

# Abbau von Herbiziden und Fungiziden durch Mikroorganismen des Bodens

Von FRANZ LINGENS

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim, 7 Stuttgart 70 (BRD)

Herrn Professor Dr. Heinrich Hellmann, Chemische Werke Hüls AG, in Marl, zum 60. Geburtstag gewidmet

## Summary

Herbicides and fungicides are chemicals which increase and ameliorate production in agriculture and save manpower. Herbicides are used to control weeds without destruction of useful plants. Fungicides protect plants against the attack of phytopathogenic fungi. Herbicides and fungicides may be dangerous for men and animals if they are not degraded at all or if they are only degraded at a very slow rate. The mechanism of degradation of some herbicides and fungicides by microorganisms are described. On the occurrence of these microorganisms in the various taxonomical groups is reported. Their potential to degrade of natural and foreign substrates is discussed. The knowledge obtained may be useful for the development of new herbicides and fungicides which are degraded easily and thus cause less pollution of the environment.

Herbizide und Fungizide, Hilfsmittel in der Landwirtschaft zur Erzeugung höherer Erträge, können unter Umständen für Mensch und Tier gefährlich werden, wenn sie nicht nach erfolgreicher Anwendung wieder abgebaut werden. Der Mechanismus des mikrobiellen Abbaus einiger Herbizide und Fungizide wird geschildert. Die Erkenntnisse können für die Entwicklung wirksamerer Herbizide und Fungizide genutzt werden, die durch günstigere Abbaumöglichkeiten weniger Verunreinigungen unserer Umwelt bewirken.

## 1. Einleitung

Der Mensch verändert seine Umwelt, indem er mit oder auch ohne Absicht Chemikalien auf Lebewesen einwirken läßt. Mit diesem Eingriff in die Natur will er schädliche Organismen pflanzlicher oder tierischer Herkunft vernichten oder hemmen und gleichzeitig Nutzpflanzen optimales Wachstum ermöglichen. Sehr häufig werden dabei unbeabsichtigt andere Lebewesen geschädigt. Die verwendeten Chemikalien werden in den meisten Fällen mehr oder weniger rasch durch Mikroorganismen des Bodens abgebaut. Am Beispiel von einigen Herbiziden und Fungiziden soll im folgenden gezeigt werden, was zur Zeit über derartige Abbaup Vorgänge bekannt ist.

## 2. Herbizide

Unter Herbiziden versteht man chemische Verbindungen, die Unkräuter und Ungräser vernichten und die Nutzpflanzen schonen und ihnen damit indirekt ein bes-

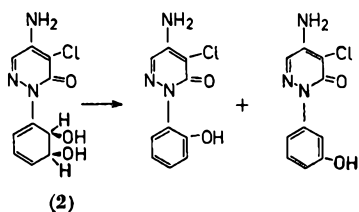
seres Wachstum ermöglichen. Über die Hälfte des Ackerlandes bzw. 20% der Bodenfläche der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich mit Herbiziden behandelt. So werden größere Herbizidmengen zur Totalunkrautbekämpfung an Bahnkörpern, Autobahnen, Industrieanlagen usw. eingesetzt<sup>1</sup>.

### 2.1. Mikrobieller Abbau des Pyramins

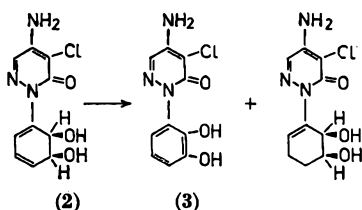
Das selektive Rübenherbizid Pyramin<sup>®</sup>, dessen eigentliche Wirksubstanz Pyrazon genannt wird, besteht aus 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3 (2H)-pyridazinon (1). Rübenpflanzen werden durch diese Verbindung bei Einhaltung einer bestimmten Dosierung normalerweise nicht geschädigt, da das Pyrazon langsamer als von anderen Pflanzen aufgenommen wird und obendrein schnell in eine Verbindung ohne herbizide Wirkung übergeführt wird<sup>2</sup>. Von Mikroorganismen des Bodens wird Pyrazon in die entphenylierte Verbindung umgewandelt<sup>3</sup>. 5-Amino-4-chlor-3 (2H)-pyridazinon (6) läßt sich regelrecht auf diesem Wege präparativ darstellen. Aus Erdproben konnten mit einem Anreicherungsverfahren Bakterien isoliert werden, die in einem Mineralsalzmedium mit Pyrazon als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können. Dem Mineralsalzmedium muß noch Cobalamin in geringen Mengen zugesetzt werden. Diese Bakterien können auch mit dem Benzolteil von Antipyrin und Pyramidon zum Wachstum gebracht werden, wachsen aber nicht mit anderen aromatischen Verbindungen, wie z.B. Brenzkatechin, Protocatechusäure oder den verschiedenen Hydroxybenzoesäuren, die erfahrungsgemäß vielfach von Bakterien metabolisiert werden. Auch auf einer üblichen Kohlenstoffquelle, wie Glucose oder einem anderen Zucker, können die pyrazonabbauenden Bakterien nicht wachsen<sup>4</sup>.

Bei der Untersuchung des Pyrazonabbaues ließ sich als erstes Zwischenprodukt 5-Amino-4-chlor-2-(2,3-cis-dihydroxycyclohexa-4,6-dien-1-yl)-3 (2H)-pyridazinon (2) nachweisen<sup>5</sup>. Zur Strukturermittlung wurden die Elementaranalyse, spektroskopische Eigenschaften (UV, CD, MS, NMR) und die Identifizierung von Zersetzungsprodukten herangezogen. Die Deutung des NMR-Spektrums führt zur Annahme der cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen, die auch durch das Ergebnis einer

Reaktion mit Kaliumtriacetylosmat gestützt wird. Die Behandlung von (2) mit 1 N HCl bei 20° führt zu einem Gemisch zweier Phenole:



Als Folgeprodukt des Abbaues ist ein Brenzkatechin-derivat (3) zu postulieren, das aber bisher aus dem Kulturmedium pyrazonabbauender Bakterien nicht isoliert werden konnte. Es ließ sich aber zeigen, daß ein Enzymrohextrakt dieser Bakterien (2) in (3) umwandelt. Die Sicherung der Struktur dieser Verbindung basiert auf massenspektrometrischer Untersuchung. Die Verbindung zeigt eine zeitabhängige Phenolatverschiebung im UV-Bereich unter alkalischen Bedingungen (Erreichen des Maximums nach 45 Minuten). (3) ist auch aus (2) auf chemischem Wege zugänglich. Durch Erhitzen von (2) in wäßriger Lösung unter Zusatz von Palladiumkohle wird in einer Disproportionierungsreaktion (3) gebildet. Es läßt sich außerdem eine Cyclohexenverbindung nachweisen.



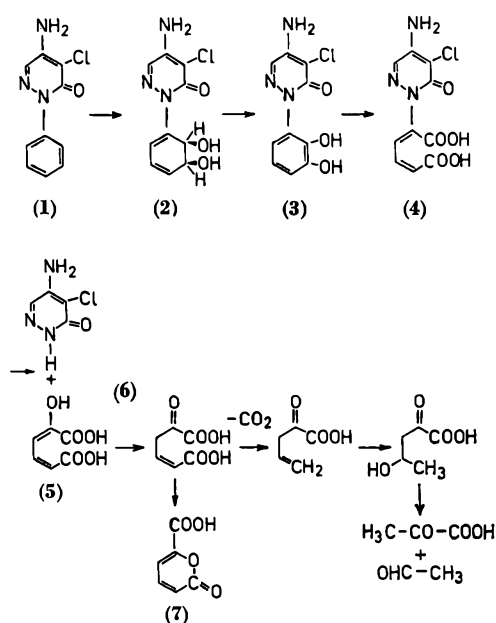
Durch diese Synthese ist es nun möglich, (3) für weitere enzymchemische Untersuchungen einzusetzen<sup>6</sup>.

Aus dem Medium pyrazonabbauender Bakterien konnte weiterhin eine Dicarbonsäure isoliert werden, deren Bildung zwanglos durch Orthospaltung von (3) gedeutet werden kann. Die nähere Untersuchung ergab, daß es sich bei dieser Dicarbonsäure um 2-(5-Amino-4-chlor-3-oxo-2,3-dihydro-2-pyridazino)-*cis,cis*-muconsäure (4) handelt<sup>5</sup>. (4) wird durch enzymatische Hydrolyse vermutlich zu 2-Hydroxymuconsäure (5) und 5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon (6) gespalten. (6) wird bei jeder Fermentation von Pyrazon mit den pyrazonabbauenden Bakterien gefunden und stellt offenbar für diese Bakterien ein nicht weiter abbaubares Endprodukt dar<sup>5</sup>. Bisher konnten keine Mikroorganismen isoliert werden, die (6) als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle nutzen können. Auch im natürlichen Boden erfolgt nach bisherigen Untersuchungen kein weiterer Abbau von (6).

Das Lacton der 2-Hydroxymuconsäure (7) tritt im Medium pyrazonabbauender Bakterien auf und läßt sich

leicht nachweisen. Diese 2-Pyron-6-carbonsäure wird offensichtlich nicht weiter abgebaut. Wahrscheinlich entsteht diese Verbindung in einer eigentlich unerwünschten Nebenreaktion enzymatisch aus (5). Zellfreie Extrakte aus pyrazonabbauenden Bakterien setzen andererseits (5) unter stöchiometrischer Abspaltung von CO<sub>2</sub> um. Vermutlich wird (5) zunächst durch eine Tautomerase umgelagert. Bei der anschließenden Decarboxylierung entsteht dann Vinylbrenztraubensäure, aus der durch Wasseranlagerung 2-Keto-4-hydroxyvaleriansäure gebildet wird. Die daraus gebildeten Verbindungen Brenztraubensäure und Acetaldehyd können die Bakterien als Kohlenstoffquelle verwerten.

Der postulierte Abbauweg wird zusammenfassend formuliert:



Bei der Untersuchung der Frage, welche Strukturelemente des Pyrazons zur Abbaufähigkeit einer Verbindung durch diese Bakterien vorhanden sein müssen, stellte es sich heraus, daß N-Methylformanilid und N-Methylacetanilid abgebaut werden. Acetanilid hingegen wird von diesen Bakterien nicht angegriffen. Auch beim Abbau von N-Methylacetanilid läßt sich im Medium 2-Pyron-6-carbonsäure (7) nachweisen<sup>7</sup>.

Die pyrazonabbauenden Bakterien können methylsubstituiertes Pyrazon als Kohlenstoffquelle nicht verwerten. Gibt man aber zu auf Pyrazon vorgezüchteten

<sup>1</sup> M. HANF, *Mitt. Biol. Bundesanstalt Land- u. Forstwiss.* 1972, 9.

<sup>2</sup> G. R. STEPHENSON und S. K. RIES, *Weed Res.* 7 (1967) 51.

<sup>3</sup> N. DRESCHER und S. OTTO, *Z. Pfl.-Krankh. Pfl.-Schutz* 76 (1969) 27.

<sup>4</sup> C. FRÖHNER, O. OLTMANN und F. LINGENS, *Arch. Mikrobiol.* 74 (1970) 82.

<sup>5</sup> E. DE FRENNE, J. EBERSPÄCHER und F. LINGENS, *Europ. J. Biochem.* 33 (1973) 357.

<sup>6</sup> S. HAUG, J. EBERSPÄCHER und F. LINGENS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, (1973) 760.

<sup>7</sup> C. FRÖHNER und F. LINGENS, unveröffentlicht.

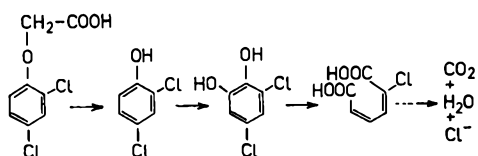
Bakterien 5-Amino-4-chlor-2-(2-methylphenyl)-3 (2H)-pyridazinon bzw. die entsprechende 3-Methylphenylverbindung, so tritt eine Umwandlung zu der entsprechenden Hydroxymethylverbindung ein. Die 4-Methylphenylverbindung wird unter diesen Bedingungen nicht verändert<sup>8</sup>.

Man bezeichnet Umsetzungen mit vorgezüchteten Mikroorganismen als Versuche unter Cometabolismus-Bedingungen. Der Cometabolismus spielt sicherlich eine Rolle für Abbauvorgänge unter natürlichen Bedingungen mit einer Mischpopulation verschiedener Arten<sup>9</sup>. Ein Bakterium kann z.B. auf einer bestimmten Kohlenstoffquelle im Boden wachsen und dann eine andere Verbindung nur partiell verändern. Diese veränderte Verbindung wird dann gegebenenfalls von einem anderen Mikroorganismus weiter metabolisiert. So wurde jüngst der Cometabolismus zur Deutung des mikrobiellen Abbaus von zyklischen Paraffinkohlenwasserstoffen herangezogen<sup>10</sup>.

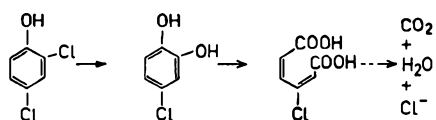
## 2.2. Mikrobieller Abbau von Phenoxyfettsäuren

Verschiedenartig substituierte Phenoxyfettsäuren werden im Getreideanbau zur Bekämpfung von Unkräutern eingesetzt. Sie greifen vermutlich bevorzugt in den Nucleinsäurestoffwechsel ein. Diese praktisch wichtigen Phenoxyfettsäuren werden durch Mikroorganismen des Bodens gewöhnlich so gespalten, daß zunächst die aliphatische Seitenkette entfernt wird. Das gebildete Phenol wird in ein Brenzkatechinderivat umgewandelt. Der weitere Abbau der verschiedenartig substituierten Chlorbrenzkatechine erfolgt dann meist über die gleichen Zwischenprodukte wie beim unsubstituierten Brenzkatechin. Oft läßt sich allerdings der Abbau von halogensubstituierten Aromaten nur auf dem Wege des Cometabolismus untersuchen, da diese Verbindungen nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden können. So hat HORVATH die Umwandlung des Herbizids 2,3,6-Trichlorbenzoat durch Cometabolismus in 3,5-Dichlorbrenzkatechin nachgewiesen<sup>11</sup>.

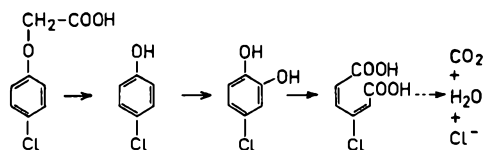
Für 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) ist folgender Abbauweg ermittelt worden<sup>12</sup>:



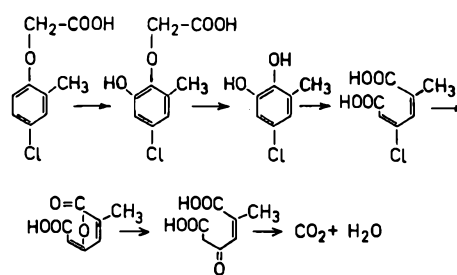
Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß aus 2,4-Dichlorphenol zunächst 4-Chlorbrenzkatechin entsteht. Daraus ergibt sich folgendes Abbauschema<sup>13</sup>:



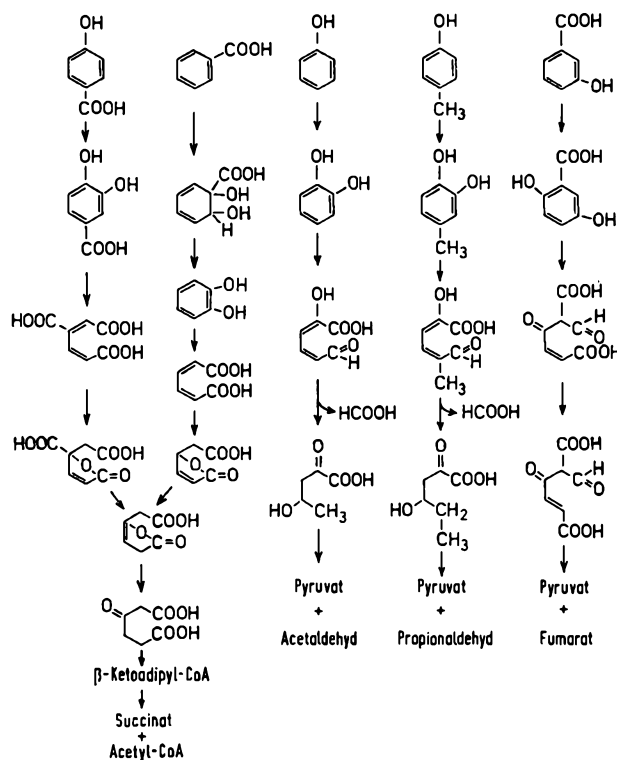
Auch 4-Chlorphenoxyessigsäure (4-CPA) wird auf einem entsprechenden Wege<sup>13</sup> abgebaut:



Für 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (MCPA) sollen mehrere Abbauwege sogar in ein und demselben Bakterium existieren. Eine dieser Abbaumöglichkeiten wird mit dem folgenden Abbauschema<sup>14</sup> skizziert:



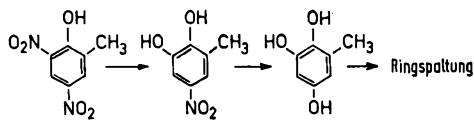
Auch durch die Untersuchung des mikrobiellen Abbaus nicht mit Halogen substituierten Aromaten ist bekannt, daß in Abhängigkeit vom Ausgangsaromaten verschiedene Spaltungssysteme induziert werden. Von



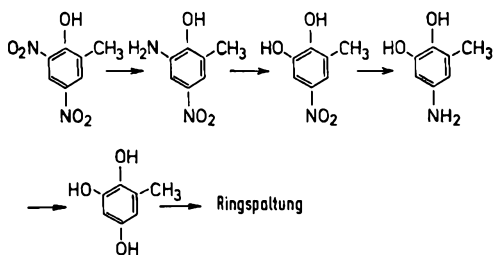
JOHNSON und STANIER<sup>15</sup> wurden verschiedene Abbauewege für *p*-Hydroxybenzoesäure, Benzoesäure, Phenol, *p*-Kresol und *m*-Hydroxybenzoesäure in *Alcaligenes (Hydrogenomonas) eutrophus* ermittelt. Brenzkatechin wird einerseits durch Orthospaltung in *cis, cis*-Muconsäure umgewandelt, andererseits beim Weg ausgehend vom Phenol durch Metaspaltung neben den Hydroxylgruppen in 2-Hydroxymuconsäurehalbalddehyd übergeführt (s. letzte Formelgruppe S. 630).

### 2.3. Nitroaromaten

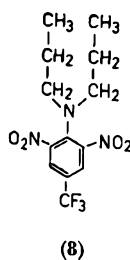
Auch Nitroaromaten werden durch Mikroorganismen metabolisiert. Durch *Arthrobacter simplex* wird das Herbizid und Insektizid 3,5-Dinitro-*o*-cresol unter stufenweisen Ersatz der Nitrogruppen unter Freisetzung von Nitrit in eine Trihydroxyverbindung verwandelt<sup>16</sup>:



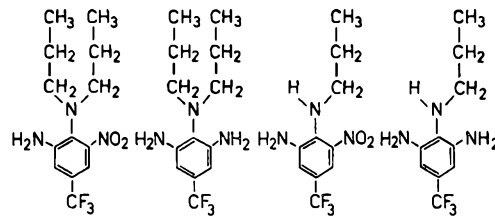
Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Nitrogruppen zunächst zu Aminogruppen reduziert werden und daß daraus dann Hydroxyverbindungen entstehen. Diese Möglichkeit wird von einem *Pseudomonas*-Stamm realisiert<sup>17</sup>:



Das Herbizid Trifluralin ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -Trifluor-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-*p*-toluidin) (8) wird als Voraufmittel (diese Mittel werden aufgebracht, bevor die Kulturpflanze die Bodendecke durchstoßen hat) bei Baumwolle, Soja, Raps, Luzerne und anderen trifluralin-toleranten Kulturpflanzen angewandt. Durch Untersuchungen mit Mikroorganismen des Kuhmagens (*Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* und *Lachnospira multiparus*)

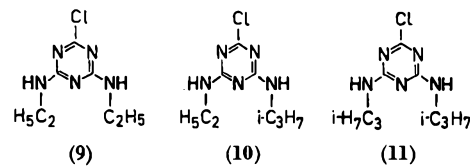


ließ sich zeigen, daß im Kuhmagen eine Veränderung durch Entalkylierung und Reduktion auftritt. Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen<sup>18</sup>:



### 2.4. s-Triazine

Zu der wichtigen Gruppe der *s*-Triazine, die als Herbizide Verwendung finden, gehören u. a. Simazin (2-Chlor-4,6-bis(äthylamino)-*s*-triazin) (9), Atrazin (2-Chlor-4-äthylamino-6-isopropylamino)-*s*-triazin (10) und Propazin (2-Chlor-4,6-bis(isopropylamino)-*s*-triazin) (11).



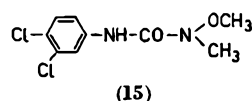
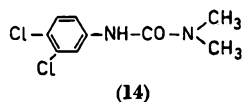
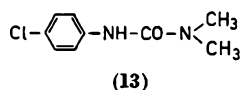
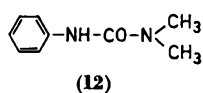
Anstelle des Chlorsubstituenten kann auch eine Methoxy- oder eine Methylthiogruppe vorhanden sein. Im Erdboden werden diese Verbindungen durch Hydrolyse und N-Dealkylierung abgewandelt<sup>19</sup>. Auch mit isolierten Mikroorganismen konnte gezeigt werden, daß die Seitenketten entfernt werden. Mit entsprechend radioaktiv markierten Verbindungen ließ sich die Entwicklung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nachweisen<sup>20</sup>. Beim Abbau durch Pilze tritt u. a. 2,4-Dihydroxy-6-amino-*s*-triazin<sup>21</sup> auf. Im Erdboden wird recht langsam auch der Heterozyklus

- <sup>8</sup> E. DE FRENNE, J. EBERSPÄCHER und F. LINGENS, unveröffentlicht.
- <sup>9</sup> R. S. HORVATH, *Bact. Rev.* 36 (1972) 146.
- <sup>10</sup> H. W. BEAM und J. J. PERRY, *Arch. Mikrobiol.* 91 (1973) 87.
- <sup>11</sup> R. S. HORVATH, *Biochem. J.* 119 (1970) 871.
- <sup>12</sup> W. C. EVANS, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 10, Springer, Berlin 1958, S. 474.
- <sup>13</sup> T. I. STEENSON und N. WALKER, *J. Gen. Microbiol.* 16 (1957) 146.
- <sup>14</sup> J. K. GAUNT und W. C. EVANS, *Biochem. J.* 79 (1961) 25 P.; L. J. AUDUS, in *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*, Academic Press, New York 1964, Kapitel 5.
- <sup>15</sup> B. F. JOHNSON und R. Y. STANIER, *J. Bacteriol.* 107 (1971) 468.
- <sup>16</sup> K. GUNDERSON und H. L. JENSEN, *Acta Agric. Scand.* 6 (1955/56) 100.
- <sup>17</sup> M. S. TEWFIK und W. C. EVANS, *Biochem. J.* 99 (1966) 31 P.
- <sup>18</sup> P. P. WILLIAMS und V. J. FEIL, *J. Agric. Food Chem.* 19 (1971) 1198.
- <sup>19</sup> E. KNUESLI, D. BERRER, G. DUPUIS und H. ESSER, in *Degradation of Herbicides* (ed. P. C. KEARNEY und D. D. KAUFMANN), M. Dekker, New York 1969, S. 51.
- <sup>20</sup> D. D. KAUFMAN, P. C. KEARNEY und T. J. SHEETS, *J. Agric. Food Chem.* 13 (1965) 238.
- <sup>21</sup> P. C. KEARNEY, D. D. KAUFMAN und T. J. SHEETS, *J. Agric. Food Chem.* 13 (1965) 369.

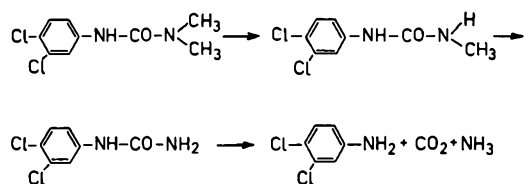
wenigstens zum Teil abgebaut, wie Versuche mit ringmarkiertem Heterozyklus ergaben<sup>22</sup>. Es ist bis jetzt noch kein genauer Abbaupfad für den eigentlichen Heterozyklus ermittelt worden.

### 2.5. Harnstoffverbindungen

Phenylsubstituierte Harnstoffverbindungen entfalten herbizide Wirksamkeit. Als Beispiele für diese große Gruppe von Verbindungen, die selektiv auf die Photosynthese von grünen Pflanzen und Algen wirken, seien genannt: Fenuron (3-Phenyl-1,1-dimethylharnstoff) (12), Monuron [3-(*p*-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff] (13), Diuron [3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff] (14) und Linuron [3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff] (15).



Die Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau dieser Verbindungen sind bisher nur bruchstückhaft. Linuron z. B. wird wahrscheinlich im Erdboden zu 3,4-Dichloranilin, Methoxymethylamin und CO<sub>2</sub> gespalten<sup>23</sup>. Für den Abbau von Diuron im Erdboden wurde folgender Abbaupfad postuliert:



Bei diesen Untersuchungen wurden keine Mikroorganismen isoliert<sup>24</sup>.

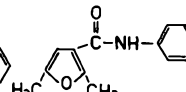
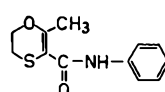
### 3. Fungizide

Fungizide werden eingesetzt, um Pflanzen vor dem Befall durch phytopathogene Pilze zu schützen. Fungizide hemmen oder vernichten Pilze in Form von Mycelien oder auch Sporen. Unter systemischen Fungiziden ver-

steht man solche Verbindungen, die von der Pflanze aufgenommen werden können und auf diese Weise den Pilzbefall verhindern.

#### 3.1. Säureanilide

Verschiedenartig substituierte Säureanilide werden in großem Umfang als systemische Fungizide eingesetzt. Sie wirken vor allem auf Basidiomyceten, wie beispielsweise Brandpilze (*Ustilago*-Arten), Rostpilze (*Puccinia*-Arten) und gegen den Bodenzwergpilz *Rhizoctonia solani*. Zur Gruppe der «Oxathiine» gehören die Fungizide Carboxin und Oxycarboxin. Unter Carboxin versteht man 5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-oxathiin-3-carboxanilid (16). Als systemische Fungizide sind weiterhin *o*-Toluanilid (17) und 2,5-Dimethyl-furan-3-carboxanilid (18) im Versuchsstadium.



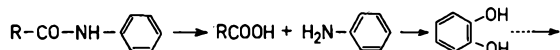
Durch Inkubation von feuchter Gartenerde mit (17) bzw. (18) über mehrere Monate bei 28°C ließ sich zeigen, daß die Verbindungen (17) und (18) langsam abgebaut werden. Aus diesen Erdbodenproben konnten durch Transfer in ein Mineralsalzmedium mit (17) oder (18) als einziger Kohlenstoffquelle Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Abbau von (17) oder (18) angereichert werden. Die Untersuchung der Reinkulturen ergab, daß es sich um ein Bakterium der Gattung *Nocardia* handelt. Diese *Nocardia*-Spezies kann auf den verschiedenartig substituierten Säureaniliden wie (16), (17) oder (18) als einziger Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle wachsen. Darüber hinaus wächst dieser Stamm auch mit Anilin, Acetanilid, Isopropyl-*N*-phenylcarbammat (Herbizid), Phenol, Paraffin und Glucose<sup>25</sup>. Beim Wachstum auf den Fungiziden wird offensichtlich nur der Anilinteil verwendet. Aus dem Medium können die entsprechenden Säuren isoliert werden. Daneben findet man auch in geringen Mengen Anilin, das bei der Spaltung entsteht, dann aber zum weiteren Wachstum verwendet wird.

Von dieser *Nocardia*-Spezies konnten Mutanten isoliert werden, die an verschiedenen Stellen im Abbaupfad der Säureanilidfungizide genetisch blockiert sind<sup>26</sup>. Ein Enzym des Abbaupfad hat also durch die Mutation seine normale Funktionsfähigkeit verloren. Zur Auslösung der Mutationen diente das hochwirksame Mutagen *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (zum Wirkungsmechanismus siehe<sup>27</sup>).

Die erhaltenen Mutanten konnten auf Grund ihres verschiedenartigen Wachstumsverhaltens in mehrere Gruppen eingeteilt werden:

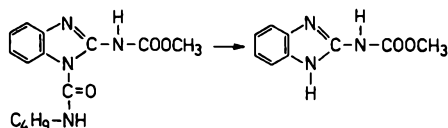
1. Wachstum mit Anilin, Phenol, Brenzkatechin und Protocatechu-Säure.
2. Wachstum mit Phenol, Brenz-

katechin und Protocatechu-Säure. 3. Wachstum nur mit Protocatechu-Säure. 4. Wachstum mit keiner der genannten Verbindungen. Auch durch Kreuzfütterungsteste läßt sich eine entsprechende Gruppeneinteilung vornehmen. Beim Kreuzfütterungstest<sup>28</sup> wird geprüft, ob eine Mutante mit ihrem Akkumulat, dem Produkt unmittelbar vor dem genetischen Block, einer anderen Mutante das Wachstum ermöglicht. Bei der näheren Untersuchung der Mutanten konnten bisher zwei Akkumulate identifiziert werden: Anilin und Brenzkatechin. Daraus ergibt sich folgendes, noch unvollständige Abbauschema<sup>26</sup>:

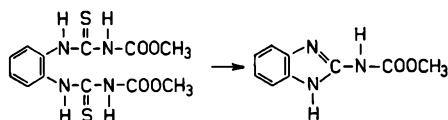


### 3.2. Benomyl

Das systemische Fungizid Benomyl ist wirksam gegenüber Ascomyceten, wie echten Mehltaupilzen, *Cerospora*-Arten, Apfelschorf und *Botrytis* sowie gegen *Fungi imperfecti*, wie *Fusarium*- und *Verticillium*-Arten. Benomyl [(1-Butylcarbamoyl)-benzimidazol-carbamatmethylester] zerfällt in wäßriger Lösung rasch in Benzimidazolcarbamatmethylester (BCM), und es wird allgemein angenommen, daß diese Verbindung die eigentliche Wirkform ist<sup>29</sup>:



Auch andere Fungizide, wie z.B. 1,2-Bis(3-methoxycarbonyl-2-thioureido)-benzol, gehen leicht in BCM über<sup>30</sup>.



BCM ist gegenüber *Neurospora crassa* und *Rhizoctonia solani* genau so wirksam wie Benomyl. Die geringere Wirksamkeit von BCM gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu Benomyl könnte mit Aufnahmeproblemen zusammenhängen. Wird Benomyl rascher als BCM aufgenommen, so kann es seine Wirkung in der Zelle doch als BCM entfalten<sup>31</sup>. BCM wirkt offensichtlich auf die DNA-Synthese im Zusammenhang mit dem Vermehrungsvorgang. Untersuchungen von SEILER haben gezeigt, daß Benzimidazol und Benzimidazolderivate in *Salmonella typhimurium* Mutationen auslösen. Benzimi-

dazol wird in die Nukleinsäuren von *Escherichia coli* eingebaut, und so kann die Mutagenität als Basensubstitution gedeutet werden<sup>32</sup>. Auch bei *Fusarium oxysporum* ruft Benomyl Mutationen hervor<sup>33</sup>. Wenn BCM seine Wirkung durch Einbau in die Nukleinsäure entfaltet, so sollte es schwierig sein, Mikroorganismen zu finden, die BCM abbauen können. Man kann sicherlich Mikroorganismen finden, die resistent gegenüber BCM sind. Das bedeutet aber nicht, daß sie es auch abbauen können. Die bisherigen Veröffentlichungen bestätigen diese Vermutung. Kürzlich wurde allerdings von HELWEG über die erfolgreiche Beobachtung des mikrobiellen Abbaus des Fungizids Benomyl berichtet<sup>34</sup>. Nach sechsmonatiger Perkolation einer Erdprobe mit benomylgesättigtem Wasser wurden Ausstriche der Erde auf Agar mit Benomyl als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle angelegt. Da Benomyl durch seine Schwerlöslichkeit als Trübung im Agar zu erkennen ist, lassen sich benomylabbauende Mikroorganismen durch Bildung klarer Zonen erkennen. Nach zweimonatiger Inkubation, einer recht ungewöhnlich langen Inkubationszeit, traten klare Zonen auf. Die Mikroorganismen mit Fähigkeit zum Abbau wurden noch nicht näher bestimmt.

### 4. Klassifizierung der zum Abbau fähigen Mikroorganismen

Die zum Abbau unnatürlicher organischer Verbindungen befähigten Mikroorganismen entstammen den verschiedenartigsten Gruppen der Bakterien und Pilze. Auffallend ist, daß besonders viele *Pseudomonas*-Arten mit besonderen Abbaufähigkeiten z.B. von aromatischen Verbindungen beschrieben worden sind. Es überrascht nicht, daß bei der Isolierung von Mikroorganismen mit besonderen Stoffwechseleigenschaften immer wieder neue Arten gefunden werden, da ja gerade das Reich der Mikroorganismen bisher nur unvollkommen entdeckt wurde. Bei der Charakterisierung neuer Arten bedient man sich klassischer Methoden, z.B. Unter-

<sup>22</sup> A. SUSS, Privatmitteilung (1967) an E. KNUESLI, D. BERRER, G. DUPUIS und H. ESSER.

<sup>23</sup> H. BÖRNER, *Z. Pfl.-Krankh. Pfl.-Schutz* 72 (1965) 516.

<sup>24</sup> R. L. DALTON, A. W. EVANS und R. C. RHODES, *Weeds* 14 (1966) 31.

<sup>25</sup> R. BACHOFER, O. OLTMANN und F. LINGENS, *Arch. Mikrobiol.* 90 (1973) 141.

<sup>26</sup> R. BACHOFER, O. OLTMANN und F. LINGENS, Veröffentlichung in Vorbereitung.

<sup>27</sup> R. SÜSSMUTH, R. HAERLIN und F. LINGENS, *Biochim. Biophys. Acta* 269 (1972) 276.

<sup>28</sup> H. HELLMANN und F. LINGENS, *Angew. Chem.* 73 (1961) 107.

<sup>29</sup> G. P. CLEMONS und H. D. SISLER, *Phytopathology* 59 (1969) 705.

<sup>30</sup> H. A. SELLING, J. W. VONK und A. KAARS SUIJPELJN, *Chem. & Ind.* 1970, 1625.

<sup>31</sup> R. S. HAMMERSCHLAG und H. D. SISLER, *Pesticide Biochem. Phys.* 2 (1972) 123.

<sup>32</sup> J. P. SEILER, *Mutation Res.* 15 (1972) 273, 17 (1973) 21; J. P. SEILER und H. LIMACHER, *Chimia* 27 (1973) 68.

<sup>33</sup> B. DASSENOY und J. A. MEYER, *Mutation Res.* 21 (1973) 119.

<sup>34</sup> A. HELWEG, *Soil Biol. Biochem.* 4 (1972) 377.

suchung der Form, Farbe, Beweglichkeit, Färbbarkeit, Größe und Aussehen der Kolonien, Verwendbarkeit von Zuckern, eventuell unter Säuerung und Gasbildung, und vieles andere mehr. Seit einiger Zeit wendet man zur Charakterisierung auch Verfahren der Molekularbiologie an. Dazu gehört z.B. die Bestimmung des Guanin-Cytosin-Gehaltes der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Man kann auch die DNS eines Bakteriums mit der DNS mutmaßlich verwandter Bakterien hybridisieren und aus dem Ausmaß der Hybridisierung Schlüsse ziehen. Zu vergleichenden Untersuchungen ist auch die Art der Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als taxonomisches Hilfsmittel herangezogen worden<sup>35</sup>. Das erste Enzym des Grundzweiges dieser Biosynthesekette, das die Kondensation von Phosphoenolbrenztraubensäure mit Erythrose-4-phosphat zu 2-Keto-3-desoxy-araboheptonsäure-7-phosphat katalysiert, kann in verschiedenen Mikroorganismen in verschiedener Weise von Zwischen- und Endprodukten der Biosynthesekette beeinflusst werden.

Die oben beschriebenen pyrazonabbauenden Bakterien konnten mit Hilfe der klassischen Untersuchungsmethoden nur provisorisch eingeordnet werden. In bestimmten Eigenschaften entsprechen sie Vertretern der Gattung *Achromobacter*<sup>4</sup>. Sie führen nur wenige der für diese Gattung typischen Testreaktionen positiv aus, und es ist außerdem noch völlig unklar, welche natürliche Kohlenstoffquellen diese Bakterien im Erdboden verwenden. Die Untersuchung des Guanin-Cytosin-Gehaltes der DNS dieser Bakterien ergab einen Wert von 58 Mol-%<sup>36</sup>. Die DNS der Organismen aus der Gattung *Achromobacter*, denen die pyrazonabbauenden Bakterien nach den klassischen Methoden ähnlich sind, hat aber einen GC-Gehalt von 44 bis 46 Mol-%. Man könnte nun vermuten, daß es sich um eine *Pseudomonas*-Art handelt. Aber gerade *Pseudomonas*-Arten zeigen eine große Variabilität im Guanin-Cytosin-Gehalt (55 bis 70 Mol-%). Durch Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß die DNS der verschiedenen, bisher isolierten pyrazonabbauenden Bakterien<sup>4</sup> homolog sind<sup>36</sup>.

Die Untersuchung der 2-Keto-3-desoxy-araboheptonsäure-7-phosphatsynthetase in den pyrazonabbauenden Bakterien ergab, daß ein einzelnes Enzym vorliegt, welches einem kumulativen Feedback-Effekt durch Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan unterliegt<sup>37</sup>. Auch dieses Ergebnis würde es erlauben, die pyrazonabbauenden Bakterien den Pseudomonaden zuzuordnen. Zum Nachweis der Vielfalt der Regulationsmöglichkeiten bei diesem Enzym soll noch angeführt werden, daß bei *Bacillus*-Arten<sup>38</sup> ein Hemmeffekt durch Chorisminsäure und Prephensäure beobachtet wurde; bei Streptomyceten liegt ebenfalls nur ein Enzym vor, das selektiv durch Tryptophan gehemmt wird<sup>39</sup>. In *Saccharomyces cerevisiae*<sup>40</sup> und *Claviceps paspali*<sup>41</sup> konnten mehrere Enzyme nachgewiesen werden, die durch Phenylalanin und Tyrosin bzw. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gehemmt werden.

## 5. Über die Befähigung zum Abbau natürlicher und unnatürlicher Substrate

Vielleicht erscheint es verwunderlich, daß Mikroorganismen auch unnatürliche Verbindungen abbauen können. Es ist verständlicher, wenn man bedenkt, daß meistens ähnliche Strukturen vorliegen, wie sie auch in natürlichen Substraten gegeben sind. Bei zu starker Halogensubstitution z.B. können aber offensichtlich diese Verbindungen nicht mehr von den mikrobiellen Enzymen umgesetzt werden. In manchen Fällen gelingt dann noch ein stufenweiser Abbau durch Cometabolismus.

Ein interessanter Aspekt ist jüngst durch die Entdeckung extrachromosomaler DNS in Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau bestimmter Verbindungen neu hinzugekommen. Ein *Pseudomonas*-Stamm mit der Fähigkeit zum Abbau von Salicylsäure verliert diese Fähigkeit durch Behandlung mit Mitomycin C<sup>42</sup>. Offensichtlich wird hierbei das genetische Material, das die Enzyme des Abbaus kodiert, aus der Zelle eliminiert. Dieser Gencluster liegt demnach in der Zelle als extrachromosomales Element vor<sup>43</sup>. Es kann auf andere *Pseudomonas*-Stämme übertragen werden, die dadurch die Fähigkeit zum Abbau der Salicylsäure erwerben. Auch die Möglichkeit zum Abbau von Campher<sup>44</sup> und von bestimmten Kohlenwasserstoffen<sup>45</sup> ist auf das Vorhandensein von extrachromosomalen Faktoren (Plasmiden) zurückgeführt worden. Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau von Chloramphenicol<sup>46</sup> sind auch resistent gegenüber diesem Breitbandantibiotikum. In den Bakterien konnte extrachromosomale DNS nachgewiesen werden<sup>47</sup>, die vielleicht die Gene für die Resistenzerscheinungen trägt. Es besteht die Möglichkeit, daß diese extrachromosomale DNS für den Abbau des Chloramphenicols oder für einen wichtigen Teilschritt dieses Abbaus verantwortlich ist.

## Ausblick

In Zukunft ist sicherlich mit einer weiteren Zunahme der Anwendung von Agrochemikalien zu rechnen. Ein erheblicher Teil der Herbizide und Fungizide gelangt bei der Anwendung in den Boden. Aus den Versuchen mit isolierten Reinkulturen kann nicht ohne weiteres auf den Verlauf des Abbaus durch eine Mischpopulation im Boden geschlossen werden. Im Boden treten weiterhin noch viele chemische und physikalische Einflüsse auf. Dabei sind besonders Adsorptionsvorgänge an polymeren Verbindungen zu erwähnen. Licht, Luft, Wasser und schwankende Temperaturen beeinflussen die Vorgänge im Boden. Normalerweise lassen sich die erwähnten Zwischenprodukte nicht aus dem Boden isolieren. Wenn sie aber nachweisbar sind, so ist zu prüfen, ob diese Verbindungen toxikologisch unbedenklich sind. Die genannten halogensubstituierten Verbindungen sind leider oft nur schwierig und langsam abbaubar. Oft wird selbst eine Mischpopulation (Cometabolismus) nicht mit

diesen Verbindungen fertig. Es wäre wünschenswert, wenn die Anwendung solcher Verbindungen eingeschränkt würde, da viel zu wenig darüber bekannt ist, wie sich diese Verbindungen bei Langzeiteinwirkung auf Lebewesen auswirken.

#### Dank

Die zitierten eigenen Arbeiten wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie, der Stiftung Volkswagenwerk und der Badischen Anilin- und Sodafabrik AG unterstützt. Herrn Doz. Dr. W. KOCH, Abteilung Herbolgie der Universität Hohenheim, danke ich für Diskussionen.

- <sup>35</sup> F. LINGENS, *Angew. Chem.* 80 (1968) 384.
- <sup>36</sup> H. UESSELER und F. LINGENS, unveröffentlicht.
- <sup>37</sup> J. EBERSPÄCHER und F. LINGENS, unveröffentlicht.
- <sup>38</sup> R. A. JENSEN, D. S. NASSER und E. W. NESTER, *J. Bacteriol.* 94 (1967) 1582.
- <sup>39</sup> H. GÖRISCH und F. LINGENS, *Biochim. Biophys. Acta* 242 (1971) 630.
- <sup>40</sup> F. LINGENS, W. GOEBEL und H. UESSELER, *Europ. J. Biochem.* 1 (1967) 363.
- <sup>41</sup> J. EBERSPÄCHER, H. UESSELER und F. LINGENS, *Z. physiol. Chem.* 351 (1970) 1465.
- <sup>42</sup> A. M. CHAKRABARTY, *J. Bacteriol.* 112 (1972) 815.
- <sup>43</sup> W. GOEBEL, *Angew. Chem.* 85 (1973) 569.
- <sup>44</sup> J. C. RHEINWALD, A. M. CHAKRABARTY und I. C. GUNSALUS, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 885.
- <sup>45</sup> A. M. CHAKRABARTY, G. CHOU und I. C. GUNSALUS, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 1137.
- <sup>46</sup> F. LINGENS und O. OLTMANN, *Biochim. Biophys. Acta* 130 (1966) 336; F. LINGENS, H. EBERHARDT und O. OLTMANN, *Biochim. Biophys. Acta* 130 (1966) 345.
- <sup>47</sup> H. SCHREMPF, W. GOEBEL und F. LINGENS, unveröffentlicht.