# Kurze Originalmitteilungen

Für die kurzen Originalmitteilungen sind ausschließlich die Verfasser verantwortlich

## On the Precipitation of Aragonite on the Surface of Marine Bacteria

W. E. Krumbein

Biologische Anstalt Helgoland

The precipitation of Ca carbonates via microbial activity has been demonstrated for terrestrial and marine environments [1-4], yet it was not known whether precipitation takes place inside the cell, on the cell surface, or in the immediate environment of bacteria, and whether it is possible to attribute fossil carbonates to microbial origin.

During extended experiments with marine heterotrophic bacteria we have studied the initial phases of crystallization in some detail. Culture control, X-ray analyses, light and scanning electron microscopy and electron-probe analyses





b

Fig. 1. a) More than 20 bacterial cells in different stages of aragonite precipitation. Some of the cells are bordered. The final aggregate corresponds to [5, 6]. b) Aragonite aggregate after mechanical disruption of several crystal bunches. Cell morphology is already adapted to the crystals on the cell surface. Later the cell is destroyed by crystallization pressure (scales 1 µm)

Naturwissenschaften 61 (1974) © by Springer-Verlag 1974

have yielded the following results: marine heterotrophic bacteria and fungi will precipitate aragonite and other carbonates (Mg calcite and monohydro calcite) under aerobic and anaerobic, agitated and non-agitated conditions at pH 6.9 to 8.7 from seawater of different qualities when organic matter is added in concentrations between 0.01 and 0.1 %. The following nutrients were tested: Na acetate, Na lactate, asparagine, alanine, peptone, glucose and homogenized blue-green algae. All these can occur in this range of concentrations in marine sediments.

The precipitation of aragonite needles and microcrystalline aragonite was observed on the cell surfaces after 36 h of cultivation (Fig. 1). Very soon the bacteria were ensheathed by aragonite needles. The needles grow both, parallel and perpendicular to the cell surface, but prefer the cell as initial crystallization site. The dissolution or mechanical disruption of such aggregates (Fig. 1b) after 36 to 90 h of cultivation, yields intact but often deformed and inflated bacterial cells which recover after 10 to 30 min by osmoregulation. After 4 to 7 days the carbonate aggregates are much larger (50-500  $\mu$ m). When these aggregates are dissolved, they yield only dead cells and amorphous organic matter. Unless the initial steps of carbonate precipitation are controlled, it is impossible to discriminate between bacterial precipitates (Fig. 1), inorganic precipitates [5], or precipitates originating from macroorganisms [6]. The late stages of microbial carbonate precipitation-namely those from agitated cultures-yield aggregates identical to those described previously [7]. The so-called "Weizenkorntyp" (wheat-grain type) has frequently been observed in beachrock environments and algal laminites of the gulf of Agaba, always together with bacteria and early phases of aragonite precipitation. The laboratory experiments thus indicate that these aggregates may have a common bacterial origin.

I acknowledge the aid of the SEM groups of the Universities of Göttingen, Bonn and Hamburg, and the assistance of E. Gavish and G. Müller in X-ray analyses. Part of the work was supported via Grant Kr 333/6-8 of the DFG.

#### Received January 14, 1974

- 1. Krumbein, W. E., in: Recent Developments in Carbonate Sedimentology in Central Europe, p. 138 (ed. G. Müller and G. M. Friedman). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968
- 2. Greenfield, L. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 109, 23 (1963)
- McCallum, M. F., et al.: J. appl. Bacteriol. 33, 649 (1970)
  Shinano, H., et al.: Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher. 35, 1001 4. (1969); 38, 825 (1972)
- Callame, B., et al.: C.R. Acad. Sci., Paris 274, 675 (1972)
- Stieglitz, R. D.: J. Sed. Petrol. 42, 211 (1972)
  Müller, G., et al.: Naturwissenschaften 56, 551 (1969).

## Darstellung von 5-Hydroxytryptophan durch mikrobiologische Hydroxylierung von L-Tryptophan

I. Daum und K. Kieslich

Pharma-Forschung Schering AG, Berlin/Bergkamen

Frau Prof. Hedwig Langecker zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Hydroxylierung des Indol Anteils ist der erste Schritt auf einem von mehreren Wegen zum oxydativen Tryptophan-Abbau durch Mikroorganismen [1]. Diese für Bakterien nicht sehr häufig beschriebene Reaktion wurde zuerst von Mitoma Tabelle 1. Meßergebnisse aus je 2 Parallel-Ansätzen. Die Substratkonzentration betrug für beide Ansätze 0,2 g L-Tryptophan/l. Ausgewertet wurde graphisch anhand einer mitgetesteten Reihe geeichter 5-HTP-Lösungen

| Teststämme   | 5-HTP         |           |        |      |   |  |  |
|--|---------------|-----------|--------|------|---|--|--|
|  | [mg/l]        | [% d.Th.] |        |      |   |  |  |
|  | 1             | 2         | Mittel |      | _ |  |  |
| Chromobact.<br>violaceum<br>ATCC 553ª                          | 4,5           | 5,5       | 5,0    | 2,3  |   |  |  |
| Chromobact.<br>violaceum<br>ATCC 7461                          | 2,7           | 2,1       | 2,4    | 1,1  |   |  |  |
| Chromobact.<br>violaceum<br>ATCC 12542                         | 13,8          | 24,5      | 19,2   | 8,9  |   |  |  |
| Bac. subtilis<br>ATCC 21733<br>Ferm-P<br>Nr. 1590 <sup>b</sup> | <b>12</b> 6,0 | 131,0     | 128,5  | 59,6 |   |  |  |
| Bac. subtilis<br>ATCC 21733<br>Eko 19°                         | 210,0         | 218,2     | 214,1  | 99,3 |   |  |  |

a Vergleichsstamm nach Mitoma et al. [3].

<sup>b</sup> Beim Ferment. Res. Inst. (Chiba city, Japan) deponierte Kopie des Eigenisolats.

<sup>c</sup> Eigenes Isolat, Kultur aus einer mittels Platten-Selektionstest isolierten Einzelkolonie.

et al. [2, 3] in Kulturen von Chromobacterium violaceum nachgewiesen, einem Mikroorganismus, der den Pigmentfarbstoff Violacein bilden kann. Wegen der geringen Ausbeute an Tryptophan-Hydroxylierungsprodukten (ca. 4% d.Th.) und ihrer Zersetzlichkeit an der Luft gelingt es nach diesem Verfahren jedoch nicht, 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) kristallin zu isolieren. Da die Verbindung unmittelbarer biosynthetischer Vorläufer des Serotonins ist, eines als wichtige Transmittersubstanz im Stoffwechsel des Zentralnervensystems bekannten , biogenen Amins" [4], versuchten wir, die mikrobielle Trypto-

phan-Hydroxylierung präparativ zu nutzen. Wegen der geringen Tryptophan-Hydroxylierungsraten sowie möglicher pathogener Eigenschaften [5] der Species Chromobact. violaceum suchten wir nach einem für Fermentationszwecke besser geeigneten Mikroorganismus. In Schüttelkolben-Versuchen wurden deshalb 100 Testkeime unterschiedlicher Species in Nährlösungen inkubiert, die 0,1 Mol L-Tryptophan/l enthielten. Nach Chromatographie an Cellulose- und Kieselgel-Dünnschichten ließen sich in Kulturen des Bac.-subtilis-Stammes ATCC 21733 erhebliche Mengen 5-HTP nachweisen. Die kolorimetrische Überprüfung dieses Resultats nach Udenfriend *et al.* [6] ergab eine beträchtliche Erhöhung der Hydro-xylierungsrate gegenüber *Chromobact. violaceum* (Tabelle 1).

Gleiche Ergebnisse wie im Schüttelkolben ließen sich in 15-l-Fermentoren mit Rühr- und Belüftungssystemen erreichen. Die Hydroxylierungsrate hängt deutlich von der Substratkonzentration ab, ein Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen kann die 5-HTP-Bildung erhöhen. Optimale Ausbeuten (100% d.Th.)

wurden in 60-Std-Kulturen von Bac. subtilitis ATCC 21733 Eko 19 mit 100 mg L-Tryptophan/l und 33 mg  $FeSO_4$ . 7  $H_2O/l$  erzielt. Das gelöste 5-HTP wird zunächst durch Einrühren von Kationenaustauscherharz (H+-Form) in die zellfreie Kulturflüssigkeit fixiert. Durch nachfolgende diskontinuierliche Elution mit 1 m Ammoniumacetat erhält man konzentrierte 5-HTP-Lösungen, die lyophilisiert und durch Säulen-chromatographie an Sephadex G $15^{\circledast}$ mit  $0,01\,m\,{\rm NH_4HCO_3}$ (pH 8,0) gereinigt werden. Durch wiederholte Gefriertrocknung der Säulenfraktionen läßt sich ein festes weißes Produkt isolieren, das durch vergleichende ein- und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie, Papier-Elektrophorese sowie UV- und IR-Spektroskopie als reines 5-HTP identifiziert werden konnte. Die nach diesem Verfahren bisher erreichten Endausbeuten an kristallinem 5-HTP betragen infolge von Aufarbeitungsverlusten 35% der Theorie.

Eingegangen am 6. Februar 1974

- 1. Nozaki, M., Ishimura, Y.: Biochem. J. 128, 24 P (1972)
- 2. Mitoma, C., Weissbach, H., Udenfriend, S.: Nature 175, 994 (1955)
- Mitoma, C., Weissbach, H., Udenfriend, S.: Arch. Biochem. Biophys. 63, 122 (1956) Page, I. H., Carlsson, A., in: Handbook of Neurochemistry,
- 4. Vol. 4, Chapt. 11, p. 251 (1970)
- Ognibene, A. J., Thomas, E.: Amer. J. Clin. Pathol. 54 (4), 607 (1970)
- Udenfriend, S., Weissbach, H., Clark, C. T.: J. Biol. Chem. 6. 215, 337 (1955)

## Gitterkonstanten von kristallinen Grignard-Verbindungen des Pyridins

## H. H. Paradies

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin-Dahlem

Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen von kristallinen Magnesium-organischen Verbindungen liegen nur von Phenylund Äthylmagnesiumbromid in solvatisiertem und in nichtsolvatisiertem Zustand vor [1-4]. Es wurde versucht, die entsprechenden Verbindungen des Pyridins herzustellen [5]. Von diesen kristallinen Produkten, welche in Diäthyläther  $(Et_2O)$  und/oder Tetrahydrofuran (THF) anfielen, konnten zunächst nur die 2-Pyridyl-MgX-Verbindungen (X = Br, J)röntgenographisch unter Schutzgasatmosphäre durch Guinierund Weissenberg-Aufnahmen charakterisiert werden. Die nichtsolvatisierten Grignard-Verbindungen wurden aus den solvatisierten im Vakuum bei 140-150 °C durch vorsichtiges Abdestillieren des Äthers oder Tetrahydrofurans gewonnen. Aus den röntgenographischen Daten, den pyknometrischen Dichten sowie durch Elementaranalyse konnten die Zelldimensionen und Raumgruppen der 2-Pyridyl-MgX-Verbindungen (Tabelle 1) bestimmt werden. Die von Wibaut et al. [6] beschriebenen Verbindungen, nach dem ., Entraiment-Verfahren" hergestellt, entsprechen den Verbindungen 7 und 8 in Tabelle 1 und sind durch MgBr<sub>2</sub> verunreinigt. Aus den röntgenographi-schen Daten von Tabelle 1 ergibt sich, daß alle Verbindungen orthorhombische, hexagonale oder tetragonale Symmetrie besitzen und nach der gewählten Aufstellung in einem P-Gitter mit zwei oder einem Vielfachen von zwei Formeleinheiten kristallisieren. Dies entspricht den Daten von [3, 7]. Die in Position 3 des Pyridins substituierten Magnesium-organischen Verbindungen bilden bislang keine einheitlichen Einkristalle

Tabelle 1. Röntgenographische Daten von RMgX · 2THF, RMgX · 2Et<sub>2</sub>O, , RMgX " und , R<sub>2</sub>Mg" (R = 2-Pyridyl-, X = Br, J, Z = Zahl der Moleküle in der Einheitszelle)

| Nr. | Verbindung           | Gitterkonstanten [Å] |        | α, β, γ | $d_{\rm R} [{\rm g} \cdot {\rm cm}^{-3}] \ d_{4^{\circ}}^{22} [{\rm g} \cdot {\rm cm}^{-3}] \ Z$ |      |      | Raum- |                    |
|-----|----------------------|----------------------|--------|---------|--|------|------|-------|--------------------|
|     |                      | a                    | Ь      | с       |  |      |      |       | gruppe             |
| 1   | RMgBr · 2THF         | 13,981               | 8,750  | 5,822   | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 1,48 | 1,52 | 2     | P212121            |
| 2   | RMgJ·THF             | 22,579               | 21,056 | 17,082  | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 2,47 | 2,51 | 4     | P222               |
| 3   | $RMgBr \cdot 2Et_2O$ | 10,807               | 6,682  | 12,041  | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 1,24 | 1,31 | 2     | $P2_{1}2_{1}2_{1}$ |
| 4   | RMgJ·2Et20           | 8,544                |        | 15,970  | $\gamma = 60^{\circ}$  | 1,99 | 2,00 | 10    | $P6\overline{22}$  |
| 5   | RMgBr                | 6,222                | —      | 10,875  | $\gamma = 60^{\circ}$  | 1.98 | 2,05 | 4     | $P6_{2}22$         |
| 6   | RMgJ                 | 15,350               | 12,400 | 6,850   | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 1,97 | 1,99 | 4     | $P2\overline{2}2$  |
| 7   | $R_2Mg \cdot 2RBr$   | 21,580               | 18,700 | 17,054  | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 1,17 | 1,18 | 10    | $P2_{1}2_{1}2_{1}$ |
| 8   | $R_2Mg \cdot RJ$     | 14,500               | 14,500 | 12,351  | $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$   | 2,03 | 2,10 | 8     | $P4_{2}22$         |