

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), montrèrent<sup>1</sup> 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 pénicillinaire			Résultats chez le lapin	
	Unités Oxford par cm <sup>3</sup>	Contact <i>in vitro</i>		Quantité inoculée dans chaque testicule	Syphilisation <sup>2</sup>
		Durée	Temperatur		
Emulsion de syphilitome testiculaire de lapin	100 1 000 10 000 0	3 heures id. id. id.	37° C id. id. id.	1 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup>	positive positive négat. c <sup>3</sup> positive
Fragment syphilomateux de lapin	100 1 000 10 000 0	3 heures id. id. id.	37° C id. id. id.	2 greffons id. id. id.	positive positive négat. c positive
Sang citraté de lapin syphilitique	100 1 000 10 000 0	1 heure id. id. id.	18° C id. id. id.	2 cm <sup>3</sup> 1,5 cm <sup>3</sup> 1,5 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup>	positive positive négat. c positive
Sang humain normal + 5% d'emulsion syphilomateuse de lapin	100 1 000 10 000 0	1 heure id. id. id.	18° C id. id. id.	2 cm <sup>3</sup> 1,5 cm <sup>3</sup> 1,5 cm <sup>3</sup> 0,5 cm <sup>3</sup>	positive positive négat. c 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»<sup>4</sup>, 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

<sup>1</sup> A. BESSEMANS et R. DEROM, Bruxelles-Médical n° 8, 343 et n° 18, 821 (1945).

<sup>2</sup> Les concentrations pénicilliniques de 1000 unités par cm<sup>3</sup> retardèrent 3 fois sur 4 l'apparition des lésions.

<sup>3</sup> c = négativité contrôlée par transfert ganglionnaire.

<sup>4</sup> A. BESSEMANS et R. DEROM, Ann. Dermatol. et Syphiliogr. 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).

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 cm<sup>3</sup>, qu'elle fut pratiquée immédiatement avant ou en même temps que l'inoculation d'un 1/2 cm<sup>3</sup> 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 vulnéreriait, jusqu'à le rendre inoffensif, l'agent étiologique.

La possibilité n'est pas exclue de recourir à la pénicillination 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 cm<sup>3</sup>. 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 (Heterauxin) im Handelsgenpenicillin

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 Handelsgenpenicillin (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/cm <sup>3</sup>	Gesamtwachstum 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

Unter dem Einfluß von Penicillin Squibb beobachtete DE ROPP<sup>1</sup> bei Stengelkulturen von Sonnenblumen eine Adventivwurzelbildung und vermutet Heterauxin als wahrscheinliche Ursache. GEIGER<sup>2</sup> zeigte, daß sehr kleine Konzentrationen ( $10^{-8}$  Mol) von Heterauxin das Längenwachstum von Maiswurzeln stark hemmen, was wir bestätigen konnten. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß Heterauxin als Verunreinigung des Handelspenicillins die Ursache der Hemmung sein könnte.

Der hemmende Faktor erwies sich als thermostabil: autoklaviertes Penicillin ergab eine ebenso starke Hemmung wie das nicht erhitze. Der Faktor ist aus schwach sauren wässrigen Lösungen durch Äther extrahierbar, was auch für Heterauxin gilt.

Anderseits hat ein Zusatz von reinem Na-Penicillin G, das wir der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, verdanken, in einer Konzentration von 150 OE/cm<sup>3</sup> keinen hemmenden Einfluß auf das Wurzelwachstum.

Als weitere Aufgabe stellte sich der chemische Nachweis der  $\beta$ -Indolylessigsäure durch eine spezifische Farbreaktion. Wir wählten dafür die Reaktion mit Cu-Sulfat, Glyoxylsäure + Schwefelsäure (SUTTER<sup>3</sup>), was eine rotviolette Färbung ergibt. Maßgeblich für die Farbstoffbildung ist offenbar die Anwesenheit eines Indolrestes, denn auch andere Indolderivate ergeben Färbungen. Wir erhielten blauviolette Färbung mit Tryptophan, rotviolette mit  $\beta$ -Indolylessigsäure und grünlichblaue Färbung mit Ergotamin. Trotz des geringen konstitutionellen Unterschiedes von Tryptophan und  $\beta$ -Indolylessigsäure erhält man deutlich verschiedene Farbnancen, die eine Verwechslung kaum zulassen. Wir glauben deshalb, daß die Spezifität der Farbreaktion auf  $\beta$ -Indolylessigsäure eine sehr hohe ist, wenn die Farbnuance als Kriterium herangezogen wird.

Ein direkter Nachweis der  $\beta$ -Indolylessigsäure aus wässriger Penicillinlösung kam indessen nicht in Frage, da eine eventuelle Farbreaktion durch die starke Gelbfärbung des Handelspenicillins verdeckt wird. Es war deshalb notwendig, eine weitgehende Trennung von  $\beta$ -Indolylessigsäure und gelben Farbstoffen vorzunehmen. Wir versuchten, die Trennung chromatographisch durch Adsorption an Aluminiumoxyd, standardisiert nach BROCKMANN, durchzuführen. Dabei führte die chromatographische Adsorption aus wässriger Lösung zu keiner sauberen Abtrennung des Hormons von den gelben Farbstoffen. Wir versuchten deshalb eine Anreicherung der Substanz durch Ätherextraktion aus angeseuerter wässriger Lösung. Der gelbe Extrakt wurde auf wenige cm<sup>3</sup> eingeengt, an Al-Oxyd chromatographiert und das Chromatogramm mit Äther entwickelt. Die Säule wurde empirisch in fünf Zonen zerlegt und jede Schicht mit wenig Wasser eluiert. Mit Glyoxylsäure ergaben die oberen drei Zonen des Chromatogramms gelbe bzw. stark braungelbe Färbung; die vierte und fünfte Zone dagegen zeigten rein rotviolette Farbe. Wenn wässrige Penicillinlösungen oder Ätherextrakte direkt untersucht werden, so zeigt sich immer eine stark gelbe oder braungelbe Färbung, was den Nachweis von  $\beta$ -Indolylessigsäure verunmöglicht. Durch die Chromatographie von Ätherextrakten konnte der störende braungelbe Färbung verursachende Stoff sauber vom Heterauxin abgetrennt werden. Die erhaltene Farbnuance entspricht der mit reiner  $\beta$ -Indolylessigsäure erhaltenen; damit ist der spezifische chemische Nachweis von  $\beta$ -Indolylessigsäure weitgehend gesichert.

Die Bedeutung des Ergebnisses sehen wir hauptsächlich darin, daß Handelspenicillin neben den wirk samen Penicillinen noch weitere Wirk- und Hemmstoffe enthält. Es darf nie vergessen werden, daß Handelspenicillin ein eingeengtes Kulturfiltrat eines Pilzes darstellt, das relativ wenig gereinigt ist und eine große Zahl der Stoffwechselprodukte des Pilzes, die z. T. biologische Aktivität besitzen, mehr oder weniger angereichert enthält. Es ist wohl bekannt, daß Heterauxin durch Mikroorganismen, namentlich durch Schimmel pilze (z. B. *Rhizopus suinus*), reichlich synthetisiert, im Kulturmilieu ausgeschieden und angereichert wird.

Die Konzentration von Heterauxin im Handelspenicillin Squibb ist eine sehr hohe; 5 OE/cm<sup>3</sup> hemmen das Wachstum von Maiswurzeln stark. Eine 100–1000-mal kleinere Konzentration würde das Wachstum fördern, denn das Optimum der Wirkung liegt für Heterauxin bei  $10^{-11}$  Mol. Ferner werden Mikroorganismen auch durch Heterauxin im Sinne einer Förderung oder Hemmung des Wachstums beeinflußt.

Bei wissenschaftlichen Versuchen mit Handelspenicillin schenkt uns deshalb eine gewisse Gefahr in der Tendenz zu liegen, beobachtete biologische Einflüsse ohne weiteres der Wirkung des Penicillins zuzuschreiben. Der sichere Beweis für eine Penicillinwirkung scheint uns nur dann erbracht, wenn die Wirkung des Handelspenicillins mit der Wirkung von Reipenicillin im entsprechenden Kontrollversuch übereinstimmt.

1. Reines Na-Penicillin G (150 OE/cm<sup>3</sup>) hat keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von Wurzelkulturen von *Zea mays*.

2. Handelspenicillin enthält Heterauxin; dieses konnte chromatographisch stark angereichert und kolorimetrisch identifiziert werden.

M. BEIN, R. SIGNER und W. H. SCHOPFER

Botanisches und organisch-chemisches Institut der Universität Bern, den 22. Mai 1947.

### Summary

(1) Pure Penicillin Sodium G (150 U/cm<sup>3</sup>) gives no inhibition in the growth-rate of *mays*-roots in sterile organ culture.

(2) Commercial penicillin (Penicillin Sodium Squibb, 5 U/cm<sup>3</sup>) inhibits the growth-rate of *mays*-roots in a fairly high degree, due to its content of indole acetic acid. We have been able to separate the substance from the yellow dyes of commercial penicillin by chromatographic adsorption and to identify it colorimetrically as indole acetic acid.

### Sul meccanismo di azione della vaccinoterapia nella infezione tifoidea

Il siero di sangue degli ammalati di tifo acquista sotto l'azione del vaccino, una evidente proprietà batteriologica, duratura nei casi che volgono a guarigione, labile nei casi in cui la malattia continua il suo decorso<sup>1</sup>: provocato sul bacillo del tifo le stesse alterazioni quali si notano per azione della penicillina<sup>2</sup>.

Lo studio del meccanismo di azione della penicillina ci ha portati alla conclusione che la penicillina aumenta il potenziale di ossido-riduzione nel mezzo, così da impedire gli scambi energetici dei germi<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> DE ROPP, Nature 158, 555 (1946).

<sup>2</sup> GEIGER, Jb. wiss. Bot. 84, 242 (1936).

<sup>3</sup> SUTTER, Ber. Schweiz. bot. Ges. 54, 197 (1944).

<sup>1</sup> F. MULÈ, La Pediatria 7-9, 395-396 (1946).

<sup>2</sup> F. MULÈ, Comun. Accad. Med. di Roma, 20 aprile 1946.

<sup>3</sup> F. MULÈ, Annali di Igiene 6, 298-301 (1946).