Folinsäure als Wuchsstoff bei verschiedenen Bakterien; ein neuer Folinsäuretest mit *Staphylococcus aureus*

VON ERNST-FRIEDRICH MÖLLER, FRIEDRICH WEYGAND UND ADOLF WACKER

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg, und dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforschg. **4b**, 92—96 [1949]; eingegangen am 28. März 1949)

Es wurde das Folinsäurebedürfnis von Milchsäurebakterien, Staphylokokken, Streptokokken, Proteus-, Coli-, Pyocyaneus-, Fluorescens-, Dysenterie-, Typhus- und Diphtherie-Stämmen untersucht. Es ergab sich, daß nicht nur ein Teil der Milchsäurebakterien, sondern auch 40% der geprüften Staphylokokkenstämme Folinsäure unbedingt zum Wachstum benötigen. Es konnte ein neuer Test zur Folinsäurebestimmung mit *Staph. aureus* ausgearbeitet werden, der dem bekannten Test mit *Sc. faecalis* R in Empfindlichkeit und Spezifität zumindest gleichwertig ist.

Zur Ausweitung unserer früheren Versuche¹ über die Hemmung des Wachstums von *Streptococcus faecalis* R durch 2-Amino-6-oxy-pteridin-aldehyd-(8) und 2-Amino-6-oxy-8-d-arabo-tetra-oxybutyl-pteridin und zur Prüfung der Frage, ob die Hemmung auch bei Folinsäure synthetisierenden Stämmen erfolgt, war es notwendig, eine Reihe von Bakterienstämmen auf ihre Folinsäurebedürftigkeit hin zu untersuchen.

Methodik

Nährmedium: In der Absicht, möglichst viele Bakterienstämme unter gleichen Bedingungen zu untersuchen, versuchten wir das in unserer vorigen Arbeit¹ benutzte Nährmedium für *Sc. faecalis* R zu verwenden. Das Nährmedium enthielt alle von J. Teply und C. A. Elvehjem² angegebenen Substanzen, mit Ausnahme des mit Norit behandelten Peptons. Als Aminosäurequelle diente mit Pankreatin abgebautes Casein³ (durch Behandeln mit Aktivkohle folinsäurefrei gemacht).

Das Nährmedium mit bzw. ohne Folinsäure wurde $\frac{1}{2}$ Stde. bei 100° sterilisiert. Stämme: Ihre Herkunft ist, wenn nichts anderes angegeben, bei Möller und Knoevenagel⁴ verzeichnet. Die Stämme wurden im allgemeinen auf Agar gehalten, wenn nicht, wie bei einigen pathogenen Bakterien, Spezialnährmedien erforderlich waren, und etwa jeden Monat auf neuen Agar überimpft. Zwecks Beimpfung der Versuchsröhrchen wurden Vorpassagen angelegt, zuerst in Glucose-Pepton (Difco + Merck), dann in synthetischem Medium + Folinsäure ($1,6 \text{ mg/cm}^3 = 1,6 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^3$), in dem alle untersuchten Stämme gutes Wachstum zeigten (mit Ausnahme von mehreren geprüften

Substanz	Konz. pro cm^3	Bemerkungen
KH_2PO_4	2,5 mg	mit Pankreatin [verdaut Rohrzuckerhydro- lysat hergestellt [nach ⁴
Na-Citrat	25 mg	
Casein	5 mg*	
Glucose	20 mg*	
Cystein-hydrochlorid	0,2 mg	Methylester [verseift
Adenin	0,01 mg	
Guanin	0,01 mg	
Uracil	0,01 mg	
Xanthin	0,01 mg	
Asparagin	0,1 mg	
d, l-Alanin	0,2 mg	
Aneurin	0,2 γ	
Lactoflavin	0,2 γ	
Nicotinsäure	0,6 γ	
Adermin	1,2 γ	
Ca-Pantothenat	0,4 γ	
Biotin	0,0004 γ *	
p-Aminobenzoesäure	0,01 γ	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	200 γ	
NaCl	100 γ	
Fe-Citrat	100 γ	
Mn-Sulfat	6,7 γ	

* Auf Ausgangsmaterial berechnet.

Tab. 1. Zusammensetzung des Nährmediums.

Gonokokkenstämmen). Die Versuchsröhrchen, die einmal keine, das andere Mal $1,6 \text{ mg/cm}^3$ Folinsäure enthielten, wurden mit 2 Ösen (Durchm. 2 mm) einer 24-stdg. Kultur aus der oben erwähnten zweiten Zwischenpassage beimpft. Die Stärke des Wachstums wurde durch Trübungsmessungen im Lange-Photometer gemessen. Bebrütungstemperaturen: s. Tabellen.

³ J. Teply u. C. A. Elvehjem, *Analyt. Chemistry* **19**, 358 [1947]; E. C. Roberts u. E. E. Snell, *J. biol. Chemistry* **163**, 499 [1946].

⁴ E. F. Möller u. C. Knoevenagel, *Klin. W.*, im Druck [1949].

¹ F. Weygand, E. F. Möller u. A. Wacker, *Z. Naturforschg.* **3b**, 299 [1948].

² J. Teply u. C. A. Elvehjem, *J. biol. Chemistry* **157**, 303 [1945].

Bacterium	Stamm	Bebrütungs- temperatur	Folinsäure- bedürfnis	Herkunft der Stämme ¹
<i>Streptococcus faecalis</i> R	—	37°	+	U.S. Stamm
<i>Streptococcus faecalis</i>	N.C.T.C.Nr.6459	37°	+	N.C.T.C.
<i>Lactobacillus casei</i>	—	37°	+	U.S. Stamm
<i>Lactobacillus helveticus</i>	N.C.T.C.Nr.6357	37°	+	N.C.T.C.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	St.K 1	37—45°	+	{ isoliert aus Schweizer- käse April 1947
<i>Streptococcus thermophilus</i>	St.K 2	37—45°	+	
<i>Betacoccus arabinosus</i>	a 11	28°	×	Prof.Orla Jensen, Kopenh.
<i>Streptobacterium casei</i>	C ₆ I	28°	0	Prof.Orla Jensen, Kopenh.
<i>Streptobacterium casei</i>	C ₆ III	28°	0	Prof.Orla Jensen, Kopenh.
<i>Streptobacterium plantarum</i>	10 S	28°	0	
<i>Streptobacterium plantarum</i>	10 S OJ	28°	0	
<i>Streptobacterium plantarum</i>	P 24	28°	0	Prof.Orla Jensen, Kopenh.
<i>Streptobacterium plantarum</i>	P 32	28°	0	Prof.Orla Jensen, Kopenh.

Tab. 2. Folinsäurebedürfnis von Milchsäurebakterien. Zeichenerklärung: (+) benötigt Folinsäure; (×) Zuwachseffekt durch Folinsäure; (0) braucht keine Folinsäure.

Bacterium	Stamm	Folinsäure- bedürfnis	Herkunft der Stämme ⁴
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	KiAu (1517)	+	Hyg. Inst. Heidelberg [Juni 1945]
<i>Staph. aureus</i>	S	+	
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	1548 Au	×	
<i>Staph. aureus</i>	N ₇ C	×	
<i>Staph. aureus</i>	1521 Au	×	
<i>Staph. aureus</i>	Bi Au	+	
<i>Staph. aureus</i>	Knoll Au	×	
<i>Staph. aureus</i>	Wa Au	+	
<i>Staph. aureus</i>	K 311	×	
<i>Staph. aureus</i>	Be	+	
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	1520	0	Diakonissenkrankenhaus, [Heidelberg 1947]
<i>Staph. aureus</i>	Bie	×	
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	Do	+	Hyg. Inst. Heidelberg [Oktober 1945]
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	Bo	0	
<i>Staph. aureus haemolyticus</i>	1648 Au	0	K.W.I. Sepsis Sept. 1943
<i>Staph. aureus</i>	Ste	0	
<i>Staph. aureus (Micrococcus?)</i>	IG Au	+	
<i>Staph. aureus + albus (haemolytisch)</i>	Bü A Au	0	
<i>Staph. albus</i>	1646 A	0	
<i>Staph. albus haemolyticus</i>	1531 A	0	
<i>Staph. albus</i>	1833 A	+	
<i>Staph. albus haemolyticus</i>	1648 A	+	
<i>Staph. albus</i>	1837 A	+	
<i>Staph. albus</i>	WA	×	
<i>Staph. albus</i>	AI	0	

Tab. 3. Folinsäurebedürfnis von Staphylokokken (bei 37°). Zeichenerklärung: s. Tab. 2.

Ergebnisse

An Milchsäurebakterien, von denen bekannt ist, daß manche Stämme Folinsäure zum Wachstum brauchen, untersuchten wir 13 Stämme. Von diesen benötigten 6 Stämme unbedingt Folinsäure, 1 Stamm zeigte mit Folinsäure einen Zuwachseffekt, während die restlichen 6 Stämme ohne dieses Vitamin normales Wachstum zeigten (s. Tab. 2).

Über das Folinsäurebedürfnis von Staphylo-

kokken ist uns bisher nichts bekannt geworden. Wir untersuchten 25 Stämme und fanden, daß für 10 Stämme Folinsäure ein unbedingt notwendiger Wuchsstoff ist. 7 Stämme wurden nur im Wachstum gefördert, während die restlichen 8 Stämme in ihrem Wachstum von Folinsäure nicht beeinflusst wurden (s. Tab. 3). Von 2 Stämmen (*Staph. aureus* KiAu und *Staph. aureus* S) wurde das Folinsäurebedürfnis quantitativ, ebenso die Spezifität, untersucht, worüber weiter unten berichtet wird.

Bacterium	Stamm	Folinsäure- bedürfnis	Herkunft der Stämme ⁴
<i>Streptococcus anhaemolyticus</i>	1646 Sc	×	Süddeutsche Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan
<i>Enterococcus</i>	1883 En	+	
<i>Micrococcus pyogenes</i>	MP	0	
<i>Micrococcus aureus</i>	Ma	0	
<i>Micrococcus roseus</i>	Mr	0	
<i>Sarcina lutea</i>	SL	0	
<i>Sarcina flava</i>	Sarc.	0	

Tab. 4. Folinsäurebedürfnis von verschiedenen Bakterien. Zeichenerklärung: s. Tab. 2.

In Tab. 4 ist das Folinsäurebedürfnis einiger weiterer Bakterien aufgeführt.

Folgende Bakterien wuchsen in folinsäurehaltigem und folinsäurefreiem Medium gleich stark:

Proteus-vulgaris-Stämme: X 19; O Pr; 1035 Pr; 1871 Pr; 1872 Pr; 1961 Pr; 2602 Pr; 3609 Pr; 3747 Pr; 3799 Pr; 3880 Pr; 4332 Pr; 4406 Pr; 7466 Pr; 0964 Pr.

Bacterium-coli-commune-Stämme: OCo und CoI.

Bacterium-coli-imperfectum-Stämme: 3920 und 3920a. Weitere Coli-Stämme: 747 Co; 882 Co; 1883 Co; 1857 Co.

Bacterium pyocyaneus: 0421 Py.

Bacterium-fluorescens-Stämme: Fl. I; Fl. II; SG 120 Fl.

Je ein Stamm von *Bacterium dysenteriae*: A; B; D; H; Schmitz; Strong; Shiga-Kruse; Flexner. *Bacterium typhi*; *Bacterium paratyphi* A und B; *Bacterium paratyphi (enteritidis)* Gaertner; *Bacterium paratyphi (enteritidis)* Breslau (Herkunft: Hyg. Inst. Heidelberg).

Die folgenden Stämme von *Bact. diphtheriae*: Bi 1240; Bi 1185; Bi 1125; Bi 1102 (Herkunft:

Hyg. Inst. Heidelberg) wurden durch Folinsäure bei der benutzten Konzentration etwas gehemmt.

Folinsäuretest mit *Staphylococcus aureus*

Von der Beobachtung ausgehend, daß einige Stämme von *Staph. aureus* und *Staph. albus* unbedingt Folinsäure in dem verwendeten Nährmedium zum Wachstum benötigen (vgl. Tab. 3), haben wir das Folinsäurebedürfnis und die Spezifität bei zwei Stämmen, nämlich *Staph. aureus* KiAu und *Staph. aureus* S näher untersucht.

In den Abb. 1a und 1b sind Wachstumskurven für die beiden Stämme nach 15-, 23- und 48-stdg. Bebrütung aufgezeichnet. Eine weitere Bebrütung führte nicht mehr zu stärkerem Wachstum.

Zur quantitativen Bestimmung von Folinsäure ist natürlich nur der mittlere lineare Teil der Kurven verwendbar. In den Abb. 2a und 2b ist dieser für *Staph. aureus* KiAu im Vergleich mit *Sc. faecalis* R dargestellt. Die Folinsäurekonzentration wurde in kleinen und linearen Intervallen gesteigert. Es zeigte sich, daß die Leerwerte bei dem

Abb. 1a und 1b. Wachstum von *Staph. aureus* in Abhängigkeit von der Folinsäurekonzentration nach 15 Stdn. $\triangle - \triangle$, 23 Stdn. $+-+$ und 48 Stdn. $\square - \square$ bei Stamm KiAu (Abb. 1a) und Stamm S (Abb. 1b). Abszissen: Konz. an Folinsäure in mg/cm^3 . Ordinaten: Extinktionswerte $\times 1000$ am Lange-Photometer.

Staphylokokkus niedriger liegen als bei *Sc. faecalis* R. Die Nullwerte sind bei dem Staphylokokkus auffallend konstant, während die Streuungen im linearen Teil genau so gering sind wie bei *Sc. faecalis* R. Die Streuungen im optimalen Gebiet sind größer. Aus den Abb. 2 ergibt sich ferner, daß die Kurven für KiAu bereits nach 15 Stdn. praktisch linear sind und das Wachstum stark genug ist, während dies für *Sc. faecalis* R erst nach 20 Stdn. der Fall ist. Es ist für die Geschwindigkeit des Testes gleichgültig, ob mit einer Öse (Durchm. 2 mm) oder mit 0,1 cm³ einer 24 Stdn.

Abb. 2a und 2b. Linearer Teil der Wachstumskurven von *Staph. aureus* KiAu (Abb. 2a) bzw. *Sc. faecalis* R (Abb. 2b) nach 15 Stdn. +—+ und 24 Stdn. Δ—Δ. Mittelwerte aus je 7 Bestimmungen. Abszissen und Ordinaten wie in Abb. 1.

alten Kultur beimpft wird. Durch die Verwendung einer großen Impfmenge wird der Nullwert weder bei *Staph. aureus*, noch bei *Sc. faecalis* R erhöht. Das Alter der Impfkultur soll nicht größer als 24 Stdn. sein, da bei Verwendung älterer Impfkulturen die Wachstumsgeschwindigkeit sinkt.

Gegenüber dem bekannten Folinsäuretest mit *Sc. faecalis* R⁵ scheint uns bei dem neuen Test die leichte Zugänglichkeit geeigneter Staphylokokkenstämme der wesentliche Vorteil zu sein, neben den tieferen Nullwerten und der etwas größeren Wachstumsgeschwindigkeit.

Im Vergleich zu *Sc. faecalis* R war es erforder-

	<i>Staph. aureus</i> KiAu	<i>Sc. faecalis</i> R	<i>Sc. faecalis</i> R nach der Literatur
Folinsäure	1,0	0,8	0,3 ⁷
Formylfolinsäure	1,0	0,8	0,3 ⁸
Pteroinsäure	2,0	1,9	0,8 ⁷
Rhizopterin	0,2	0,16	0,034 ⁹
Teropterin ⁶	34	28	4,2 ⁷
Thymin	550	525	600 ¹⁰

Tab. 5. Konzentrationen verschiedener Stoffe in mg/cm³ für halboptimales Wachstum von *Staph. aureus* KiAu und *Sc. faecalis* R.

lich, auch bei *Staph. aureus* die mit der Folinsäure verwandten Verbindungen auf Wuchsstoffwirkung zu prüfen.

In den Abb. 3a und 3b sind die Wirksamkeiten von Folinsäure, Formylfolinsäure, Pteroinsäure, Pteroyl-triglutaminsäure (= Teropterin⁶) und Thymin bei *Staph. aureus* KiAu (Abb. 3a) und *Sc. faecalis* R (Abb. 3b) aufgetragen. Die Konzentrationen für halboptimales Wachstum in mg/cm³ sind für die beiden Bakterienstämme in Tab. 5 zu finden. (Die Werte sind Mittel aus 4 bis 8 Einzelwerten, die ihrerseits um ± 10% streuen.)

4-Methyluracil zeigte bei *Staph. aureus* KiAu und *Sc. faecalis* R in einer Konz. von 174 γ/cm³ eine schwache, aber deutliche Wachstumswirkung.

Die in der letzten Spalte angegebenen, der Literatur entnommenen Wirksamkeiten wurden offenbar in Testen ermittelt, in denen säurehydrolysiertes Casein verwendet worden war. Da nach Roberts und Snell³ die optimal wirksamen Konzentrationen der Folinsäure für *Sc. faecalis* R bei Anwendung von pankreatin-verdaulichem Casein 2,6-mal größer sind als mit säurehydrolysiertem Casein, ist die Übereinstimmung unserer Werte mit denen der Literatur befriedigend. Kleinere Unterschiede dürften darauf zurückzuführen sein, daß das Casein anderer Herkunft war und das Peptonpräparat weggelassen wurde. Die Konzentrationen für halboptimales Wachstum sind bei

⁵ E. E. Snell u. W. H. Peterson, J. Bacteriol. **39**, 273 [1940]; T. D. Luckey, G. M. Briggs u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry **152**, 157 [1944]; O. D. Bird, B. Breßler, R. A. Brown, C. J. Campbell u. A. D. Emmett, J. biol. Chemistry **159**, 631 [1945]; H. K. Mitchell u. E. E. Snell, Univ. Texas Publ. Nr. 4137 [1941]; M. Landy u. D. M. Dicken, J. Lab. clin. Med. **27**, 1086 [1942]; L. J. Teply u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry **157**, 303 [1945]; E. C. Roberts u. E. E. Snell, J. biol. Chemistry **163**, 499 [1946].

⁶ Teropterin (Lederle Laboratories), etwa 70% Pteroyl-triglutaminsäure enthaltend.

⁷ C. W. Waller et al., J. Amer. chem. Soc. **70**, 19 [1948].

⁸ M. Gordon, J. M. Ravel, R. E. Eakin u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. **70**, 878 [1948].

⁹ E. L. Rickers, L. Chalet u. J. Keresztesy, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2749 [1947].

¹⁰ K. K. Krueger u. W. H. Peterson, J. biol. Chemistry **158**, 145 [1945].

Abb. 3a und 3b. Wachstum von *Staph. aureus* KiAu (Abb. 3a) und *Sc. faecalis* R (Abb. 3b) in Anwesenheit steigender Mengen von $\circ - \circ$ Folsäure, $+ - +$ Formylfolsäure, $\square - \square$ Pteroinsäure, $\Delta - \Delta$ Pteroyl-triglutaminsäure, $\times - \times$ Thymin. Abszissen: Konzentrationen in mg/cm^3 . Ordinaten: Extinktionswerte $\times 1000$ am Lange-Photometer.

dem Staphylokokkenstamm KiAu für alle geprüften Verbindungen etwas höher als bei *Sc. faecalis* R.

Die Beobachtungen über den Antagonismus Folsäure: 2-Amino-6-oxy-pteridinaldehyd-(8) und die Wuchsstoffwirkung der Kombination dieses Aldehyds mit *p*-Aminobenzoesäure bzw. *p*-

Aminobenzoyl-*l*-glutaminsäure bei *Sc. faecalis* R, worüber wir berichtet haben¹, konnten wir auch bei den folsäurebedürftigen Staphylokokken und verschiedenen Milchsäurebakterien machen. Näheres wird darüber später mitgeteilt werden.

Wir danken Fr. F. Uhl vom Hyg. Inst. Heidelberg für die Reinzüchtung verschiedener Bakterienstämme.