

In the same paper¹, we have remarked that the hypothesis has been advanced² that the activity of streptomycin might be due to a competition between H^+ ions and this antibiotic.

We have now proved that this is really the case, and that this competition takes place in an electro-adsorption complex of the type already mentioned.

In fact, it is very easy to show, by methods similar to those we have already described, that in dead and in living yeast cells a competition takes place for the same linkage between acridines and streptomycin, when those two substances are added together to yeast cells.

1st method: On a series of watch glasses we put 0.1 ml of a 1% suspension of baker's yeast, dry it below 70° C, fix it with alcohol and dry it again; then we stain during 10 minutes with trypaflavine 10^{-3} M or with trypaflavine 10^{-3} M containing definite concentrations of streptomycin; we wash with alcohol until the washing fluid is colorless- then we wash the acridine out with HCl (normal solution) and determine by colorimetry (Stufenphotometer).

Here follow the results of such an experiment:

Table I

Concentration of Trypaflavine	Concentration of Streptomycin	Colorimeter Reading
10^{-3} M	0	0.26
10^{-3} M	$\frac{1}{100}$	0.05
10^{-3} M	$\frac{1}{1,000}$	0.10
10^{-3} M	$\frac{1}{10,000}$	0.125

In a concentration of 10^{-3} M trypaflavine and 10^{-4} streptomycin, the trypaflavine has been expelled from the electro-adsorption complex to the extent of 50%.

2nd method: In a series of centrifuge tubes we put 8 ml of fluid composed of 2 ml of a 3% suspension of baker's yeast and 6 ml containing known amounts of trypaflavine and streptomycin; then we centrifuge. The color of the *centrifuged yeast cells* gives a first qualitative idea of the competition between trypaflavine and streptomycin. The supernatant fluid is examined in the stufenphotometer as to its content of trypaflavine.

Here follow the results of such an experiment. The colorimeter reading for the trypaflavine solution used (10^{-4} M) is 1.40.

We see that for a concentration of 10^{-4} M trypaflavine and 10^{-5} streptomycin, about half of the linkages are occupied with acridine.

3rd method: We proceed as in the first method, but stain all the suspensions with trypaflavine, wash with alcohol until the washing fluid is colorless, and then add to the suspensions different concentrations of streptomycin solutions. Through competition the trypaflavine is driven out.

¹ L. MASSART, G. PEETERS, J. DE LEY, R. VERCAUTEREN, and A. VAN HOUCKE, *Experientia*, **3**, 288 (1947).

² DR. E. CHAIN, Lecture at the University of Ghent on April 24th, 1947.

Table II

Concentration of		
Trypaflavine	Streptomycin	Colorimeter Reading
10^{-4} M	0	1.22
10^{-4} M	$1 \cdot 10^{-2}$	1.40
10^{-4} M	$1 \cdot 10^{-3}$	1.40
10^{-4} M	$1 \cdot 10^{-4}$	1.355
10^{-4} M	$1 \cdot 10^{-5}$	1.295
10^{-4} M	$1 \cdot 10^{-6}$	1.225

All our results indicate that acridines (and basic dyes in general) interfere with the metabolism of the nucleoproteids. They do this by displacing physiologically active ions, especially hydrogen ions, from an electro-adsorption complex. So does streptomycin. This explains why acridines, which are strong bases, and streptomycin all are more active inhibitors when the hydrogen ion concentration is decreased. Streptomycin and basic dyes have a common effect, but of course it is not impossible that they have still a specific action as well.

During the course of our experiments we had the good fortune to obtain a copy of the paper of COHEN^{1,2}. This author has found that streptomycin combines with nucleic acids to produce polymeric compounds. He suggests that the size of these compounds depends on the combining ratios of the bivalent base (streptomycin contains the diguanido base streptidine) to multivalent nucleates. He concludes that it is not unlikely that the *in vitro* reactivity of streptomycin with nucleic acid is related to the *in vivo* activity of this antibiotic.

Our experiments were performed with a $\frac{1}{10}$ solution of streptomycin Merck put kindly at our disposal by Prof. REGNIER, Director of the Clinic for Internal Medicine of the University of Ghent.

This research was aided by a grant of the Ella Sachs Plotz Foundation and of the Van der Stricht Foundation.

L. MASSART, G. PEETERS, and A. VAN HOUCKE

Biochemical Laboratory and Pharmacological Laboratory of the Veterinary College, University of Ghent, May 17, 1947.

Résumé

La streptomycine et les acridines ont une propriété commune, en ce qu'ils forment avec les nucléoprotéides des levures de complexes électro-adsorptifs.

¹ S. S. COHEN, *J. biol. Chem.* **166**, 393 (1946).

² We thank DR. H. VELDSTRA (Amsterdam) for sending us a copy of this interesting paper.

Action *in vitro* de la pénicilline sur la virulence du Tréponème pâle

Le problème n'a été que peu étudié jusqu'ici. Pour DUNHAM et RAKE¹, qui travaillèrent avec la souche Nichols, la pénicilline n'est virulicide *in vitro* qu'à partir de 1 100 unités par centimètre cube. Nos premières re-

¹ W. DUNHAM et G. RAKE, *Am. J. Syph., Gon. a. ven. Dis.* **29**, 214 (1945).

cherches, effectuées sur la souche Gand avec le «penicillin (sodium salt)» en tablettes de la «Therapeutic Research Corporation of Great Britain L.D.T.» et avec le «penicillin sodium» en poudre de la firme «Chas. Pfizer & Co., Inc.» (New-York et Chicago), montrèrent¹ qu'à la concentration de 50 unités par centimètre cube et à 37° C l'antibiotique ne détruit pas, après 2 heures, le pouvoir pathogène. Le sort de la mobilité du germe, sous son influence, se trouve décrit également dans nos publications.

Matériel tréponémifère	Conditionnement de l'action pénicillinique			Résultats chez le lapin	
	Unités Oxford par cm³	Contact <i>in vitro</i>		Quantité inoculée dans chaque testicule	Syphili- sation ²
		Durée	Tem- pé- ra- ture		
Emulsion de syphi- lome tes- ticulaire de lapin	100	3 heures	37° C	1 cm³	positive
	1 000	id.	id.	1 cm³	positive
	10 000	id.	id.	1 cm³	négat. c³
	0	id.	id.	1 cm³	positive
Fragment syphilo- mateux de lapin	100	3 heures	37° C	2 greffons	positive
	1 000	id.	id.	id.	positive
	10 000	id.	id.	id.	négat. c
	0	id.	id.	id.	positive
Sang citra- té de la- pin syphi- litique	100	1 heure	18° C	2 cm³	positive
	1 000	id.	id.	1,5 cm³	positive
	10 000	id.	id.	1,5 cm³	négat. c
	0	id.	id.	1 cm³	positive
Sang hu- main nor- mal + 5 % d'émul- sion sy- philoma- teuse de lapin	100	1 heure	18° C	2 cm³	positive
	1 000	id.	id.	1,5 cm³	positive
	10 000	id.	id.	1,5 cm³	négat. c
	0	id.	id.	0,5 cm³	positive

Mais, poursuivant nos expériences sur la même souche avec la dernière nommée de ces pénicillines et avec le «penicillin C.S.C. sodium salt» de la «Commercial Solvent Corporation»⁴, nous sommes arrivés à la conclusion que la stérilisation totale peut s'obtenir *in vitro* à raison de 10 000 unités par centimètre cube et un contact de 1 heure à 18° C ou de 3 heures à 37° C, lorsqu'on se sert respectivement, d'une part, de sang citraté à 0,5 % de lapin syphilitique ou de sang humain normal citraté de même et additionné de 5 % d'une émulsion de syphilome testiculaire de lapin (2 à 3 tréponèmes par champ au fond noir) et, d'autre part, soit d'une telle émulsion seule, soit d'un fragment syphilomateux non émulsionné. Le tableau ci-joint donne le détail de nos nouveaux résultats. Chaque fois notre matériel

infectieux était frais et le mélange de l'émulsion tréponémifère avec les solutions de pénicilline se faisait à parties égales. Toujours aussi les témoins développèrent, après le temps habituel, des lésions caractéristiques.

Il y a lieu de noter que l'injection, dans chaque testicule chez le lapin, d'une solution de 20 000 unités de pénicilline dans 2 cm³, qu'elle fût pratiquée immédiatement avant ou en même temps que l'inoculation d'un ½ cm³ d'émulsion fraîche tréponémifère semblable à celle précisée plus haut, ne protégea pas l'animal contre la syphilisation symptomatique ordinaire. Ce fut donc bien, dans nos essais *in vitro*, la pénicilline qui vulnérifiait, jusqu'à le rendre inoffensif, l'agent étiologique.

La possibilité n'est pas exclue de recourir à la pénicillinisation du sang donneur pour prévenir, en certains cas, la syphilisation transfusionnelle. La dose requise est pourtant si grande que la méthode ne nous paraît pas destinée à l'usage courant. Il reste d'ailleurs à savoir si l'action tréponémicide, que nous avons observée, est due à la pénicilline elle-même ou bien à quelque impureté contenue dans les préparations commerciales utilisées. Des tentatives complémentaires sont en cours au moyen de pénicilline chimiquement pure.

A. BESSEMANS, P. DEROM et R. DEROM

Institut d'hygiène et de bactériologie de l'Université de l'Etat à Gand (Belgique), le 13 juin 1947.

Summary

The Ghent strain of *Treponema pallidum* loses entirely its virulence for the rabbit when mixed *in vitro* during 1 hour at 18° C or 3 hours at 37° C with a solution of "penicillin sodium Chas. Pfizer & Co., Inc." or with "penicillin C.S.C. sodium salt of the Commercial Solvent Corporation" at the rate of 10,000 Oxford units per cm³. The injection of 20,000 units in each testicle of the animal, when made immediately before or at the same time as the inoculation of the virus, does not protect against the infection. It is therefore possible to prevent syphilis by penicillizing the blood for transfusion. But too great amounts of the drug are required in practice. It must also be proved that chemically pure penicillin has the same treponemicid action.

Einfluß von Penicillin auf die Wurzelkultur
(Zea mays)

Nachweis von β-Indolylessigsäure (Heteroauxin)
im Handelspenicillin

Bei der Untersuchung der Wirkung von Penicillin auf das Wachstum von Wurzeln von *Zea mays* in steriler Organkultur ergab sich ein stark hemmender Einfluß von Handelspenicillin (Na-Penicillin Squibb) auf das Längenwachstum (Tabelle). Nach 6–8 Tagen zeigen sich zudem charakteristische Veränderungen im Dermatogen: stellenweise starke Aufblähungen und oft sogar ein Platzen der Wandungen.

Zahl Kulturen	OE/cm³	Gesamtzuwachs in mm nach Tagen			
		3	8	17	40
14	—	9,1	17,5	28,4	41,5
14	5	2,4	6,1	12,6	21,0
17	50	1,7	5,3	10,7	18,2

¹ A. BESSEMANS et R. DEROM, Bruxelles-Médical n° 8, 343 et n° 18, 821 (1945).
² Les concentrations pénicilliniques de 1000 unités par cm³ retardèrent 3 fois sur 4 l'apparition des lésions.
³ c = négativité contrôlée par transfert ganglionnaire.
⁴ A. BESSEMANS et R. DEROM, Ann. Dermatol. et Syphiligr. n° 11bis, 744 (1946); C. r. Réunion du 28 juillet 1946 à l'Hôp. mil. Namur, p. 29; Monde et Médecine n° 10, 43 (1946).