

ÜBER DIE WIRKUNG VON STERINEN AUF DAS WACHSTUM DER MIKROORGANISMEN

Von

B. MATKOVICS und GY. SIPOS

Organisch—Chemisches Institut der Universität, Szeged
(Eingegangen am 2. Okt. 1958)

Einleitung

Die Untersuchung der Wirkung von Sterinen auf Bakterien und Pilze ging von unserer Beobachtung aus, dass die Quantität des Myzels auf Wirkung des zum Nährboden gegebenen Cholesterins eine augenscheinliche Abweichung zeigt. Als Kontrolle benützten wir die Trockensubstanz des Myzels des Cholesterin nicht enthaltenden Nährbodens.

Nach dem Überblick der Literatur finden wir Angaben zunächst für die chemischen, sowie für die physikalisch-chemischen Eigentümlichkeiten des Cholesterins und Ergosterins; unser literarischer Überblick, sogar auch unsere Experimente beziehen sich auf die Wirkung des Cholesterins und Ergosterins auf Mikroorganismen 1,5. Mit der rapiden Entwicklung der Sterinchemie wurde die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren immer mehr auf die praktischen Verwendungsmöglichkeiten gerichtet. Aber neben der Untersuchung der praktischen Anwendbarkeit ist auch die Prüfung des Wirkungsmechanismus, sowie die der Entstehung der Sterinen von Wichtigkeit. In der Literatur findet man zahlreiche, auf Letztere bezügliche Angaben 6, 18, 23.

Unter den physikalisch-chemischen Eigentümlichkeiten von Sterinen ist vor allem die Wirkung auf die semipermeablen Membranen (einbegriffen auch die Zellwände) erwähnenswert. Nach den Untersuchungen von KISZELY erhöht das Cholesterin die Durchlässigkeit der Kollagen und Celloidin Membranen bei Wasser, wasserlöslichen Stoffen und Farbstoffen; das Lezithin hingegen vermindert sie. Wenn das Verhältnis des Lezithins und des Cholesterins entsprechend ist, so wächst die die Permeabilität steigernde Wirkung. Ist dagegen das Lezithin im Überschuss, so nimmt sie ab. BÜRGERS (2) wies nach, dass zum Durchgang der Prontozil Bakterie durch die Zellwand die Anwesenheit des Cholesterins notwendig ist. Diese letztere Beobachtung bezeugt, dass die auf das permeabele Membranmodell bezüglichen Feststellungen auch im Falle der Bakterien gültig sind. Die oben erwähnten Eigentümlichkeiten des Cholesterins spielen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Wirkung der Sterinen auf Bakterien und Pilze, die später erwähnt werden.

Eine seiner wichtigsten Eigentümlichkeiten ist, dass es aus Jodidlösung das Jod zu befreien imstande ist (19).

Von den biochemischen Eigentümlichkeiten ist zu erwähnen, dass das Lezithin die Sauerstoffaufnahme des Muskelgewebes erhöht, das Cholesterin aber dieselbe vermindert (25, 26).

Ausser den schon Erwähnten ist — nach REMEZOV's Untersuchungen (19) — eine sehr interessante Eigentümlichkeit des Cholesterins, dass es den Zerfall des 10⁰/₀-igen Peroxyds zu katalysieren imstande ist. Mit dieser Eigentümlichkeit hängt es zusammen, dass das molekulare und kolloidale dispergierte Cholesterin eine Oxydase-Reaktion aufweist. Es zeigt mit frisch bereitetem Dimethyl-p-phenylendiamin oder mit p-Toluidenamin nach einer Weile eine Verfärbung. Auch Ester und Ölsäure geben die obige Reaktion (20).

Mit Obigem eng verbunden ist die Beobachtung, welche sich auf die Oxydation des Vitamins C bezieht. Man fand, dass Cholesterin und Ergosterin die Oxydation des Vitamins C gegensätzlich beeinflussen. Das Cholesterin beschleunigt, das Ergosterin aber hemmt sie.

Cholesterin und Ergosterin hemmen — obwohl in kleinerem Masse, als Öl- und Linolensäure — die Sauerstoffaufnahme des *Micrococcus pyogenes*. Die Cholsäure und das Lezithin sind imstande diese Wirkung zu parieren (28).

Der grössere Teil der Untersuchungen erwies Cholesterin und Ergosterin als bakteriostatische Wirkung ausübende Stoffe. Damit steht aber im Gegensatz, dass sie die Wachstumsfaktoren mancher Protozoen sind — wie wir es später erwähnen werden.

Es wurde verhältnismässig früh nachgewiesen, dass das Ergosterin und das Vitamin D auf den Tuberkulosebazillus *in vitro* hemmend wirken (17). Auf diesen Beobachtungen beruht auch ihre spätere therapeutische Anwendung. Die Untersuchungen in 1928 fanden das bestrahlte Cholesterin in der Tuberkulose für nicht wirksam. Ausser den obigen gibt es noch zahlreiche Angaben, welche sich mit der hemmenden Wirkung des Cholesterins und Ergosterins auf Bakterien beschäftigen. KODICEK und WORDEN (11) wiesen nach, dass das Cholesterin und Ergosterin das Wachstum und die Milchsäureproduktion des *Lactobacillus helveticus* hemmen.

Das Cholesterin hemmt die fermentative Aktivität der Hefezellen, hindert aber die alkoholische Fermentation. Es ist jedoch am Ende der Fermentation unverändert zurückzugewinnen (8).

Nach BING (1) hängt die wachstumshemmende Wirkung von Ergosterin, Cholesterin, Vitamin D, sogar auch von Kortison mit der steroiden Struktur eng zusammen.

In kolloidaler Lösung (in Verdünnung 1:400) hemmt das Cholesterin das Staphylophag. In grösserer Verdünnung dagegen erhöht es schon seine Wirkung (1:6000—1:100 000). Dasselbe wurde neuerdings von WILLIAMS, SANDHOLZER und BERRY (27) beobachtet.

Nach den Untersuchungen von SCHATZ, SAVARD und PINTNER (22) beeinflusst das Cholesterin das Wachstum der Bakterien und Aktinomyzeten nicht. das Ergosterin dagegen vermindert es bei den meisten.

Die wachstumsteigernde Wirkung des Cholesterins wurde zunächst bei den Protozoen und bei der Larve der Goldfliege beobachtet (9, 10).

Für das Wachstum von *Trichomonas batracorum* (3), von anaeroben Ziliaten und von *Trichomonas columbae* (4) ist es unbedingt notwendig.

SQUIRE und SQUIRE (23) prüften die Wirkung verschiedener Sterinderivate auf verschiedene Bakterien. Sie fanden, dass die Ergebnisse bei den Gram-Positiven aberrant sind, wirken aber auf die Gram-Negative durchaus nicht.

PULAY, KONSANSZKY und MATKOVICS (13, 14, 15) — wie ich es schon erwähnt habe — wir untersuchten die Wirkung des Cholesterins auf *Penicillium chrysogenum* Q 176. Wir fanden, dass das Cholesterin — in Abhängigkeit von seiner Konzentration — das Gewicht des Myzels des obigen Pilzstammes in geschüttelten Kulturen erhöht oder vermindert (1). Auch prüften wir, wie Cholesterin verschiedener Quantität die Penizillinproduktion des vorigen Stammes beeinflusst. Wir fanden, dass schon kleine Konzentrationen des Cholesterins die Penizillinproduktion des Stammes zu vermindern imstande sind. Gleichzeitig nimmt auch der Trockensubstanzgehalt des Myzels ab (2).

Die Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration auf Fettsäure haben schon GOLDSCHMIDT und seine Mitarbeiter im Falle von *Penicillium chrysogenum* Q 176 (7) untersucht. Sie fanden, dass die gesättigten Fettsäuren — in Abhängigkeit von ihrer Konzentration — das Wachstum des Pilzes stimulieren oder hemmen.

Die auf die Wirkung der erwähnten Sterine bezügliche Beobachtung von TAUSZON (24) ist sehr bedeutend; er fand den Trockensubstanzgehalt von *Saccharomyces carlbergiensis* und von *Endomyces magnusii* in Anwesenheit von Ergosterin um 6—12% grösser. Ausserdem beobachtete er die Abkürzung der Gärungskapazität und die der Reduktion von Methylenblau. Er erläutert diese Erscheinungen mit der hemmenden Eigenschaft der Ergosterin-Dehydrogenase. Zur selben Zeit war — auf Wirkung des Ergosterins — auch die morphologische Änderung der Zellen zu beobachten.

Von den obigen literarischen Beobachtungen ausgehend bildete die Untersuchung der Wirkung des Cholesterins und Ergosterins auf verschiedene Pilzstämme den Gegenstand meiner Arbeit.

Methoden

In allen Experimenten benutzte ich den folgenden halbsynthetischen Nährboden:

2% Maismarmelade (corn steep liquor)

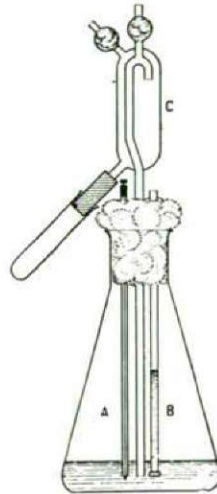
2% Glukose

0,1% CaCO₃

1000 ml Leitungswasser

Das pH fand ich nach der Sterilisation für 6,3—6,5. Die Sterilisation wurde 20 Minuten lang bei 110° C vorgenommen. In 1000 ml Erlenmeyerkolben wurde je 300 ml Nährboden gegeben. Mit Stopfen versehen sterilisierte ich ihn bei obiger Temperatur. Wenn wir im Laufe der Entwicklung den Potentialwert gemessen haben, haben wir ausser der Platinelektrode ein unten mit unglasiertem, gebranntem Porzellan verschlossenes Glasrohr eingebaut, welches mit 3% Agar enthaltendem gesättigtem KCl gefüllt wurde. Bei unseren Messungen haben wir die stabförmige gesättigte normal KCl-Elektrode in das Rohr gestellt, welches gesättigtes KCl-Agar enthielt. Dies stellte die andere Messungselektrode dar (16). Mit dieser Methode haben wir den Oxydationsreduktionspotentialwert der Nährböden unter sterilen Umständen messen können. (1. Bild.)

Wir massen das pH an herausgenommenen Mustern. Aus pH und Potentialwerten rechneten wir das rH aus. Wir bringen diese Werte auf *Abbildung 3.* (30). Die verschiedene Quantität des Cholesterins lösten wir anfangs in warmem Aceton (50 ml), gossen sie in 50 ml Wasser und brachten sie nach der Verdamp-



1. *Abbildung*
 A) Pt-Elektrode
 B) KCl-enthaltendes Agar-Agar Rohr
 C) Probennehmer

fung des Acetons in den Nährboden. Später gossen wir das Cholesterin oder Ergosterin in gemessener Quantität gleich von der Sterilisierung in den Nährboden und so sterilisierten wir es.

Wir machten die Impfung mit der mit 0,9%igem Kochsalz abgewaschenen Kultur des auf biersaftigem Schrägagar gezüchteten Pilzes.

Wir trockneten das Myzel — das mit Hilfe einer in einen Trichter gelegten Watte abgeseiht wurde — bei 60–70° C in einem Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz, dann extrahierten wir es mit 50–50 ml Chloroform oder Benzol, seiheten das Lösemittel ab, trockneten das Myzel wieder und massen so von neuem sein Gewicht.

Als ich den Nährboden mit 50 ml Chloroform kalt extrahierte, konnte ich mit der bekannten Reaktion von LIEBERMANN—BURHARDT 12 gamma/ml Sterin im Nährboden nachweisen. Die Quantität des Penizillins wurde mit biologischer Wertmessung bestimmt.

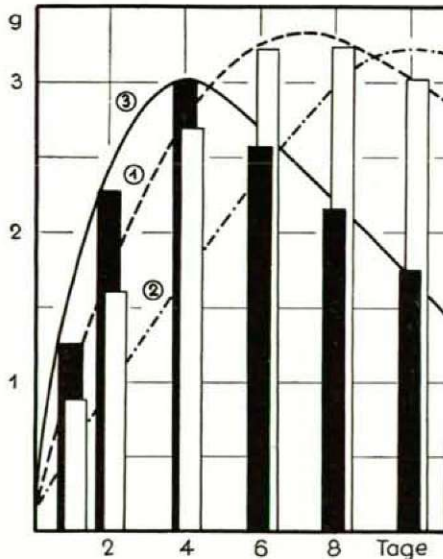
Bewertung der Ergebnisse

Vor der ausführlichen Darlegung unserer Ergebnisse muss ich erwähnen, dass wir schon früher darauf bezügliche Experimente angestellt hatten, wie der *Rhizopus arrhizus*-Stamm, welcher am 11-ten Kohlenstoffatom gewisse Sterinderivate zu oxydieren imstande ist, der verschiedenen Quantität des Cholesterins reagiert. Wir fanden, dass die verschiedene Quantität

des Cholesterins den Trockensubstanzgehalt des Myzels im Falle des obigen Stammes erhöht. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten müssen 2 wesentliche Tatsachen bemerkt werden: der benutzte Nährboden weicht von dem oben gegebenen ab; ausserdem wurde durch Extraktion mit Benzol nicht die ganze Cholesterinquantität zurückgewonnen. Das benutzte Cholesterin wurde also entweder als Nährstoffquelle benutzt, oder aber in ein anderes Derivat umgewandelt, dessen Lösbarkeit von der des Cholesterins abweicht. In dieser Beziehung sind unsere Untersuchungen noch nicht zu Ende gekommen.

Ich untersuchte die Wirkung grosser Quantitäten (0,5 g/300 ml Nährboden) von Ergosterin auf Trockensubstanzgehalt und Redox des *Penicillium chrysogenum* Q 176. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden unten ausführlich dargelegt.

Aus zahlreichen parallelen Untersuchungen ergab es sich, dass der Trockensubstanzgehalt des Myzels durch Ergosterin vermindert wird. Die zweite Abbildung zeigt diese Werte mit den bei dem Cholesterin gewonnenen Werten verglichen.

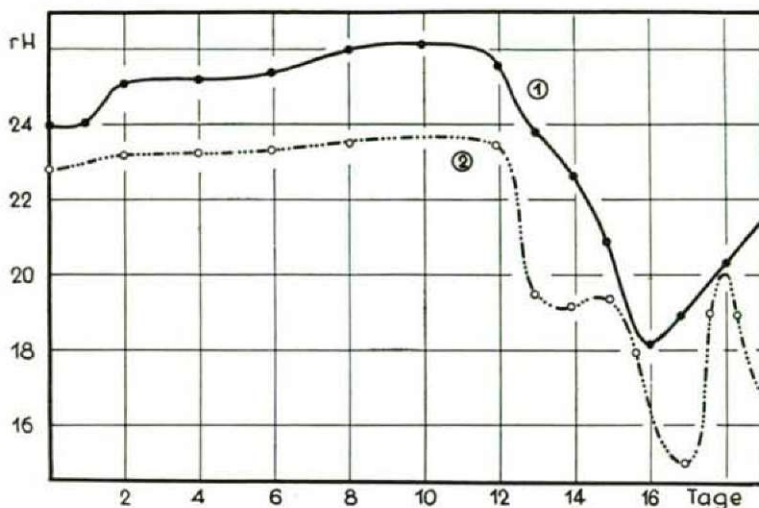


2. Abbildung

1. Trockensubstanzkurve des Cholesterin enthaltenden Nährbodens
2. Myzelgewichtkurve des Kontrollnährbodens
3. Myzelgewichtkurve des Ergosterin enthaltenden Nährbodens

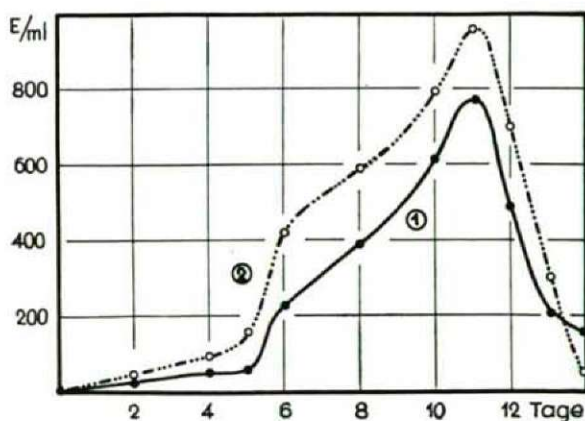
Die 2. Abbildung beweist, dass falls die Wirkung von Cholesterin und Ergosterin auf das Trockengewicht des Myzels bei dem *Penicillium chrysogenum* Q 176-Stamm mit der Kontrolle verglichen wird, gleichzeitig wesentliche Unterschiede zu beobachten sind. Während das Myzelgewicht des Ergosterin enthaltenden Nährbodens anfangs wächst, erreicht das Myzelgewicht

des Nährbodens von Cholesterin in der Mittelphase der Entwicklung das Maximum. Die Kontrollkurve ist gleichzeitig mehr gedehnt und flacher (2. Abb., 2. Kurve). Aus der Abbildung ergibt sich, dass Ergosterin und Cholesterin die Entwicklung des *Penicillium chrysogenum* Q 176-Stammes gleichermaßen beschleunigen. Das Ergosterin wirkt am Anfang der Ent-



3. Abbildung

1. rH-Kurve des Ergosterin enthaltenden Nährbodens
2. rH-Kurve des Kontrollnährbodens



4. Abbildung

1. Penicillinwerte des Cholesterin enthaltenden Nährbodens
2. Potentialwerte des Kontrollnährbodens

wicklung, das Cholesterin aber verlängert die Mittelphase der Entwicklung. Eine rapide Autolyse folgt der durch Ergosterin verursachten Entwicklungsbeschleunigung. Auf Wirkung von Ergosterin findet auch die Sporenbildung des Stammes eher statt. Wir haben bei obigem Stamm das Elektrodepotential des Ergosterin enthaltenden, sowie des Ergosterin nicht enthaltenden Nährbodens verglichen; dies hat zu den auf *Abbildung 3*. angegebenen Werten geführt. (Das rH wurde durch die Anwendung von Potentialwerten und pH gerechnet (16). Es geht klar hervor, dass die rH-Werte des Ergosterin enthaltenden Nährbodens über denen des ergosterinfreien Nährbodens stehen.

Es sei noch die unter ähnlichen Umständen untersuchte Wirkung von Cholesterin kurz erwähnt.

Wir haben untersucht, welche Veränderungen im Myzelgewicht von einigen bekannten Mikroorganismen — bei verschiedenen Cholesterin-Konzentrationen eintreten. Die untersuchten Cholesterin-Konzentrationen sind: 0,07, 0,16, 0,2, 0,33%. Das Myzel zeigte eine Veränderung im Trockengewicht — in Abhängigkeit von der Sterinkonzentration. Während das Myzelgewicht des *Penicillium chrysogenum* Q 176-Stammes im Falle der niedrigeren Cholesterinkonzentrationen eine Verminderung zeigt, erhöht während der selben Zeit die Cholesterinkonzentration von 0,33% das Trockengewicht des Myzels.

Wenn wir zur gleichen Zeit die Wirkung der Cholesterinkonzentration von 0,33% auf die Penizillinproduktion untersuchen, gewinnen wir die auf der 4-ten *Abbildung* sichtbaren Werte. Hieraus ersieht man, dass die erwähnte Cholesterinkonzentration die Penizillinproduktion vermindert. Das pH des Cholesterin enthaltenden Nährbodens bleibt immer unter dem des Kontrollnährbodens.

Zusammenfassung: Die Ergebnisse zusammenfassend ist die Folgerung zu ziehen, dass das Cholesterin und Ergosterin auf das Wachstum der Pilze eine Wirkung ausübt. Diese Wirkung offenbart sich im Falle von Cholesterin und Ergosterin in der Beschleunigung der Entwicklung von Pilzen.

Die Klärung des Wirkungsmechanismus ist ein grösseres Problem. In der Literatur sind diesbezüglich ganz verschiedene Meinungen zu finden. Es sind welche, die die Wirkung mit dem während der Fermentation entstehenden Wasserstoffsuperoxid in Verbindung bringen. Es scheint aber wahrscheinlicher und auch unsere Untersuchungen verweisen darauf, dass sowohl das Cholesterin, als auch das Ergosterin die Oberflächenspannung der Nährböden verändert. Diesbezügliche Messungen haben wir nur im Falle einer gewissen Konzentration von Cholesterin durchgeführt. Wir fanden, dass sich die Oberflächenspannung in diesem Falle im Cholesterin enthaltenden Nährboden stalagmometrisch für 56,5 din/cm^2 ergibt, die Oberflächenspannung der Kontrolle war dagegen 53,64 din/cm^2 . Bei Schüttenkulturen bedeutet auch ein so geringer Unterschied in der Oberflächenspannung vom Gesichtspunkt der Lüftung des Nährbodens und von dem der Sauerstoff-Adsorptionsfähigkeit eine wesentliche Abweichung. Vom Gesichtspunkt der Wirkung hält TAUSZON die Dehydrogenase-Hemmung für wichtig; diese Tatsache ist auch in Betracht zu nehmen.

Eine weitere Untersuchung der Frage wäre aufschlussreich.

Schrifttum

- (1) *Bing, M.*: Growth inhibiting properties of steroids. *Brit. Med. J.* 846 (1950).
- (2) *Bürgers, J.*: Ueber den Wirkungsmechanismus von Prontosil und ähnlichen Substanzen. *Z. Bakt. Parasit. I. Abt.* 144, 223—227 (1939).
- (3) *Gailliau, R.*: Activity of some sterols as growth factors for the flagellate, *Trichomonas Columbae*. *Compt. rend. soc. biol.* 122, 1027—1028 (1936).
- (4) *Gailliau, R.*: Cholesterol as a growth factor for the flagellate, *Trichomonas batracorum*. *Compt. rend. soc. biol.* 130, 1089—1091 (1939).
- (5) *Dorfman, R. I.*: Biosynthesis of adrenocortical steroids. *Cancer* 10, 741—745 (1958).
- (6) *Dorfman, R. I.—F. Ungar*: Metabolism of steroid hormones. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota (1953).
- (7) *Goldschmidt, M. C.—H. Koffler*: Effect of surface active agents on penicillin yields. *Ind. Eng. Chem.* 42, 1819—1823 (1950).
- (8) *Herrmann, S.—R. Nieger*: Effect of Cholesterol and insulin on yeast fermentation. *Biochem. Z.* 281, 121—127 (1935). (C. A. 30, 740 (1936)).
- (9) *Hobson, R. P.*: A fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae I. *Biochem. J.* 29, 1292—1296 (1935).
- (10) *Hobson, R. P.*: A fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae II. *Biochem. J.* 29, 2023—2026 (1935).
- (11) *Kodicek, E.—A. N. Worden*: Effect of unsaturated fatty acids on *Lb. helveticus* and other Gram-positive microorganisms. *Biochem. J.* 39, 78 (1945).
- (12) *Levin, B. S.—J. Lominszki*: Cholesterol and the lytic action of bacteriophage. *Compt. rend. soc. biol.* 122, 1063—1064 (1936).
- (13) *Matkovics B., Pulay G.*: Wirkung von Sterinen auf Mikroorganismen I. Teil. *Z. Bakt. Parasit., II. Abt.* 111, 440—442 (1958).
- (14) *Matkovics B., Konsanszky A.*: Wirkung von Sterinen auf Mikroorganismen. II. Teil. *Z. Bakt. Parasit., II. Abt.* 111, 540—542 (1958).
- (15) *Matkovics B.*: Wirkung von Sterinen auf Mikroorganismen. III. Teil. *Z. Bakt. Parasit., II. Abt.* 111, 543—545 (1958).
- (16) *Matkovics B., Kovács E.*: A simple method for rH measuring in microbiological processes. *Schw. Z. Path. Bakteriol.* 21, 666—669 (1958).
- (17) *Moritz, A. R.*: Effect of cholesterol activated by ultraviolet irradiation on growth of tubercle bacilli in vitro. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 26, 43—44 (1928).
- (18) *Raab, W.*: Antibacterial action of phenanthrene related substances. *Science* 103, 670—671 (1946).
- (19) *Remezov, J.*: Physikalisch-chemische Untersuchungen über den kolloiden Zustand von Cholesterin, Cholesterinester und Lecithin IX. *Biochem. Z.* 269, 63—68 (1934).
- (20) *Remezov, J.*: Mikro-heterogene Hydroperoxyd-Katalyse durch Cholesterin-Sole. *Ber.* 67B, 134—140 (1934).
- (21) *Rousseau, E.*: Photochemical oxidizing power of cholesterol and ergosterol after irradiation with mercury arc light. *Compt. rend. soc. biol.* 99, 1844—1847 (1928).
- (22) *Schatz, A.—K. Sward—I. J. Pintner*: Decomposition of steroids by soil microorganisms. *J. Bact.* 58, 117—125 (1949).
- (23) *Squire, E. B.—N. W. Squire*: Steroid effect upon bacterial growth. *J. Bact.* 55, 766—767 (1948).
- (24) *Tauszon, T. A.*: Physiological effect of ergosterol on yeast and *Endomyces*. *Mikrobiologija* 17, 127—131 (1948). (C. A. 44, 4078 (1950).)
- (25) *Tsuneyoshi, K.*: Effect of lipid on the dehydrogenation power of tissue. *J. Biochem. (Japan)* 7, 267—272 (1927).

- (26) *Tsuneyoshi, K.*: Effect of lipin and allied substances on the oxidative activity of the tissue. *J. Biochem. (Japan)* **7**, 235—258 (1927).
- (27) *Williams, C. H.—L. A. Sandholzer—C. P. Berry*: The inhibition of bacteriophagy by cholesterol and by bacterial and non bacterial phospholipides. *J. Bact.* **40**, 517—527 (1940).
- (28) *Wynne, E. S.—I. W. Foster*: Studies on the effect of C₁₈ unsaturated fatty acids on growth and respiration of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. *J. Infect. Diseases* **86**, 33—37 (1950).

Auschrift der Verfasser: Oberassistent Dr. B. MATKOVICS, und Oberassistent Dr. GY. SIPOS, Institut für Organische-Chemie der Universität, Beloiannis-Platz 1., Szeged (Ungarn).