

Wirkung von N-Trichlormethylthio-tetrahydrophthalimid auf Weinhefen

von

L. DROENICA, E. ŠTURDÍK und E. MINÁRIK

Effect of N-trichloromethylthio-tetrahydrophthalimide on wine yeasts

S u m m a r y . — N-trichloromethylthio-tetrahydrophthalimide (NTT), an active component of many commercial fungicidal preparations used in viticulture, is a powerful inhibitor of yeast fermentation due to the inactivation of some glycolytic enzymes. In experiments especially with respiratory yeast types the results obtained show also interferences of NTT with the oxidative phosphorylation. The inhibition of this process and also of glycolysis is a result of modification of proteins requiring thiol groups for their catalytic activity. As a consequence of the multitarget effect of NTT on yeast energy metabolism, biosynthetic processes are inhibited and, finally, yeast growth is blocked. These facts are indicated by the results obtained from study of NTT influence on incorporation of ¹⁴C-labelled precursors of both protein and nucleic acid biosynthesis. Data included in the paper make it also possible to compare the antiyeast activities of different types of commercial fungicides. The importance of yeasts as a model for the elucidation of the mode of action of antifungal substances is emphasized.

Einleitung

N-Trichlormethylthio-tetrahydrophthalimid (NTT) ist als wirksame Komponente in vielen Pilzbekämpfungsmitteln enthalten, die im Weinbau und bei anderen landwirtschaftlichen Kulturen verwendet werden. Die Problematik der Wirkstoffrückstände und der Gärbeeinflussung nach Behandlung von Reben mit diesen Präparaten ist schon länger bekannt. So können Orthocid- oder Captanrückstände im Traubenmost zu beträchtlichen Gärverzögerungen führen. Andererseits kann durch die Rückstände auch die Entwicklung unerwünschter Kahlhefen (*Hansenula anomala*, *Candida vini* usw.) gefördert werden (KAROW und KAROWA 1965, NYERGES und LEHOCZKY 1965, MINÁRIK und RÁGALA 1975). Der Wirkungsmechanismus der Gärhemmung durch NTT wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Das polyvalente Fungizid, das gegen verschiedene Pilzschädlinge eingesetzt wird, ist als Thiolreagens zu betrachten. Somit besteht die Möglichkeit, daß — durch Hemmung der Thiolenzyme — Eingriffe an mehreren Stellen des Zellstoffwechsels stattfinden (LUKENS 1971). In der vorliegenden Arbeit wird die primäre Einwirkung von NTT auf den energetischen Stoffwechsel von Gärungs- und Atmungstypen der Hefen untersucht. Zugleich sollen diese Untersuchungen zum Verständnis der allgemeinen fungitoxischen Wirksamkeit von NTT beitragen,

Material und Methoden

1. Hefen und Protoplasten

Die Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Sherry (CCY 28-3), *S. cerevisiae* XII (CCY 21-4-13), *S. cerevisiae* XII a (CCY 21-4-19) und *Candida albicans* Pn 10 (CCY 29-3-91) wurden auf schrägem Würze-Agar aufbewahrt und alle 14 d umgeimpft. Die Kultur erfolgte aerob auf einem Schüttelapparat bei 28 °C im synthetischen Nährboden VITA, der Ammoniumsulfat und Glucose als einzige N- bzw. C-Quelle sowie Mineralsalze und Vitamine enthält (SVOBODOVÁ und DROBNICA 1962). Die Zellenkonzentration wurde nephelometrisch eingestellt. Alle Versuche wurden mit Hefen aus der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Protoplasten von *S. cerevisiae* wurden mit lyophilisiertem Schneckenextrakt (snail gut juice) gewonnen. Methodische Einzelheiten hierzu, zur Bestimmung des Konversionsgrades und der Stoffwechselaktivität von Protoplasten sowie zum Einfluß von Hemmstoffen auf das Verhalten von Protoplasten sind einer früheren Arbeit zu entnehmen (DROBNICA *et al.* 1968).

2. Fungizide Substanzen und Laborchemikalien

Es wurden die Handelspräparate Antracol, Euparen, Morestan (Bayer, Leverkusen), Delan flüssig (E. Merck, Darmstadt), Dithane M 45 und Karathane (Rohm and Haas, Philadelphia), Manzate D (Du Pont de Nemour, Wilmington), Nirit (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M.) und Orthocid 50 (Schering AG, W-Berlin) sowie einige reine Wirkstoffe verwendet. Die genannten Fungizide sowie NTT wurden in allen Versuchen als Dimethylsulfoxid- (DMSO-)Lösungen zugesetzt. DMSO erwies sich für diese Untersuchungen als am besten geeignet (DROBNICA *et al.* 1970).

Die Bestimmung von Glucose und Enzymaktivitäten wurde mit Biochemikalien und Enzymen der Firma Boehringer, Mannheim, vorgenommen. Als radioaktive Präkursoren dienten L-(U-¹⁴C)Leucin (0,1 mCi/0,145 mg) und (8-¹⁴C)Adeninsulfat (0,1 mCi/0,307 mg) aus dem Institut für Forschung, Produktion und Ausnutzung von Radioisotopen, Praha. Das Ellman-Reagens — 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) — wurde von der Firma Fluka, Buchs, DMSO, Vitamine und alle übrigen Chemikalien (p. a.) von der Firma Lachema, Brno, bezogen.

3. Untersuchung des Hefenwachstums

Die Hefensuspension (Medium VITA, logarithmische Wachstumsphase), deren Konzentration durch Messung der Extinktion bei 650 nm bestimmt wurde, wurde nach Erreichen einer Zellenzahl von $1 \cdot 10^7/\text{ml}$ ($E_{650\text{nm}} = 0,15$) in L-förmige Standardeprouvetten (10 ml) verteilt. Sodann wurde in DMSO gelöstes Fungizid zugesetzt. Die Dosierung wurde dergestalt vorgenommen, daß — neben einer Kontrollvariante — im Kulturmedium Fungizidkonzentrationen von 78,125, 31,25, 12,5, 5, 2 und 0,8 µg/ml vorlagen; die DMSO-Konzentration im Medium betrug 1 %. Nach der Zugabe des Hemmstoffes wurde die Kultur bei 28 °C auf dem Schüttelapparat (90 Schwingungen/min) fortgesetzt. Das Hefenwachstum wurde durch Extinktionsmessungen in den L-Eprouvetten selbst, die als spektrophotometrische Küvetten dienten, verfolgt. Unter den vorliegenden Kulturbedingungen besteht eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Zellenkonzentration bis zur maximalen stationären Wachstumsphase.

4. Manometrische Messungen

Sie dienen der Untersuchung der Hefenatmung und -gärung mit und ohne NTT. In den Versuchen wurden Hefen aus der exponentiellen Wachstumsphase benützt. Sie wurden in 0,05 M KH_2PO_4 und 1,5 % Glucose suspendiert, so daß eine Zellenkonzentration von $1 \cdot 10^7$ /ml vorlag. 3 ml dieser Suspension wurden in den Hauptraum der Warburg-Gefäße pipettiert. Die einzelnen Konzentrationen des in DMSO gelösten Inhibitors wurden jeweils in zwei Gefäße gegeben. Die Messungen und Berechnungen erfolgten in der üblichen Weise (KLEINZELLER 1965).

5. Enzymversuche

Die Enzymaktivitäten wurden in zellfreien Extrakten der Protoplasten bestimmt. Die Protoplastensuspension (12,5 ml, $1 \cdot 10^7$ /ml) wurde hierzu zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4 °C) und das Sediment in 1 ml redestilliertem Wasser suspendiert. Nach 30 min wurde das Protoplastenlysat zentrifugiert (5000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde zur spektrophotometrischen Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet. Gemessen wurde die Geschwindigkeit der NAD^+ - (NADP^+ -)Reduktion bzw. NADH-Oxidation anhand der Extinktion bei 340 nm. Der Reaktionsablauf wurde während 5 min in 1-ml-Quarzküvetten bestimmt. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen zur Bestimmung einzelner Enzyme, d. h. der Hexokinase (EC 2.7.1.1), 6-Phosphofructo-Kinase (EC 2.7.1.11), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) und Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1) ist bei DROBNICA *et al.* (1975) beschrieben.

6. Inkorporation radioaktiver Präkursoren

Die Biosynthese der Proteine und Nukleinsäuren mit und ohne NTT wurde an der Weinhefe *S. cerevisiae* Stamm Sherry untersucht. Die NTT-Lösung mit je 0,04 ml in DMSO wurde in 6 Epruvetten pipettiert, in die 7. nur DMSO (Kontrolle). Dann wurden allen Epruvetten 4 ml Hefekultur zugesetzt. In eine 2. Serie von 7 Epruvetten wurden 2 ml der Serie 1 pipettiert. Der Inhalt der Proberöhrchen wurde 10 min bei 28 °C inkubiert. Sodann wurden die radioaktiven Präkursoren zugesetzt: in die 1. Epruvettenserie 0,1 ml ^{14}C -Adenin (0,234 $\mu\text{Ci}/30,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) und in die 2. Serie 0,1 ml ^{14}C -Leucin (0,210 $\mu\text{Ci}/5,3 \mu\text{g}/\text{ml}$) in der angegebenen Reihenfolge. Nach 1 h Inkubation bei 28 °C wurden die Epruvetten in ein Eisbad übertragen. Danach wurde 1 ml 15 %ige Trichloressigsäure zugefügt. Nach 90–120 min wurde der Inhalt der Epruvetten membranfiltriert (\varnothing 2,5 μm , Synpor, Synthesia, Uhříněves). Der Niederschlag wurde mit 10 ml 5 %iger Trichloressigsäure und 10 ml eisgekühltem destilliertem Wasser gewaschen. Nach Trocknen der Filter bei 105 °C (20 min) wurde die Radioaktivität gemessen.

Für ^{14}C -Adenin wurde die Kinetik der Inkorporation analog bestimmt; nur wurde die Kultur in L-Epruvetten auf dem Schüttelapparat vorgenommen (eine Epruvette enthielt 7 ml Hefekultur, 0,07 ml NTT-Lösung in DMSO und 0,25 ml der Präkursorlösung mit einer spezifischen Aktivität von 6,1 $\mu\text{Ci}/792,5 \mu\text{g}/\text{ml}$). Die Probeentnahme von je 1 ml erfolgte 0, 15, 30, 45 und 60 min nach der ^{14}C -Adenin-Zugabe.

7. Bestimmung der SH-Gruppen-Konzentration

Zur Zellsuspension von *S. cerevisiae* Stamm Sherry (logarithmische Wachstumsphase, $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) wurde die NTT-Lösung in DMSO in verschiedenen Kon-

zentrationen zugefügt. Nach 1 h statischer Inkubierung bei 28 °C wurden 15 ml Suspension unter Kühlung zentrifugiert und das Sediment in 1 ml 0,2 M des Tris-Puffers (pH 7,2) suspendiert. Unmittelbar danach wurden 0,1 ml methanolischer Ellman-Reagens-Lösung (4 mg/ml) und nach 10 min noch 4 ml Methanol zugefügt. Nach Zentrifugieren wurde im Überstand die Extinktion bei 412 nm in 1-ml-Küvetten gemessen. Methodische Einzelheiten hierzu sowie zur Auswertung sind andernorts beschrieben (SEDLÁK und LINDSAY 1968). Die Konzentration der SH-Gruppen der Hefensuspension (25 mg Trockensubstanz/ml Tris-Puffer) entspricht einem Wert von 28–29 mM.

Ergebnisse und Diskussion

1. Vergleich der Hemmwirkung einiger reiner Fungizide bzw. Handelspräparate auf das Hefenwachstum

In Tabelle 1 sind Angaben zusammengefaßt, die Aufschluß über die Wirksamkeit von 9 Fungizid-Handelspräparaten bzw. einiger wirksamer Komponenten von Fungiziden auf das Wachstum der Weinhefe *S. cerevisiae* geben.

Abb. 1 zeigt die Wirkung von Orthocid 50 (Wirkstoff: NTT) und die Bestimmungsmethode des ED₅₀-Wertes nach 6stündiger Kultur, d. h. derjenigen Konzen-

Tabelle 1

Hemmwirkung käuflicher Fungizide und einiger ihrer wirksamen Komponenten auf das Wachstum von *S. cerevisiae* Stamm Sherry · Der Grad der Hemmwirkung wird ausgedrückt durch die ED₅₀-Werte (µg/ml) nach 3- und 6stündiger Inkubation und durch die MIC-Werte (µg/ml) nach 24stündiger Inkubation

Inhibition activity of commercial fungicides and some of their effective components on growth of *S. cerevisiae* var. Sherry · Antiyeast activity is characterized by ED₅₀ values (µg/ml) estimated after 3 and 6 h incubation and by MIC values (µg/ml), which were assessed after 24 h

| Präparat | ED ₅₀ (3 h) | ED ₅₀ (6 h) | MIC (24 h) |
|--|------------------------|------------------------|------------|
| Antracol | 25,1 | > 78,1 | > 78,1 |
| Delan flüssig (1) | < 0,8 | < 0,8 | 2,0 |
| Dithane M-45 (2) | > 78,1 | > 78,1 | > 78,1 |
| Euparen | < 0,8 | < 0,8 | 12,5 |
| Karathane | 8,9 | > 78,1 | > 78,1 |
| Manzate D (1) | > 78,1 | > 78,1 | > 78,1 |
| Morestan | > 78,1 | > 78,1 | > 78,1 |
| Nirit | 6,9 | 10,0 | > 78,1 |
| Orthocid 50 (3) | 2,2 | 4,5 | 31,2 |
| 1: 1,4-Dithiaanthrachinon- -2,3-dicarbonitril | 0,3 | 0,2 | 0,8 |
| 2: Zink-Mangan-Äthyl- -bis-dithiokarbamat | 91,5 | 98,1 | > 156,2 |
| 3: N-Trichlormethylthio- tetrahydrophthalimid | 1,3 | 2,8 | 12,5 |

(1), (2), (3) = In den Handelspräparaten enthaltene Wirkstoffe 1, 2, 3.

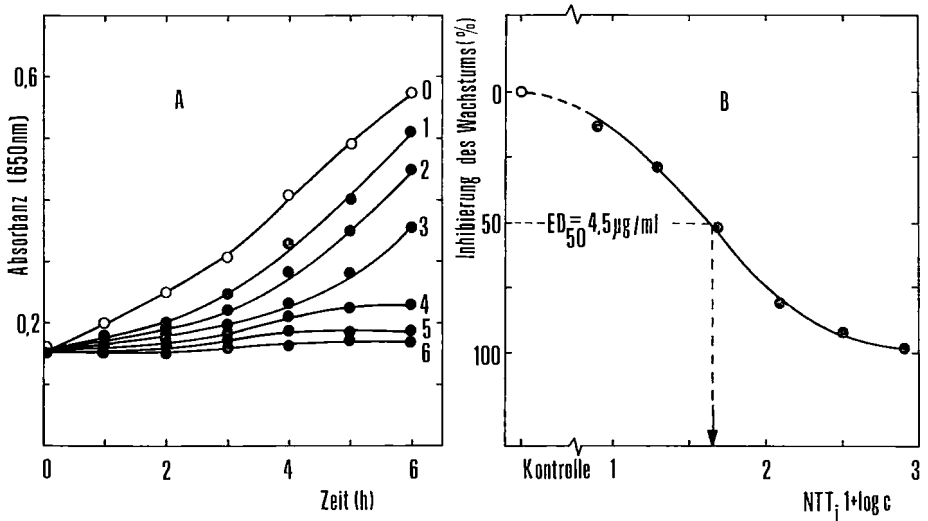


Abb. 1: Beeinflussung des Wachstums von *S. cerevisiae* Stamm Sherry mit Orthocid 50 (A) und Methode der ED₅₀-Bestimmung (B). Wachstum densitometrisch in L-Eprouvetten, als spektrophotometrische Küvetten angewandt, bestimmt. Intensives Lüften, 28 °C, synthetisches Medium VITA. Orthocid-50-Konzentrationen: 0 (0), 0,8 (1), 2 (2), 5 (3), 12,5 (4), 31,25 (5) und 78,125 µg/ml (6).

Effect of Orthocid 50 on growth of *S. cerevisiae* var. Sherry (A) and method for determining ED₅₀ values (B). Growth was followed densitometrically in L-shaped test tubes as spectrophotometric cuvettes in synthetic medium VITA under intensive aeration at 28 °C. Used concentrations of Orthocid 50: 0 (0), 0.8 (1), 2 (2), 5 (3), 12.5 (4), 31.25 (5) and 78.125 µg/ml (6).

Tabelle 2

Beeinflussung des O₂-Verbrauches, der CO₂-Bildung und des RQ-Wertes durch NTT bei *C. albicans*

Effect of NTT on O₂ uptake, CO₂ production and on respiration quotient of *C. albicans*

| NTT-Konzentration µg/ml | O ₂ -Verbrauch µl/3 h | CO ₂ -Bildung µl/3 h | RQ |
|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------|
| 0 | 480 | 1000 | 2,08 |
| 1,2 | 560 | 1110 | 1,98 |
| 6,0 | 380 | 1310 | 3,45 |
| 15,0 | 185 | 570 | 3,08 |
| 30,0 | 20 | 45 | 2,25 |

tration des Präparates in µg/ml, die zu einer 50%igen Wachstumshemmung der Hefe gerade benötigt wird. (Die Bestimmung für das 3-h-Intervall wurde entsprechend vorgenommen.) Die Wirkung der übrigen Präparate wurde in derselben Weise charakterisiert.

Der MIC-Wert stellt die jeweils niedrigste der getesteten Konzentrationen dar, die das Wachstum von *S. cerevisiae* nach 24stündiger Kultur noch völlig unter-

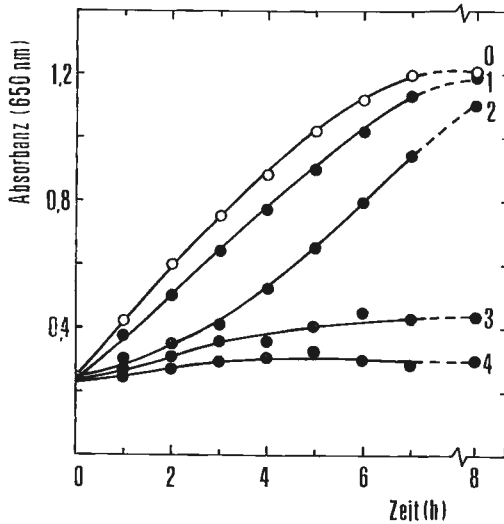


Abb. 2: Wachstum von *C. albicans* ohne (0) und mit Orthocid 50 in Konzentrationen von 1,25 (1), 6,25 (2), 31,25 (3) und 156,25 $\mu\text{g/ml}$ (4). Wachstum densitometrisch in L-Eprouvetten unter intensivem Lüften bei 28 °C im synthetischen Medium VITA untersucht.

Growth of *C. albicans* without (0) and in presence of Orthocid 50 in concentrations 1.25 (1), 6.25 (2), 31.25 (3) and 156.25 $\mu\text{g/ml}$ (4). Growth was followed densitometrically in L-shaped test tubes in synthetic medium VITA under intensive aeration at 28 °C.

drückt. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß Orthocid 50 ein Präparat mit ausgeprägter Hemmwirkung gegen Hefen ist. Wenn seine wirksame Komponente (NTT) im reinen Zustand verwendet wird, kann der gleiche Effekt mit der ungefähr halben Konzentration erzielt werden. Es sei noch erwähnt, daß durch Orthocid 50 bei 31,25 $\mu\text{g/ml}$ VITA-Nährboden eine totale Wachstumshemmung der Bäckerhefe *S. cerevisiae* XII hervorgerufen wird. Dies gilt auch für den hefenartigen Mikroorganismus *C. albicans* (Abb. 2).

2. Wirkung von NTT auf die Hefenatmung und -gärung

Ergebnisse von Versuchen mit dem fermentativen Hefentyp *S. cerevisiae* Stamm Sherry zeigen, daß mit NTT die anaerobe und auch die aerobe Hefengärung in Anwesenheit von Glucose als einzigem energetischem Substrat völlig gehemmt wird. Es sei noch bemerkt, daß Konzentrationen, die eine völlige Gärhemmung hervorrufen, nicht auch zur Hemmung der Respiration ausreichen (Abb. 3).

Im Falle atmungsdefizienter Mutanten (*S. cerevisiae* XII a), bei denen der energetische Bedarf vor allem durch die Glykolyse gedeckt wird, kann eindeutig geschlossen werden, daß die festgestellte Hemmung der CO_2 -Bildung (Abb. 4) als Folge des NTT-Eingriffs in die Glykolyse zu werten ist. Versuche mit dem intensiv atmenden Hefentyp *C. albicans* im glucosehaltigen Medium zeigten, daß NTT bei 30 $\mu\text{g/ml}$ eine völlige Hemmung der CO_2 -Bildung sowie des O_2 -Verbrauches verursacht. Durch niedrige Konzentrationen werden diese Prozesse jedoch stimuliert (Abb. 5). Die stimulierende Wirkung von NTT in der Konzentration von 1,2 $\mu\text{g/ml}$ ist nicht durch Veränderungen des ursprünglichen RQ-Wertes gekennzeichnet, wie Tabelle 2 zu entnehmen ist. 6 μg NTT/ml bewirkten sogar eine 31 %ige Erhöhung der CO_2 -Bildung

und gleichzeitig eine signifikante RQ-Wert-Erhözung. Die beobachtete Wirkung niedriger NTT-Konzentrationen kann nach früheren Befunden als Folge der Beeinflussung mitochondrialer Funktionen gedeutet werden (DROBNICA 1967). Die Berechtigung dieser Auffassung geht auch aus Versuchen mit isolierten Mitochondrien her-

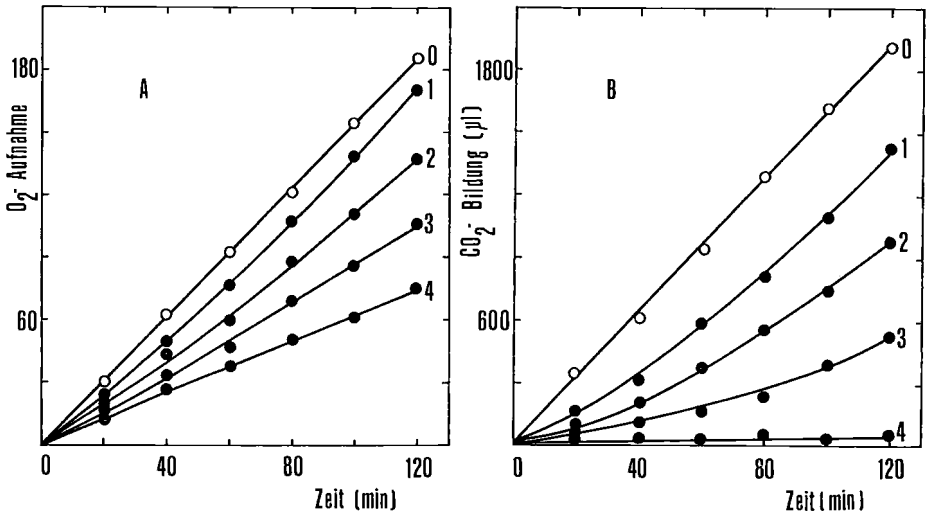


Abb. 3: Wirkung von NTT auf Atmung (A) und anaerobe Gärung (B) von *S. cerevisiae* Stamm Sherry. Gasaustausch manometrisch in 0,05 M KH_2PO_4 mit 1,5 % Glucose bei 25 °C untersucht. Hefenkonzentration: $1 \cdot 10^7$ /ml. NTT-Konzentrationen: 0 (0), 2 (1), 5 (2), 8,35 (3) und 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4).

Effect of NTT on respiration (A) and anaerobic fermentation (B) of *S. cerevisiae* var. Sherry. Exchange of gases was followed manometrically in 0,05 M KH_2PO_4 with 1,5 % glucose at 25 °C. Concentration of yeast $1 \cdot 10^7$ /ml, concentrations of inhibitor 0 (0), 2 (1), 5 (2), 8,35 (3) and 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4).

Tabelle 3

Aktivität einiger Enzyme nach 60minütiger Einwirkung von NTT (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf Protoplasten von *S. cerevisiae* ($4 \cdot 10^7$ /ml) und deren Homogenate bei 28 °C. Enzymaktivitäten in nmol/min/ml angegeben

Activities of some enzymes after 60 min treatment of NTT (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on protoplasts of *S. cerevisiae* ($4 \cdot 10^7$ /ml) and their crude extracts at 28 °C. Enzyme activities are expressed in nmol/min/ml

| Enzym | Kontrolle | Protoplasten | Homogenate |
|--|-----------|--------------|------------|
| Hexokinase | 47,0 | 3,3 | 30,1 |
| Phosphofructo-Kinase | 16,2 | 1,2 | 5,2 |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase | 570,0 | 2,6 | 6,3 |
| Alkohol-Dehydrogenase | 24,1 | 2,4 | 6,2 |
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase | 13,3 | 1,0 | 1,1 |

vor, wo NTT in niedrigen Konzentrationen als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung und in höheren Konzentrationen als Inhibitor der Atmung auftrat (DROBNICA *et al.* 1974).

3. Lokalisierung des Eingriffs in die Glykolyse

Aufgrund früherer Arbeiten (DROBNICA *et al.* 1968) erscheint es zweckmäßig, für Untersuchungen dieser Art Hefenprotoplasten zu verwenden. Im vorliegenden Fall wirkten 100 μg NTT/ml auf isolierte Hefenprotoplasten in einem synthetischen Medium mit Glucose und mit KCl als osmotischem Stabilisator. Nach 1 h wurden die Protoplasten einer Osmolyse in redestilliertem Wasser unterzogen. Das zentri-fugierte Cytosol diente der Untersuchung der Aktivität einiger glykolytischer Enzyme und von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Dem analog hergestellten Extrakt (Homogenat) aus Protoplasten ohne NTT wurden 100 μg NTT/ml zugefügt. Nach 1 h erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität.

Tabelle 3 zeigt eine ausgeprägte Hemmung der Aktivität des entscheidenden Thiolenzyms der Glykolyse, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, sowie die Inhibition weiterer Thiolenzyme. Versuche mit reinen Präparaten von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (66 μg Protein/ml 0,1 M Carbonat-Hydrocarbonat-Puffer, pH 8,6) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (4 μg Protein/ml 0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,6) zeigten, daß NTT als direkter Inhibitor dieser Enzyme zu betrachten ist. Bei 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des mit Enzym versetzten Puffers verursachte NTT nach 2 h eine völlige Hemmung des ersten und eine 94 %ige Inaktivierung des zweiten Enzymes.

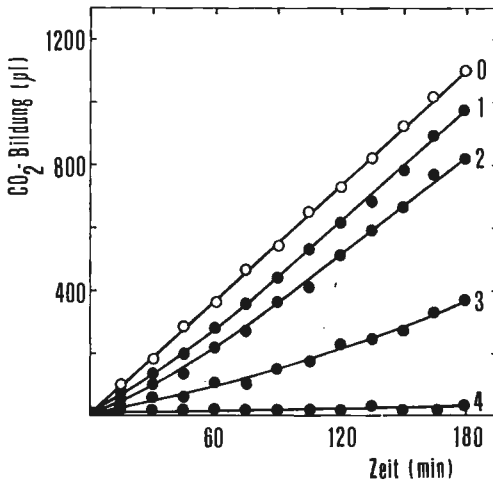


Abb. 4: Aerobe Gärung atmungsdefizienter Mutanten von *S. cerevisiae* XII a ohne (0) und mit NTT in Konzentrationen von 1,2 (1), 6 (2), 15 (3) und 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4). Die Gärung wurde manometrisch durch Messung der CO_2 -Bildung in 0,05 M KH_2PO_4 mit 1,5 % Glucose bei 25 °C untersucht. Hefenkonzentration: $1 \cdot 10^7/\text{ml}$.

Aerobic fermentation of respiratory deficient mutant *S. cerevisiae* XII a without (0) and in presence of NTT in concentrations 1.2 (1), 6 (2), 15 (3) and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4). Fermentation was followed by manometric measurements of CO_2 production in 0.05 M KH_2PO_4 with 1.5 % glucose at 25 °C. Concentration of yeast: $1 \cdot 10^7/\text{ml}$.

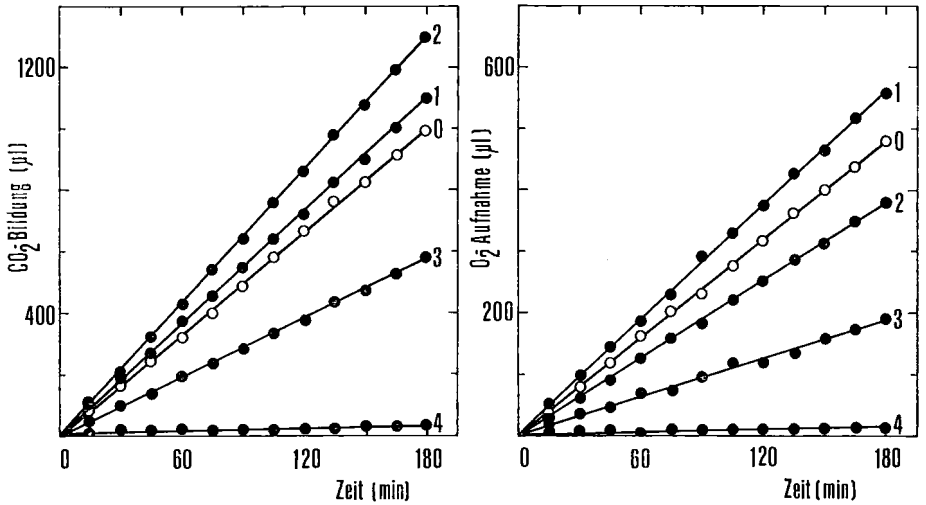


Abb. 5: Wirkung von NTT auf O₂-Verbrauch und CO₂-Bildung bei *C. albicans*. Gasaustausch manometrisch in 0,05 M KH₂PO₄ mit 1,5 % Glucose bei 25 °C untersucht. NTT-Konzentrationen: 0 (0), 1,2 (1), 6 (2), 15 (3) und 30 µg/ml (4).

Effect of NTT on O₂ uptake and CO₂ production of *C. albicans*. Exchange of gases was followed manometrically in 0.05 M KH₂PO₄ with 1.5 % glucose at 25 °C. Concentrations of NTT: 0 (0), 1.2 (1), 6 (2), 15 (3) and 30 µg/ml (4). Concentration of yeast: 1·10⁷/ml.

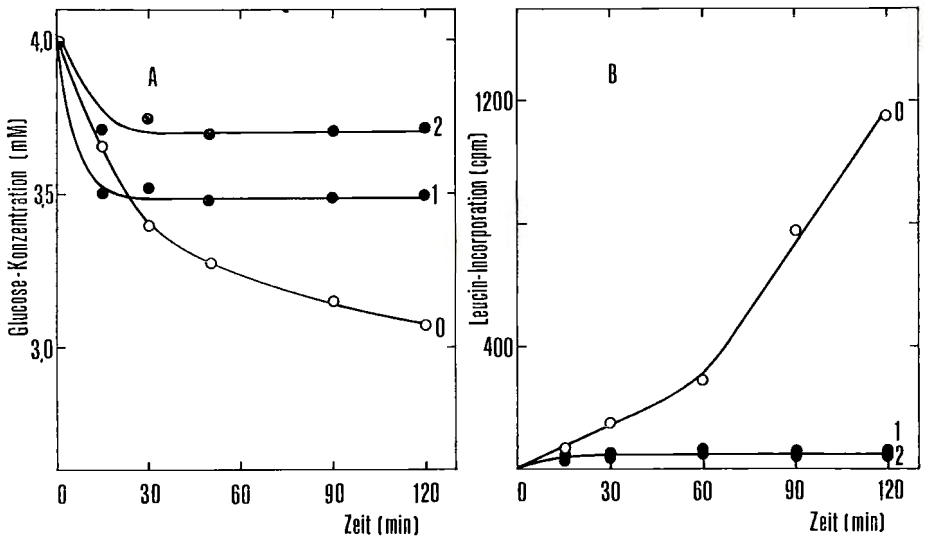


Abb. 6: Wirkung von NTT auf Glucose-Verbrauch (A) und Inkorporation von ¹⁴C-Leucin (B) bei Protoplasten von *S. cerevisiae*. Synthetisches Medium SYB mit KCl, 28 °C. NTT-Konzentrationen: 0 (0), 20 (1) und 100 µg/ml (2). Protoplastenkonzentration: 4·10⁷/ml.

Effect of NTT on glucose uptake (A) and incorporation of ¹⁴C-leucine into protoplasts of *S. cerevisiae* in synthetic medium SYB with KCl at 28 °C. Concentrations of NTT: 0 (0), 20 (1) and 100 µg/ml (2). Concentration of protoplasts: 4·10⁷/ml.

In Versuchen mit Hefenprotoplasten konnte letztlich auch die hemmende Wirkung von NTT auf den Glucoseverbrauch aufgezeigt werden (Abb. 6, A). Ebenso werden biosynthetische Prozesse gehemmt, die durch die ^{14}C -Leucin-Inkorporation in die Trichloressigsäure-fällbare Fraktion der Protoplasten charakterisiert sind (Abb. 6, B).

4. Beeinflussung der biosynthetischen Aktivität und des Gehaltes an Thiolgruppen bei *S. cerevisiae*

Im Zusammenhang mit dem Nachweis primärer Wirkungen von Fungiziden kommen Untersuchungen über die Beeinflussung biosynthetischer Prozesse der Hefen unter Verwendung radioaktiver Präkursoren der Nukleinsäure- und Proteinsynthese (z. B. Adenin und Leucin) eine besondere Bedeutung zu. Hierzu wurde die kurzfristige Wirkung (maximal bis zur Verdoppelung der Hefen) verschiedener Inhibitorkonzentrationen auf Hefen, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden, untersucht. Falls die Fungizide die Inkorporation beider Präkursoren parallel hemmen, ist zu folgern, daß primär ein Eingriff in den energetischen Stoffwechsel vorliegt, der den Energiebedarf für die Biosynthese der Makromoleküle deckt.

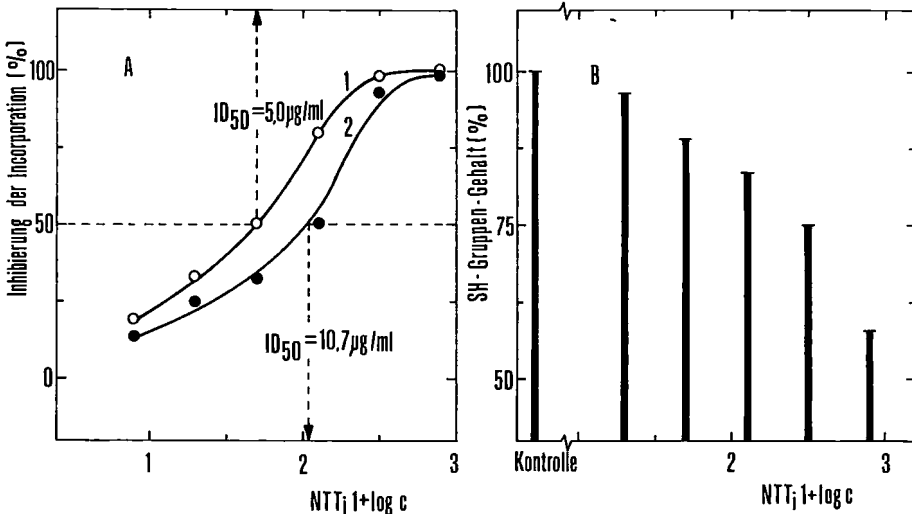


Abb. 7: Inhibition der Inkorporation von ^{14}C -Adenin (A, 1) und ^{14}C -Leucin (A, 2) und Verringerung der gesamten SH-Gruppen (B) durch NTT bei *S. cerevisiae* Stamm Sherry. Synthetisches Medium VITA, 1 h Inkubation bei 28 °C. Inkorporation durch Radioaktivitätsmessung der Trichloressigsäure-fällbaren Hefefraktion bestimmt. Aktivitäten der Kontrolle: 2025 cpm bei Adenin und 1440 cpm bei Leucin. SH-Konzentrationen mit Ellman-Reagens bestimmt. NTT-Konzentrationen: 0, 0,8, 2, 5, 12,5, 31,25 und 78,125 $\mu\text{g/ml}$.

Inhibition of ^{14}C -adenine (A, 1) and ^{14}C -leucine (A, 2) incorporation and decrease of total SH-group content (B) with NTT in *S. cerevisiae* var. Sherry after 1 h incubation in synthetic medium VITA at 28 °C. Incorporation was determined by measuring radioactivity in trichloroacetic acid precipitates of yeasts. Radioactivity in control: 2025 cpm for adenine and 1440 cpm for leucine. Concentration of SH groups was estimated with Ellman reagent. Concentrations of NTT: 0, 0.8, 2, 5, 12.5, 31.25 and 78.125 $\mu\text{g/ml}$.

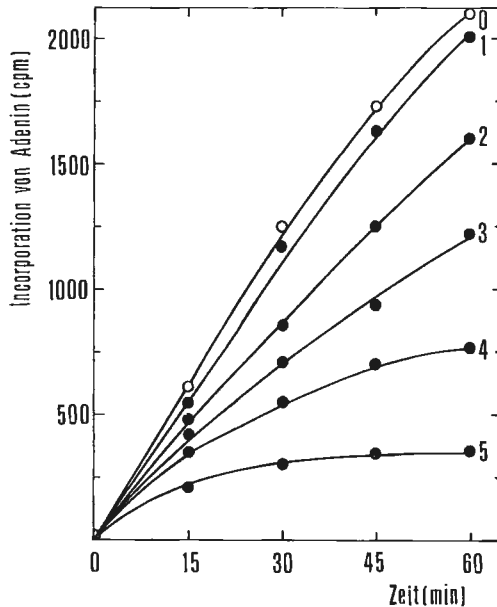


Abb. 8: Kinetik der ¹⁴C-Adenin-Inkorporation bei *S. cerevisiae* Stamm Sherry ohne (0) und mit NTT der Konzentrationen 0,5 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4) und 8 μ g/ml (5). Synthetisches Medium VITA, 28 °C. Ausgangskonzentration der Zellen: $1 \cdot 10^7$ /ml. Radioaktivität durch Messung der Trichloressigsäure-fällbaren Hefefraktion bestimmt.

Kinetics of ¹⁴C-adenine incorporation into *S. cerevisiae* var. Sherry without (0) and in presence of NTT in concentrations 0.5 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4) and 8 μ g/ml (5). Synthetic medium VITA, 28 °C. Initial concentration of cells $1 \cdot 10^7$ /ml. Radioactivity determined in trichloroacetic acid precipitable fraction of yeasts.

Die Ergebnisse eines solchen Versuches mit NTT bei *S. cerevisiae* Stamm Sherry zeigen eine parallele Hemmung der Inkorporation von ¹⁴C-Adenin und ¹⁴C-Leucin in die Makromoleküle der Hefenzellen (Abb. 7, A). Darauf weist auch das Verhältnis der für Adenin und Leucin bestimmten ID₅₀-Hemmkonzentrationen hin, dessen Wert 2,1 ist, d. h. ähnlich wie bei den bekannten Hemmstoffen des energetischen Metabolismus der Hefen und anderer eukaryotischer Zelltypen (DROBNICA 1967). Der Rückgang biosynthetischer Aktivitäten der Hefen unter der Einwirkung von NTT ist korreliert mit der Herabsetzung der Thiolgruppen-Konzentration (Abb. 7, B).

Die „Titration“ der Thiolgruppen der Hefen mit NTT steht im Einklang mit der Auffassung, daß dieser Hemmstoff ein SH-Reagens ist, das bei Hefen die Thiolenzyme inaktiviert (LUKENS 1971). Abb. 8 stellt die Dynamik der ¹⁴C-Adenin-Inkorporation in die Trichloressigsäure-fällbare Zellfraktion von *S. cerevisiae* Stamm Sherry und ihre Beeinflussung durch verschiedene NTT-Konzentrationen dar. Mit steigender NTT-Konzentration wird die Einbaugeschwindigkeit herabgesetzt. 8 μ g NTT/ml verursachen einen nahezu vollständigen Stillstand der Inkorporation nach etwa 45 min. Diese Hemmung ist jedoch nur zeitweilig. Zur dauerhaften Blockierung sind nämlich höhere NTT-Konzentrationen (ca. 30 μ g/ml) erforderlich, die eine praktisch totale Hemmung der Glykolyse hervorrufen und die gleichzeitig eine deutliche oder vielleicht völlige Hemmung der ATP-Synthese auch auf anderem Weg, d. h. durch Einwirkung auf die oxidative Phosphorylierung (Entkopplung, evtl. Hem-

mung der Atmungskette) auslösen. Die primären Eingriffe von NTT in den Stoffwechsel laufen sehr rasch ab, wodurch auch die Intensität biosynthetischer Prozesse rasch zurückgeht, wie durch den Verlauf der ^{14}C -Adenin-Inkorporation in Abb. 8 demonstriert wird.

Zusammenfassung

N-Trichlormethylthio-tetrahydrophthalimid (NTT) ist in mehreren käuflichen Fungiziden enthalten, die im Rebschutz verwendet werden. Diese Substanz ist in Folge der Inaktivierung einiger glykolytischer Enzyme als wirksamer Inhibitor der Weinhefengärung anzusprechen. Versuchsergebnisse mit Atmungs-Hefentypen weisen auch auf Eingriffe von NTT an verschiedenen Stellen der oxidativen Phosphorylierung hin. Die Inhibition dieses Vorganges sowie der Glykolyse beruht auf einer Abänderung der Proteine, die für ihre katalytische Aktivität Thiolgruppen benötigen. Als Folge mehrfacher Eingriffe von NTT in den energetischen Stoffwechsel der Hefen kommt es zur Hemmung biosynthetischer Prozesse und damit auch zur Einstellung des Zellwachstums. Hierauf deuten die Ergebnisse von Untersuchungen über die Aufnahme ^{14}C -markierter Präkursoren der Protein- und Nukleinsäuresynthese hin. Es werden ferner Angaben mitgeteilt, die es ermöglichen, die Hemmwirkung verschiedener Fungizidpräparate des Handels gegenüber Hefen zu vergleichen. Die Bedeutung der Hefen als Modellorganismen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus fungitoxischer Substanzen wird unterstrichen.

Literatur

- DROBNICA, L., 1967: Über die Frage der primären und sekundären Wirkungen von Fungiziden und Antibiotika. In: GIRBARDT, M. (Hrsg.): Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika, 403—414 (s. auch 131, 247, 311 und 363). Akademie-Verlag, Berlin.
- — —, AUGUSTÍN, J. and MIKO, M., 1970: The influence of dimethylsulfoxide on metabolic activity of Ehrlich ascites carcinoma cells and microorganisms. *Experientia* 26, 506—508.
- — —, — — —, SVOBODA, A. and NEČAS, O., 1968: The metabolic activity of the protoplasts and normal cells of *Saccharomyces cerevisiae* and the effect of inhibitors. *Can. J. Microbiol.* 14, 853—859.
- — —, CHANCE, B. and SCARPA, A., 1974: Participation of thiols in mitochondrial functions. Abstr. Commun. 8th FEBS Meeting, Budapest, 8, 282.
- — —, HELIA, O. and JINDRA, A., 1975: The effect of γ,γ -bis-4-ethylphenyl- α,β -dibromoisocrotonic acid on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. *Biochem. Pharmacol.* 24, 853—858.
- KAROV, S. und KAROVA, J., 1965: Einfluß organischer (kupferfreier) Fungizide auf die Weinhefen. II. Einfluß von Fungiziden auf die Maischegärung behandelter Trauben (bulg.). *Lozar. Vinar.* (Sofia) 14 (4), 35—40.
- KLEINZELLER, A., 1965: Manometrische Methoden und ihre Anwendung in Biologie und Biochemie. VEB Fischer-Verlag, Jena.
- LUKENS, R. J., 1971: Chemistry of fungicidal action. In: KLEINZELLER, A., SPRINGER, G. F. and WITTMANN, H. G. (Eds.): *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Vol. 10, 136 pp. Springer-Verlag, Berlin.
- MINÁRIK, E. und RÁGALA, P., 1975: Die selektive Wirkung von Rebschutzmitteln auf die Mikroflora von Weintrauben. *Mitt. Klosterneuburg* 25, 187—204.
- NYERGES, P. und LEHOCZKY, J., 1965: Wirkung der im Rebschutz angewandten Fungizide auf die Mostgärung. *Növénytermelés* 14, 365—376.

- SEDLÁK, J. and LINDSAY, R. H., 1968: Estimation of total protein bond and non protein SH groups in tissue with Ellman's reagent. *Analyt. Biochem.* 25, 192—205.
- SVOBODOVÁ, Y. and DROBNICA, L., 1962: Study of physiological and biochemical properties of *Candida albicans* strains causing various diseases. *Folia Microbiol.* 7, 312—319.

Eingegangen am 11. 9. 1979

Dr. L. DROBNICA

Dr. E. ŠTURDÍK

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
und Biochemie

Slowakische Technische Universität

Jánska 1,

880 37 Bratislava

ČSSR

Dr. E. MINÁRIK

Forschungsinstitut für Weinbau
und Kellerwirtschaft

Matúškova 25

801 00 Bratislava

ČSSR