

Handwritten: 1. 1. 1979 No 3

SGAE BER. No. 3034

BL-267/79

MÄRZ 1979

**Berichte der
Österreichischen Studiengesellschaft
für Atomenergie Ges. m. b. H.
Forschungszentrum Seibersdorf**

EINFLUSS VON CYCLOHEXIMID AUF DIE STRAHLENEMPFLINDLICHKEIT
VON SCHIMMELPILZEN

EVA ZECHMEISTER
KAROLY TURANITZ
GERHARD STEHLIK
HANS ALTMANN
JOSEF MEYRATH

EINFLUSS VON CYCLOHEXIMID AUF DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT
VON SCHIMMELPILZEN

Eva Zechmeister
Karoly Turanitz
Gerhard Stehlik
Hans Altmann⁺
Josef Meyrath⁺

Zur Veröffentlichung vorgesehen in "Die Bodenkultur"
Proj. Nr. 6203

Österreichische
Studiengesellschaft für Atomenergie
Ges.m.b.H.
Lenaugasse 10 A-1082 Wien

INSTITUT FÜR BIOLOGIE
Forschungszentrum Seibersdorf

⁺ Institut für angewandte Mikrobiologie, Universität für
Bodenkultur, Wien

EINFLUSS VON CYCLOHEXIMID AUF DIE STRAHLENEMPFFINDLICHKEIT
VON SCHIMMELPILZEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Fungi bestimmt, sowie der Einfluß von Cycloheximid. Bei den strahlenempfindlichen *Byssochlamys fulva* und *Penicillium terrestre* zeigte eine Behandlung mit Cycloheximid vor der γ -Bestrahlung keine Sensibilisierung. Bei der radioresistenten *Pullularia pullulans* brachte hingegen eine Vorbehandlung mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid eine deutliche Steigerung der Strahleneinwirkung. Die Behandlung mit Cycloheximid nach der γ -Bestrahlung zeigte dagegen einen geringeren Effekt.

SCHLÜSSELWORTE

Strahlenempfindlichkeit, Cycloheximid, *Byssochlamys fulva* A - 2614, A - 3849, *Penicillium terrestre*, *Pullularia pullulans*, γ -Bestrahlung.

INFLUENCE OF CYCLOHEXIMIDE ON THE RADIATION SENSITIVITY OF FUNGI.

ABSTRACT

The radiation sensibility of different fungi was determined and the influence of cycloheximide on radioresistance was tested. The radiation sensitive *Byssochlamys fulva* and *Penicillium terrestre* were treated with cycloheximide before γ -irradiation, but no sensitization could be found. The radioresistent *Pullularia pullulans*, however, pre-treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide, showed an increase of the radiation effect; this effect was much lower when the organisms were treated after γ -irradiation.

KEY WORDS

Irradiation sensibility, cycloheximide, *Byssochlamys fulva*
A - 2614, A - 3849, *Penicillium terrestre*, *Pullularia*
pullulans, γ -irradiation.

EINFLUSS VON CYCLOHEXIMID AUF DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT
VON SCHIMMELPILZEN

1. EINLEITUNG

Unter den Mikroorganismen, die auf Früchten vorkommen und den Verderb von Fruchtkonserven verursachen können, befinden sich die besonders strahlenresistente *Pullularia pullulans* (Rußtau), die hitzeresistente *Byssochlamys fulva* und das auch im Boden vorkommende *Penicillium terrestre*. Die Ascosporen von *Byssochlamys fulva* können bei den üblichen Pasteurisationsverfahren von Fruchtprodukten nicht unschädlich gemacht werden (OLLIVER und RENDLE 1934, HULL 1939). *Pullularia pullulans* ist unter anderem auch für die Verfärbung von Holz verantwortlich und wird aber auch mit pathologischen Erscheinungen beim Menschen im Zusammenhang gebracht (MERDINGER et al 1968).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung, ob diese Mikroorganismen durch Hemmstoffe der Proteinsynthese wie Cycloheximid gegenüber einer γ -Bestrahlung sensibilisiert werden könnten. Bereits CABELA et al (1967) fanden nämlich bei Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* einen synergistischen Effekt von Cycloheximid und Gammastrahlen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Mikroorganismen

Byssochlamys fulva: wurde von der Northern Utilisation Research and Development Division (NRRL), U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois zur Verfügung gestellt; für die

Konidiengewinnung wurde der Stamm A - 2614 und für die Asco-sporenzüchtung der Stamm A - 3849 verwendet.

Penicillium terrestre (JENSEN): wurde aus Apfelsäften (Klosterneuburg) isoliert und vom Centraalbureau voor Schimmelkultures in Baarn (Holland) als solches identifiziert. *Pullularia pullulans*: hierbei handelte es sich um einen dänischen Stamm, der uns freundlicherweise von C. Emborg zu Verfügung gestellt wurde.

2.2. Cycloheximid

Cycloheximid, das 3-(2-(3,5 Dimethyl-oxocyclohexyl)-2 hydroxy-äthyl)-glutarimid, wurde erstmals in Kulturfiltraten von *Streptomyces* entdeckt und erwies sich als sehr wirksam gegen Hefen und Fungi (WHIFFEN 1948). Während Bakterien gegen diese Substanz weitgehend unempfindlich sind, kann für bestimmte Fungi eine Wachstumshemmung bereits ab einer Konzentration von 0,2 µg/ml beobachtet werden (WHIFFEN 1948). Cycloheximid hemmt vor allem die Protein- und DNA-Synthese, die RNA-Synthese erst nach längerem Einwirken (BRADLEY 1962, KERRIDGE 1958).

2.3. Strahlenquelle

Als Strahlenquelle stand eine ⁶⁰Co-Gammacell 220 mit einer Dosisleistung von 460 krad/h zur Verfügung. Die zu bestrahlenden Proben wurden in einem mit Eiswasser gefüllten Behälter in die Bestrahlungsposition gebracht.

2.4. Nährmedien und Anzucht

Die Blastosporenzüchtung von *Pullularia pullulans* wurde in einer Bakto-Potato-Dextrose-Broth von Difco (24 g/l pH 5,2) durchgeführt. Die beimpfte Nährlösung wurde bei 24°C über Nacht geschüttelt.

Die Konidienbildung von *Byssochlamys fulva* erfolgte in einem Sporulationsnährmedium (10 g Glucose, 1 g KH₂PO₄, 0.25 g MgSO₄·7H₂O, 0.06 g NaNO₃, 0.62 g CaCl₂·2H₂O, 0.234 mg CuSO₄·5 H₂O 6.32 mg FeSO₄·7H₂O, 1.1 mg ZnSO₄·7H₂O und

3.5 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ /1000ml aqua dest.; pH 4,5) bei 30°C im Schüttler über einen Zeitraum von 4 bis 7 Tagen.

Die Ascosporenzüchtung wurde auf Sabouraud-Glucose Agar (2%) durchgeführt. Die Züchtung der Ascosporen wurde während 4 Tagen bei 37°C vorgenommen. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur auf 20-22°C gesenkt und nach 2 bis 3 Wochen die Sporen geerntet. Zur Gewinnung einer Suspension von Einzelsporen wurde die von PARTSCH (1969) entwickelte Methode angewandt.

Die Züchtung von *Penicillium terrestre* erfolgte auf Bacto-Potato-Dextrose-Schrägagarkulturen bei 30°C.

2.5. Methodik

Um eventuelle Einflüsse der verschiedenen Nährsubstrate auszuschalten, wurden die Sporen nach Abzentrifugieren und Waschen in 0,1 M Citratpuffer aufgenommen.

Die Bestrahlung wurde bei 0°C (Eisbad, ohne Ausschluß von Sauerstoff) durchgeführt. Die Behandlung mit Cycloheximid erfolgte entweder unmittelbar vor (Vorbehandlung) oder nach (Nachbehandlung) der Bestrahlung. Für die Vorbehandlung wurde die Sporensuspension mit Cycloheximid (20 bzw. 40 µg/ml) 1 Stunde bei 27°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen wurden die Sporen in Citratpuffer bestrahlt, anschließend auf Agarplatten ohne Cycloheximid aufgebracht und bei 30°C bebrütet.

Für die Nachbehandlung wurden die Zellsuspensionen unmittelbar nach der Bestrahlung auf Agarplatten, die 20 µg/ml Cycloheximid enthielten, aufgebracht.

Als Kontrollproben wurden die Sporensuspensionen anstelle der Strahlenbehandlung eine gleich lange Zeit im Eisbad belassen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Cycloheximid auf das Überleben von Sporen.

Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$)	Überlebende Sporen nach 3tägiger Einwirkungszeit (in %)			
	Pull.pull. (Blasto- sporen)	Byss.f. 2614 (Konidien)	Pen.terr. (Konidien)	Byss.f. 3849 (Ascosporen)
20	68	18	90	77
30	15	0	21	55
40	9		12	16

Ascosporen von *Byssochlamys fulva* zeigten sich wesentlich resistenter als deren Konidien und auch resistenter als die Blastosporen von *Pullularia pullulans* gegenüber Cycloheximid (siehe Tab. 1). Am empfindlichsten waren dabei die Konidien von *Byssochlamys fulva* 2614, die nach dreitägiger Einwirkung von Cycloheximid mit 20 $\mu\text{g/ml}$ bereits stark reduziert und mit 30 $\mu\text{g/ml}$ vollständig abgetötet waren.

Gegenüber γ -Bestrahlung erwiesen sich *Byssochlamys fulva* sowie *Penicillium terrestre* als äußerst empfindlich (LD_{90} Werte von 80 krad), *Pullularia pullulans* hingegen als sehr resistent (siehe Abb. 1), Die Fraktion überlebender Blastosporen nimmt nach reiner γ -Bestrahlung mit steigender Strahlendosis bis zu einer Dosis von 500 krad nur langsam, erst bei höheren Dosen stärker ab. Einen deutlichen Effekt, besonders bei niedrigeren Strahlendosen, ergibt hier eine Vorbehandlung mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid.

Eine Erhöhung der Cycloheximidkonzentration auf 40 $\mu\text{g/ml}$ zeigt nur mehr einen geringen zusätzlichen Einfluß.

Nahezu keine Auswirkung auf das Überleben nach γ -Bestrahlung

zeigt Cycloheximid bei den radiosensitiven Sporen, wie Konidien und Ascosporen von *Byssochlamys fulva* und *Penicillium terrestre*, aber einen deutlich synergistischen Einfluß auf die radioresistenten Blastosporen von *Pullularia pullulans*. Eine einstündige Vorbehandlung mit dieser Verbindung bewirkt dabei einen deutlich stärkeren Effekt, als eine Nachbehandlung. Dies und vor allem das Verschwinden der Schulter im niedrigen Dosisbereich der Überlebenskurve nach γ -Bestrahlung läßt auf eine weitgehende Blockierung der DNA-Reparaturprozesse schließen, wodurch gerade die strahlenresistenten Zellen wesentlich empfindlicher gegenüber Strahleneinwirkung werden.

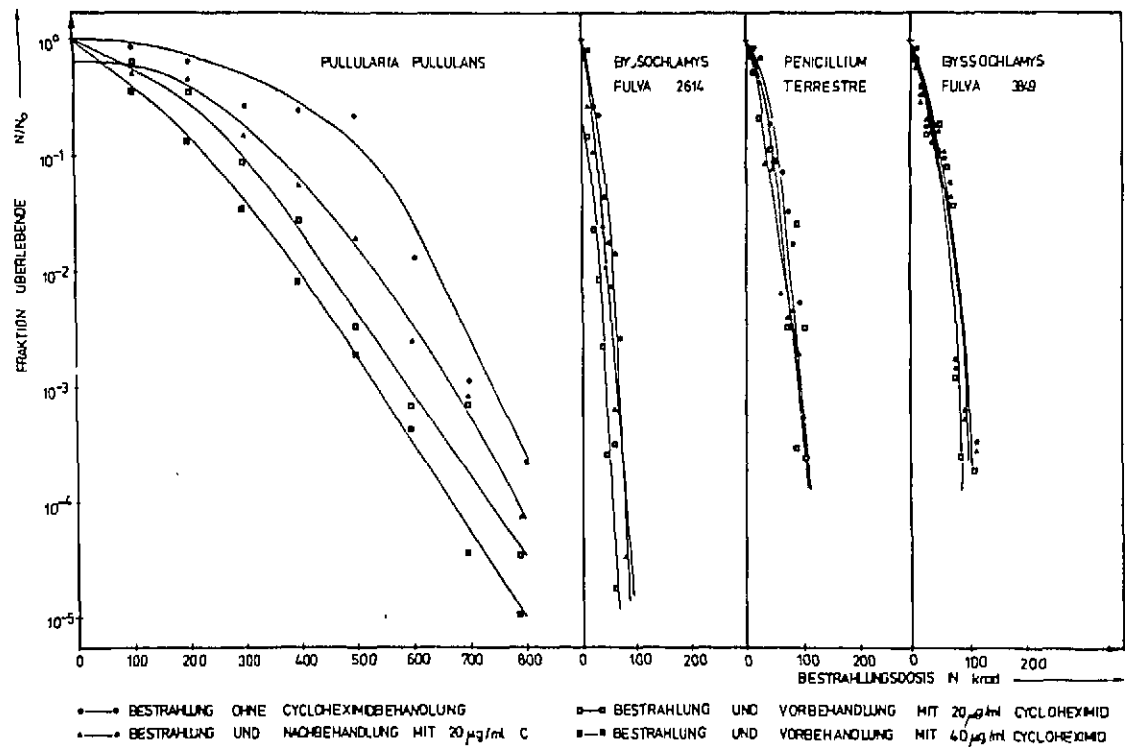


Abbildung 1: Fraktion überlebender Sporen von *Pullularia pullulans*, *Byssochlamys fulva* 2614, bzw. 3849 und *Penicillium terrestre*, nach γ -Bestrahlung bzw. Kombination derselben mit Cycloheximidbehandlungen.

4. LITERATUR

1. BRADLEY, S.G.: Relationship between Sugar Utilization and the Action of Cycloheximide on Diverse Fungi. *Nature* 194 (1962) 315-316.
2. CABELA, E., G. STEHLIK, K. KAINDL, A. SZILVINYI: The Influence of Cycloheximide on the Radiosensitivity of *Saccharomyces cerevisiae*. Seibersdorf Project Report SPR 16 (1967) 1-18.
3. HULL, R.: Study of *Byssochlamys fulva* and control measures in processed fruits. *Ann. Appl. Biol.* 26 (1939) 800-822.
4. KERRIDGE, D.: The Effect of Actidione and other Antifungal Agents on Nucleic Acid and Protein Synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Gen. Microbiol.* 19 (1958) 497.
5. MERDINGER, E., P. KOHN, R. MC CLAIN: Composition of Lipids in Extracts of *Pullularia pullulans*. *Canad. J. of Microbiol.* 14 (1968) 1021.
6. OLLIVER, M., T. RENDLE: A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. *J. Soc. Chem. Ind., London* 53 (1934) 166-172.
7. PARTSCH, G.: Simple Method for the Separation of Ascospores. *Appl. Microbiol.* 17 (1969) 925.
8. WHIFFEN, A.J.: The Production, Assay and Antibiotic Activity of Actidione, an Antibiotic from *Strept. griseus*. *J. Bact.* 56 (1948) 283.

SGAE-Berichte: Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:
Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges.m.b.H.
Nach dem Pressegesetz verantwortlich:
a.o. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Franz JEGLITSCH,
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.