

**19. Apidiothricin, ein neues Makrolidantibiotikum aus  
Paenibacillus larvae subsp larvae, dem Erreger der  
Amerikanischen Faulbrut (AFB)**

T Neumann, R Reiche, Ej Hentschel, U Gräfe

► **To cite this version:**

T Neumann, R Reiche, Ej Hentschel, U Gräfe. 19. Apidiothricin, ein neues Makrolidantibiotikum aus Paenibacillus larvae subsp larvae, dem Erreger der Amerikanischen Faulbrut (AFB). Apidologie, Springer Verlag, 1997, 28 (3-4), pp.177-179. <hal-00891426>

**HAL Id: hal-00891426**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891426>**

Submitted on 1 Jan 1997

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

### Comparative studies on *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* of different origin

Investigations into epidemiology of American Foulbrood (AFB) show differences in the probability of outbreaks of AFB between the lands of the Federal Republic of Germany. Biochemical differences of strains of the pathogen are known. The aim of the study was to state possible biochemical properties of the pathogen of Thuringia, Nordrhein-Westfalen and Rheinland-Pfalz.

Material from infected larvae, scales and food was grown on columbia-blood medium or MYP-agar. The isolates were characterized morphologically and biochemically (catalase, nitrate reduction). The ability of the different strains to use 95 carbon sources was investigated with the BIOLOG-system (BIOLOG-Inc). The different strains were compared to the type strain ATCC 9545 and the reference strain NRRL B-3650.

All investigated strains showed typical morphological and biochemical characteristics of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*. There were differences in the reduction of nitrate to nitrite. With UPGMA algorithm the strains could be classified into five different clusters. Within each group, the similar origin showed an extreme kinship. A clear correlation could be shown between the cluster and the biochemical properties of the different strains and origin.

### Études comparatives de souches de *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* d'origines diverses

Les recherches sur l'épidémiologie de la loque américaine (AFB) effectuées en Allemagne montrent que les différentes provinces sont plus ou moins gravement touchées par cette maladie. On sait que l'agent pathogène de l'AFB a des souches qui diffèrent biochimiquement. Il fallait donc déterminer si cette différence d'attaque était due

à des différences biochimiques dans les souches bactériennes de Thuringe, Rhénanie du Nord-Westphalie et Rhénanie-Palatinat.

Des souches provenant de larves décomposées ou d'écaillés et de nourriture ont été cultivées sur gélose au sang de Columbia ou sur gélose MYP. Les isolats ont été caractérisés sur le plan morphologique et biochimique (formation de catalase, réduction de nitrate). Le système d'identification BIOLOG-Inc a permis d'étudier l'aptitude des souches à se développer sur 95 sources différentes de carbone et de les comparer avec la souche type ATCC 9545 et la souche de référence NRRL B-3650.

Toutes les souches étudiées provenant de rayons attaqués par la loque américaine et d'échantillons de nourriture ont présenté les caractères morphologiques et biochimiques typiques de *P larvae* subsp *larvae*. On a observé des différences dans la réduction des nitrates en nitrites. Les souches ont été classées dans cinq groupes au moyen de l'algorithme d'UPGMA. À l'intérieur de chacun de ces groupes, la provenance des isolats se reflète dans le degré de parenté élevé. Il existe une relation très nette entre la formation des groupes, c'est-à-dire entre les caractères biochimiques des souches et leur provenance.

### 19. Apidithricin, ein neues Makrolidantibiotikum aus *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, dem Erreger der Amerikanischen Faulbrut (AFB). T Neumann<sup>1</sup>, R Reiche<sup>2</sup>, EJ Hentschel<sup>2</sup>, U Gräfe<sup>1</sup> (<sup>1</sup>HKI Jena Beutenbergstr. 11; <sup>2</sup>Apidologie der FSU, Am Steiger 3, D-07743 Jena)

*Paenibacillus larvae* ist der Erreger der amerikanischen Faulbrut, welche jährliche Schäden in Millionenhöhe verursacht. Im Rahmen eines Screenings nach neuen Naturstoffen aus « ökologischen Nischen » wurde *Paenibacillus larvae* DSM 11324 als Bildner antibiotischer Substanzen isoliert.

Aus diesem *Paenibacillus larvae* wurde ein Gemisch verschiedener Makrolidantibiotika isoliert und strukturell charakterisiert.

**Kultivierung:** Die Stammkultur wurde 96 Stunden in J-Medium gehalten (5g Trypton [Difco], 15g Hefeextrakt und 3g  $K_2HPO_4$  je Liter aqua dest.). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben 90 U/min und bei 32°C.

Neben Chlorothricin, Demethylchlorothricin und Deschlorothricin wird das neue Apidiothricin mit antibakterieller und zytostatischer Wirkung gebildet. Die Auftrennung der Makrolidantibiotika war mittels HPLC möglich. So konnte das neue Makrolidantibiotikum Apidiothricin in reiner Form isoliert werden. Die Strukturaufklärung des gereinigten Makrolidantibiotikums Apidiothricin erfolgte mittels ESI-MS sowie ein- und zweidimensionaler NMR. Es wurde nachgewiesen, daß *Paenibacillus larvae* DSM 11324 unter den genannten Kultivierungsbedingungen einen neuen Makrolidwirkstoff, Apidiothricin, bildet. Apidiothricin könnte Bedeutung für den Einsatz als Antibiotikum oder Zytostatikum haben. Die mikrobiologische Bearbeitung des Stammes, zum Beispiel durch Mutantenauswahl, erscheint uns als vielversprechender Weg.

#### **Apidiothricin a new chlorothricin-type antibiotic from *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, the cause of American foulbrood**

*Paenibacillus larvae* is the cause of the American bee foulbrood and the annual loss runs into millions. In the course of our screening for new natural products from ecological niches we isolated *Paenibacillus larvae* as a producing organism of antibiotics. From the cultural broth of *Paenibacillus larvae* we isolated a mixture of different chlorothricin-type antibiotics.

**Fermentation:** The strain was cultivated in 500 mL Erlenmeyer flasks with 300 mL of a medium composed of Trypton (Difco)

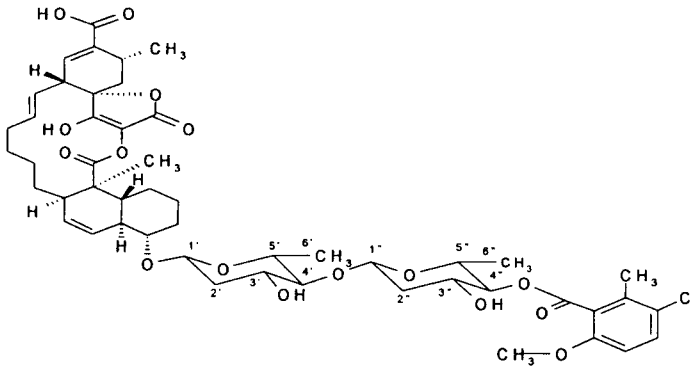
5.0 g/L; yeast extract 15 g/L;  $K_2HPO_4$  3 g/L; adjusted to pH 7.3 to 7.5. The flasks were mounted on a reciprocal shaker and agitated at 90 rpm and 35 °C for 96 h. In addition to chlorothricin, demethylchlorothricin, and deschlorothricin, the new antibiotic apidiothricin with antibacterial and cytostatic effects was produced. The separation of the antibiotics was carried out by HPLC. The structure was assigned by ESI-MS and one- and two dimensional NMR-methods. It was shown, that under the given conditions, *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* DSM 11324 produces apidiothricin, a new antibiotic. Apidiothricin could reach importance as an antibiotic or cytostatic drug. In order to obtain higher quantities of the compound the selection of higher producing strains and improvement of fermentation yield would be advantageous.

#### **L'apidiothricine, un nouvel antibiotique de type macrolide obtenu à partir de *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, agent pathogène de la loque américaine**

*Paenibacillus larvae* est l'agent de la loque américaine qui cause chaque année des millions de dégâts. Dans le cadre d'une recherche sur de nouvelles substances naturelles issues de niches écologiques, on a isolé *Paenibacillus larvae* DSM 11324 qui produit des substances antibiotiques. À partir de *Paenibacillus larvae*, un mélange de différents antibiotiques de type macrolide a été isolé et sa structure caractérisée.

**Culture :** La souche a été cultivée pendant 96 h dans un milieu contenant 5 g de trypton (Difco), 15 g d'extrait de levure et 3 g de  $K_2HPO_4$  par litre d'eau distillée. La culture était réalisée dans un erlenmeyer de 500 mL, à 32 °C et à 90 tours/min, pH 7,3-7,5.

Outre la chlorothricine, la déméthylchlorothricine et la deschlorothricine, il se forme un nouvel antibiotique, l'apidiothri-



Struktur von Apidiothricin, einem neuen Makrolidwirkstoff aus *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, Erreger der AFB.

Structure of apidiothricin, a new chlorothricin-type antibiotic from *Paenibacillus larvae* subsp *larvae*, cause of AFB.

Structure de l'apidiothricine, un nouveau macrolide actif obtenu à partir de *Paenibacillus larvae* subspec *larvae*, agent de la loque américaine.

cine, à effet antibactérien et cytostatique. Les antibiotiques ont pu être séparés à l'aide de la HPCL et l'apidiothricine a pu être isolée sous forme pure. Sa structure a été déterminée par ESI-MS et par NMR uni- et bidimensionnelle. La production d'une nouvelle matière active, l'apidiothricine, par *Paenibacillus larvae* DSM 11 324 a pu être mise en évidence dans les conditions de culture indiquées ci-dessus. L'apidiothricine pourrait jouer un rôle comme antibiotique ou comme cytostatique. L'exploitation microbiologique de la souche, par exemple par la sélection de mutants, nous semble une perspective prometteuse.

**22. Kombinationsbehandlung der Varroatose mit verdünnter Ameisensäure und Majoranöl: Labortests und Freilandversuche.** Le Tu Long, N Koeniger, S Fuchs (*Institut für Bienenkunde (Polytechnische Gesellschaft), Fachbereich Biologie der Universität Frankfurt / M, Karl-von-Frisch-Weg 2, D-61440 Oberursel*)

Zunächst wurde in Laborversuchen (909 aufgeklebte *Varroa*, 5 pro Versuchsgefäß) gezeigt, daß *Varroa jacobsoni* bei Dauerbehandlung mit Ameisensäure (AS) geringer Konzentration getötet werden können (Le Tu Long, *Apidologie* 1996, 290). Weiter hatte die Kombination von AS und Majoranöl (MÖ) eine höhere Milbenmortalität als AS allein ( $n=140$ ,  $p \leq 0,0005$ ). Dagegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Bienenverträglichkeit bei der Kombination (AS + MÖ) und der AS allein ( $n=140$ ,  $p \leq 0,065$ ).

In Freilandversuchen erfolgte die Applikation von 1 l AS in einer mit Gaze verdeckten (2,6 mm Maschenweite) Wanne (40 × 40 cm), die unter die Waben in die Beute eingeschoben wurde. Die Bienenmortalität wurde mit Gary-Fallen bei einer Behandlung von 4 Wochen mit AS von 0,5%, 5%, 10%, 15%, 20% und Wasser (3 Völker pro Konzentration) bestimmt. Bei niedrigen Konzentrationen von AS gab es keine systematischen Unterschiede. Erst bei einer Konzentration von 20% konnten wir einen signifikanten Unterschied in der