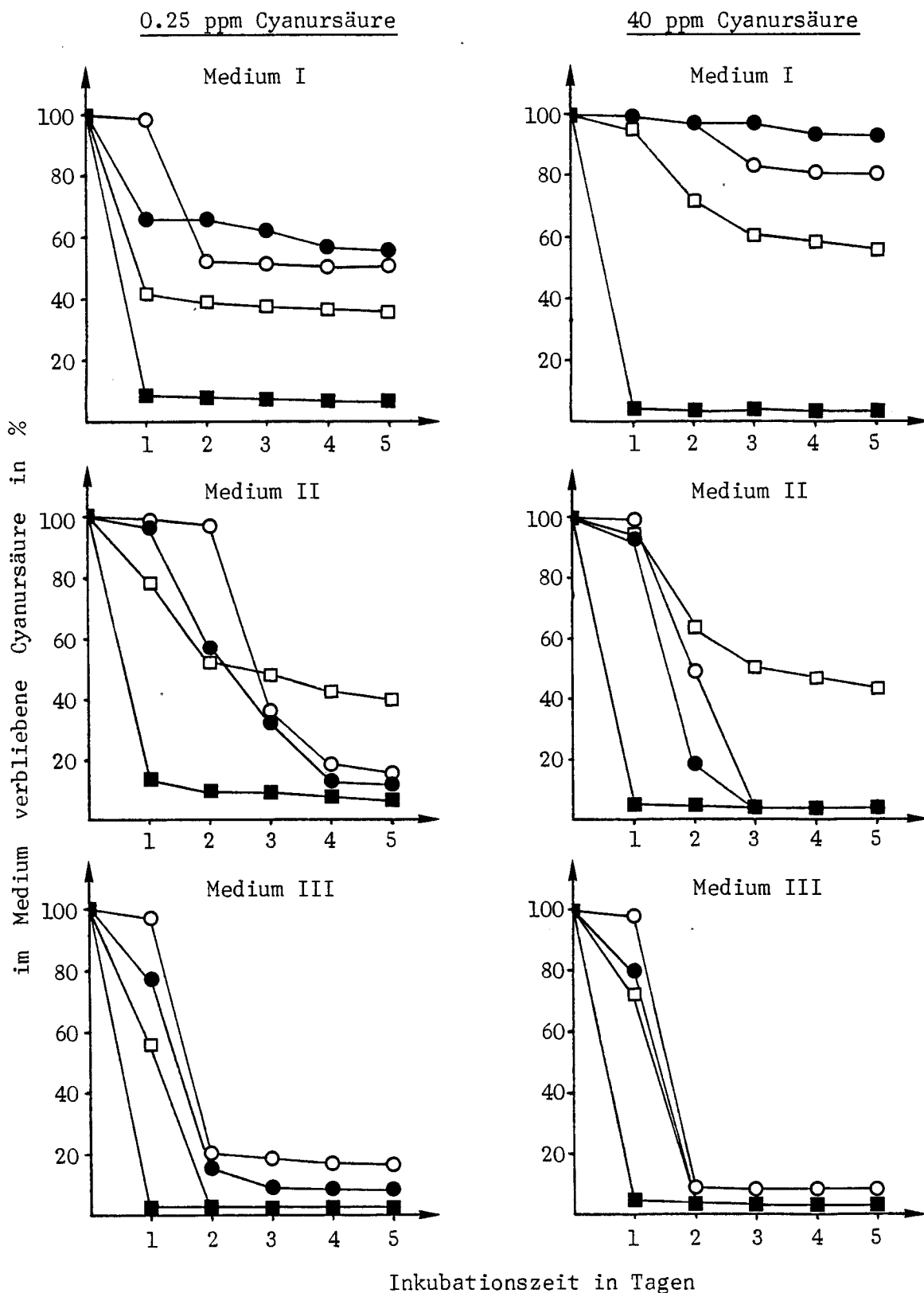
Medien: I: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE

II: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE

III: Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE

<sup>14</sup>C-Cyanursäure: 0.25 resp. 40 ppm

Analytik: Bestimmung der im Medium verbliebenen Radioaktivität



schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 bei Wachstum auf einem Minimalmedium mit 5 verschiedenen Konzentrationen (0.25, 1, 5, 20 und 100 ppm) von Cyanursäure geprüft wurde (Fig. 8). Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 zeigt im Bereich von 0.25-20 ppm Cyanursäure in vergleichbaren Zeitintervallen stets ungefähr denselben prozentualen Abbau. Beispielsweise werden innerhalb von 2 Tagen rund 40 % Cyanursäure abgebaut, das heisst 0.1 ppm (bei einer Konzentration von 0.25 ppm), 0.4 ppm (bei 1 ppm), 2 ppm (bei 5 ppm) und 8 ppm (bei 20 ppm). Bei einer Konzentration von 100 ppm Cyanursäure werden innerhalb von 2 Tagen rund 8 %, das heisst 8 ppm abgebaut. Daraus folgt, dass bei Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 die Abbauleistung mit zunehmender Cyanursäurekonzentration steigt und bei einer Konzentration von >20 ppm ein Plateau erreicht. Bei den Stachybotrys chartarum Stämmen Haider und Martin ist die Streuung der Werte sehr gross und eine zuverlässige Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit der Abbauleistung kann deshalb nicht gemacht werden. Auf dem verwendeten Minimalmedium wuchsen die beiden Stämme stets schlecht und unregelmässig, was vermutlich der Grund für die Streuung der Werte ist.

Ueber die Konzentrationsabhängigkeit der Abbauleistung bei Sporothrix schenkii Stamm 6.2 kann nichts ausgesagt werden, da die Cyanursäure innerhalb eines Tages stets praktisch vollständig abgebaut wird.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 und die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin den beim Abbau von Cyanursäure freiwerdenden Stickstoff (vermutlich  $\text{NH}_3$ ) als N-Quelle zum Wachstum verwerten können. Zum Vergleich wurde auch das Wachstum auf  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als N-Quelle geprüft (Tab. 3). Die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin wachsen auf Cyanursäure deutlich besser als auf  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Sporothrix schenkii CBS 472.48 hingegen wächst auf  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  besser als auf Cyanursäure. Nur Sporothrix schenkii Stamm 6.2 kann sowohl Cyanursäure als auch  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gut als N-Quelle verwerten. Dieselben Wachstumsexperimente wurden auch in Gegenwart von 25, 50 resp. 100 ppm YE durchgeführt. Dabei konnte nie ein signifikanter Einfluss auf die in Tab. 3 dargestellten Trockengewichte beobachtet werden (Daten nicht aufgezeichnet). Die 4 Stämme sind somit nicht auf die Zugabe von Aminosäuren und/oder Vitaminen (im YE enthalten!) angewiesen.

Fig. 8: Abbau von Cyanursäure durch Stachybotrys chartarum und Sporothrix schenkkii bei Wachstum auf einem Minimalmedium bei verschiedenen Konzentrationen von Cyanursäure

Medium: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE

Zusätze von  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure: 0.25, 1, 5, 20 resp. 100 ppm

Analytik: Bestimmung der im Medium verbliebenen Radioaktivität

Stämme: Stachybotrys chartarum:

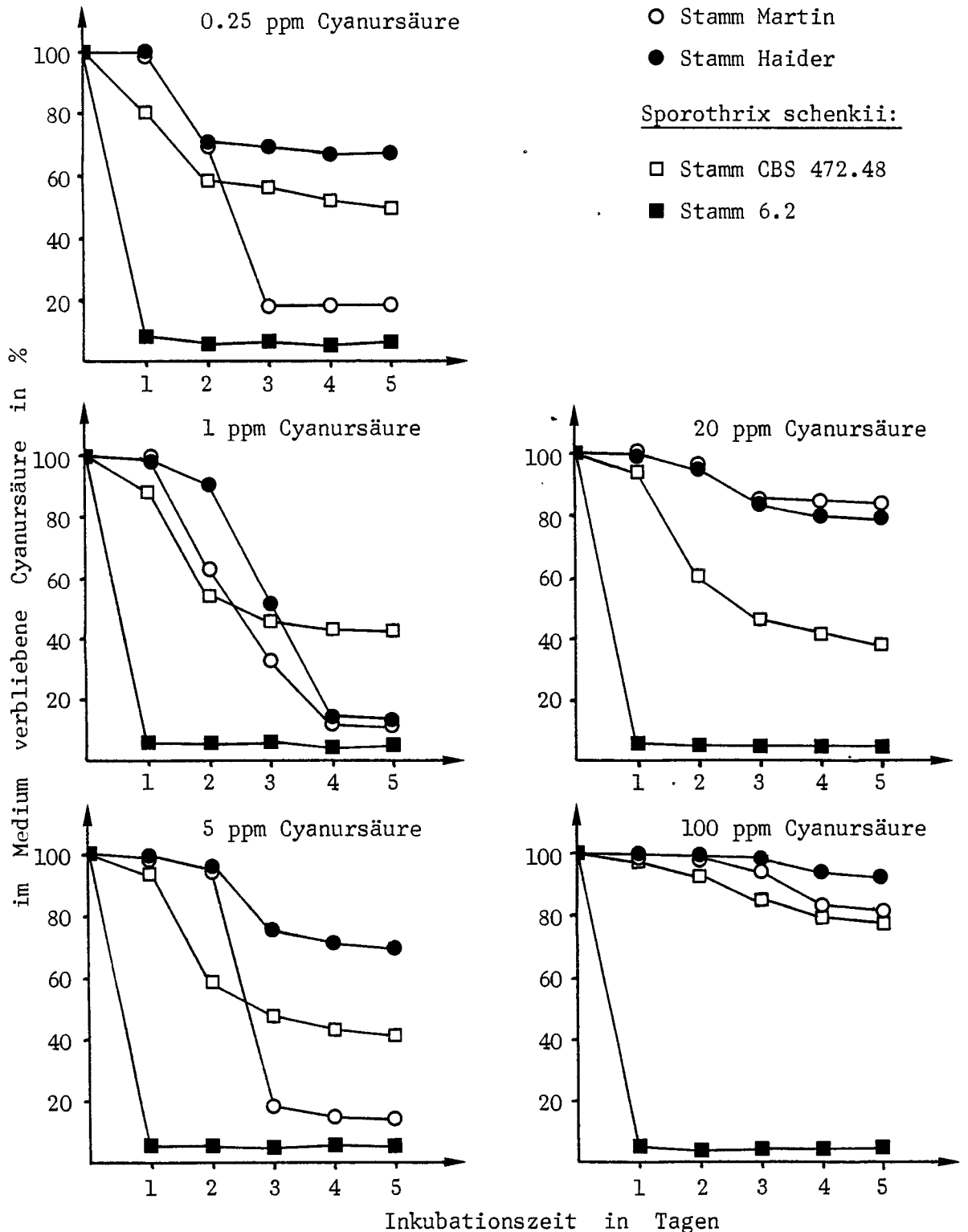
○ Stamm Martin

● Stamm Haider

Sporothrix schenkkii:

□ Stamm CBS 472.48

■ Stamm 6.2



Tab. 3: Wachstum der Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 und der Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin auf Cyanursäure resp.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als N-Quelle

Trockengewicht (mg/ml) nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen

Stamm \ Medium	Ma + 1.0 % GS + 1000 ppm $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (= 350 ppm N)	Ma + 1.0 % GS + 1000 ppm Cyanursäure (= 326 ppm N)
<u>Sporothrix schenkii:</u>		
Stamm CBS 472.48	3.59	0.51
Stamm 6.2	2.93	3.03
<u>Stachybotrys chartarum:</u>		
Stamm Haider	0.76	2.34
Stamm Martin	0.79	2.37

### 3.2.2. Wachstumseigenschaften von Sporothrix schenkii Stamm 6.2

Wie in Kap. 3.2.1. gezeigt werden konnte, baut Sporothrix schenkii Stamm 6.2 von allen geprüften Stämmen Cyanursäure am schnellsten ab. Um diesen Abbau genauer untersuchen zu können, wurden vorerst einige Wachstumseigenschaften von S. schenkii Stamm 6.2 abgeklärt. Da der Stamm bis zu einer  $\text{OD}_{546}$  von 3 - 4 in Form einer Suspension von Einzelzellen mit kurzen Mycelfragmenten wächst, konnte das Wachstum mit Hilfe der  $\text{OD}_{546}$  bestimmt werden. In höheren  $\text{OD}_{546}$ -Bereichen wächst der Stamm auf Minimalmedien zunehmend flockiger und die  $\text{OD}_{546}$ -Werte werden unzuverlässig. Bei Wachstum auf Komplexmedien hingegen konnte nie eine Flockenbildung beobachtet werden. Wie schon gezeigt wurde (Tab. 3), war der Stamm nicht auf die Zugabe von Aminosäuren und Vitaminen angewiesen.

Das Temperaturoptimum liegt im Bereich von 28 - 32°C. Bei 21 und 37°C liegt das  $\mu_{\text{max}}$  rund 45 resp. 35 % unter dem maximalen Wert von 0.24 (Daten nicht aufgezeichnet).

Das Wachstum wurde auf den Medien MaN + Glukose resp. Saccharose (0, 0.25, 0.5, 0.75 resp. 1.0 %) bestimmt. Auf beiden C-Quellen betrug das  $\mu_{\max}$  rund 0.22 - 0.24. Mit einer Konzentrationserhöhung der C-Quelle von 0.5 auf 0.75 % konnte die  $OD_{\max}$  (rund 4 - 5) bei beiden C-Quellen nicht mehr gesteigert werden (Daten nicht aufgezeichnet). Bei Minimalmedien wurde in der Folge meistens mit einem Zusatz von 0.5 % Glukose gearbeitet.

Das Wachstum auf verschiedenen N-Quellen ist in Tab. 4 dargestellt. Das  $\mu_{\max}$  wurde von der Konzentration der N-Quelle nicht wesentlich beeinflusst, sodass in Tab. 4 jeweils nur ein Mittelwert angegeben wurde. Die  $OD_{\max}$  lag bei beiden Konzentrationen der N-Quellen im Bereich von 3.5 - 5.7 (bei Cytosin, Uracil und Barbitursäure nur 0.2 - 0.6) und auch die tiefere Konzentration (0.05 %) der N-Quelle war nicht wachstumslimitierend (Daten nicht aufgezeichnet). Erwähnenswert ist die Tatsache, dass S. schenkii Stamm 6.2 auf Cyanursäure sehr gut (vergl. Tab. 3), auf Cytosin, Uracil und Barbitursäure jedoch schlecht oder praktisch nicht wächst. Die in der Einleitung erwähnte Hypothese (vergl. Fig. 4), wonach Cyanursäure über den Pyrimidin-Katabolismus abgebaut wird, wird durch diesen Befund nicht gestützt.

Das Wachstum wurde auch auf den beiden Komplexmedien MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE und Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE geprüft. Auf beiden Medien ergab sich ein  $\mu_{\max}$  von 0.28 und eine  $OD_{\max}$  von rund 20.0. Zur Bestimmung des Trockengewichtes in Abhängigkeit von der  $OD_{546}$  wurde S. schenkii Stamm 6.2 auf einigen der in Tab. 4 erwähnten Medien (u. a.  $NH_4NO_3$ , Cyanursäure und Adenin als N-Quellen) inkubiert. Im Bereich einer  $OD_{546}$  von 0.7 - 1.3 wurde das Trockengewicht der Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Trockengewicht (mg/ml) in diesem Bereich parallel zur  $OD_{546}$  zunimmt und stets (unabhängig von der N-Quelle!) 0.37 mg/ml Kultur bei  $OD_{546} = 1.0$  beträgt (Daten nicht aufgezeichnet). Zur Berechnung der spezifischen Abbauleistung von S. schenkii Stamm 6.2 wurde in der Folge stets dieser Wert verwendet.

Tab. 4: Wachstum von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 auf verschiedenen N-Quellen

Medium: Ma + 0.5 % Glukose + N-Quelle (0.05 resp. 0.1 %)

N-Quelle (0.05 und 0.1 %)	$\mu_{\max}$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.24
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.23
$\text{NaNO}_3$	0.19
Cyanursäure	0.22
Adenin	0.16
Guanidin	0.21
Biuret	0.21
Harnstoff	0.23
N-Aethylharnstoff	0.18
Cytosin	~0.03
Uracil	~0.02
Barbitursäure	0.14

3.2.3. Spezifische Abbauleistung gegenüber Cyanursäure von wachsenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2

Der Verlauf der spezifischen Abbauleistung von wachsenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 wurde auf einem Medium bestimmt, das als hauptsächlichste N-Quelle (neben 10 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  enthielt. Zum Beimpfen dieses Mediums wurden 3 verschiedene Vorkulturen verwendet ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + Cyanursäure resp. Cyanursäure allein als N-Quelle) (Fig. 9). Neben der Bildung von  $^{14}\text{CO}_2$ , das jeweils über ein Inkubationsintervall von einer Stunde bestimmt wurde, wurde auch die  $\text{OD}_{546}$  und die Konzentration der Cyanursäure (durch Auszählen einer Probe im Scintillationszähler, Daten nicht aufgezeichnet) im Inkubationsgefäß stündlich gemessen. Obwohl die spezifische Abbauleistung zu Beginn des Wachstums je nach der Vorkultur verschieden ist, beträgt die maximal erreichte spezifische Abbauleistung in allen 3 Experimenten stets rund

Fig. 9: Spezifische Abbauleistung von wachsenden Zellen von *Sporothrix schenckii* Stamm 6.2 auf Medien mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als N-Quelle

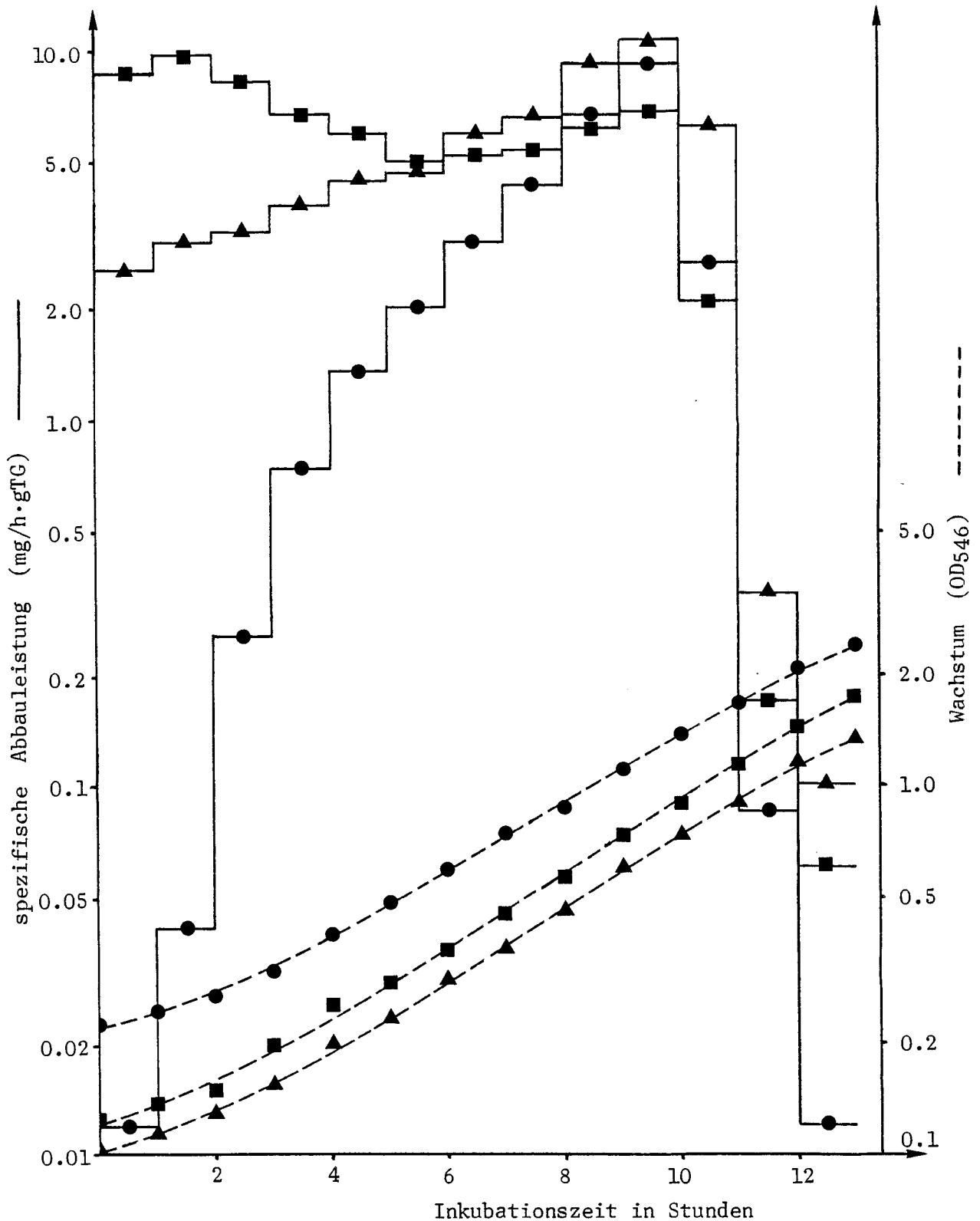
Medium: ●, ▲, ■ MaN + 0.5 % Glukose + 10 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure

Medium der Vorkultur: ● MaN + 0.5 % Glukose

▲ MaN + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure

■ Ma + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure

Analytik: Bestimmung von  $^{14}\text{CO}_2$  mit Radiorespirometrie





10 mg/h·gTG. Die spezifische Abbauleistung zu Beginn des Wachstums steigt mit zunehmendem Cyanursäure-Anteil am Gesamtstickstoff der Vorkultur. Der Abfall der spezifischen Abbauleistung nach 10 - 12 Stunden ist nicht auf einen Aktivitätsverlust der Zellen, sondern auf die Erschöpfung der Cyanursäure im Medium zurückzuführen.

In einem weiteren Experiment wurde der Verlauf der spezifischen Abbauleistung auf einem Medium bestimmt, das neben 0.06 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nicht 10 (wie in Fig. 9), sondern 200 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure enthielt. Die Zellen wurden auf dem Medium MaN + 0.5 % Glukose vorgezuchtet. Dabei zeigte sich, dass die spezifische Abbauleistung wie in Fig. 9 kontinuierlich zunimmt und bei einem Wert von 15 mg/h·gTG ein Plateau erreicht (Daten nicht aufgezeichnet). Die Vermutung, dass die spezifische Abbauleistung mit zunehmendem Cyanursäure-Anteil am Gesamtstickstoff steigt, wird durch diesen Befund gestützt.

Bisher wurde nur der Einfluss verschiedener Konzentrationen von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  auf die spezifische Abbauleistung untersucht. In den folgenden Experimenten wird der Einfluss verschiedener N-Quellen auf die spezifische Abbauleistung von Sporothrix schenckii Stamm 6.2 bestimmt (Fig. 10). Als N-Quellen wurden Biuret, Harnstoff, N-Aethylharnstoff, Adenin, Guanidin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{NaNO}_3$  in einer Konzentration von 500 ppm verwendet. Um die spezifische Abbauleistung über eine längere Inkubationszeit bestimmen zu können und um die Werte nicht durch eine rasche Erschöpfung der Cyanursäure zu verfälschen, wurde den Medien neben den genannten N-Quellen 500 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure zugegeben. Zum Vergleich wurde die spezifische Abbauleistung auch auf einem Medium bestimmt, das nur 1000 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure als N-Quelle enthielt. Für alle diese Experimente wurde Stamm 6.2 jeweils auf einem Medium vorgezuchtet, das dieselbe Zusammensetzung aufwies wie das Testmedium selbst. Die spezifische Abbauleistung wurde stets über eine Inkubationszeit von 22 Stunden verfolgt. In Fig. 10 ist jedoch nur ein Bereich über 15 Stunden aufgezeichnet, der die maximalen Werte der spezifischen Abbauleistung enthält.

Fig. 10: Spezifische Abbauleistung von wachsenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 auf Medien mit verschiedenen N-Quellen

Medium: Ma + 0.5 % Glukose + 500 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure + 500 ppm N-Quelle  
Analytik: Bestimmung von  $^{14}\text{CO}_2$  mit Radiorespirometrie

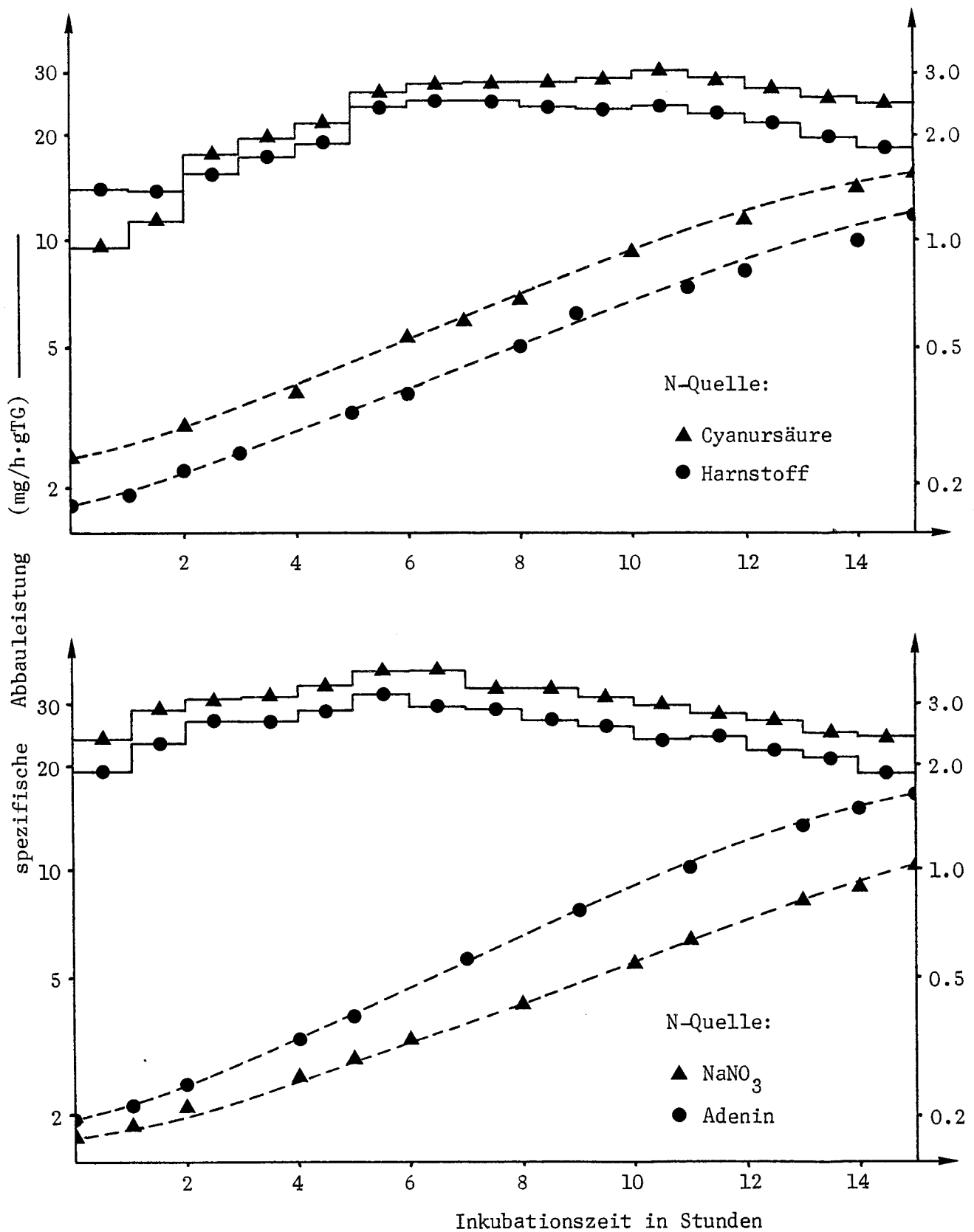
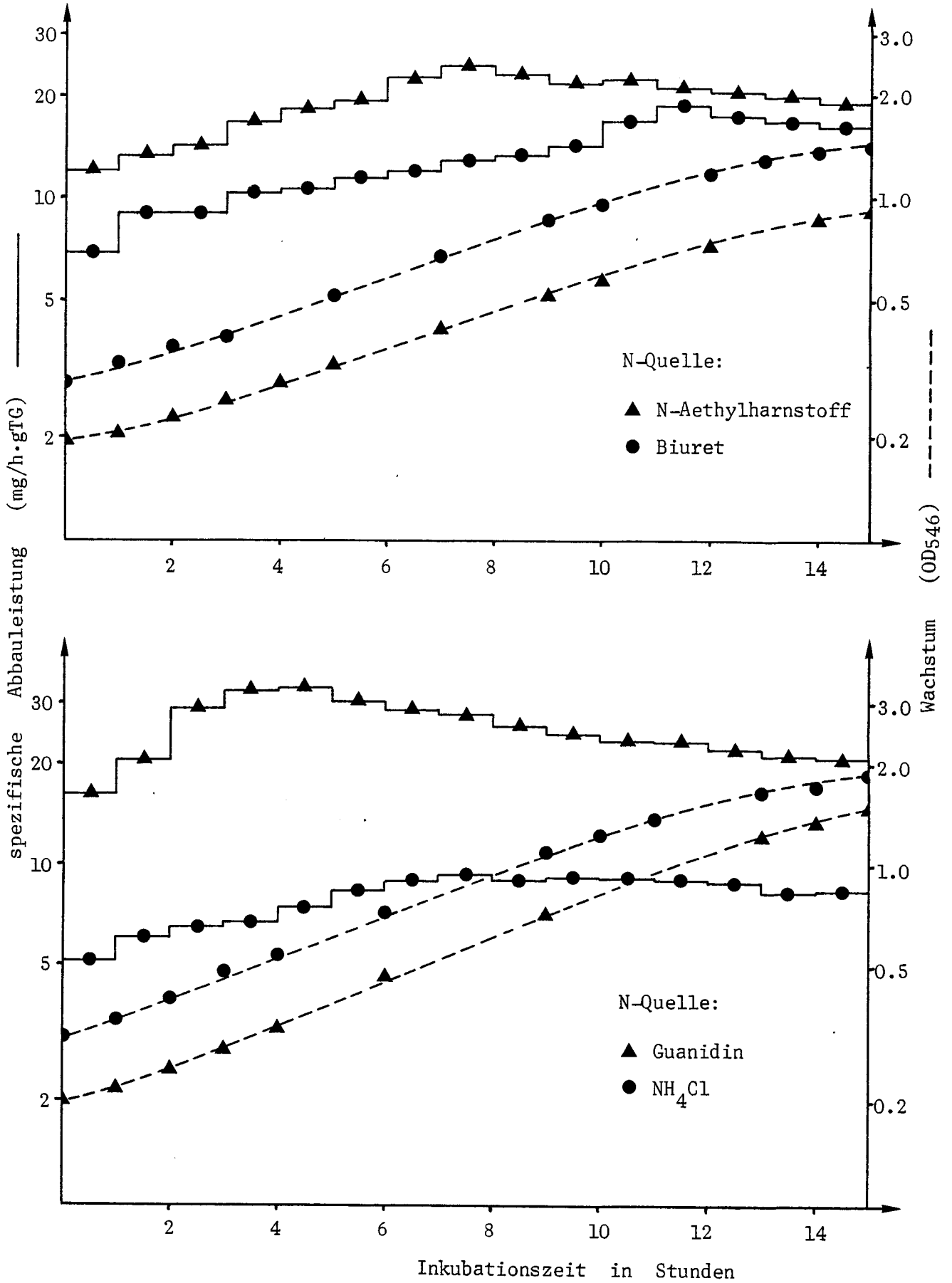


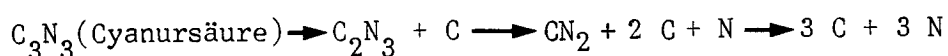
Fig. 10: (Fortsetzung)



Im Medium mit Cyanursäure als einziger N-Quelle erreicht die spezifische Abbauleistung einen Wert von 30 mg/h·gTG. In Medien, die neben Cyanursäure noch andere N-Quellen enthalten, wurden Werte von 25 mg/h·gTG (bei Harnstoff und N-Aethylharnstoff), 30 mg/h·gTG (bei Adenin), 33 mg/h·gTG (bei Guanidin) und 37 mg/h·gTG (bei NaNO<sub>3</sub>) erreicht. Diese Streuung dürfte vermutlich noch innerhalb des experimentellen Fehlerbereiches liegen. Deutlich wird aber die spezifische Abbauleistung durch Biuret (18 mg/h·gTG, das heisst rund 40 % Hemmung) und durch NH<sub>4</sub>Cl (9 mg/h·gTG, das heisst rund 70 % Hemmung) gehemmt. Die in Fig. 9 beobachtete Hemmung der spezifischen Abbauleistung durch NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ist somit auf Ammoniumionen zurückzuführen. Die maximale spezifische Abbauleistung liegt bei Biuret, NH<sub>4</sub>Cl und Cyanursäure im Bereich einer OD<sub>546</sub> von 0.8 - 1.2, bei allen andern N-Quellen im Bereich einer OD<sub>546</sub> von 0.3 - 0.5.

Berechnet man bei den in Fig. 10 aufgezeichneten Wachstumskurven die  $\mu_{\max}$ , so ergeben sich Werte von 0.11 - 0.17. Die in Tab. 4 dargestellten Werte liegen wesentlich höher. Bei den in Fig. 10 dargestellten Experimenten wurde jeweils mit 20 - 35 ml Kultur in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben gearbeitet, was möglicherweise eine mangelhafte Belüftung und damit eine Sauerstofflimitierung zur Folge hatte. In einem Kontrollexperiment wurde das Wachstum von S. schenkii Stamm 6.2 auf denselben Medien wie in Fig. 10 bei guter Belüftung untersucht. Die  $\mu_{\max}$ -Werte lagen dabei zwischen 0.21 und 0.25, was mit den Werten in Tab. 4 übereinstimmt. Der Einfluss der Belüftung auf den Verlauf der spezifischen Abbauleistung wurde jedoch nicht untersucht.

Wird der Cyanursäureabbau auf Grund der CO<sub>2</sub>-Bildung mit Hilfe der Radiorespirometrie untersucht, so kann eine kurzfristige Akkumulation von Zwischenprodukten (C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>- und CN<sub>2</sub>-Verbindungen, vergl. Fig. 4) nicht erfasst werden, da in jedem Falle CO<sub>2</sub> gebildet wird. Das Verhältnis von freigesetztem CO<sub>2</sub> zu freigesetztem NH<sub>3</sub> ist jedoch bei jeder Zwischenproduktbildung unterschiedlich, wie die folgende Reaktionsgleichung zeigt:



Beim Wachstum von S.schenkii Stamm 6.2. auf 1000 ppm Cyanursäure als einziger N-Quelle (in Fig. 10 ein Teilbereich aufgezeichnet), wurde insgesamt 0.79 mg/ml Trockensubstanz gebildet (auf Grund der Differenz der  $OD_{546}$  berechnet). Dabei wurde insgesamt 17.0 % der Radioaktivität freigesetzt (als  $CO_2$  aufgefangen). Da 1000 ppm Cyanursäure einer Menge von 23.25  $\mu M$  C/ml entsprechen, wurden somit rund 4.0  $\mu M$  C/ml in Form von  $CO_2$  freigesetzt. Die Bildung einer  $C_2N_3$ -Verbindung ist unwahrscheinlich, weil dabei kein Stickstoff zur Bildung der Zellmasse freigesetzt wird. Bei der Bildung einer  $CN_2$ -Verbindung würden 2.0  $\mu M$  N/ml freigesetzt. Die gebildete Zellmasse von 0.79 mg/ml würde dabei einen Stickstoffgehalt von 3,5 % aufweisen. Bei einem Totalabbau von Cyanursäure zu  $CO_2$  und  $NH_3$  würden 4.0  $\mu M$  N/ml freigesetzt. Dies würde für die Zellmasse einen Stickstoffgehalt von 7.0 % ergeben.

Der Gesamtstickstoff von Zellen, die auf dem Medium Ma + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure bis zu einer  $OD_{546}$  von 1.5 inkubiert wurden, wurde mit der Methode von Kjeldahl (45) bestimmt. Dabei ergab sich ein Stickstoffgehalt von 7.1 %. Es darf somit angenommen werden, dass S. schenkii Stamm 6.2 Cyanursäure vollständig abbaut und keine Zwischenprodukte akkumuliert werden.

#### 3.2. 4. Spezifische Abbauleistung gegenüber Cyanursäure von ruhenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2

---

Sporothrix schenkii Stamm 6.2 wurde auf verschiedenen N-Quellen inkubiert. Bei einer  $OD_{546}$  von rund 1.0 wurden die Zellen geerntet, mit Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert ( $OD_{546} = 1.0$ ). Die spezifische Abbauleistung von diesen suspendierten Zellen wurde bei einer  $^{14}C$ -Cyanursäurekonzentration von 50 ppm bestimmt (Tab. 5). Die  $CO_2$ -Bildung wurde jeweils über eine Inkubationszeit von 6 Stunden (mit Messintervallen von 1 Stunde) verfolgt.

Tab. 5: Spezifische Abbauleistung von ruhenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2, die auf verschiedenen N-Quellen vorgezüchtet wurden

Analytik: Bestimmung von  $^{14}\text{CO}_2$  mit Radiorespirometrie

Medium, auf dem die Zellen vorgezüchtet wurden (bis $\text{OD}_{546}$ von rund 1.0)	Puffer zum Waschen und Suspendieren der Zellen	SA (mg/h·gTG) (50 ppm $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure)
Ma + 0.5 % Glukose + 0.1 % Cyanursäure		18.4
Ma + 0.5 % Glukose + 0.1 % Biuret	Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0)	5.1
Ma + 0.5 % Glukose + 0.1 % Harnstoff		< 0.1
Ma + 0.5 % Glukose + 0.1 % N-Aethylharnstoff		1.8
Ma + 0.5 % Glukose + 0.1 % Adenin		3.6
MaN + 0.5 % Glukose (= 0.06% $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )		< 0.1
MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE		< 0.1
Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE		< 0.1

Zellen, die auf Cyanursäure als einziger N-Quelle vorgezüchtet wurden, zeigen eine spezifische Abbauleistung von 18.4 mg/h·gTG. Bei Vorzucht auf Biuret, Adenin und N-Aethylharnstoff beträgt die spezifische Abbauleistung nur 1.8 - 5.1 mg/h·gTG. Bei Vorzucht auf Harnstoff,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und Komplexmedien kann keine Aktivität beobachtet werden.

Die in Tab. 5 aufgezeichneten Werte sind Mittelwerte der ersten beiden Stunden der Inkubation. Bei den Zellen, die auf Biuret, Harnstoff, N-Aethylharnstoff sowie auf MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE vorgezüchtet wurden, konnte nach 3 - 6 Stunden eine spezifische Abbauleistung gemessen werden, die rund 1.5 mg/h·gTG höher liegt als der in Tab. 5 angegebene Wert. Die Zellen, die auf Cyanursäure als einziger N-Quelle vorgezüchtet wurden, zeigten über die ersten 2 Stunden hinweg eine konstante spezifische Abbauleistung, die jedoch dann rasch abfiel und nach 6 Stunden nur noch rund 40 % des Anfangswertes betrug.

Bei Kulturen, die auf Cyanursäure als einziger N-Quelle vorgezüchtet wurden, wurde nach dem Ernten der Zellen durch Zentrifugation auch die Aktivität des Ueberstandes geprüft. Dabei konnte nie eine Abbauproduktaktivität beobachtet werden (Daten nicht aufgezeichnet). Die Cyanursäure abbauenden Enzyme sind somit intrazellulär oder zellgebunden, sicher aber nicht extrazellulär lokalisiert.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss verschiedener Verbindungen auf die spezifische Abbauleistung von ruhenden Zellen von S. schenkii Stamm 6.2 untersucht, die auf Cyanursäure als einziger N-Quelle vorgezüchtet wurden. Wie schon in den vorangehenden Experimenten wurden die Zellen wiederum bis zu einer  $OD_{546}$  von rund 1.0 inkubiert, anschliessend geerntet, mit Puffer (mit oder ohne Zusatz) gewaschen und in demselben Puffer (mit oder ohne Zusatz) suspendiert ( $OD_{546} = 1.0$ ). Die spezifische Abbauleistung wurde über eine Inkubationszeit von 6 Stunden (mit Messintervallen von einer Stunde) bei einer  $^{14}C$ -Cyanursäurekonzentration von 50 ppm bestimmt. In Tab. 6 sind die Mittelwerte der ersten beiden Stunden der Inkubation aufgezeichnet. In Tris-Puffer lag die spezifische Abbauleistung deutlich tiefer als in Phosphatpuffer. Deshalb wurde in der Folge stets Phosphat-Puffer verwendet, dessen Molarität und pH jedoch nicht optimalisiert wurde. In Phosphatpuffer ohne Zusatz erreicht die spezifische Abbauleistung einen Wert von 18.4 mg/h·gTG. Bei Zusätzen von Harnstoff, Guanidin oder Adenin liegen die Werte in einem Bereich von 15.5 - 21.2 mg/h·gTG, was innerhalb der experimentellen Fehlergrenze liegen dürfte. Gehemmt wird die spezifische Abbauleistung durch Zusätze von  $NH_4Cl$  (25 % Hemmung),  $NaNO_3$  (31 %), Biuret (33 %) und  $NH_4NO_3$  (38 %).  $NH_4Cl$ , Biuret und  $NH_4NO_3$  hemmten auch die spezifische Abbauleistung von wachsenden Zellen, während hingegen  $NaNO_3$  die Aktivität von wachsenden Zellen eher förderte (vergl. Fig. 9 und 10).

Falls Biuret und vielleicht auch Harnstoff den Abbau von Cyanursäure auf der Stufe einer Hydrolase hemmen (vergl. Fig. 4), wäre möglicherweise eine Akkumulation des vorangehenden Eduktes zu beobachten. Eine TLC-Analyse von Proben, die den Inkubationsgemischen (ruhende Zellen in Phosphatpuffer + Biuret resp. Harnstoff) nach 2, 4 und 6 Stunden

Tab. 6: Spezifische Abbauleistung von ruhenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 in Puffern mit verschiedenen Zusätzen

Analytik: Bestimmung von  $^{14}\text{CO}_2$  mit Radiorespirometrie

Medium, auf dem die Zellen vorgezüchtet wurden (bis $\text{OD}_{546}$ von rund 1.0)	Puffer (mit und ohne Zusatz) zum Waschen und Suspendieren der Zellen Puffer: 0.05M, pH 7.0 Zusatz: 7.5 mM	SA (mg/h·gTG) 50 ppm $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure)	Hemmung in % gegenüber SA in $\text{PO}_4$ ohne Zusatz
Ma + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure	$\text{PO}_4$ <sup>1)</sup> (ohne Zusatz)	18.4	
	Tris <sup>2)</sup> (ohne Zusatz)	13.4	27
	$\text{PO}_4$ + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	11.4	38
	$\text{PO}_4$ + $\text{NH}_4\text{Cl}$	13.8	25
	$\text{PO}_4$ + $\text{NaNO}_3$	12.7	31
	$\text{PO}_4$ + Biuret	12.3	33
	$\text{PO}_4$ + Harnstoff	15.5	16
	$\text{PO}_4$ + Guanidin	17.9	3
	$\text{PO}_4$ + Adenin	21.2	-

1)  $\text{PO}_4$ : Phosphatpuffer

2) Tris: Tris-Puffer (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)

entnommen wurden, zeigte jedoch weder bei Biuret noch bei Harnstoff irgendwelche Metabolite, die einen andern Rf-Wert aufwiesen als Cyanursäure selbst (bei den Flussmitteln Nr. 1 und 2, Daten nicht aufgezeichnet).

Bisher wurde die spezifische Abbauleistung von ruhenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 stets bei einer Cyanursäurekonzentration von 50 ppm bestimmt. In den folgenden Experimenten wurde nun die Aktivität der Zellen in Abhängigkeit von der Cyanursäurekonzentration geprüft. Dazu wurde S. schenkii Stamm 6.2 auf dem Medium Ma + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure inkubiert, bei einer  $\text{OD}_{546}$  von rund 1.0



geerntet, mit Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert ( $OD_{546} = 1.0$ ). Die Suspension wurde in mehrere Fraktionen aufgeteilt, die mit verschiedenen Konzentrationen von  $^{14}C$ -Cyanursäure (0.23 - 50.23 ppm) versetzt wurden. Die Abnahme der Radioaktivität in den verschiedenen Suspensionen wurde verfolgt und in Fig. 11 dargestellt. Bei allen Konzentrationen ergibt die logarithmische Darstellung der Radioaktivitäts-Abnahme nahezu eine Gerade. Der Abbau verläuft somit annähernd nach einer Reaktionskinetik 1. Ordnung. Aus den in Fig. 11 dargestellten Abbaukurven wurden unter Berücksichtigung der Cyanursäurekonzentrationen und des Trockengewichtes der Zellsuspensionen die spezifischen Abbauleistungen berechnet und in Fig. 12 als Funktion der Cyanursäurekonzentration dargestellt. Die spezifische Abbauleistung von S. schenkii Stamm 6.2 steigt mit zunehmender Cyanursäurekonzentration und erreicht bei rund 5 ppm Cyanursäure eine Plateau (spezifische Abbauleistung von rund 25 mg/h · gTG). Bei Konzentrationen von mehr als 20 ppm Cyanursäure nimmt die spezifische Abbauleistung wiederum ab, was möglicherweise durch eine Substrat- oder Produkthemmung bedingt ist. Der scheinbare Km-Wert (Km: Michaelis-Konstante) liegt im Bereich von 1 - 3 ppm Cyanursäure, was einer Konzentration von 8 - 23  $\mu M$  entspricht. Eine weitere Auswertung der Daten ist jedoch nicht sinnvoll, da ein sehr komplexes System vorliegt und viele Bedingungen für eine genaue Enzymkinetik nicht erfüllt sind. Beispielsweise wurde nicht die Aktivität eines Enzyms, sondern die Summe der Aktivitäten mehrerer Enzyme (u. a. Permeasen, Hydrolasen) bestimmt. Die Annahme einer Reaktionskinetik 1. Ordnung ist somit nur bedingt richtig. Im weiteren sollte zur Bestimmung einer Enzymaktivität die Konzentration des Substrates innerhalb der Messperiode nur wenig abnehmen (<10 %); eine Bedingung, die insbesondere bei kleinen Cyanursäurekonzentrationen nicht erfüllt ist.

Die Daten zeigen jedoch, dass eine Konzentration von 50 ppm Cyanursäure zur Bestimmung der spezifischen Abbauleistung (vergl. Tab. 5 und 6) günstig ist. Einerseits liegt bei dieser Konzentration die maximale spezifische Abbauleistung (18.4 mg/h · gTG) nur rund 25 % unterhalb des optimalen Wertes (25 mg/h · gTG). Andererseits nimmt

Fig. 11: Cyanursäureabbau durch ruhende Zellen von Sporothrix schenckii Stamm 6.2 bei verschiedenen Konzentrationen von Cyanursäure

Zellen von S. schenckii Stamm 6.2 auf Ma + 0.5 % Glukose + 1000 ppm Cyanursäure vorgezchtet  
Zellen in Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0) suspendiert ( $OD_{546} = 1.0$ )  
Zugabe von  $^{14}C$ -Cyanursäure (0.23 - 50.23 ppm)  
Analytik: Bestimmung der in der Suspension verbliebenen Radioaktivität

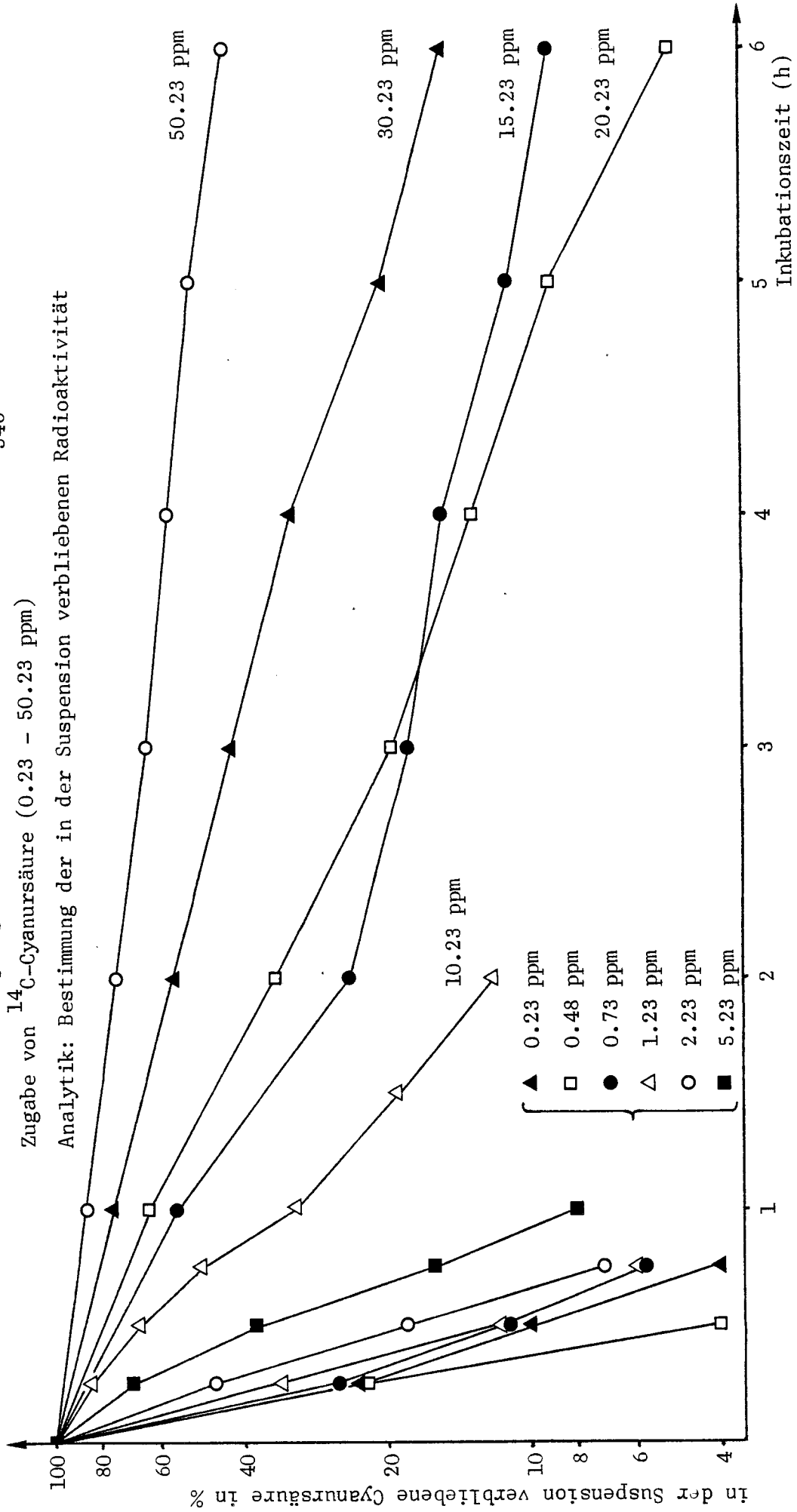
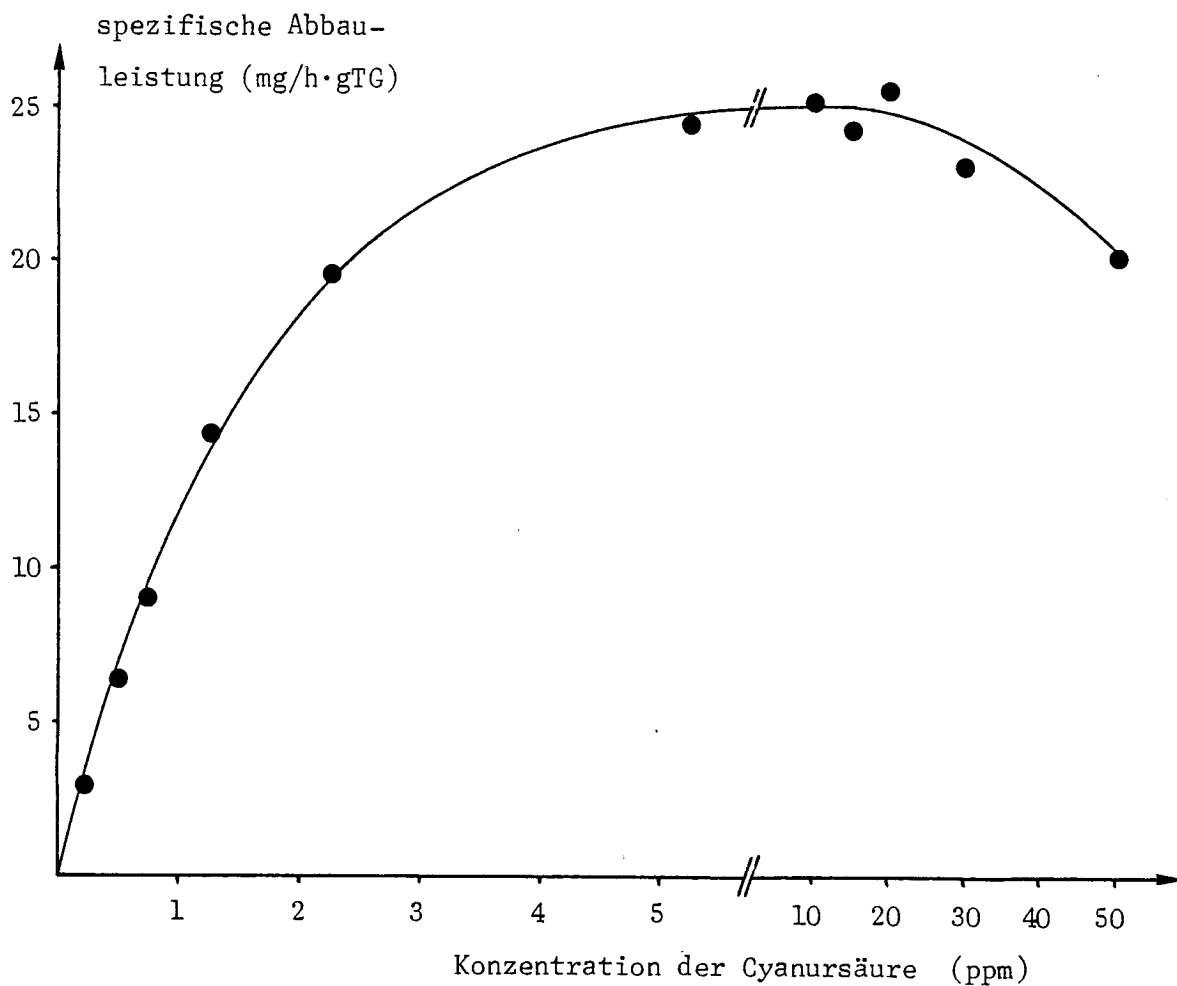


Fig. 12: Spezifische Abbauleistung von ruhenden Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 bei verschiedenen Konzentrationen von Cyanursäure

Berechnung der spezifischen Abbauleistung auf Grund der in Fig. 11 dargestellten Abbaukurven



innerhalb der bisher zur Berechnung der spezifischen Abbauleistung verwendeten Messperiode (2 Stunden) die Cyanursäurekonzentration bei 50 ppm nur um rund 25 % ab.

Zur Kontrolle wurde bei einigen Cyanursäurekonzentrationen die spezifische Abbauleistung auch mit Hilfe der Radiorespirometrie bestimmt. Dabei konnte bei hohen Konzentrationen eine gute Uebereinstimmung mit den in Fig. 12 aufgezeichneten Werten erzielt werden.

Bei kleinen Konzentrationen und somit bei einer schnellen Bildung von  $\text{CO}_2$  ist jedoch die Bestimmung der spezifischen Abbauleistung mit Hilfe der Radiorespirometrie ungeeignet (Daten nicht aufgezeichnet).

### 3.2.5. Abbau von Cyanursäure durch Sporothrix schenkii Stamm 6.2 in Anwesenheit von fremden Zellen, Ammelin und Ammelid

---

Um bei Abbauversuchen (insbesondere im Bereich Ammelin  $\rightarrow$  Cyanursäure) Cyanursäure nicht mit TLC-Platten nachweisen zu müssen, wurde im folgenden Experiment versucht, eine Methode zum Nachweis von  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure mit Hilfe von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 zu entwickeln. Dazu wurde der Cyanursäureabbau durch S. schenkii Stamm 6.2 bei Bedingungen analysiert, wie sie bei Abbauversuchen im Bereich Ammelin  $\rightarrow$  Cyanursäure herrschen können (gleichzeitige Anwesenheit von Ammelin, Ammelid, Cyanursäure und fremden Zellen). Eine Zellsuspension (im vorliegenden Fall wurde der Stamm 6.15 gewählt,  $\text{OD}_{546} = 1.5$ ) wurde in Portionen à 1 ml aufgeteilt, die mit verschiedenen Mengen von Ammelin, Ammelid und Cyanursäure versetzt wurden. Sämtliche Proben wurden autoklaviert, anschliessend mit 0.5, 1.0, 2.0 resp. 4.0 ml einer Suspension von wachsenden Zellen von S. schenkii Stamm 6.2 (suspendiert in MaN + 1.0 % Glukose,  $\text{OD}_{546} = 0.05$ ) beimpft und inkubiert. Bei Inkubationsbeginn und nach 1, 2 und 4 Tagen wurde die Radioaktivität in diesen Kulturen bestimmt (Fig. 13). Die Daten zeigen, dass der Abbau von Cyanursäure durch Ammelin und Ammelid nicht beeinflusst wird und selbst grosse Mengen von Cyanursäure bei ausreichender Zugabe der Impf-Suspension innerhalb von 2 Tagen praktisch vollständig abgebaut werden.

Der prozentuale Anteil von  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure in einem Gemisch mit verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -Triazin-Derivaten kann somit bestimmt werden, indem eine Probe des Gemisches mit S.schenkii Stamm 6.2 beimpft und die cpm-Werte zu Beginn und am Ende einer Inkubationszeit von 2 Tagen gemessen werden. Diese Methode zum Nachweis von Cya-

Fig. 13: Abbau von Cyanursäure durch Sporothrix schenkii Stamm 6.2  
in Anwesenheit von fremden Zellen, Ammelin und Ammelid

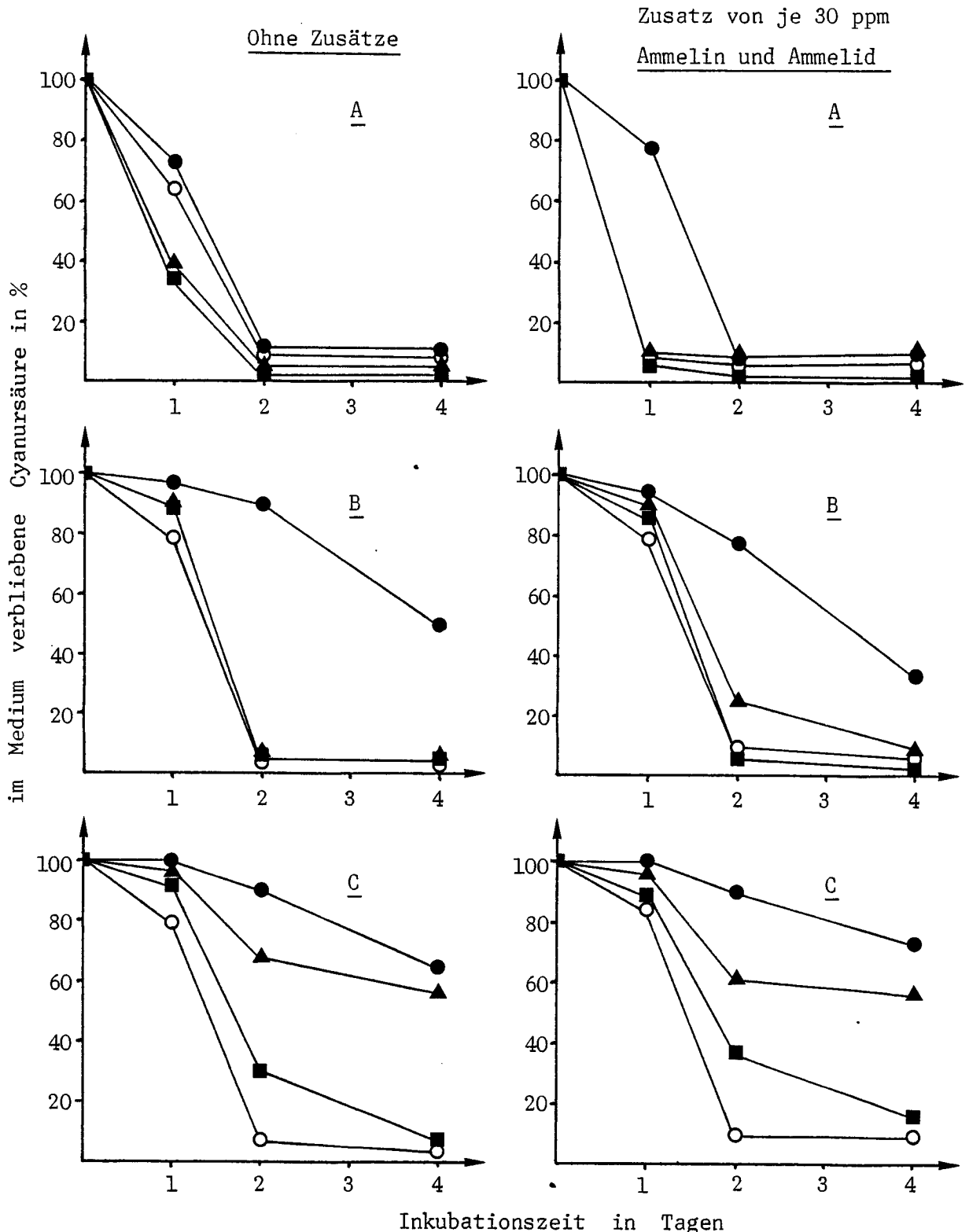
Vorgegebene Probe: Zellsuspension des Stammes 6.15

(Gesamt- ± je 30 ppm Ammelin und Ammelid

volumen: 1 ml) + 0.2 (=A), 1500 (=B) resp. 3000 ppm (=C)  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure

Beimpft mit 0.5 (●), 1.0 (▲), 2.0 (■) resp. 4.0 ml (○) einer Suspension  
von S. schenkii Stamm 6.2 (in MaN + 0.5 % Glukose,  $\text{OD}_{546} = 0.05$ )

Analytik: Bestimmung der im Medium verbliebenen Radioaktivität



nursäure wird im Folgenden "6.2-Test" genannt (vergl. Kap. 2.5). Der "6.2-Test" kann auch zum Nachweis von  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure auf TLC-Platten eingesetzt werden. Dazu wird das Silicagel ausgekratzt, in Suspension gebracht und analog wie eine Medienprobe analysiert (Daten nicht aufgezeichnet).

### 3.2.6. Wachstum und Cyanursäureabbau von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 in Anwesenheit von Mutterlauge aus einer Atrazin-Produktionsanlage

---

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Sporothrix schenkii Stamm 6.2 fähig ist, in Anwesenheit von Mutterlauge aus einer Atrazin-Produktionsanlage zu wachsen und Cyanursäure abzubauen (Tab. 7). Die verwendete Mutterlauge stammte aus einer nicht-kontinuierlichen Atrazin-Produktion (Batch PA II/II-BSG 9076 vom 24. 8. 78) des Ciba-Geigy-Werkes Grenzach (BRD) und war wie folgt charakterisiert: TOC (Totaler organischer Kohlenstoff): 2500 ppm, NaCl: 150 g/l, pH: 13 - 14 (P. Mayer, Ciba-Geigy AG, persönliche Mitteilungen). Aus den angegebenen Werten lässt sich grob abschätzen, dass diese Mutterlauge rund 7 x konzentrierter ist als das in Tab. 1 angegebene Atrazin-Abwasser und somit vermutlich rund 2300 ppm Triazin-Derivate (davon rund 470 ppm Cyanursäure) enthält. Diese Mutterlauge wurde auf pH 7.0 gebracht, wobei sich eine dichte, grau-weiße Suspension bildete (Trockengewicht bei Filtration mit GF/C-Filter: 0.84 mg/ml). Diese Suspension wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt (1:10, 1:100 resp. 1 :1000), mit verschiedenen Zugaben versetzt und mit S. schenkii Stamm 6.2 beimpft. Die Bestimmung des Cyanursäureabbaus erfolgte, in dem den Inkubationsgemischen 0.2 ppm  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure zugegeben und Proben bei Beginn der Inkubation und nach 2 und 4 Tagen im Scintillationszähler ausgezählt wurden. Bei den unverdünnten Inkubationsgemischen bewirkte die dichte Suspension eine sehr niedrige Zählrate. Deshalb wurde in diesen Fällen der Cyanursäureabbau mit Hilfe der Radiorespirometrie (mit NaOH zum Auffangen von  $\text{CO}_2$ ) über eine Inkubationszeit von 4 Tagen bestimmt. Bei den in Tab. 7 angegebenen Trockengewichten ist das durch die Suspension allein bedingte Trockengewicht bereits abgezogen worden. In der unverdün-

Tab. 7: Wachstum und Cyanursäureabbau von Sporothrix schenckii Stamm 6.2 in Anwesenheit von Mutterlauge aus einer Atrazin-Produktionsanlage

Verdünnung der Mutterlauge	0 (unverdünnt)		1 : 10		1 : 100		1 : 1000	
	Trocken- gewicht nach 3.7 Tagen	Abbau nach Tagen 4	Trocken- gewicht nach 3.7 Tagen	Abbau nach Tagen 2 4	Trocken- gewicht nach 3.7 Tagen	Abbau nach Tagen 2 4	Trocken- gewicht nach 3.7 Tagen	Abbau nach Tagen 2 4
Zusätze zur Mutterlauge <sup>1)</sup>	/							
Ohne Zusätze	0	0	0	6	0.05	5	0.04	6
0.5 % Glukose	0.15	n.b. <sup>2)</sup>	0.13	49	0.14	68	0.12	67
Ma + 0.5 % Glukose	0.35	n.b.	0.13	93	0.19	98	0.16	98
0.06 % NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + 0.5 % Glukose	0.59	n.b.	0.13	33	0.19	34	0.14	25
MaN + 0.5 % Glukose	0.25	n.b.	1.58	89	1.79	93	1.74	94
MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE	0.78	0	4.49	90	4.77	89	4.72	91

1) 1 ml einer 20-fach konzentrierten Stammlösung auf 20 ml Mutterlauge

2) n.b. : nicht bestimmt

ten Mutterlauge ohne Zusätze kann kein Wachstum festgestellt werden. Mit einem Zusatz von Zucker und vorallem YE kann jedoch ein geringes Wachstum erzielt werden. In der 1 : 10 verdünnten Mutterlauge liegt das Trockengewicht bei geeigneten Zusätzen nur noch rund 10 % unter dem Wert der 1:100 resp. 1:1000 verdünnten Mutterlauge. Cyanursäure (rund 470 ppm) wird in der unverdünnten Mutterlauge nicht abgebaut. In der 1:10 verdünnten Mutterlauge jedoch wird bei geeigneten Zusätzen Cyanursäure (rund 47 ppm) praktisch vollständig abgebaut.

### 3.3 Experimente im Bereich der Abbausequenz

Ammelin → Ammelid → Cyanursäure

---

#### 3.3.1. Abbau von Ammelin durch verschiedene Stämme

---

Bei allen isolierten Stämmen (insgesamt 200 Stämme, vergl. Fig. 5 und 6) sowie bei den in Kap.2.1.2 erwähnten Sammlungsstämmen (mit Ausnahme von Hendersonula toruloidea Stamm Martin und Sporothrix schenkii Stamm CBS 359.36) wurde das Abbauverhalten gegenüber Ammelin bei Wachstum auf einem Komplexmedium geprüft (mit Hilfe des "6.2-Tests"). Zudem wurde bei rund 70 der geprüften Stämme das Abbauverhalten gegenüber Ammelin auch bei Wachstum auf einem Minimalmedium bestimmt (mit Hilfe des "6.2-Tests" und mit Hilfe von TLC) (Tab. 8).

Bei Wachstum auf einem Komplexmedium setzten 30 Stämme innerhalb von 30 Tagen 50 - 96 % Ammelin zu Cyanursäure um, davon zeigten 15 Stämme schon nach 14 Tagen einen Umsatz von 95 %. Am schnellsten (70 - 95 % in 3 Tagen) wurde Ammelin durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B zu Cyanursäure abgebaut.

Die insgesamt 70 Stämme, deren Abbauverhalten bei Wachstum auf einem Minimalmedium bestimmt wurde, bestanden je zur Hälfte aus Pilzen und Bakterien. Alle Pilze und rund 85 % der Bakterien waren fähig, Ammelin innerhalb von 40 Tagen total zu Ammelid umzusetzen. Jedoch nur rund 40 % der Pilze konnten Ammelid partiell weiter zu Cyanursäure umsetzen, während wiederum rund 85 % der Bakterien dazu fähig waren. Bei fast allen Stämmen, die Ammelin abbauen, konnte



Tab. 8: Abbau von Ammelin durch verschiedene Stämme

Angabe der prozentualen Verteilung von Ammelin, Ammelid und Cyanursäure beim Abbau von 2.5 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin

Medium	MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE				"6.2-Test"				MaN + 1.0% GS + 0.5% YE				
	Tage	Ammelin	Ammelid	Cyanur- säure	Tage	Ammelin Ammelid	Cyanur- säure	Tage	Ammelin Ammelid	Cyanur- säure	Tage	Ammelin Ammelid	Cyanur- säure
<i>Edukt resp. Produkt nach Tagen</i>													
Stamm													
2.2, 2.20, 8.1	55	0	80 - 100	0 - 20	55	0	80 - 100	0 - 20	55	0	92 - 100	0 - 8	
6.1	43	0	30	70	43	0	30	70	43	21	96	4	
6.15	69	0	0	100	69	0	0	100	69	38	79	21	
6.22	43	0	80	20	43	0	80	20	43	18	9	91	
1, 44, 118B	6	47 - 61	25 - 36	14 - 17	6	47 - 61	25 - 36	14 - 17	6	20 - 34	5 - 6	94 - 95	
123B	6	85	11	4	6	85	11	4	6	95	4	96	
<i>Rhizopus stolonifer</i> Stamm M 2669	75	20	0	80	75	20	0	80	75	46	18	82	
<i>Rhizopus stolonifer</i> Stamm M 2670	75	40	0	60	75	40	0	60	75	53	19	81	
<i>Rhizopus stolonifer</i> Stamm M 2679	75	60	0	40	75	60	0	40	75	77	93	7	
<i>Rhizopus stolonifer</i> Stamm M 2875	75	60	0	40	75	60	0	40	75	64	83	17	
<i>Aspergillus fumigatus</i>													
Stämme M 429, M 475, M 8809	75	0	100	0	75	0	100	0	75	0	100	0	
<i>Penicillium notatum</i> Stamm M 2544	75	0	100	0	75	0	100	0	75	0	100	0	
<i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm Haider	6	65	35	0	6	65	35	0	6	65	35	0	
<i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm Martin	6	57	43	0	6	57	43	0	6	57	43	0	
<i>Sporothrix schenckii</i> Stamm CBS 472.48	6	56	43	10	6	56	43	10	6	56	43	10	
<i>Sporothrix schenckii</i> Stamm 6.2	6	36	64	0	6	36	64	0	6	36	64	0	

Weitere Analysen des Ammelinabbaus durch  
*Stachybotrys chartarum* und  
*Sporothrix schenckii* vergl. Kap. 3.4

Ammelid als Zwischen- oder Endprodukt deutlich nachgewiesen werden. Nur bei den Rhizopus stolonifer Stämmen M 2669, M 2670, M 2679 und M 2875 konnte nie Ammelid gefunden werden. Dieser Befund wird im nächsten Kapitel (Kap. 3.3.2.) kommentiert und weiter untersucht.

Die Art des Mediums kann einen wesentlichen Einfluss auf den Abbau von Ammelin zu Cyanursäure haben. Während bei den Stämmen 6.22, 1, 44, 118B und 123B und den Rhizopus stolonifer Stämmen M 2669 und M 2670 der Abbau durch einen hohen Zusatz von YE beschleunigt wird, wird bei den Stämmen 6.1 und 6.15 und den Rhizopus stolonifer Stämmen M 2679 und M 2875 der Abbau durch einen Zusatz von YE gehemmt.

Bei allen in Tab. 8 erwähnten Stämmen wurde zusätzlich zum Ammelinabbau geprüft, ob möglicherweise Radioaktivität in die Zellmasse eingelagert wird. Dazu wurden die Stämme auf dem Medium MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 2.5 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin inkubiert. Nach 2 Tagen wurde eine Probe der Kultur zentrifugiert und das Sediment wurde (nach dem Waschen mit einer 0.8 %igen NaCl-Lösung im Scintillationszähler ausgezählt. Dabei zeigten die Stämme 2.20, 8.1 und die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 mehr als 80 % der eingesetzten Radioaktivität im Sediment, während bei allen andern Stämmen die Werte unter 40 % lagen. Bei den Stämmen 2.20 und 8.1 und den Sporothrix schenkii Stämmen CBS 472.48 und 6.2 nahm die Radioaktivität im Sediment im Verlaufe des Wachstums wiederum ab und betrug nach 20 Tagen weniger als 40 %. Die hohe Radioaktivität im Sediment dürfte somit vermutlich nicht auf einen Einbau von Ammelin (oder Fragmenten davon), in die Zellsubstanz, sondern eher auf eine kurzfristige Akkumulation oder Adsorption von Ammelin durch die Organismen zurückzuführen sein. Auch die Akkumulation von Ammelid durch die Stämme 2.20 und 8.1 und die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 wurde geprüft. Dabei konnte nur bei Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 eine kurzfristige Akkumulation gefunden werden (rund 30 % nach 2 Tagen); bei allen andern Stämmen lagen die Werte unter 2 % (Daten nicht aufgezeichnet).

3.3.2. Bestimmung des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes  
beim Abbau von Ammelin zur Cyanursäure durch Rhizopus  
stolonifer und durch den Stamm 123B

---

Beim Ammelinabbau durch die Rhizopus stolonifer Stämme M 2669, M 2670, M 2679 und M 2875 konnte stets nur Ammelin und Cyanursäure, nie jedoch Ammelid gefunden werden (Tab. 8). Bei allen andern Stämmen, die Ammelin abbauen, konnte Ammelid stets als Zwischen- oder Endprodukt deutlich nachgewiesen werden; Ammelin wird somit schneller deaminiert als Ammelid. Bei Rhizopus stolonifer scheint der geschwindigkeitslimitierende Schritt jedoch bei der Sequenz Ammelin  $\longrightarrow$  Ammelid zu liegen. Diese Vermutung wurde genauer untersucht, indem das Abbauverhalten von Rhizopus stolonifer bei Wachstum auf 3 verschiedenen Medien geprüft wurde (Fig. 14).

Die R. stolonifer Stämme M 2669 und M 2670 bauen auf allen Medien Ammelin und Ammelid schneller ab als die R. stolonifer Stämme M 2679 und M 2875. Alle 4 Stämme bauen auf allen Medien Ammelid schneller oder zumindest gleich schnell ab wie Ammelin. Bei Wachstum auf den Komplexmedien bauen die R. stolonifer Stämme M 2669 und M 2670 Ammelin mit einer Abbauleistung von rund 0.08-0.17 ppm/h und Ammelid mit einer Abbauleistung von rund 0.17-0.25 ppm/h zu Cyanursäure ab. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure die Deaminierung von Ammelid miteinschliesst. Trotzdem stützen die vorliegenden Daten die Vermutung, dass beim Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch die R. stolonifer Stämme M 2669, M 2670, M 2679 und M 2875 die Deaminierung von Ammelin den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt.

Wie die Werte in Tab. 8 zeigen, wird beispielsweise beim Ammelinabbau durch den Stamm 123B (im Gegensatz zu Rhizopus stolonifer) Ammelid deutlich akkumuliert. Diese Akkumulation wurde im folgenden Experiment genauer untersucht. Dazu wurde der Stamm 123B auf einem Komplexmedium bis zur stationären Wachstumsphase ( $OD_{546}$  von rund 20.0) inkubiert und anschliessend mit 3.2 ppm  $^{14}C$ -Ammelin versetzt. Der Abbau von Ammelin sowie die Bildung von Ammelid und Cyanursäure wurden mit Hilfe von TLC und mit Hilfe des "6.2-Tests" verfolgt (Fig. 15). Ammelin wird

Fig. 14: Abbau von Ammelin und Ammelid zu Cyanursäure durch Rhizopus stolonifer

Stämme: Rhizopus stolonifer: Stämme ● M 2669, △ M 2670, ■ M 2679, ▲ M 2875

Medien: I: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE      II: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE

III: Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE

Zusätze: 20 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin resp. 20 ppm <sup>14</sup>C-Ammelid

Analytik: Bestimmung der <sup>14</sup>C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

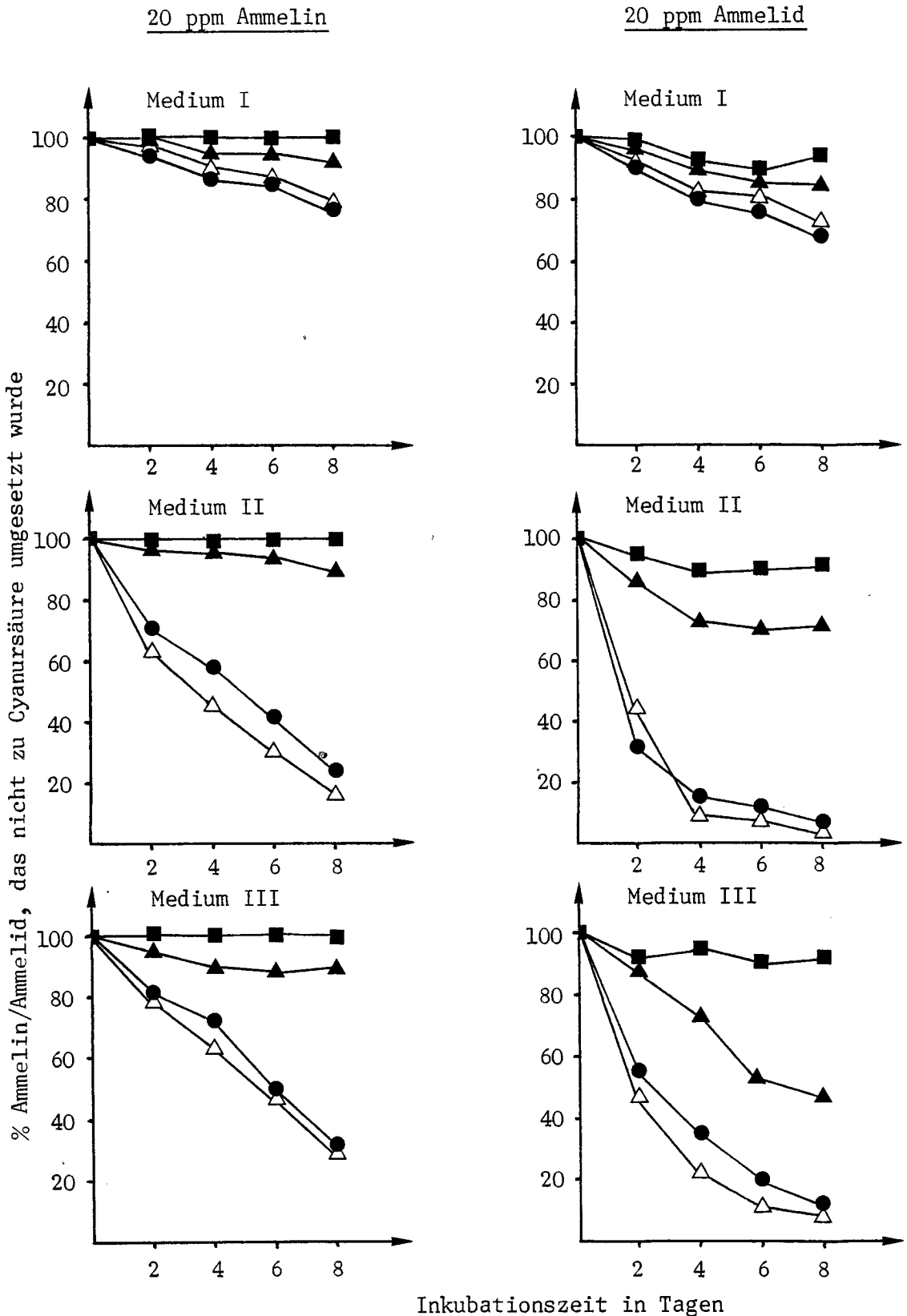


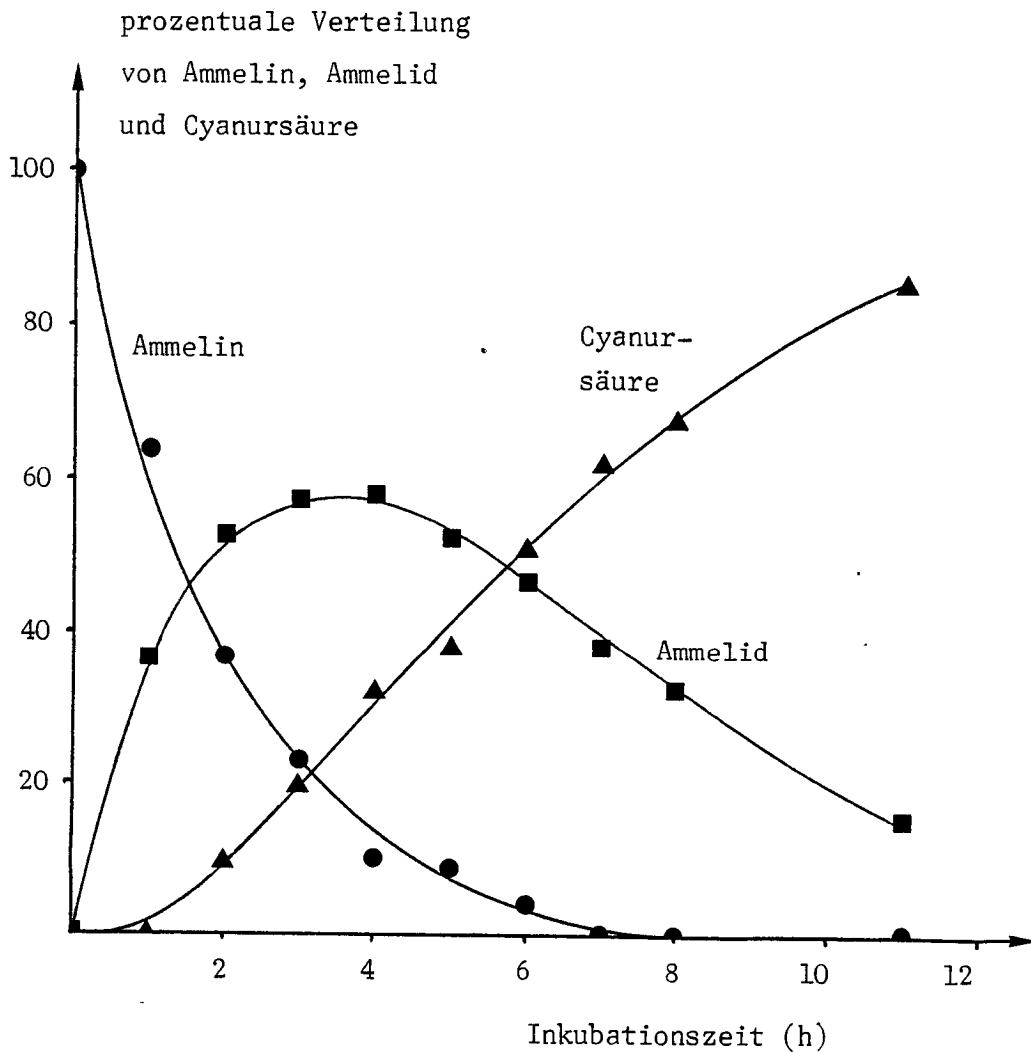
Fig. 15: Prozentuale Verteilung von Ammelin, Ammelid und Cyanursäure beim Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B

Medium: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE

Wachstum: stationär,  $OD_{546}$  von rund 20.0 (nicht aufgezeichnet)

Zugabe von 3.2 ppm  $^{14}C$ -Ammelin zum Zeitpunkt  $t = 0$  h

Analytik: Bestimmung aller  $^{14}C$ -Triazin-Derivate mit Hilfe von TLC  
Bestimmung der  $^{14}C$ -Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"  
(zur Kontrolle)



mit einer Abbauleistung von rund 1 ppm/h zu Ammelid deaminiert. Die Deaminierung von Ammelid zu Cyanursäure erfolgt bedeutend langsamer (rund 0.2 ppm/h). Die maximale Konzentration von Ammelid erreicht knapp 60 % der Gesamtradioaktivität. Beim Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B liegt somit der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Deaminierung von Ammelid. Beim Vergleich der Werte der Abbauleistungen muss berücksichtigt werden, dass die in Fig. 15 verwendete Ammelinkonzentration (3.2 ppm) unterhalb der Enzym-Sättigungsgrenze liegt (vergl. Tab. 13).

### 3.3.3. Abbau von Ammelin durch die Stämme 1,44, 118B und 123B bei Wachstum auf verschiedenen Medien

---

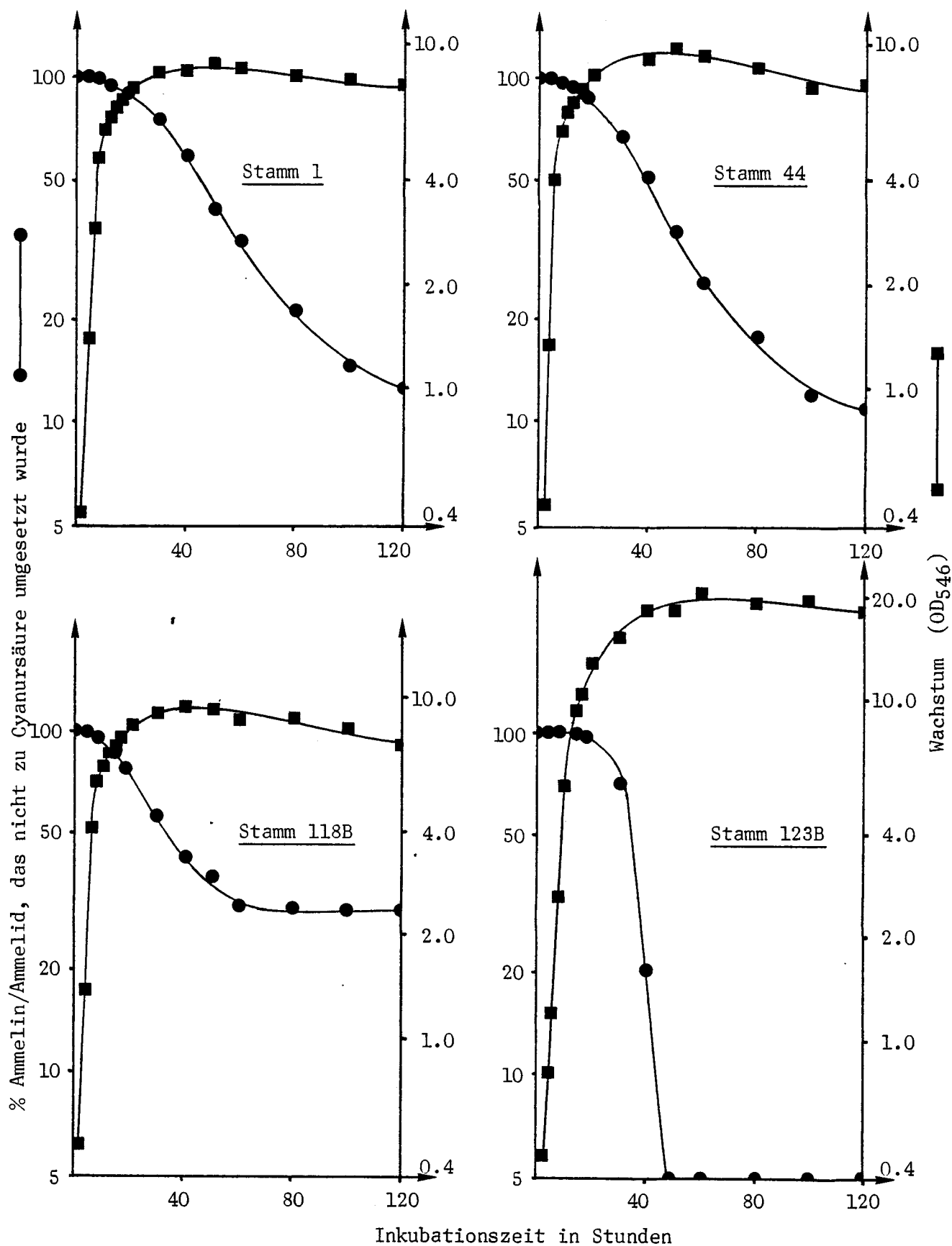
Der Verlauf des Abbaus von Ammelin zu Cyanursäure durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B sowie das Wachstum dieser Stämme wurden bei Inkubation auf einem Komplexmedium parallel bestimmt (Fig. 16). Bei allen 4 Stämmen ist erst gegen Ende der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase eine signifikante Akkumulation von Cyanursäure zu beobachten. Innerhalb einer Inkubationszeit von 80 Stunden bauen alle Stämme 70 - 95 % Ammelin zu Cyanursäure ab. Eine TLC-Analyse von Proben der Kulturen nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden zeigte bei allen Stämmen Cyanursäure und allenfalls Ammelid, nie jedoch Ammelin. Alle Stämme wachsen auf dem verwendeten Komplexmedium sehr gut. Das  $\mu_{\max}$  beträgt 0.51 (Stamm 1), 0.52 (Stamm 44), 0.49 (Stamm 118B) resp. 0.36 (Stamm 123B). Die  $OD_{\max}$  liegt bei rund 9.0 (Stämme 1, 44 und 118B) resp. 20.0 (Stamm 123B).

Das Wachstum der Stämme 1, 44, 118B und 123B auf 2 verschiedenen Minimalmedien (Glukose resp. Saccharose als C-Quelle) ist in Tab. 9 und der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure bei Inkubation auf einem Minimalmedium in Tab. 10 aufgezeichnet. Alle 4 Stämme können Glukose als C-Quelle verwenden, wogegen nur die Stämme 1 und 118B auch auf Saccharose gut wachsen. Insgesamt jedoch ist das Wachstum der 4 Stämme auf Minimalmedien deutlich schlechter als auf dem in Fig. 16 verwendeten Komplexmedium. Auch Ammelin wird auf dem Minimalmedium wesentlich schlechter abgebaut als auf

Fig. 16: Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Wachstum auf einem Komplexmedium

Medium: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE + 2.5 ppm  $^{14}\text{C}$ -Ammelin

Analytik: Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"



dem Komplexmedium. Der Stamm 123B kann auf dem Minimalmedium Ammelin praktisch nicht zu Cyanursäure abbauen, während bei Wachstum auf dem in Fig. 16 verwendeten Komplexmedium Ammelin innerhalb von 2 Tagen nahezu vollständig zu Cyanursäure umgesetzt wird.

Um beim Stamm 123B den Einfluss von Zucker und YE auf den Abbau genauer bestimmen zu können, wurde der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure in Abhängigkeit von der Konzentration von Zucker und YE untersucht (Tab. 11).

Tab. 9: Wachstum der Stämme 1, 44, 118B und 123B auf Minimalmedien mit Glukose resp. Saccharose als C-Quelle

Medium: MaN + 5 ppm YE + 1.0 % Glukose resp. Saccharose

Stamm	Glukose		Saccharose	
	$\mu_{\max}$	OD <sub>max</sub>	$\mu_{\max}$	OD <sub>max</sub>
1	0.20	1.1	0.18	1.2
44	0.16	0.5	0.06	0.4
118B	0.18	1.6	0.18	1.2
123B	0.24	2.3	0.06	0.5

Tab. 10: Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch die Stämme 1, 44 118B und 123B bei Wachstum auf einem Minimalmedium

Medium: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 2.5 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin

Analytik: Bestimmung der <sup>14</sup>C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

% Ammelin/Ammelid, das nicht zu Cyanursäure umgesetzt wurde			
Inkubations- Stamm zeit	5 Tage	15 Tage	30 Tage
1	58	38	21
44	53	39	23
118B	54	36	34
123B	94	97	96



Tab. 11: Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B  
bei verschiedenen Konzentrationen von Zucker und YE

Medium: MaN + GS (0 - 0.5 %) + YE (0 - 0.5%) + 1 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin

OD<sub>546</sub> bei Inkubationsbeginn: 0.05

Analytik: Bestimmung der <sup>14</sup>C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

		% Cyanursäure nach einer Inkubationszeit von:									
		2 Tagen					5.5 Tagen				
%GS \ %YE		0	0.05	0.1	0.2	0.5	0	0.05	0.1	0.2	0.5
0	0	1	3	1	1	0	6	15	16	25	6
0.05	0	11	38	35	19	1	37	86	83	67	31
0.1	0	13	56	70	56	8	66	95	94	93	59
0.2	0	4	16	78	93	34	7	80	96	94	89
0.5	0	0	6	8	60	94	3	10	21	97	94

Bereits mit geringen Konzentrationen von Zucker und YE (je 0.05 - 0.1 %) kann ein praktisch vollständiger Abbau von Ammelin zu Cyanursäure erzielt werden, doch nimmt die Abbauleistung (ppm/h) mit sinkenden Konzentrationen von Zucker und YE ab. Nicht nur die Konzentrationen von Zucker und YE sind für den Abbau entscheidend, sondern auch das Verhältnis der beiden Zusätze.

Ein analoges Experiment wie in Tab. 11 beschrieben, wurde auch mit den Stämmen 6.15 und 6.22 durchgeführt. Dabei konnte beim Stamm 6.15 keine Beschleunigung des Ammelinabbaus durch eine erhöhte Konzentration von Zucker und YE beobachtet werden. Beim Stamm 6.22 hingegen war der Abbau deutlich von der Konzentration von Zucker und YE abhängig. Innerhalb einer Inkubationszeit von 23 Tagen wurden bei 0.25 % YE und 0.2 % GS nur 7 %, bei 0.5 % YE und 1.5 % GS jedoch 90 % Ammelin zu Cyanursäure umgesetzt. Wie in Tab. 11 wurde der Abbau auch durch das Verhältnis der Konzentrationen von Zucker und YE beeinflusst (Daten nicht aufgezeichnet).

### 3.3.4. Abbau von Ammelin durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Wachstum auf Komplexmedien mit verschiedenen Konzentrationen von Ammelin und Cyanursäure

---

Der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure wurde bisher bei variablen Konzentrationen (1 - 20 ppm) von Ammelin bestimmt. Im folgenden Experiment wird der Abbau von Ammelin durch die Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Wachstum auf einem Komplexmedium in Abhängigkeit von der Konzentration von Ammelin und Cyanursäure untersucht. Aus dem prozentualen Abbau innerhalb einer bestimmten Inkubationsperiode lässt sich unter Berücksichtigung der Anfangskonzentration von Ammelin die Abbauleistung (ppm/h) berechnen (Tab. 12).

Bei allen Stämmen steigt mit zunehmender Ammelinkonzentration die Abbauleistung. Eine Ammelinkonzentration von 2 und 12 ppm liegt noch deutlich unterhalb der Enzym-Sättigungsgrenze. Mit zunehmender Cyanursäurekonzentration kann im allgemeinen keine signifikante Abnahme der Abbauleistung beobachtet werden; Cyanursäure bewirkt offenbar keine Hemmung des Abbaus. Nur beim Stamm 44 ergibt sich bei kleinen Ammelinkonzentrationen in der ersten Inkubationsperiode eine leichte Verminderung der Abbauleistung durch Cyanursäure. Viele Proben zeigen nach 10 Tagen (Stamm 123B schon nach 2 Tagen) einen praktisch vollständigen Ammelinabbau. Da jedoch auch bei diesen Proben zur Berechnung der Abbauleistung ein linearer Abbau angenommen wurde, liegen die Werte (ppm/h) möglicherweise zu tief.

Die Abbauleistung des Stammes 123B liegt durchwegs rund 5x höher als die Abbauleistung der Stämme 1, 44 und 118B. Da im vorliegenden Experiment (Tab. 12) jedoch weder die  $OD_{546}$  noch das Trockengewicht der Kulturen verfolgt wurde, lässt sich die spezifische Abbauleistung nicht berechnen. Unter der Annahme, dass die Zellmasse beim Stamm 123B rund doppelt so hoch ist wie bei den Stämmen 1, 44 und 118B (vergl. Fig. 16), lässt sich aber abschätzen, dass die spezifische Abbauleistung des Stammes 123B rund 2.5x höher liegt als die spezifische Abbauleistung der Stämme 1, 44 und 118B. Die spezifische Abbauleistung von wachsenden Zellen des Stammes 123B wird im folgenden Kapitel (Kap. 3.3.5) genau bestimmt.

Tab. 12: Abbauleistung von wachsenden Zellen der Stämme 1, 44, 118B und 123B bei Inkubation in einem Komplexmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Ammelin und Cyanursäure

Medium: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE + <sup>14</sup>C-Ammelin (2, 12 resp. 22 ppm) + Cyanursäure (0, 1000 resp. 2000 ppm)  
 OD<sub>546</sub> bei Inkubationsbeginn: 0.1 Analytik: Bestimmung der <sup>14</sup>C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"  
 Probenentnahme: nach 5 und 10 Tagen bei den Stämmen 1, 44, 118B ; nach 2 und 5 Tagen beim Stamm 123B

Stamm	<sup>14</sup> C-Ammelin (ppm)		2		12		22		2		12		22	
	Cyanur- säure (ppm)	zu Cyanursäure abgebaut	%	ppm/h	%	ppm/h	%	ppm/h	%	ppm/h	%	ppm/h	%	ppm/h
1	0		Inkubationsperiode 0 - 5 Tage											
	1000		76	0.01	52	0.05	44	0.08	92	0.01	89	0.04	85	0.08
	2000		67	0.01	48	0.05	45	0.08	91	0.01	87	0.04	87	0.08
44	0		Inkubationsperiode 0 - 5 Tage											
	1000		57	0.01	52	0.05	37	0.07	88	0.01	86	0.05	92	0.08
	2000		Inkubationsperiode 5 - 10 Tage											
118B	0		Inkubationsperiode 0 - 5 Tage											
	1000		90	0.02	53	0.05	39	0.07	94	0.01	88	0.03	83	0.08
	2000		46	0.01	33	0.03	16	0.03	86	0.01	85	0.05	78	0.11
123B	0		Inkubationsperiode 0 - 5 Tage											
	1000		30	0.01	39	0.04	44	0.08	84	0.01	86	0.05	80	0.07
	2000		Inkubationsperiode 5 - 10 Tage											
123B	0		Inkubationsperiode 0 - 2 Tage											
	1000		49	0.01	47	0.05	34	0.06	66	0.01	89	0.04	80	0.08
	2000		30	0.01	13	0.01	32	0.06	83	0.01	72	0.01	90	0.11
123B	0		Inkubationsperiode 2 - 5 Tage											
	1000		46	0.01	35	0.03	38	0.07	92	0.01	90	0.05	90	0.10
	2000		Inkubationsperiode 2 - 5 Tage											
123B	0		Inkubationsperiode 2 - 5 Tage											
	1000		92	0.04	93	0.23	84	0.38	Werte nicht aufgezeichnet,					
	2000		95	0.04	92	0.23	72	0.33	da Ammelin nach 2 Tagen schon weitgehend abgebaut war					

### 3.3.5 Spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin von wachsenden Zellen des Stammes 123B

---

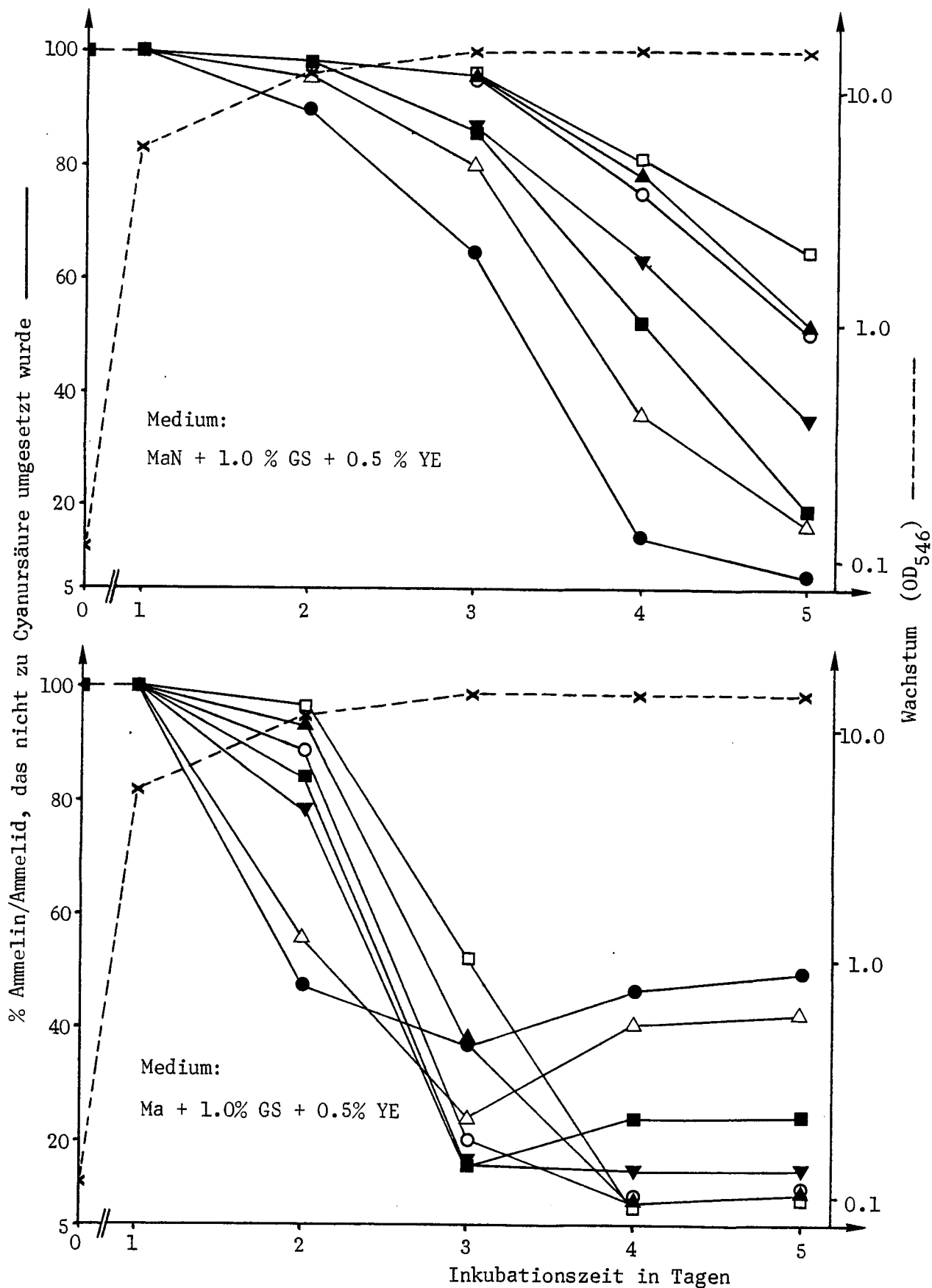
In den bisherigen Experimenten wurde gefunden, dass bei Wachstum auf einem Komplexmedium von allen geprüften Stämmen der Stamm 123B Ammelin am schnellsten zu Cyanursäure abbaut (Tab. 8, Fig. 16). In Tab. 12 wurde zudem gezeigt, dass die Abbauleistung des Stammes 123B gegenüber Ammelin von der Ammelinkonzentration abhängig ist und von Cyanursäure nicht beeinflusst wird. Im folgenden Experiment wurde die spezifische Abbauleistung des Stammes 123B bei Wachstum auf 2 verschiedenen Komplexmedien (mit und ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) und bei 7 verschiedenen Konzentrationen von Ammelin bestimmt. In Fig. 17 ist das Wachstum des Stammes 123B und der prozentuale Abbau von Ammelin zu Cyanursäure bei Inkubation auf den beiden Komplexmedien dargestellt. Da das Wachstum bei allen Ammelinkonzentrationen und auf beiden Komplexmedien gleich war, wurde in Fig. 17 nur je eine Wachstumskurve aufgezeichnet. Aus den dargestellten Werten wurde für jede Inkubationsperiode (das heisst für jeden Tag) die Abbauleistung (ppm/h, analog Tab. 12) berechnet. Im weiteren wurde das Trockengewicht des Stammes 123B bei Wachstum auf den verwendeten Komplexmedien bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Trockengewicht nicht parallel zur  $\text{OD}_{546}$  steigt. Bei einer  $\text{OD}_{546}$  von 1.0 beträgt das Trockengewicht (unabhängig vom Medium) 0.37 mg/ml, bei einer  $\text{OD}_{546}$  von 20.0 beträgt das Trockengewicht 5.20 mg/ml, das heisst bezogen auf eine  $\text{OD}_{546}$  von 1.0 nur 0.26 mg/ml. Dazwischen fällt das Trockengewicht annähernd linear ab (Daten nicht aufgezeichnet). Wird nun die aus Fig. 17 berechnete Abbauleistung (ppm/h) mit dem mittleren Trockengewicht innerhalb einer bestimmten Inkubationsperiode dividiert, so ergibt sich die spezifische Abbauleistung (mg/h·gTG) (Tab. 13).

Bei der Interpretation der in Fig. 17 und Tab. 13 dargestellten Daten muss berücksichtigt werden, dass in diesen Experimenten das Verhalten eines sehr komplexen Systems geprüft wurde. Die berechnete spezifische Abbauleistung stellt die Summe der Aktivitäten mehrerer Enzyme (u. a. Permeasen, katabolische Enzyme) dar, die zudem durch mehrere Verbindungen gefördert (u. a. durch Ammelin) oder gehemmt (u. a. durch Ammoniumionen) werden können. Trotzdem können einige Aussagen gemacht werden:

Fig. 17: Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B bei Wachstum auf Komplexmedien mit verschiedenen Konzentrationen von Ammelin

$^{14}\text{C}$ -Ammelin (ppm): ●1.7, △3.7, ■5.7, ▼9.7, ○13.7, ▲17.7, □21.7

Analytik: Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"



Tab. 13: Spezifische Abbauleistung von wachsenden Zellen des Stammes 123B bei Inkubation in Komplexmedien mit verschiedenen Konzentrationen von Ammelin

Berechnungsgrundlage:

- prozentualer Abbau von Ammelin zu Cyanursäure (Fig. 17)
- Berechnung der Abbauleistung (ppm/h)
- Berechnung der spezifischen Abbauleistung (mg/h·gTG)

Inkubationsperiode (Tage)	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	Ammelin-konzentration (ppm)
Mittlere OD <sub>546</sub>	1.8	11.6	17.7	18.9	18.9	
Mittleres Trockengewicht (mg/ml)	0.67	3.62	4.97	5.11	5.11	
	spezif. Abbauleistung (mg/h·gTG)					
Medium:	-	0.03	0.08	0.15	0.02	1.7
MaN + 1.0 % GS	-	0.02	0.10	0.27	0.13	3.7
+ 0.5 % YE	-	0.01	0.12	0.32	0.33	5.7
(mit NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	-	0.01	0.18	0.36	0.45	9.7
	-	-	0.10	0.43	0.54	13.7
	-	-	0.14	0.45	0.78	17.7
	-	-	0.17	0.48	0.55	21.7
	spezif. Abbauleistung (mg/h·gTG)					
Medium:	-	0.14	0.03	-	-	1.7
Ma + 1.0 % GS	-	0.24	0.19	-	-	3.7
+ 0.5 % YE	-	0.12	0.63	-	-	5.7
(ohne NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	-	0.28	0.92	0.05	-	9.7
	-	0.17	1.48	0.22	-	13.7
	-	0.15	1.52	0.81	-	17.7
	-	0.09	1.50	1.50	-	21.7

Auf beiden Medien ist erst gegen Ende der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase eine Abbauleistung messbar (vergl. auch Fig. 16).  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  hemmt die spezifische Abbauleistung um rund 50 %. Kleine Konzentrationen von Ammelin werden jedoch in Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  innerhalb von 5 Tagen nur partiell zu Cyanursäure umgesetzt. Wieso der "6.2-Test" auf dem Komplexmedium ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gegen Ende der Inkubationszeit zum Teil einen Anstieg der Ammelin/Ammelid-Konzentration (reproduzierbar!) ergab, wurde nicht weiter untersucht. Auf beiden Medien wurde erst bei einer Ammelinkonzentration von rund 10 - 15 ppm (= 80 - 120  $\mu\text{M}$ ) die maximale spezifische Abbauleistung erreicht (vergl. dazu Fig. 12). Die maximale spezifische Abbauleistung (1.5 mg/h·gTG) beträgt nur rund 5 % des Wertes, der mit wachsenden Zellen von Sporothrix schenckii Stamm 6.2 beim Cyanursäureabbau erreicht worden ist (vergl. Fig. 10). Wieso der vollständige Abbau von 1.7 - 2.5 ppm Ammelin auf dem Medium MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE in 2 Fällen 2 Tage (Fig. 16, Tab. 12) und in einem Fall 5 Tage (Fig. 17) erforderte, bleibt unklar. Bei allen 3 Experimenten betrug die  $\text{OD}_{546}$  bei Inkubationsbeginn rund 0.1 - 0.3.

### 3.3.6. Spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin von ruhenden Zellen des Stammes 123B

---

Der Stamm 123B wurde auf Komplexmedien mit und ohne Ammelin vorgezchtet. Da zum Zeitpunkt dieser Experimente noch nicht bekannt war, dass  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  den Ammelinabbau hemmt, wurde ein Komplexmedium mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gewählt. Bei einer bestimmten  $\text{OD}_{546}$  wurden die Zellen geerntet, mit Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert. Die Suspension wurde mit  $^{14}\text{C}$ -Ammelin versetzt und dessen Abbau zu Cyanursäure wurde bestimmt (Tab. 14). Die Werte der spezifischen Abbauleistung zeigen, dass die Aktivität im Verlaufe des Wachstums zunimmt (wie in Tab. 13) und dass die Enzyme nicht durch Ammelin induziert werden müssen. In einigen Suspensionen wurde festgestellt, dass erst nach 2 - 4 Stunden eine signifikante Produktion von Cyanursäure einsetzt. Es bestand somit die Möglichkeit, dass die abbauenden Enzyme erst in der Suspension gebildet werden. Deshalb wurde bei mehre-

Tab. 14: Spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin von ruhenden Zellen des Stammes 123B

Analytik: Bestimmung der <sup>14</sup>C-Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

Medium, auf dem der Stamm 123B vorgezüchtet wurde: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE	OD <sub>546</sub> der Kultur zum Zeitpunkt der Ernte	OD <sub>546</sub> der suspendierten Zellen	Zugabe von <sup>14</sup> C-Ammelin (ppm)	Abbau von Ammelin zu Cyanursäure		spezifische Abbauleistung (mg/h·gTG) <sup>1)</sup>
				%	Zeit (Stunden)	
-	0.96	18.7	7.7	6	30	< 0.01
+ 20 ppm Ammelin	0.93	19.0	7.7	6	30	< 0.01
-	4.8	21.1	7.7	19	27	0.01
+ 20 ppm Ammelin	4.7	17.4	7.7	17	27	0.01
-	10.0 <sup>2)</sup>	18.0	6.7	58	30	0.03
+ 20 ppm Ammelin	11.4 <sup>2)</sup>	18.4	6.7	81	30	0.03
-	10.0 <sup>2)</sup>	18.4 <sup>3)</sup>	6.7	44	30	0.02
+ 20 ppm Ammelin	11.4 <sup>2)</sup>	18.2 <sup>3)</sup>	6.7	50	30	0.02
-	16.0	19.4	7.6	85	24	0.05

1) Es wurde mit einem Trockengewicht von 0.3 mg/ml Kultur bei einer OD<sub>546</sub> von 1.0 gerechnet

2) Bei diesen Kulturen wurde nach der Zentrifugation auch die Aktivität des Ueberstandes geprüft.

Dabei konnte nie ein Abbau von Ammelin zu Cyanursäure beobachtet werden

3) Zusatz von 20 mM Chloramphenicol zur Zellsuspension um eine nachträgliche Enzymsynthese zu verhindern



ren Suspensionen Chloramphenicol zugegeben. Die spezifische Abbauleistung wurde dadurch um rund 30 % vermindert, war aber dennoch deutlich messbar. Die verzögerte Bildung der Cyanursäure dürfte somit darauf zurückzuführen sein, dass zuerst Ammelin zu Ammelid umgesetzt werden muss, das dann weiter zu Cyanursäure abgebaut wird (vergl. Fig.15). Da nach der Zentrifugation der Kulturen der Ueberstand nie eine Abbauprodukt aufwies, sind die Ammelin abbauenden Enzyme offenbar intrazellulär oder zellgebunden, sicher aber nicht extrazellulär lokalisiert.

### 3.3.7 Wachstum und Ammelinabbau des Stammes 123B auf Minimalmedien mit verschiedenen N-Quellen bei einem Zusatz von Thiamin

---

Wächst der Stamm 123B auf Komplexmedien, so können verschiedene Fragen bezüglich des Ammelinabbaus (u. a. Problem der Induktion) nur unzureichend abgeklärt werden, da die Bestandteile der Komplexmedien nicht genau definiert sind. Auf den bisher verwendeten Minimalmedien wiederum ist sowohl das Wachstum als auch die Abbauleistung des Stammes 123B sehr gering. Es war somit von Interesse, abzuklären, ob ein Zusatz von YE direkt für den Ammelinabbau notwendig ist (u. a. zur Induktion von Enzymen, als Co-Substrat), oder ob der Stamm 123B nur auf einzelne im YE enthaltenen Aminosäuren und/oder Vitamine zum Wachstum angewiesen ist.

In einer Reihe von Experimenten, bei denen der Einfluss verschiedener Aminosäuren und Vitamine auf das Wachstum des Stammes 123B untersucht wurde, ergab sich, dass der Stamm auf die Zugabe von Thiamin (=Vitamin B<sub>1</sub>) angewiesen ist. Bei einer Zugabe von 0.4 ppm Thiamin erreichte der Stamm 123B auf dem Medium MaN + 2.0 % Glukose innerhalb von 2 Tagen eine OD<sub>546</sub> von rund 10.0 ohne Thiamin blieb das Wachstum unter einer OD<sub>546</sub> von 1.0. Eine Erhöhung der Thiaminkonzentration erbrachte keine Steigerung der OD<sub>546</sub> (Daten nicht aufgezeichnet).

In der Folge wurde das Wachstum des Stammes 123B auf Minimalmedien mit verschiedenen N-Quellen und bei Zugabe von Thiamin bestimmt (Tab. 15). Auf Cytosin, Uracil und Barbitursäure wächst der Stamm sehr schlecht, was die in der Einleitung erwähnte Hypothese, wonach Ammelin über den Pyrimidin-Katabolismus abgebaut wird (vergl. Fig. 4), nicht stützt. Im weiteren wächst der Stamm auch auf Cyanursäure,  $\text{NaNO}_3$  und Adenin nicht oder zumindest sehr schlecht. Die Tatsache, dass Cyanursäure nicht als N-Quelle dienen kann, stimmt mit dem Befund überein, dass Cyanursäure durch den Stamm 123B nicht abgebaut werden kann (vergl. Tab. 2). Bei keiner N-Quelle ergaben sich Unterschiede beim  $\mu_{\text{max}}$  als Folge der Konzentration der N-Quelle. Deshalb wurde in Tab. 15 nur je 1 Wert aufgezeichnet.

Tab.15 Wachstum des Stammes 123B auf Minimalmedien mit verschiedenen N-Quellen bei Zugabe von Thiamin

Medium: Ma + 0.5 % Glukose + N-Quelle (0.05 resp. 0.1 %) + 0.4 ppm Thiamin

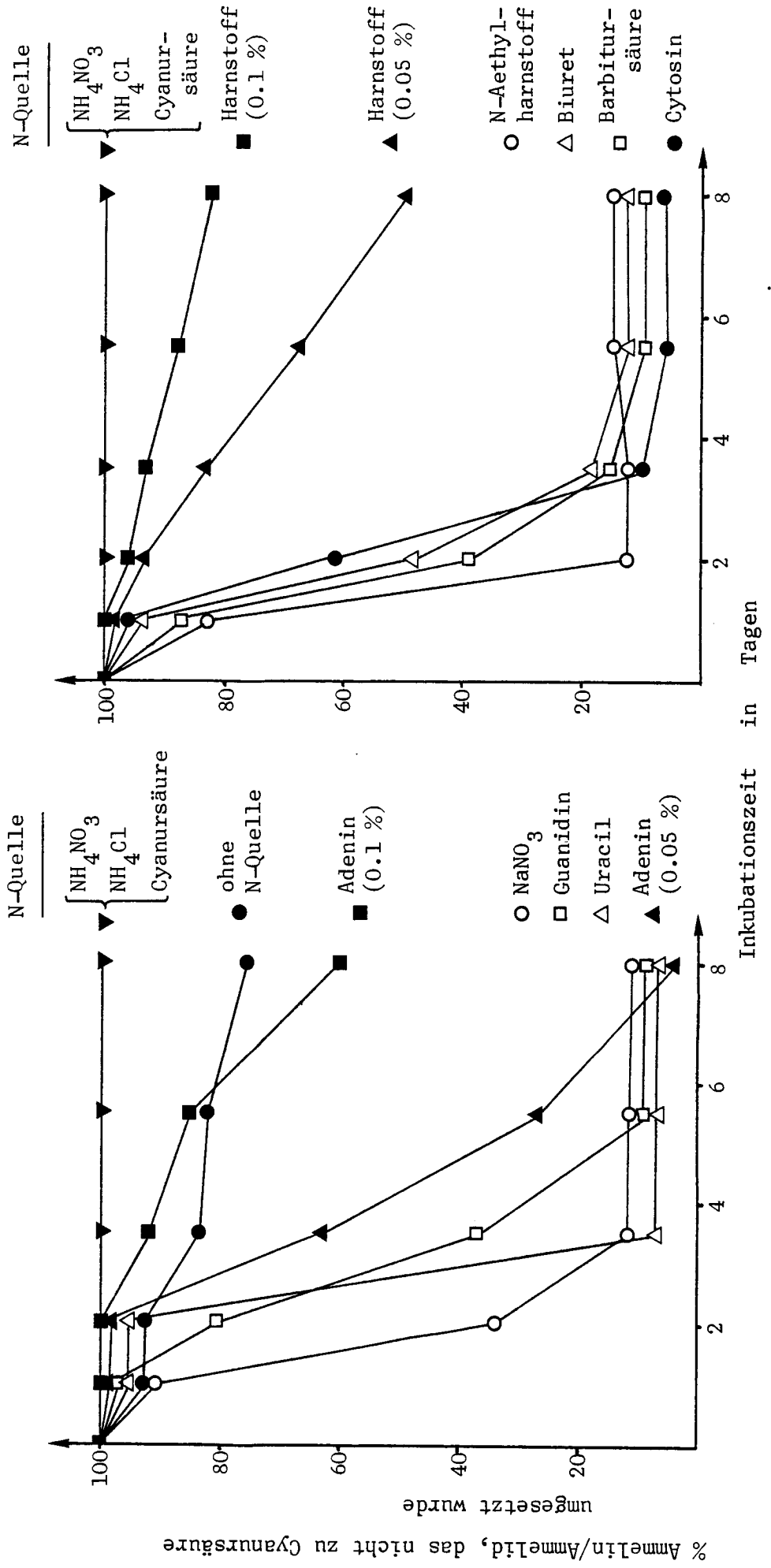
N-Quelle (0.05 und 0.1 %)	$\mu_{\text{max}}$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.30
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.29
$\text{NaNO}_3$	0.09
Cyanursäure	0
Adenin	0.06
Guanidin	0.23
Biuret	0.29
Harnstoff	0.28
N-Aethylharnstoff	0.24
Cytosin	0.12
Uracil	0.08
Barbitursäure	~0.04

Fig. 18: Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B bei Wachstum auf einem Minimalmedium mit verschiedenen N-Quellen und bei einem Zusatz von Thiamin

Medium: Ma + 1.0 % Glukose + N-Quelle (0.05 resp. 0.1 %) + 0.4 ppm Thiamin + 2.5 ppm  $^{14}\text{C}$ -Ammelin  
 Analytik: Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure mit Hilfe des "6.2-Tests"

Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten, wurden die Abbaukurven in 2 Graphen dargestellt

Falls bei der N-Quelle keine Konzentration angegeben wird, gilt dieselbe Abbaukurve für beide Konzentrationen der N-Quelle



In den folgenden Experimenten wurde der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch den Stamm 123B bei Wachstum auf verschiedenen N-Quellen bestimmt (Fig. 18). In Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und Cyanursäure wird kein Abbau festgestellt; alle anderen N-Quellen jedoch erlauben einen praktisch vollständigen oder zumindest partiellen Abbau. Obwohl der Stamm 123B auf  $\text{NaNO}_3$ , Cytosin, Uracil und Barbitursäure schlecht wächst (vergl. Tab. 15), wird auch bei diesen N-Quellen ein rascher Abbau festgestellt. Selbst in Abwesenheit einer N-Quelle wird Ammelin partiell zu Cyanursäure abgebaut; möglicherweise verwertet der Stamm 123B den beim Ammelinabbau freiwerdenden Stickstoff. Nur bei Adenin und Harnstoff ist die Abbauleistung von der Konzentration der N-Quelle abhängig.

In einem weiteren Experiment wurde der Ammelinabbau des Stammes 123B bei Wachstum auf gemischten N-Quellen untersucht. Der eine Teil der N-Quellen war  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0.05 %), der andere Teil war Biuret, Cytosin, Adenin, N-Aethylharnstoff, Guanidin, Uracil oder Barbitursäure (je 0.05 %). Dabei konnte auf keinem der Medien ein Abbau von Ammelin zu Cyanursäure festgestellt werden (Daten nicht aufgezeichnet). Vermutlich wird der Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch Ammoniumionen vollständig gehemmt.

### 3.4 Totalabbau von Ammelin und Ammelid zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub>

#### 3.4.1. Abbau von Ammelin durch Stachybotrys chartarum und Sporothrix schenkii

Die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 können Cyanursäure gut abbauen (vergl. Tab. 2) und eine Analyse des Ammelinabbaus mit Hilfe des "6.2-Tests" ist somit nicht sinnvoll. Deshalb wurde der Abbau von <sup>14</sup>C-Ammelin durch diese 4 Stämme untersucht, indem den Kulturen (je 1 Minimalmedium und 2 Komplexmedien mit und ohne NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) nach einer Inkubationszeit von 7.5 Tagen eine Probe entnommen und im Scintillationszähler ausgezählt wurde. Eine weitere Probe wurde zentrifugiert und die Radioaktivität des Sedimentes wurde nach dem Waschen mit einer 0.8 %igen NaCl-Lösung ebenfalls im Scintillationszähler bestimmt (Tab. 16). Die Daten zeigen, dass zumindest Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 Ammelin vermutlich direkt zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> abbauen kann. Bei den anderen Stämmen hingegen kann keine signifikante Abnahme der Radioaktivität im Medium beobachtet werden und ein direkter Abbau von Ammelin zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> ist somit unwahrscheinlich. Die Genauigkeit der Werte in Tab. 16 wurde jedoch durch mehrere Faktoren beeinträchtigt. Die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 bilden ein starkes Mycel, sodass die Entnahme einer homogenen Probe sehr schwierig ist. Dieselben Stämme produzieren einen dunklen Farbstoff (bei Stachybotrys chartarum als Huminsäure-ähnliche Polymere identifiziert, vergl. 36, 37), der die Zählflasche im Scintillationszähler und damit die Zählgenauigkeit reduziert. Alle 4 Stämme haben zudem die Fähigkeit, Ammelin mehr oder weniger zu akkumulieren (vergl. Kap. 3.3.1), wodurch möglicherweise die Zählgenauigkeit ebenfalls beeinträchtigt wird.

Beim Abbau von Ammelin durch die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und Sporothrix schenkii Stamm 6.2 konnte Ammelid stets deutlich nachgewiesen werden (Tab. 8). Zudem können diese Stämme Cyanursäure gut, Ammelin jedoch nicht zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> abbauen (Fig. 7, Tab. 16). Es darf somit angenommen werden, dass diese Stämme innerhalb der Abbausequenz Ammelin → CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> den Schritt von Ammelid zu Cyanursäure nicht durchführen können.

Tab. 16: Abbau von Ammelin durch die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin und die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2

Medien: I: MaN + 0.5 % GS      II: MaN + 0.1 % GS + 0.5 % YE  
 III: Ma + 1.0 GS + 0.5 % YE

Stamm	Medium	Zusatz von <sup>14</sup> C-Ammelin	Radioaktivität in der Kultur nach 7.5 Tagen	
			total (%)	nach Zentrifugation im Sediment (%)
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Haider	I	22 ppm (= 100 %)	99	< 1
	II		111	< 1
	III		101	6
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Martin	I		92	5
	II		103	2
	III		107	6
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm 6.2	I		95	28
	II		104	9
	III		102	4
<u>Sporothrix schenkii</u> Stamm CBS 472.48	I		55	50
	II		84	8
	III		31	18

Der Abbau von Ammelin durch Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 wurde im Folgenden mit Hilfe der Radiorespirometrie genauer untersucht. Dazu wurde der Stamm auf verschiedenen Medien mit verschiedenen Ammelinkonzentrationen inkubiert. Allfällig gebildetes CO<sub>2</sub> wurde über eine Woche hinweg in 0.1 N NaOH aufgefangen und anschliessend im Scintillationszähler ausgezählt. Nach einer Woche wurde auch je eine Probe der Kulturen ausgezählt. Eine weitere Probe wurde zentrifugiert und die Radioaktivität des Ueberstandes und des Sedimentes (nach dem Waschen mit einer 0.8 %igen NaCl-Lösung) wurde ebenfalls bestimmt (Tab. 17). Zusätzlich wurde auch das Wachstum von Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48

Tab. 17: Totalabbau von Ammelin zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> durch Sporothrix schenckii Stamm CBS 472.48

Medien: I: MaN + 0.5 % GS    II: MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE    III: Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE

Medium	Zusatz von <sup>14</sup> C-Ammelin	Radioaktivität nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen						Bilanz (%)	
		in der Kultur			als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> aufgefangen (%)				
		total (%)	nach Zentrifugation		im Ueberstand (%)	im Sediment (%)			
			im Ueberstand (%)	im Sediment (%)					
I	5.8 ppm (= 100 %)	50	6	44	5	-	45		
II		94	74	20	8	+	2		
III		9	4	5	74	-	17		
I	11.2 ppm (= 100 %)	81	25	56	10	-	9		
II		85	67	18	13	-	2		
III		49	29	20	40	-	11		
I	20.4 ppm (= 100 %)	71	5	66	4	-	25		
II		102	92	10	9	+	11		
III		22	12	10	68	-	10		

auf den verwendeten Medien geprüft. Der Stamm erreichte auf MaN + 0.5 % GS ein maximales Trockengewicht von 1.8 mg/ml, auf MaN + 1.0 % GS und 0.5 % YE von 6.3 mg/ml und auf Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE von 6.5 mg/ml. Diese Werte wurden innerhalb von 2 Tagen erreicht. Der Stamm wächst somit auf allen Medien gut, wobei jedoch das Trockengewicht auf den Komplexmedien rund 3.5x höher liegt als auf dem Minimalmedium. Die Werte in Tab. 17 zeigen, dass Ammelin auf allen Medien zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  abgebaut werden kann. In Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wird jedoch der Abbau um rund 70 - 90 % gehemmt (bezogen auf die Bildung von  $\text{CO}_2$ ). Die Ammelinkonzentration hat keinen signifikanten Einfluss auf den Abbau. Bei der Radioaktivitäts-Bilanz ergeben sich vorallem auf dem Minimalmedium stets grosse Verluste. Der Grund dieser Verluste liegt möglicherweise darin, dass Ammelin auf dem Minimalmedium stark akkumuliert wird und dadurch im Scintillationszähler nur noch zum Teil nachgewiesen werden kann. Mit einer Verbrennungsanalyse der Zellen könnte diese Radioaktivität vermutlich erfasst werden.

#### 3.4.2. Abbau von Ammelin und Ammelid durch eine Mischkultur von Stamm 123B und Sporothrix schenkii Stamm 6.2

---

In bisherigen Experimenten wurde gefunden, dass von allen geprüften Stämmen der Stamm 123B Ammelin am schnellsten zu Cyanursäure (Tab. 8, Fig. 16) und Sporothrix schenkii Stamm 6.2 Cyanursäure am schnellsten zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  (Tab. 2, Fig. 7) abbauen kann. Im folgenden Experiment wurde versucht, mit einer Mischkultur der beiden Stämme Ammelin und Ammelid direkt zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  abzubauen. Dazu wurden die beiden Stämme auf dem Medium Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE separat bis zu einer  $\text{OD}_{546}$  von 7.0 (= exponentielle Wachstumsphase) inkubiert und anschliessend mit demselben Medium auf eine  $\text{OD}_{546}$  von 1.0 verdünnt und in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Je 0.2 ml dieser Mischkulturen wurden in 4.0 ml Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE + 21 ppm  $^{14}\text{C}$ -Ammelin resp.  $^{14}\text{C}$ -Ammelid überimpft und weiter inkubiert. Die  $\text{OD}_{546}$  sowie die totale Radioaktivität



Tab. 18: Totalabbau von Ammelin und Ammelid zu CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> durch eine Mischkultur von Stamm 123B und Sporothrix schenckii Stamm 6.2

Medium: Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE + 21 ppm <sup>14</sup>C-Ammelin resp. <sup>14</sup>C-Ammelid  
 Analytik: Bestimmung der im Medium verbliebenen Radioaktivität

%--Anteile des Stammgemisches		% Radioaktivität in Medien mit <sup>14</sup> C-Ammelin			% Radioaktivität in Medien mit <sup>14</sup> C-Ammelid				
123B	<u>S. schenckii</u> Stamm 6.2	Inkubations- beginn	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 3 Tagen	Inkubations- beginn	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 3 Tagen
100	0		100	100	100		100	100	100
95	5		100	8	7		98	4	4
90	10		100	9	8		99	4	4
80	20		98	12	11		94	3	3
70	30		92	15	13		83	2	2
60	40	100 %	84	11	10	100 %	78	2	2
50	50	(21 ppm)	87	12	11	(21 ppm)	80	3	2
40	60		83	15	14		87	3	2
30	70		85	19	18		86	3	2
20	80		90	28	26		100	10	3
10	90		92	41	37		97	22	3
5	95		99	61	47		100	49	19
0	100		100	100	100		100	100	100
OD <sub>546</sub> der Kulturen		0.05	13.8	24.3	24.0	0.05	13.8	24.3	24.0

dieser Kulturen wurden nach 1, 2 und 3 Tagen bestimmt (Tab. 18). Da die  $OD_{546}$  in allen Kulturen praktisch gleich war, wurde in Tab. 18 nur ein Mittelwert angegeben. Sowohl Ammelin als auch Ammelid können durch die Mischkultur praktisch vollständig zu  $CO_2$  und  $NH_3$  abgebaut werden. In Medien mit Ammelin verbleibt nach 3 Tagen eine Rest-Radioaktivität von 10 %, bei Ammelid jedoch beträgt die Rest-Radioaktivität nur rund 2 %. Der Grund für diese Differenz liegt möglicherweise darin, dass Ammelin (im Gegensatz zu Ammelid) durch Sporothrix schenkii Stamm 6.2 akkumuliert wird (vergl. Kap. 3.3.1. und Tab. 16) und somit für den Abbau nur beschränkt verfügbar ist. Bei einem Anteil von weniger als 30 % des Stammes 123B an der Mischkultur sinkt die Abbauleistung deutlich. Dies ist auf Grund der verschiedenen Abbauleistungen des Stammes 123B (1.5 mg/h·gTG, vergl. Tab. 13) und von S. schenkii Stamm 6.2 (30 mg/h·gTG, vergl. Fig. 10) zu erwarten.

### 3.5 Experimente im Bereich der Abbausequenz

Atrazin/OH-Atrazin  $\longrightarrow$  Ammelin/Ammelid

---

#### 3.5.1. Abbau von Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelid und N-Isopropylammelid durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Minimalmedium

---

Bei rund 60 der insgesamt 200 isolierten Stämme (vergl. Fig. 5 und 6) und bei den in Kap. 2.1.2. erwähnten Sammlungsstämmen (mit Ausnahme von Hendersonula toruloidea Stamm Martin und Sporothrix schenkii Stamm CBS 359.36) wurde das Abbauverhalten gegenüber N-Aethylammelid und N-Isopropylammelid bei Wachstum auf einem Minimalmedium geprüft (Tab. 19). Bei keinem der geprüften Stämme konnte je eine signifikante Dealkylierung von N-Aethylammelid oder N-Isopropylammelid zu Ammelin beobachtet werden. Deshalb wurde in Tab. 19 nur der prozentuale Umsatz von N-Aethylammelid zu N-Aethylammelid resp. von N-Isopropylammelid zu N-Isopropylammelid angegeben. Während N-Isopropylammelid nur schwach (16 % in 70 Tagen durch den Stamm 6.22) deaminiert wurde, konnten mehrere Stämme N-Aethylammelid innerhalb von 14 - 50 Tagen zu rund 20 - 50 % deaminieren (insbesondere die Stämme 2.2, 2.20, 6.22, Penicillium notatum Stamm M 2544 und Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48). Eine Dealkylierung der entstandenen Dihydroxy-Triazine konnte nie nachgewiesen werden.

Bei allen in Tab. 19 erwähnten Stämmen wurde in der Folge auch das Abbauverhalten gegenüber Atrazin und OH-Atrazin bei Wachstum auf einem Minimalmedium geprüft (Tab. 20). Bei keinem der geprüften Stämme konnte je eine signifikante Dealkylierung von OH-Atrazin beobachtet werden. Deshalb wurde in Tab. 20 bei OH-Atrazin auf die genaue Angabe der quantitativen Werte verzichtet. Atrazin hingegen wurde von mehreren Stämmen deutlich dealkyliert. Insbesondere bei den Aspergillus fumigatus Stämmen M 429, M 475 und M 8809 konnten nach 52 Tagen rund 20 - 50 % dealkylierte Produkte nachgewiesen werden, wobei das Verhältnis von deaethyliertem Atrazin zu deisopropyliertem Atrazin bei allen 3 Stämmen rund 7 : 1 betrug. Daneben konnten auch Spuren (<2%) von vermutlich doppelt dealkyliertem Atrazin (2-Chlor-4,6-Diamino-Triazin) nachgewiesen werden, die jedoch nicht genau identifiziert werden konnten, da

Tab. 19: Abbau von N-Aethylammelmin und N-Isopropylammelmin durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Minimalmedium<sup>1)</sup>

Medium: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 3 - 6 ppm <sup>14</sup>C-Triazin-Derivat  
 Analytik: TLC<sup>2)</sup>

Stamm	Abbau von N-Aethylammelmin zu N-Aethylammelid		Abbau von N-Isopropylammelmin zu N-Isopropylammelid	
	Tage	%	Tage	%
2.2	50	22	70	7
2.20	50	49	70	8
6.1, 8.1	50	< 5	50	< 5
6.15	50	15	50	< 5
6.22	50	27	70	15
1, 44, 118B, 123B	28	< 5	28	< 5
<u>Rhizopus stolonifer</u>				
Stämme M 2669, M 2670 M 2679, M 2875	75	< 5	75	< 5
<u>Aspergillus fumigatus</u>				
Stämme M 429, M 475, M 8809	75	7	75	< 5
<u>Penicillium notatum</u>				
Stamm M 2544	75	31	75	< 5
<u>Stachybotrys chartarum</u>				
Stämme Haider und Martin	14	< 5	14	< 5
<u>Sporothrix schenkii</u>				
Stamm CBS 472.48	14	30	14	< 5
Stamm 6.2	60	10	60	< 5

1) Da keiner der geprüften Stämme N-Aethylammelmin oder N-Isopropylammelmin dealkylieren konnte, wurden nur die Deaminierungen aufgezeichnet

2) Auf TLC-Platten lassen sich N-Aethylammelmin und N-Aethylammelid resp. N-Isopropylammelmin und N-Isopropylammelid nur schlecht auftrennen und quantitative Angaben über die Verteilung der Metabolite sind somit relativ ungenau

Tab. 20: Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Minimalmedium

Medium: MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 3 - 6 ppm <sup>14</sup>C-Triazin-Derivat  
 Analytik: TLC

Edukt Stamm	Atrazin				OH-Atrazin	
	% Edukt/Produkt nach Tagen	Tage	Atrazin	Deal- kylierte Produkte	Polare Produkte	
2.2, 2.20	67	14 - 29	4	67 - 82	Nach Inkubationszeiten von 14 - 75 Tagen wurde bei keinem der Stämme ein signifikanter Abbau beobachtet	
6.1, 6.15	67	60 - 86	0	14 - 40		
6.22, 8.1	67	47 - 62	6	32 - 47		
1, 44, 118B, 123B	28	68 - 92	0	8 - 32		
<u>Rhizopus stolonifer</u>						
Stamm M 2669	52	75	18	7		
Stamm M 2670	52	84	8	9		
Stämme M 2679 und M 2875	52	79 - 86	5	9 - 16		
<u>Aspergillus fumigatus</u>						
Stamm M 429	52	17	31	52		
Stamm M 475	52	60	22	18		
Stamm M 8809	52	26	51	23		
<u>Penicillium notatum</u>						
Stamm M 2544	14	79	11	10		
<u>Stachybotrys chartarum</u>						
Stämme Haider und Martin	14	66 - 81	7	13 - 27		
<u>Sporothrix schenkii</u>						
Stamm CBS 472.48	14	77	5	18		
Stamm 6.2	67	53	6	41		

keine Referenzproben zur Verfügung standen. Im Gegensatz zu A. fumigatus war bei Rhizopus stolonifer Stamm M 2669 deisopropyliertes Atrazin das hauptsächlichste dealkylierte Produkt. Nachträglich wurde festgestellt (Daten nicht aufgezeichnet), dass bei vielen Stämmen die Konzentration von dealkyliertem Atrazin einen bestimmten Höchstwert erreicht und nachher wiederum absinkt. Vermutlich wird dealkyliertes Atrazin dechloriert und somit zu polaren Produkten umgesetzt. Beispielsweise wurde bei den Stämmen 6.22 und 8.1 nach 14 Tagen 15 resp. 24 % dealkyliertes Atrazin (und rund 15% polare Produkte) gefunden, während nach 67 Tagen nur noch rund 6 % dealkyliertes Atrazin (und rund 40 % polare Produkte) nachgewiesen werden konnte. Die Werte in Tab. 20 können also nur bedingt miteinander verglichen werden.

Alle Verbindungen, die beim Flussmittel Nr. 1 (Vergl. Kap. 2.4.1.) einen Rf-Wert von 0 - 0.1 aufwiesen, wurden in Tab. 20 als "polare Produkte" bezeichnet. Bei A. fumigatus Stamm M 429 wurden die polaren Produkte zum Teil identifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 52 Tagen wies der Stamm insgesamt 52 % polare Produkte auf (Tab. 20), davon waren 17 % N-Isopropylammelid, 16 % OH-Atrazin (und evtl. Anteile von N-Aethylammelid), 3 % N-Aethylammelid und 16 % nicht identifizierbare Produkte (vermutlich u. a. N-Isopropylammelid, Ammelin, Ammelid). Diese Verbindungen dürften durch eine Dechlorierung der entsprechenden Chlor-Triazine entstanden sein, da eine Dealkylierung von Hydroxy-Triazinen nicht beobachtet werden konnte (vergl. Tab. 19 und 20). Inwieweit an der Dechlorierung chemische und/oder enzymatische Reaktionen beteiligt sind, kann auf Grund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Die Stämme 2.20 und 8.1 und die Sporothrix schenckii Stämme CBS 472.48 und 6.2 waren fähig, Ammelin gut zu akkumulieren (vergl. Kap. 3.3.1). Deshalb wurde geprüft, ob diese Stämme möglicherweise auch Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelid und/oder N-Isopropylammelid akkumulieren können. Dazu wurden die Stämme auf dem Medium MaN + 0.5 % GS + 5 ppm YE + 3 - 6 ppm <sup>14</sup>C-Triazin-Derivat inkubiert. Nach 7 Tagen wurde eine Probe der Kultur zentrifugiert und das Sediment wurde (nach dem Waschen mit einer 0.8 %igen NaCl-Lösung) im Scintillationszähler ausgezählt.

Alle 4 Stämme zeigten bei N-Aethylammelmin rund 10 % der eingesetzten Radioaktivität im Sediment. N-Isopropylammelmin wurde nur vom Stamm 8.1 schwach (rund 6 %) akkumuliert. Atrazin und OH-Atrazin wurden von keinem der Stämme akkumuliert

### 3.5.2. Abbau von Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelmin und N-Isopropylammelmin durch verschiedene Stämme bei Wachstum auf einem Komplexmedium

---

In bisherigen Experimenten zeigte sich mehrfach, dass die Abbauleistung verschiedener Stämme bei Wachstum auf einem Komplexmedium stark zunehmen kann (vergl. u.a. Fig. 7, Tab. 8). Deshalb wurde das Abbauverhalten der in Tab. 19 und 20 erwähnten Stämme (mit Ausnahme von Rhizopus stolonifer) gegenüber Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelmin und N-Isopropylammelmin bei Inkubation auf einem Komplexmedium ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  geprüft (Tab. 21). Dabei wurden nur noch Inkubationszeiten von maximal 4 Wochen gewählt, weil inzwischen festgestellt wurde, dass beispielsweise beim Abbau von Atrazin durch Aspergillus fumigatus die Konzentration der dealkylierten Produkte nach 1 - 3 Wochen einen Höchstwert erreicht (Daten nicht aufgezeichnet). Auch die prozentuale Verteilung der Produkte beim Abbau von N-Aethylammelmin durch die Stämme 2.20 und 6.22 erfährt nach 2 Wochen keine wesentlichen Änderungen mehr (Daten nicht aufgezeichnet).

Wie schon erwähnt (Kap. 3.5.1.), lassen sich beim Abbau von Atrazin die Konzentrationen der dealkylierten Produkte bei Experimenten mit verschiedenen Inkubationszeiten nur bedingt miteinander vergleichen. Trotzdem zeigen die Daten in Tab. 20 und 21, dass sich beim Abbau von Atrazin bei einem Wechsel von einem Minimalmedium zu einem Komplexmedium qualitativ wenig ändert.

OH-Atrazin wurde auch bei Inkubation auf einem Komplexmedium von keinem der Stämme dealkyliert. In Tab. 21 wurde deshalb auf eine detaillierte Darstellung der Werte verzichtet.

Eine Dealkylierung von N-Aethylammelmin und N-Isopropylammelmin konnte ebenfalls bei keinem der Stämme beobachtet werden. Deshalb wurde in Tab. 21 stets nur der prozentuale Umsatz von N-Aethylammelmin zu N-Aethyl-

Tab. 21: Abbau von Atrazin, OH-Atrazin, N-Aethylammelin und N-Isopropylammelin auf einem Komplexmedium ohne NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

Edukt	Atrazin		OH-Atrazin	N-Aethylammelin		N-Isopropylammelin	Inkubationszeit (Tage)
	Atrazin	Deal-kylierte Produkte		Polare Produkte	N-Aethylammelin		
	Medium: Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE + 3 - 6 ppm <sup>14</sup> C-Triazin-Derivat						
	Analytik: TLC						
% Edukt/Produkt	Nie ein signifikanter Abbau beobachtet						
Stamm							
2.2, 6.1	50 - 59	7 - 10	34 - 40	< 5	< 5	< 5	14
2.20, 6.22	50 - 56	4 - 9	30 - 41	21	< 5	< 5	14
6.15	45	6	49	16	< 5	< 5	14
8.1	37	26	37	< 5	< 5	< 5	14
1, 44, 118B	nicht	bestimmt		12 - 18	< 5	< 5	28
123B	80	0	20	100	60	60	28
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 429	45	15	40	< 5	< 5	< 5	14
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 475	34	26	40	< 5	< 5	< 5	14
<u>Aspergillus fumigatus</u> Stamm M 8809	18	43	39	8	< 5	< 5	14
<u>Penicillium notatum</u> Stamm M 2544	62	3	35	18	< 5	< 5	14
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Haider	58	15	27	16	< 5	< 5	14
<u>Stachybotrys chartarum</u> Stamm Martin	56	7	37	34	< 5	< 5	14
<u>Sporothrix schenckii</u> Stamm CBS 472.48	56	5	39	29	< 5	< 5	14
<u>Sporothrix schenckii</u> Stamm 6.2	50	12	38	16	< 5	< 5	14



ammelid resp. von N-Isopropylammelin zu N-Isopropylammelid aufgezzeichnet. Dabei fällt auf, dass der Stamm 123B innerhalb von 28 Tagen N-Aethylammelin zu 100 % und N-Isopropylammelin zu 60 % deaminieren konnte, während bei Wachstum auf einem Minimalmedium keine signifikante Deaminierung der beiden Verbindungen nachweisbar war (vergl. Tab. 19). Auch die Stämme 1, 44, 118B und die Stachybotrys chartarum Stämme Haider und Martin zeigen eine wesentliche Steigerung der Abbauleistung gegenüber N-Aethylammelin im Vergleich zum Wachstum auf einem Minimalmedium.

Das Abbauverhalten der Stämme 1, 44, 118B und 123B gegenüber N-Aethylammelin und N-Isopropylammelin wurde nachträglich noch genauer untersucht (Daten nicht aufgezeichnet). Dazu wurde der Abbau auf den Medien MaN + 1.0 % GS + 0.5 % YE resp. Ma + 1.0 % GS + 0.5 % YE über mehrere Wochen hinweg verfolgt. Die Stämme 1, 44 und 118B zeigten auf beiden Medien dieselben Abbauleistungen. Der Stamm 123B jedoch deaminierte N-Aethylammelin und N-Isopropylammelin auf dem Komplexmedium ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  rund doppelt so schnell wie auf dem Komplexmedium mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . In Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wurden N-Aethylammelin innerhalb von rund 28 Tagen und N-Isopropylammelin innerhalb von rund 50 Tagen vollständig zu den entsprechenden Dihydroxy-Triazinen deaminiert.

### 3.5.3. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch Aspergillus fumigatus bei Wachstum auf verschiedenen Medien

---

Bisher wurde gezeigt (Tab. 19, 20, 21), dass bei Wachstum auf einem Minimalmedium mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  oder einem Komplexmedium ohne  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  keiner der getesteten Stämme fähig ist, Hydroxy-Derivate von Atrazin (OH-Atrazin, N-Aethylammelin, N-Isopropylammelin) zu dealkylieren. Atrazin hingegen konnte durch mehrere Stämme, vorallem aber Aspergillus fumigatus, gut dealkyliert werden. Es war somit naheliegend, insbesondere mit A. fumigatus zu versuchen, eine Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten von Atrazin zu erreichen. Um abzuklären, ob sich durch Zugabe eines Strukturanalogen eine Dealkylierung erzielen lässt, wurde der

Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch die A. fumigatus Stämme M 429, M 475 und M 8809 in Anwesenheit von N-Aethylharnstoff als zusätzlicher (neben  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) oder einziger N-Quelle untersucht (Tab. 22). Zum Vergleich wurde nochmals der Abbau von Atrazin und OH-Atrazin bei Wachstum auf einem Minimalmedium (analog Tab. 20) und auf einem Komplexmedium (analog Tab. 21, jedoch mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) überprüft. Die Werte in Tab. 22 zeigen, dass ein Zusatz von N-Aethylharnstoff nicht zum Abbau von OH-Atrazin führt und auch den Abbau von Atrazin praktisch nicht beeinflusst. Bei den nicht identifizierten Produkten des Atrazinabbaus handelt es sich vermutlich zum grössten Teil um doppelt dealkyliertes Atrazin (Rf-Wert von 0.1 - 0.4 bei Flussmittel Nr. 1). Auf dem Komplexmedium wird Atrazin wesentlich besser abgebaut als auf den Minimalmedien. Es zeigte sich jedoch (Daten nicht aufgezeichnet), dass auf dem Komplexmedium auch das Wachstum von A. fumigatus bedeutend besser ist als auf den Minimalmedien. Beispielsweise erreicht A. fumigatus Stamm M 8809 auf dem Komplexmedium ein maximales Trockengewicht von 7.3 mg/ml, während auf den Minimalmedien das Trockengewicht im Bereich von 1.7 - 2.0 mg/ml liegt. Die spezifische Abbauleistung auf dem Komplexmedium dürfte also eher geringer sein als auf den Minimalmedien.

Die in Tab. 20, 21 und 22 dargestellten Werte für den Atrazinabbau durch A. fumigatus bei Wachstum auf Minimal- resp. Komplexmedien stimmen schlecht überein. Offenbar wird bei längeren Inkubationszeiten der Abbau durch Faktoren (u.a. Belüftung, Verklumpung des Mycels, nicht-enzymatische Reaktionen, Lyse der Zellen) beeinflusst, die nur schwer kontrollierbar sind.

#### 3.5.4. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch Aspergillus fumigatus bei tiefen pH's

---

Während der Triazinring bei Atrazin eine aromatische Struktur aufweist, liegt OH-Atrazin überwiegend in der Ketoform vor (20). Im weiteren dürfte der induktive Effekt des C2-Substituenten auf die N-Alkyl-Bindung

Tab. 22: Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch Aspergillus fumigatus bei Wachstum auf verschiedenen Medien

Analytik: TLC Inkubationszeit: 28 Tage

Stamm	Edukt (2 ppm)	% Edukt/Produkt	Medium	MaN + 0.5% GS	MaN + 0.5% GS + 0.1% N-Aethylharnstoff	Ma + 0.5% GS + 0.1% N-Aethylharnstoff	MaN + 1.0% GS + 0.5% YE
<u>A. fumigatus</u> Stamm M 429	<sup>14</sup> C- Atrazin	Atrazin	66	65	60	19	
		Deaethyl-Atrazin	18	19	26	25	
		Deisopropyl-Atrazin	2	3	4	3	
		Polare Produkte	12	10	7	51	
		Nicht identifiziert	2	3	3	2	
<u>A. fumigatus</u> Stamm M 475	<sup>14</sup> C- Atrazin	Atrazin	63	57	67	18	
		Deaethyl-Atrazin	23	24	20	39	
		Deisopropyl-Atrazin	2	4	2	5	
		Polare Produkte	10	12	8	36	
		Nicht identifiziert	2	3	3	2	
<u>A. fumigatus</u> Stamm M 8809	<sup>14</sup> C- Atrazin	Atrazin	6	7	6	1	
		Deaethyl-Atrazin	67	56	73	47	
		Deisopropyl-Atrazin	7	6	7	4	
		Polare Produkte	17	28	10	44	
		Nicht identifiziert	3	3	4	4	
<u>A. fumigatus</u> Stämme M 429, M 475, M 8809	<sup>14</sup> C-OH- Atrazin	Nie ein signifikanter Abbau beobachtet					

bei Atrazin grösser sein als bei OH-Atrazin. Möglicherweise ist die im Vergleich zu Atrazin erhöhte Persistenz von OH-Atrazin (vergl. Tab. 20, 21, 22) auf diese chemischen Unterschiede zurückzuführen. Im Folgenden wurde abgeklärt, ob diese chemischen Eigenschaften bei einem tiefen pH insofern verändert werden, dass ein Abbau von OH-Atrazin durch Aspergillus fumigatus möglich wird. Vor-erst wurde das Wachstum von A. fumigatus Stamm M 8809 auf dem Medium MaN + 0.5 % GS in einem pH-Bereich von 3 - 7 bestimmt. Dabei ergab sich über den gesamten pH-Bereich ein maximales Trockengewicht von 1.7 - 2.0 mg/ml. Das Wachstum des Stammes wird somit durch einen tiefen pH nicht beeinflusst. Anschliessend wurde A. fumigatus Stamm M 8809 unter denselben Bedingungen (MaN + 0.5 % GS, pH 3 - 7) in Anwesenheit von  $^{14}\text{C}$ -Atrazin resp.  $^{14}\text{C}$ -OH-Atrazin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Tagen wurden die Medien mit Hilfe von TLC analysiert. Dabei konnten bei Atrazin über den gesamten pH-Bereich stets rund 10 % dealkylierte und 16 - 37 % polare Produkte (keine signifikante Abhängigkeit vom pH-Wert feststellbar!) nachgewiesen werden, während bei OH-Atrazin über den gesamten pH-Bereich nie ein Abbau beobachtet wurde (Daten nicht aufgezeichnet).

#### 3.5.5. Abbau von Atrazin und OH-Atrazin durch Enzympräparate von Aspergillus fumigatus

---

Möglicherweise wird OH-Atrazin von Aspergillus fumigatus nicht abgebaut, weil es von den Zellen nicht aufgenommen werden kann. Deshalb wurde versucht, mit aufgeschlossenen Zellen von A. fumigatus eine Dealkylierung von OH-Atrazin zu erzielen. Dazu wurde A. fumigatus Stamm M 8809 auf dem Medium MaN + 0.5 % GS + 30 ppm Atrazin (zur allfälligen Induktion von dealkylierenden Enzymen) inkubiert, bei einem Feuchtgewicht von 5.3 mg/ml geerntet, mit Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.0) gewaschen und in demselben Puffer suspendiert (30 %ige Suspension). Die suspendierten Zellen wurden mit 2 mM PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid, Proteaseninhibitor) versetzt und mit der French-

Press (Aminco) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde in 4 Teile (A - D) aufgetrennt.

- Teile A und B wurden direkt mit  $^{14}\text{C}$ -Atrazin resp.  $^{14}\text{C}$ -OH-Atrazin versetzt

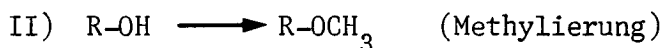
- Teile C und D wurden zentrifugiert (40'000g, 30min). Die Ueberstände wurden mit  $^{14}\text{C}$ -Atrazin resp.  $^{14}\text{C}$ -OH-Atrazin versetzt

Alle 4 Gemische wurden inkubiert und nach 15 Stunden und nach 6 Tagen mit Hilfe von TLC analysiert. Dabei konnte weder ein Abbau von Atrazin noch von OH-Atrazin festgestellt werden. Möglicherweise sind die dealkylierenden Enzyme membrangebunden und/oder sauerstoffempfindlich (bei Oxygenasen möglich) und somit durch den Aufschluss zerstört worden. Vielleicht sind die Enzyme aber auch auf den Zusatz von Coenzymen (u.a. NADPH) angewiesen, wie das von Laanio (27) bei der Dealkylierung von Dinitraminen durch A. fumigatus gezeigt wurde.

### 3.5.6. Abbau von Methoxy-Triazinen und reduzierten Triazinen durch Aspergillus fumigatus

---

Mehrere Mikroorganismen wurden beschrieben (43), die bei verschiedenen Molekülen folgende Transformationen ausführen:



Würden diese Transformationen auch bei OH-Atrazin gelingen und wäre eine Dealkylierung der entsprechenden Produkte möglich, so könnte OH-Atrazin über diese "Umwege" abgebaut werden. Versuche, die genannten Transformationen bei OH-Atrazin durchzuführen, sind jedoch nur sinnvoll, falls die entsprechenden Produkte schnell und vollständig dealkyliert werden können. Deshalb wurde im Folgenden der Abbau von 2-Hydro-4-Aethylamino-6-Isopropylamino-Triazin (= reduziertes Ametryn) und 2-Methoxy-4-Aethylamino-6-Isopropylamino-Triazin (= Atraton) durch die Aspergillus fumigatus Stämme M 429, M 475 und M 8809 untersucht. Dazu wurden die Stämme auf dem Medium MaN + 0.5 % GS in Anwesenheit von

reduziertem <sup>14</sup>C-Ametryn resp. Atraton (nur unmarkiert zur Verfügung) inkubiert. Nach 21 Tagen wurden die Kulturen mit Hilfe von TLC (und Anfärben der Atraton-Proben) analysiert. A. fumigatus Stamm M 8809 zeigte bei reduziertem Ametryn und bei Atraton rund 10 - 20 % dealkylierte Produkte. Die A. fumigatus Stämme M 429 und M 475 dealkylierten die beiden Verbindungen ebenfalls, jedoch zu weniger als 10 % (Daten nicht aufgezeichnet). Da diese Abbauleistungen sehr gering sind, erscheint es auch nicht lohnend, bei OH-Atrazin die genannten Transformationen durchzuführen.

## 4. Diskussion

---

### 4.1. Dealkylierung von Triazin-Derivaten

---

In der vorliegenden Arbeit (Kap. 3.1., 3.5.) und in der Literatur (vergl. Einleitung) konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine mikrobielle Dealkylierung von Triazin-Derivaten mit einem Chlor-, Methoxy-, Methylthio- oder Wasserstoff-Substituenten in C2-Position möglich ist. Eine Dealkylierung von Triazin-Derivaten mit einer Hydroxygruppe in C2-Position konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der Grund für diese Persistenz ist bisher unbekannt und insbesondere folgende Punkte bedürfen einer weiteren Bearbeitung:

- Die hydrolytische Abspaltung des C2-Substituenten von Triazin-Herbiziden verändert die chemischen Eigenschaften des gesamten Moleküls. Der aromatische Charakter des Triazinrings geht weitgehend verloren. Auch der induktive Effekt des C2-Substituenten auf die N-Alkylbindung dürfte durch eine Hydroxylierung verändert werden. Es ist somit nicht auszuschließen, dass beispielsweise Atrazin und OH-Atrazin durch völlig verschiedene Enzyme dealkyliert werden, die zudem auch verschiedenen Regulations-Mechanismen unterliegen. Möglicherweise reprimiert Glukose die Dealkylierung von OH-Atrazin, nicht jedoch die Dealkylierung von Atrazin. In der Literatur finden sich mehrere Hinweise für eine Repression der Dealkylierung von schwer abbaubaren Verbindungen durch Glukose (46, 47). Die Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten wurde bisher meistens in Medien geprüft, die Glukose als C-Quelle enthielten. Möglicherweise liesse sich bei Wachstum auf anderen C-Quellen eine Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten erzielen.
- Die Anreicherung von Mikroorganismen in Medien, die N-Alkyl-Triazine als einzige C-Quelle enthalten, wurde mit ungünstigen Methoden durchgeführt (Fig. 5, 6). Um ein gutes Wachstum zu erreichen, wurden hohe Konzentrationen von Triazin-Derivaten zugegeben, die unter Umständen toxisch wirkten. Abgesehen davon zeigte sich nachträglich, dass auf Grund der sehr geringen Abbauleistungen praktisch kein Wachstum zu

erwarten ist. Die bisher maximal erreichte spezifische Abbauleistung im Bereich der Dealkylierungen wurde von Aspergillus fumigatus erbracht und beträgt nur wenige  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{gTG}$  (abgeschätzt auf Grund des Atrazinabbaus, Tab. 22). Mit Hilfe eines Chemostaten liessen sich möglicherweise Mikroorganismen anreichern, die N-Alkyl-Triazine gut dealkylieren und als einzige C-Quelle verwerten können. Zudem könnte in einem Chemostaten ein Triazin-Derivat, das gut dealkyliert wird, langsam durch ein Hydroxy-Derivat ersetzt und somit eine Adaption versucht werden (vergl. 48, 49).

- Möglicherweise werden Hydroxy-Derivate durch Enzyme mit einer breiten Substratspezifität dealkyliert, die jedoch nicht durch Hydroxy-Derivate selbst, sondern nur durch Strukturanaloge induziert werden können (vergl. 50, 51, 52). Wie in Tab. 22 gezeigt wird, führt die Zugabe von N-Aethylharnstoff nicht zu einer Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten. Auch Atrazin selbst kann die zur Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten notwendigen Enzyme nicht induzieren, denn beim Abbau von Atrazin konnte mehrfach OH-Atrazin als nicht mehr weiter abbaubares Nebenprodukt nachgewiesen werden (Kap. 3.5.1.). Im weiteren konnte auch mit einer Zugabe von Hefeextrakt keine Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten erzielt werden. Die Wirkung von weiteren möglichen Induktoren wurde bisher nicht untersucht.
- Nicht eindeutig abgeklärt wurde bisher, ob Verbindungen wie OH-Atrazin, N-Aethylammelín und N-Isopropylammelín von Mikroorganismen aufgenommen werden können. Da jedoch viele Organismen (vor allem der Stamm 123B, Tab. 19, 21) N-Aethylammelín und N-Isopropylammelín gut deaminieren können, ist anzunehmen, dass diese Verbindungen aufgenommen werden. Die Deaminierung von Ammelín durch den Stamm 123B erfolgt durch Enzyme, die intrazellulär lokalisiert oder an die Zellmembran gebunden sind (Tab. 14). Eine Deaminierung von N-Aethylammelín und N-Isopropylammelín durch extrazelluläre Enzyme ist somit unwahrscheinlich. Sollte es sich aber trotzdem zeigen, dass einige Hydroxy-Derivate



nicht aufgenommen werden können, so müsste mit permeabilisierten Zellen oder mit Zellextrakten gearbeitet werden. Der in Kap. 3.5.5. beschriebene Abbauersuch mit Zellextrakten sagt wenig aus, da neben OH-Atrazin auch Atrazin nicht abgebaut werden konnte, weil vermutlich die zur Dealkylierung notwendigen Coenzyme nicht zugegeben wurden (vergl. 27).

- Der Abbau von Hydroxy-Derivaten unter anaeroben Bedingungen wurde im Verlaufe der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, und in der Literatur finden sich keine Hinweise für eine Beschleunigung des Abbaus unter anaeroben Bedingungen (vergl. Einleitung). Da die Dealkylierung vermutlich ein oxydativer Prozess ist (vergl. Einleitung), kann eine Dealkylierung unter anaeroben Bedingungen kaum erwartet werden. Nicht auszuschliessen ist jedoch, dass in einem stark reduzierenden Milieu der Triazinring hydriert wird. Ein weiterer Abbau eines vollständig hydrierten Triazinrings dürfte keine Schwierigkeiten bieten. Triazin-Derivate würden dabei nicht über den in Fig. 3 aufgezeichneten Abbaueg metabolisiert.

#### 4.2. Einfluss von Ammoniumionen auf die Deaminierung von Triazin-Derivaten und auf den Abbau von Cyanursäure

---

Die Aktivitäten sämtlicher Abbauschritte von Sporothrix schenkii und des Stammes 123B, bei denen Stickstoff vermutlich in Form von  $\text{NH}_3$  freigesetzt wird, werden durch Ammoniumionen vermindert. Beispielsweise werden die Deaminierung von N-Aethylammelín, N-Isopropylammelín und Ammelín durch den Stamm 123B (Fig. 17, 18, Tab. 13, Kap. 3.5.2.), der Totalabbau von Ammelín durch Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 (Tab. 17) und die Spaltung von Cyanursäure durch die Sporothrix schenkii Stämme CBS 472.48 und 6.2 (Fig. 7, 9, 10, Tab. 6) durch die gleichzeitige Anwesenheit von Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat im Medium deutlich reduziert.

Auf Grund der vorliegenden Daten kann jedoch nicht bestimmt werden,

ob Ammoniumionen eine Repression der Enzymsynthese und/oder eine Hemmung der Enzymaktivität bewirken. Weiter ist unklar, ob der Einfluss auf der Stufe der Permeasen und/oder katabolischen Enzyme erfolgt. Die Tatsache jedoch, dass Ammoniumionen den Abbau von Cyanursäure durch wachsende Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 bedeutend stärker hemmen als den Abbau durch ruhende Zellen (Fig. 10, Tab. 6), lässt vermuten, dass zumindest bei diesem Stamm Ammoniumionen eine Repression und eine Enzymhemmung bewirken. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass bei ruhenden Zellen von Stamm 6.2, die auf Ammoniumnitrat als einziger N-Quelle vorgezchtet wurden, keine Cyanursäure abbauende Aktivität beobachtet werden konnte (Tab. 5).

Die Repression des Abbaus von stickstoffhaltigen Verbindungen durch Ammoniumionen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (53, 54, 55, 56); zum Teil unter dem Begriff "Ammonium-Repression". Einzelnen Autoren ist es gelungen, diese Repression durch eine Mutation zu eliminieren. In einigen Fällen wird das für die Ammonium-Repression verantwortliche Regulationssystem direkt mutiert (55), in andern Fällen tritt eine Aktivitätsverminderung der Ammonium-Permease auf (56).

Der Ammelinabbau durch Rhizopus stolonifer und der Cyanursäureabbau durch Stachybotrys chartarum wurden durch Ammoniumionen nicht signifikant gehemmt (Fig. 7, 14). Zudem wurde gefunden, dass Stachybotrys chartarum auf Ammoniumnitrat als N-Quelle wesentlich schlechter wächst als Sporothrix schenkii (Tab. 3). Möglicherweise kann sowohl das Fehlen der Ammonium-Repression als auch das schlechte Wachstum auf Ammoniumnitrat bei Stachybotrys chartarum durch eine geringe Aktivität der Ammonium-Permease erklärt werden (vergl. 56)

Die in Kap. 3.1. beschriebene Anreicherung von Mikroorganismen erfolgte auf Medien, die stets Ammoniumnitrat als N-Quelle enthielten. Die Deaminierungsreaktionen und die Spaltung der Cyanursäure sind dabei wahrscheinlich gehemmt worden. Vermutlich hätte eine Anreicherung auf Medien mit anderen N-Quellen oder womöglich mit Triazin-Derivaten als einzige N-Quellen schneller zum Ziel geführt.

#### 4.3. Enzymatik und Regulation des Abbaus innerhalb der

Abbausequenz Ammelin  $\longrightarrow$   $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$

---

Bei Vorzucht auf Komplexmedien mit und ohne Ammelin zeigen ruhende Zellen des Stammes 123B gegenüber Ammelin praktisch die gleiche spezifische Abbauleistung (Tab. 14). Die Ammelin abbauenden Enzyme des Stammes 123B müssen somit nicht spezifisch durch Ammelin induziert werden, doch unterliegen sie vermutlich einer Ammonium-Repression (vergl. Kap. 4.2.). Da Ammelin und Ammelid im Stoffwechsel der Mikroorganismen nicht auftreten, ist kaum anzunehmen, dass die Organismen über spezifische Enzyme zur Deaminierung dieser Verbindungen verfügen. Die Tatsache hingegen, dass praktisch alle geprüften Mikroorganismen Ammelin zu Ammelid, jedoch nur rund die Hälfte Ammelid zu Cyanursäure deaminieren können (Kap. 3.3.1.), spricht wiederum gegen eine sehr breite Substratspezifität der Deaminasen.

Ruhende Zellen von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 zeigen bei Vorzucht auf Cyanursäure eine spezifische Cyanursäure-Abbauleistung von 18.4 mg/h·gTG und bei Vorzucht auf Biuret von 5.1 mg/h·gTG. Bei allen anderen getesteten N-Quellen lagen die Werte unter 3.6 mg/h·gTG (Tab. 5). Biuret reduziert den Cyanursäureabbau von wachsenden und von ruhenden Zellen von S. schenkii Stamm 6.2 (Fig. 10, Tab. 6). Die Cyanursäure abbauenden Enzyme dieses Stammes scheinen somit durch das Substrat Cyanursäure induziert zu werden. Falls die Reduktion der Abbauleistung durch Biuret auf der Stufe der katabolischen Enzyme und nicht auf der Stufe der Permeasen erfolgt, darf angenommen werden, dass Biuret ein Zwischenprodukt des Cyanursäureabbaus darstellt und den Abbau möglicherweise kompetitiv hemmt. Die relativ gute Abbauleistung von ruhenden Zellen des Stammes 6.2, die auf Biuret vorgezchtet wurden, weist darauf hin, dass eine durch Biuret induzierte Hydrolase gegenüber Cyanursäure eine gewisse Affinität aufweist oder dass Cyanursäure und Biuret durch dieselbe Hydrolase gespalten werden.

Zumindest für den Stamm 123B scheint aber keine dieser Vermutungen zuzutreffen. Der Stamm 123B wächst gut auf Biuret (Tab. 15), kann jedoch die beim vermutlich intrazellulären Abbau von Ammelin entstehende Cyanursäure selbst in Anwesenheit von Biuret nicht verwerten (Tab. 14, Fig. 18). Dieser Befund spricht dafür, dass Cyanursäure und Biuret durch 2 verschiedene Hydrolasen abgebaut werden. Sporothrix schenkii Stamm 6.2 würde somit über beide Hydrolasen, der Stamm 123B jedoch nur über eine Biuret-Hydrolase verfügen.

Obwohl der Stamm 123B und Sporothrix schenkii Stamm 6.2 Ammelin resp. Cyanursäure sehr gut abbauen können, vermögen sie auf Cytosin, Uracil und Barbitursäure als N-Quelle nicht zu wachsen (Tab. 4, 15). Die in der Einleitung erwähnte Hypothese, wonach einige Triazin-Derivate durch Enzyme des oxydativen Pyrimidin-Katabolismus abgebaut werden könnten, wird durch diesen Befund nicht gestützt.

#### 4.4. Triazin-Derivate als C- oder N-Quellen für Mikroorganismen

---

Obwohl der Begriff Cometabolismus im Zusammenhang mit dem Abbau von schwer abbaubaren Verbindungen vielfach erwähnt wird (57), bleibt die eindeutige Definition des Cometabolismus und insbesondere dessen Abgrenzung gegenüber dem klassischen Katabolismus unklar (58). Meistens wird unter einer cometabolischen Reaktion eine Abbausequenz verstanden, die durch Enzyme des natürlichen Stoffwechsels katalysiert wird und die für den Organismus keine verwertbaren C- oder N-Fragmente und auch keine Energie liefert. Cometabolische Reaktionen können also nur in Anwesenheit von leicht verwertbaren C- und N-Quellen ablaufen. In diesem Sinne dürfte es sich beim Abbau zumindest einiger Triazin-Derivate nicht um cometabolische Mechanismen handeln:

- Cyanursäure kann von Sporothrix schenkii und von Stachybotrys chartarum (Tab. 3) und von einigen Stämmen der Gattungen Penicillium und Hormodendrum (31) als N-Quelle verwertet werden. Cyanursäure wird somit nicht cometabolisch abgebaut.

- Ein gutes Wachstum von Mikroorganismen auf Ammelin als N-Quelle konnte bisher nicht nachgewiesen werden, obwohl vermutlich Stickstoff in Form von  $\text{NH}_3$  freigesetzt wird und Ammelin somit nicht cometabolisch abgebaut werden dürfte. Die bisher gemessene maximale spezifische Abbauleistung des Stammes 123B gegenüber Ammelin beträgt 1.5 mg/h·gTG (Tab. 13). Falls diese Abbauleistung nicht wesentlich überschritten wird, beträgt die Zunahme der Zellmasse des Stammes 123B bei Wachstum auf Ammelin als einziger N-Quelle nur rund 0.3 % pro Stunde. Dies entspricht einer Generationszeit von ungefähr 10 Tagen. Ein gutes Wachstum des Stammes 123B auf Ammelin als N-Quelle ist somit nicht zu erwarten.
- Verschiedene N-Alkyl-Derivate (u.a. Atrazin) werden von mehreren Mikroorganismen dealkyliert, wobei die Alkylgruppe vermutlich als Aldehyd freigesetzt wird (vergl. Einleitung) und somit als C-Quelle verwertbar sein dürfte. Auf Grund der geringen Abbauleistungen (vergl. Kap. 4.1.) ist jedoch kein signifikantes Wachstum zu erwarten. In der Literatur finden sich Hinweise, dass N-Alkyl-Derivate als C-Quellen verwertet werden (13). Es ist kaum anzunehmen, dass eine Dealkylierung von Hydroxy-Derivaten über einen cometabolischen Mechanismus läuft.

Bei mehreren Abbauschritten konnte durch eine Erhöhung der Konzentration von Zucker und Hefeextrakt eine deutliche Beschleunigung des Abbaus erreicht werden. In allen untersuchten Fällen zeigte sich jedoch, dass die spezifische Abbauleistung mehr oder weniger konstant blieb. Der beschleunigte Abbau bei Zugabe von leicht verwertbaren Substraten ist deshalb lediglich auf eine Erhöhung der Zellmasse zurückzuführen.

## 5. Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, verschiedene Triazin-Derivate mit Hilfe von Mikroorganismen abzubauen. Die Arbeiten konzentrierten sich auf hydroxylierte Derivate von Atrazin. Die getesteten Mikroorganismen wurden vorwiegend aus Abwasser- und Bodenproben isoliert. Zudem wurde auch das Abbauverhalten einiger Organismen aus Stammsammlungen geprüft. Zur Erleichterung der Analytik wurde meistens mit  $^{14}\text{C}$ -ringmarkierten Triazin-Derivaten gearbeitet.

Die einzelnen Abbausequenzen lassen sich im wesentlichen in vier Gruppen einteilen:

- Hydrolyse des C2-Substituenten: Die hydrolytische Abspaltung des C2-Substituenten wurde in der Literatur mehrfach beschrieben und in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.
- Dealkylierung: Mehrere der getesteten Organismen können Triazin-Derivate mit einem Chlor-, Methoxy-, Methylthio- oder Wasserstoff-Substituenten in C2-Position dealkylieren. Die beste spezifische Abbauleistung auf der Stufe der Dealkylierungen (Atrazin  $\rightarrow$  dealkylierte Produkte) wurde durch Aspergillus fumigatus erbracht und liegt im Bereich von wenigen  $\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{gTG}$ . Eine Dealkylierung von Triazin-Derivaten mit einer Hydroxygruppe in C2-Position konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der Grund für die scheinbare Persistenz dieser Verbindungen bleibt unklar.
- Deaminierung: Praktisch alle getesteten Mikroorganismen konnten Ammelin zu Ammelid, jedoch nur rund die Hälfte konnte Ammelid zu Cyanursäure deaminieren. Der geschwindigkeitslimitierende Schritt innerhalb der Sequenz Ammelin  $\rightarrow$  Cyanursäure liegt mit Ausnahme von Rhizopus stolonifer bei allen getesteten Stämmen bei der Deaminierung von Ammelid. Die beste spezifische Abbauleistung gegenüber Ammelin (Ammelin  $\rightarrow$  Cyanursäure) wurde durch den Stamm 123B erbracht und beträgt  $1.5 \text{ mg}/\text{h}\cdot\text{gTG}$ . Die Ammelin abbauenden

Enzyme des Stammes 123B sind intrazellulär oder zellgebunden lokalisiert, müssen nicht durch Ammelin induziert werden und werden durch Ammoniumionen vermutlich reprimiert und/oder gehemmt. Von allen untersuchten Stämmen kann der Stamm 123B am besten N-Aethylammelid zu N-Aethylammelid und N-Isopropylammelid zu N-Isopropylammelid deaminieren.

- Spaltung des Triazinrings: Von allen geprüften Stämmen waren nur Sporothrix schenkii und Stachybotrys chartarum fähig, Cyanursäure zu  $\text{CO}_2$  und vermutlich  $\text{NH}_3$  umzusetzen. Diese Stämme konnten Cyanursäure als N-Quelle verwerten. Die beste spezifische Abbauleistung gegenüber Cyanursäure (Cyanursäure  $\longrightarrow$   $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$ ) wurde durch Sporothrix schenkii Stamm 6.2 erbracht und beträgt rund 30 mg/h·gTG. Die Cyanursäure abbauenden Enzyme des Stammes 6.2 sind intrazellulär oder zellgebunden lokalisiert, werden durch Cyanursäure induziert und durch Ammoniumionen reprimiert und gehemmt. Es ergaben sich Hinweise, dass beim Cyanursäureabbau Biuret als Zwischenprodukt auftritt. Mit Hilfe des Stammes 6.2 ist es gelungen, einen einfachen Test zum Nachweis von  $^{14}\text{C}$ -Cyanursäure zu entwickeln. Der Stamm 6.2 vermag Cyanursäure auch in Anwesenheit von Mutterlauge aus einer Atrazin-Produktionsanlage abzubauen.

Sporothrix schenkii Stamm CBS 472.48 ist fähig, Ammelin direkt zu  $\text{CO}_2$  und vermutlich  $\text{NH}_3$  umzusetzen. Auch eine Mischkultur des Stammes 123B und von Sporothrix schenkii Stamm 6.2 vermag Ammelin vollständig abzubauen.

(vergl. Tab. 23)

Tab. 23: Zusammenfassende Darstellung der Abbauleistungen der einzelnen Mikroorganismen

Abbauschritt	Dealkylierung von Atrazin	Dechlorierung von 2-Chlor-Triazinen	Dealkylierung von 2-Hydroxy-Triazinen	Deaminierung von N-Alkyl-ammelin	Deaminierung von Ammelin zu Ammelid	Deaminierung von Ammelid zu Cyanursäure	Spaltung von Cyanursäure zu CO <sub>2</sub> und NH <sub>3</sub>
Nr. des Schrittes in Fig. 3	1, 3, 6, 7	2, 4, 9, 12	5, 8, 11, 13, 15, 17	10, 14	16	18	19
Tab. und Fig. im Resultatteil	Tab. 20, 21, 22	Tab. 20, 21, 22	Tab. 19, 20, 21, 22	Tab. 19, 21	Tab. 8, 16 Fig. 14, 16	Tab. 8, 16 Fig. 14, 16	Tab. 2, 16 Fig. 7, 8
Stamm							
<u>Rhizopus stolonifer</u>	(+)	(+)	-	-	+	+	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	+	+	-	(+)	+	-	-
<u>Penicillium notatum</u>	(+)	+	-	+	+	-	-
<u>Stachybotrys chartarum</u>	(+)	+	-	+	+	-	+
<u>Sporothrix schenckii</u>							
Stamm CBS 472.48	(+)	+	-	+	+	+	+
Stamm 6.2	(+)	+	-	+	+	-	+
2.2, 2.20	(+)	+	-	+	+	-	-
6.1	(+)	+	-	-	+	+	-
6.15, 6.22	(+)	+	-	+	+	+	-
8.1	+	+	-	-	+	-	-
1, 44, 118B, 123B	-	+	-	+	+	+	-

+ : guter Abbau

(+) : schwacher Abbau

- : Abbau nicht signifikant



## 6. Summary

---

The degradation of a variety of s-triazine compounds by microorganisms was investigated. The microorganisms were isolated mainly from waste water and soil, but some strains obtained from culture collections were also examined. Most experiments were done with  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled hydroxylated derivatives of atrazine.

Three classes of degradation pathways were recognized:

- Dealkylation. Several organisms tested are able to dealkylate 2-chloro-, 2-methoxy- or 2-methylthio-triazines. The highest specific degradation rate was obtained with Aspergillus fumigatus for the step atrazine to the dealkylated products and was of the order of  $1 - 10 \mu\text{g atrazine} \times (\text{h})^{-1} \times (\text{g dry weight})^{-1}$ . Dealkylation of triazines with a 2-hydroxy group was not detected. The reason for the apparent persistence of these compounds is not known.
- Deamination. Nearly all microorganisms tested could deaminate ammeline to ammelide, but only about 50 % deaminated ammelide to cyanuric acid. The deamination of ammelide appears to be the rate limiting step in all strains except Rhizopus stolonifer. The highest specific degradation rate for the conversion of ammeline to cyanuric acid was found in strain 123B and amounted to  $1.5 \text{ mg ammeline} \times (\text{h})^{-1} \times (\text{g dry weight})^{-1}$ . The enzymes catabolizing ammeline are intracellular, they are apparently constitutive and are repressed and/or inhibited by  $\text{NH}_4^+$ . Of all strains tested, strain 123B deaminated most efficiently N-ethylammeline to N-ethylammelide and N-isopropylammeline to N-isopropylammelide.
- Cleavage of the triazine-ring. Only Stachybotrys chartarum and Sporothrix schenckii were found to degrade cyanuric acid to  $\text{CO}_2$  and  $\text{NH}_3$ . These strains could use cyanuric acid as a nitrogen source. The highest specific degradation rate was  $30 \text{ mg cyanuric acid} \times (\text{h})^{-1} \times (\text{g dry weight})^{-1}$  and occurred in Sporothrix

schenkii strain 6.2; a biological assay for  $^{14}\text{C}$ -cyanuric acid was developed with this strain. The enzymes degrading cyanuric acid in this strain were intracellular, induced by cyanuric acid and repressed and inhibited by  $\text{NH}_4^+$ . Biuret was apparently an intermediate in cyanuric acid degradation.

Sporothrix schenkii CBS 472.48 was able, to convert ammeline directly to  $\text{CO}_2$  and  $\text{NH}_3$ . A total degradation of ammeline with a mixed culture of strain 123B and Sporothrix schenkii strain 6.2 was also observed.

## 7. Literatur

---

1. Esser H. O., Dupuis G., Ebert E., Vogel C. & Marco G. J.,  
s-Triazines, in "Herbicides: chemistry, degradation and mode of action",  
edited by Kearney P. C. & Kaufman D. D., Marcel Dekker, (1975)
2. Gysin H. & Knüsli K.,  
Chemistry and Herbicidal Properties of Triazine Derivatives,  
Adv. Pest Control Res. 3, 289 - 358, (1960)
3. Harris C. I., Kaufman D. D., Sheets T. J., Nash R. G. & Kearney P. C.,  
Behaviour and Fate of s-Triazines in Soils,  
Adv. Pest Control Res. 8, 1 - 55, (1968)
4. The Triazine Herbicides,  
Residue Reviews 32, edited by Gunther F. J., Springer-Verlag, (1970)
5. Pflanzenschutzmittel,  
Ciba-Geigy AG, Basel, (1974)
6. van der Zweep W. & van Oorschot J. L. P.,  
Neue Forschungsergebnisse über Wirkungsweise und Verhalten von Herbi-  
ziden in Pflanzen,  
Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, Sonderh. 5, 61 - 70, (1970)
7. Koch W. & Hurle K.,  
Herbizide und Boden  
Mitteilungen Schweiz. Landw. 20, 125 - 138, (1972)
8. Skipper H. D., Gilmour C. M. & Furtick W. R.,  
Microbial Versus Chemical Degradation of Atrazine in Soils,  
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 653 - 656, (1967)
9. Skipper H. D. & Volk V. V.,  
Biological and Chemical Degradation of Atrazine in Three Oregon Soils,  
Weed Sci. 20, 344 - 347, (1972)
10. Wolf D. C. & Martin J. P.,  
Microbial Decomposition of Ring-<sup>14</sup>C Atrazine, Cyanuric Acid, and  
2-Chloro-4,6-diamino-s-triazine,  
J. Environ. Qual. 4, 134 - 139, (1975)

Leer - Vide - Empty

11. Goswami K. P. & Green R. E.,  
Microbial Degradation of the Herbicide Atrazine and Its 2-Hydroxy  
Analog in Submerged Soils,  
Environ. Sci. Technol. 5, 426 - 429, (1971)
12. Hance R. J. & Chesters G.,  
The Fate of Hydroxyatrazine in a Soil and a Lake Sediment,  
Soil Biol. Biochem. 1, 309 - 315, (1969)
13. Kaufman D. D., Kearney P. C. & Sheets T. J.,  
Microbial Degradation of Simazine,  
J. Agr. Food Chem. 13, 283 - 242, (1965)
14. Kaufman D. D., Kearney P. C. & Sheets T. J.,  
Simazine: Degradation by Soil Microorganisms,  
Science 142, 405 - 406, (1963)
15. Kearney P. C., Kaufman D. D. & Sheets T. J.,  
Metabolites of Simazine by Aspergillus fumigatus,  
J. Agr. Food Chem. 13, 369 - 372, (1965)
16. Khan S. U. & Marriage P. B.,  
Residues of Atrazine and Its Metabolites in an Orchard Soil and Their  
Uptake by Oat Plants,  
J. Agr. Food Chem. 25, 1408 - 1413, (1977)
17. Ramsteiner K. A., Hörmann W. D. & Eberle D.,  
Rückstände von Atrazin, Simazin und einigen ihrer Metaboliten im  
Boden nach langjähriger Applikation,  
Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, Sonderh. 6, 43 - 52, (1972)
18. Harris C. I.,  
Fate of 2-Chloro-s-triazine Herbicides in Soils,  
J. Agr. Food Chem. 15, 157 - 162, (1967)
19. Mayer P.,  
Metabolism of C 18898 in Paddy Rice,  
Abstr. 4<sup>th</sup> Int. Congress of Pesticide Chemistry, Zürich, (1978)
20. Russell J. D., Cruz M. & White J. L.,  
Mode of Chemical Degradation of s-Triazines by Montmorillonite,  
Science 160, 1340 - 1342, (1968)

21. Couch R. W., Gramlich J. V., Davis D. E. & Funderburk H. H.,  
The Metabolism of Atrazine and Simazine by Soil Fungi,  
Proc. South. Weed Conf. 18, 623 - 631, (1965)
22. Janke D. & Fritsche W.,  
Mikrobielle Dechlorierung von Pesticiden und anderen Umweltchemikalien,  
Z. Allg. Mikrobiologie 18, 365 - 382, (1978)
23. Hill J. R.,  
Microbial Transformation, in "Pesticide Microbiology",  
edited by Hill J. R. & Wright S. J. L., Academic Press, (1978)
24. Muir D. C. & Baker B. E.,  
Detection of Triazine Herbicides and Their Degradation Products in  
Tile-Drain Water from Fields under Intensive Corn (Maize) Production,  
J. Agr. Food Chem. 24, 122 - 125, (1976)
25. Kaufman D. D. & Blake J.,  
Degradation of Atrazine by Soil Fungi,  
Soil Biol. Biochem. 2, 73 - 80, (1970)
26. Plimmer J. R., Kearney P. C. & Klingebiel U. I.,  
s-Triazine Herbicide Dealkylation by Free-Radical Generating Systems,  
J. Agr. Food Chem. 19, 572 - 573, (1971)
27. Laanio T. L., Kearney P. C. & Kaufman D. D.,  
Microbial Metabolism of Dinitramine,  
Pestic. Biochem. Physiol. 3, 271 - 277, (1973)
28. Dupuis G., Laanio T., Marbach P. & Esser H. O.,  
Degradation in corn, alfalfa, soil and in the rat of metabolites  
common to various triazine herbicides,  
Abstr. 7<sup>th</sup> Int. Congress of Plant Protection, Paris, (1970)
29. Hauck R. D. & Stephenson H. F.,  
Nitrification of Triazine Nitrogen,  
J. Agr. Food Chem. 12, 147 - 151, (1964)
30. Saldick J.,  
Biodegradation of Cyanuric Acid  
Appl. Microbiol. 28, 1004 - 1008, (1974)

31. Jensen H. L. & Abdel-Ghaffar A. S.,  
Cyanuric Acid as Nitrogen Source for Micro-Organisms,  
Arch. Mikrobiol. 67, 1 - 5, (1969)
32. Hayaishi O. & Kornberg A.,  
Metabolism of Cytosine, Thiamine, Uracil, and Barbituric acid by  
Bacterial Enzymes,  
J. Biol. Chem. 197, 717 - 732, (1952)
33. Jpata P. L. & Cercignani G.,  
Cytosine and Cytidine Deaminase from Yeast, in "Methods in Enzymo-  
logy", Vol. 51, edited by Hoffee P. A. & Jones M. E.,  
Academic Press, (1978)
34. Temperle A., Türler H. & Ergegovich C. D.,  
Incorporation of s-Triazines (cyanuric acid and prometryne) into  
bacterial nucleic acid,  
Z. Naturforschg. 21, 903 - 904, (1966)
35. Mücke W., Müller P. W. & Esser H. O.,  
Triazine Nucleic Acid Interrelationship in Escherichia coli  
15 arg<sup>-</sup> t<sup>-</sup> u<sup>-</sup>,  
Experientia 25, 353, (1969)
36. Haider K. & Martin J. P.,  
Humic acid-type phenolic polymers from Aspergillus sydowi culture  
medium, Stachybotrys spp. cells and autoxidized phenol mixtures,  
Soil Biol. Biochem. 2, 145 - 156, (1970)
37. Martin J. P. & Haider K.,  
Phenolic polymers of Stachybotrys atra, Stachybotrys chartarum  
and Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation,  
Soil Sci. 107, 260 - 270, (1969)
38. Loos M. A. & Kearney P. C.,  
Thin-Layer and Paper Chromatography of Potential Degradation  
Products of s-Triazine-Herbicides,  
J. Chromatogr. Sci. 16, 86 - 89, (1978)
39. Flückiger J.,  
Glukose-Stoffwechsel bei Acetobacter aceti,  
Dissertation Nr. 5814, ETH-Zürich, (1976)

40. Fröhner C., Oltmanns O. & Lingens F.,  
Isolierung und Charakterisierung Pyrazon-abbauender Bakterien,  
Arch. Mikrobiol. 74, 82 - 89, (1970)
41. Fröhner C.,  
Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau des Herbizids Pyrazon  
und anderer aromatischer Verbindungen,  
Dissertation, Universität Hohenheim, BRD, (1972)
42. Neururer H.,  
Bioteste in der Herbologie,  
Pflanzenkrankh. 5, 316 - 328, (1975)
43. Kieslich K.,  
Microbial Transformations,  
Georg-Thieme-Verlag, (1976)
44. Knüsli E.,  
The Future of the Development of Pesticides by Industry,  
Pure and Appl. Chem. 42, 77 - 87, (1975)
45. Naumann K. & Bassler R.,  
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln,  
Verlag J. Neumann-Neudamm, Berlin, (1976)
46. Tulp M. T. M., Tillmanns G. M. & Hutzinger O.,  
Environmental Chemistry of PCB-Replacement Compounds -V-  
The Metabolism of Chloro-Isopropylbiphenyls in Fish, Frogs, Fungi  
and Bacteria,  
Chemosphere 5, 223 - 230, (1977)
47. Benezet H. J. & Matsumura F.,  
Factors Influencing the Metabolism of Mexacarbate by Microorganisms,  
J. Agr. Food Chem. 22, 427 - 430, (1974)
48. Harder W. & Kuenen J. G.,  
A Review, Microbial Selection in Continuous Culture,  
J. Appl. Bacteriol. 43, 1 - 24, (1977)
49. Senior E., Bull A. T. & Slater J. H.,  
Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide  
Dalapon,  
Nature 263, 476 - 479, (1976)



50. Engelhardt G., Wallnöfer P. R. & Plapp R.,  
Degradation of Linuron and Some Other Herbicides and Fungicides  
by a Linuron-Inducible Enzyme Obtained from Bacillus sphaericus,  
Appl. Microbiol. 22, 284 - 288, (1971)
51. Tiedje J. M., Duxbury J. M., Alexander M. & Dawson J. E.,  
2,4-D Metabolism: Pathway of Degradation of Chlorocatechols by  
Arthrobacter sp.,  
J. Agr. Food Chem. 17, 1021 - 1026, (1969)
52. Horvath R. S.,  
Cometabolism of the Herbicide 2,3,6-Trichlorobenzoate by Natural  
Microbial Populations,  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 7, 273 - 276, (1972)
53. Pateman J. A. & Kinghorn J. R.,  
Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism, in "Genetics and Physiology  
of Aspergillus", edited by Smith J. E. & Pateman J. A.,  
Academic Press, (1977)
54. Hynes M. J.,  
Induction and Repression of Amidase Enzymes in Aspergillus nidulans,  
J. Bacteriol. 103, 482 - 487, (1970)
55. Arst H. N. & Cove D. J.,  
Nitrogen Metabolite Repression in Aspergillus nidulans,  
Molec. gen. Genet. 126, 111 - 141, (1973)
56. Arst H. N. & Page M. M.,  
Mutants of Aspergillus nidulans Altered in the Transport of  
Methylammonium and Ammonium,  
Molec. gen. Genet. 121, 239 - 245, (1973)
57. Horvath R. S.,  
Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds  
in Nature,  
Bacteriol. Rev. 36, 146 - 155, (1972)
58. Hulbert M. H. & Krawiec S.,  
Cometabolism: A Critique  
J. theor. Biol. 69, 287 - 291, (1977)

59. Zeyer J., Bodmer J. & Hütter R.,  
Microbial degradation of triazine herbicides,  
*Experientia* 33, 1687, (1977)
60. Zeyer J., Bodmer J. & Hütter R.,  
Microbial Degradation of Hydroxy-Derivatives of s-Triazine Herbicides,  
Abstr. 4<sup>th</sup> Int. Congress of Pesticide Chemistry, Zürich, (1978)

## Lebenslauf

---

18. April 1950      geboren in Ettiswil (LU)
- 1957 - 1962      Primarschule in Ettiswil (LU)
- 1962 - 1966      Mittelschule in Willisau (LU)
- 1966 - 1969      Kantonsschule in Luzern,  
Abschluss mit Maturität Typus C
- 1969 - 1974      Studium an der ETH Zürich, Abteilung für  
Naturwissenschaften,  
Abschluss mit Diplom als Naturwissenschaftler  
mikrobiologisch-biochemischer Richtung
- 1975 - 1979      Assistent am Mikrobiologischen Institut  
der ETH Zürich,  
Ausführung der Promotionsarbeit