

This work was performed during the tenure of a Postdoctoral Fellowship at the Institute of Microbiology supported by a grant from the Rockefeller Institute to Prof. WALTER J. NICKERSON.

A. SARACHEK*

Institute of Microbiology, Rutgers - the State University, New Jersey, July 23, 1958.

Zusammenfassung

In einer genetisch nachweisbar polyploiden Familie von *Saccharomyces* wurden der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren und die Geschwindigkeit der Zellteilungen in Abhängigkeit der Ploidie bestimmt. Es liess sich zeigen, dass die Geschwindigkeit der Zellteilungen von der Ploidie nicht beeinflusst wird, während der Gesamtgehalt an freien intrazellulären Aminosäuren sich direkt proportional mit der Zunahme der Ploidie vergrössert (Verhältnis 1:1).

* Present address: Department of Biology, University of Wichita, Wichita, Kansas.

Verteilungskoeffizient und bakterizide Wirkung von Phenolen und aromatischen Alkoholen

Die Bedeutung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Zellipoiden (Cytoplasmamembran) und wässriger Phase für die Wirksamkeit eines Arzneimittels wurde vielfach dargelegt und findet in neuerer Zeit wieder vermehrte Beachtung¹. Nur von wenigen Autoren ist diese Denkweise konsequent auch bei der Einwirkung von Desinfektionsmitteln auf Bakterien angewandt worden^{2,3,4,5}, obgleich in homologen Serien (bei Phenolen, Alkoholen u. a.) den bakteriziden Wirkungen gewisse Stoffeigenschaften in auffälliger Weise parallel laufen: Wasserlöslichkeit, Erniedrigung der Oberflächenspannung, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient (Konzentration in lipphiler Phase/Konzentration in Wasser)².

Bei Abtötungsversuchen an Bakterien stellten wir ganz allgemein fest⁶, dass von den geprüften Phenolen und aromatischen Alkoholen um so geringere Konzentrationen zur Erreichung eines bestimmten Mortalitätsgrades nötig waren, je geringer die Wasserlöslichkeit einer Verbindung war. Damit kamen wir vorerst zum gleichen Resultat wie FERGUSON². Dieser bezeichnete den Quotienten

geprüfte, molare Konzentration

Wasserlöslichkeit in mol

als (thermodynamische) Aktivität und zeigte am Beispiel der Alkohole (Methyl- bis Octyl-), dass trotz sehr verschiedenen geprüften Konzentrationen die Aktivitäten ungefähr gleich waren. ALLAWALA und RIEGELMAN³ kamen bei der Untersuchung einer grösseren Reihe von Phenolen zum gleichen Schluss.

Besonders aufschlussreich zeigten sich bei der Prüfung die aromatischen Alkohole. Erwartungsgemäss stellten wir folgende Wirkungssteigerung fest:

¹ B. B. BRODIE und C. A. M. HOGBEN, J. Pharm. Pharmacol. 9, 345 (1957).

² J. FERGUSON, Proc. Roy. Soc. London, B 127, 387 (1939).

³ N. A. ALLAWALA und S. RIEGELMAN, J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. ed. 43, 93 (1954).

⁴ E. M. RICHARDSON und E. E. REID, J. Amer. chem. Soc. 62, 413 (1940).

⁵ A. J. SHUKIS und R. C. TALLMAN, J. Amer. chem. Soc. 65, 2365 (1943).

⁶ Wir bedienten uns der Membranfilter-Methode und arbeiteten meist im Mortalitätsbereich 99,9-99,999%, vgl. Diss. H. HESS, Basel 1958, in der sich die ausführlichen Resultate finden.

Benzylalkohol < β -Phenylaethylalkohol < γ -Phenylpropylalkohol. Neben dieser Verlängerung der Seitenkette suchten wir auch mit Hilfe von Kernsubstitution zu wirksameren Verbindungen zu kommen und stellten p-Chlorbenzylalkohol und p-Chlor- β -phenylactylalkohol dar. Die beiden chlorierten Alkohole und γ -Phenylpropylalkohol sind unseres Wissens noch nicht auf ihre bakterizide Wirkung geprüft worden. Bei diesen chlorierten Alkoholen fanden wir nun, dass die Wirksamkeit sich nicht, wie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, umgekehrt proportional zur Wasserlöslichkeit verhielt. So erzielten wir zum Beispiel mit einer 0,3% (0,021 mol) -Lösung von p-Chlorbenzylalkohol (Wasserlöslichkeit bei + 3°C = 0,021 mol) einen gleichen Mortalitätsgrad wie mit einer 0,2%-Lösung (0,013 mol) von p-Chlor- β -phenylaethylalkohol (Wasserlöslichkeit = 0,0294 mol). Die nach FERGUSON berechneten Aktivitäten stimmen somit nicht überein: p-Chlorbenzylalkohol = 1,0, p-Chlor- β -phenylaethylalkohol = 0,44. Mit Hilfe der Verteilung zwischen Wasser und Hexan als lipoider Phase konnte das Problem jedoch gelöst werden. Die erwähnten, gleich stark bakterizid wirkenden Konzentrationen ergaben nach der Verteilung folgendes Bild (s. Tabelle).

Die bei der Verteilung zwischen Wasser und Hexan vom letzteren aufgenommenen Mengen sind also annähernd gleich. Ähnliche Zusammenhänge ergaben die Prüfungen von Phenolen: Von substituierten Monophenolen und Monoäthern von Diphenolen, die gleiche Wasserlöslichkeit besitzen, sind die Monophenole dank besserem Verteilungskoeffizienten wirksamer. RICHARDSON und REID⁴ kamen bei α - ω -Di-p-hydroxyphenylalkanen und SHUKIS und TALLMAN⁵ bei aliphatischen Hg-Verbindungen ebenfalls zur Ansicht, dass der Verteilungskoeffizient von ausschlaggebendem Einfluss auf die bakterizide Wirksamkeit ist.

Auf Grund dieser Resultate lässt sich die Regel aufstellen, dass verschiedene, in wässriger Lösung vorhandene Konzentrationen von Phenolen und aromatischen Alkoholen eine gleiche bakterizide Wirkung ausüben, wenn bei der Verteilung zwischen Wasser und einer lipophilen Phase in der Lipoidphase gleiche molare Konzentrationen erhalten werden. Diese Regel kann in erster Annäherung für die Bewertung von phenolischen und alkoholischen Desinfektionsmitteln gebraucht werden, indem wie folgt vorgefahren wird:

c_w sei die in wässriger Lösung vorgegebene Konzentration (in mol), c_L die Konzentration in der Lipoidphase nach der Verteilung. Den Quotienten c_w/c_L bezeichnen wir vorläufig als «Aktivitätsindex». Bei der Festlegung der lipoiden Phase ist die erhaltene Zahl für einen bestimmten Stoff immer gleich. Mit den «Aktivitätsindizes» als Stoffkonstanten werden nun die in wässriger Lösung vorgegebenen Konzentrationen c_w der zu vergleichenden Substanzen so lange geändert, bis gleiche Konzentrationen in der Lipoidphase erhalten werden. Die auf diese Weise errechneten, verschiedenen Konzentrationen der zum Vergleich stehenden Phenole oder aromatischen Alkohole werden eine ungefähr gleiche bakterizide Wirkung ausüben. Da das phenolische Hydroxyl auch gegenüber Bakterien reaktionsfähiger ist, können die Phenole und aromatischen Alkohole nicht in der gleichen Reihe behandelt werden. Da ferner Phenolat-Ionen nicht bakterizid wirken (dies wird durch unsere Versuche erneut bestätigt), müssen Phenole in undissoziierter Form vorliegen, bzw. es darf nur der undissozierte Anteil berücksichtigt werden.

Bei den in Frage stehenden Verbindungen sind zwei Gesichtspunkte für die bakterizide Wirksamkeit massgebend:

	Konzentration in		Verteilungskoeffizient
	Wasser	Hexan	
p-Chlorbenzylalkohol	0,0105 mol	0,0106 mol	1,0
p-Chlor- β -phenylaethylalkohol	0,0037 mol	0,0091 mol	2,5

1) Die Wirkung steigt mit zunehmender Lipoidlöslichkeit.

2) Die Substanz muss in Wasser gelöst sein, damit die Moleküle überhaupt an die hydrophile Aussenschicht der Bakterienzelle gelangen können.

Aus diesen beiden, sich widersprechenden Punkten ergibt sich beim Anstieg in einer homologen Reihe folgende Situation: Bei der Überschreitung eines gewissen Verteilungskoeffizienten kann eine weitere Substitution im Kern oder eine weitere Verlängerung der Seitenkette die Lipoidlöslichkeit (gemessen am Verteilungsgleichgewicht) nur noch unwesentlich erhöhen. Gleichzeitig wird aber die Wasserlöslichkeit stärker erniedrigt. An dieser Stelle einer homologen Reihe muss ein Wirkungsabfall eintreten. Denn die zu geringe Wasserlöslichkeit der Verbindung erlaubt es nicht mehr, genügend Moleküle an die Grenzfläche der Zelle heranzubringen. Folglich ist es auch nicht mehr möglich, die gleiche Konzentration in den Zellipoiden zu erreichen, wie beim nächst niederen Homologen. Es hängt natürlich von der Resistenz der geprüften Bakterienart ab, bei welcher Verbindung einer homologen Reihe der Wirkungsabfall eintritt.

Diejenige Substanz wird also am besten wirken, die bei genügender Wasserlöslichkeit sich zum grössten Teil in der Lipoidphase anreichern kann. Als solche Verbindung kann der zu fast 0,5% in Wasser lösliche p-Chlor- β -phenylaethylalkohol bezeichnet werden, denn er erreicht bei der Verteilung zwischen Wasser und Hexan eine 3mal höhere Konzentration in der Lipoidphase. Dieser aromatische Alkohol dürfte deshalb als neues, bakterizides und wenig toxisches Mittel für viele Verwendungsmöglichkeiten geeignet sein (wie zum Beispiel für die Sterilhaltung oder Konservierung von Injektionslösungen). In der Phenolreihe zeigt p-Chlor-m-kresol ebenfalls ähnliche Eigenschaften bezüglich Wasserlöslichkeit und hohem Verteilungskoeffizienten zwischen lipophiler und wässriger Phase.

Unsere Abtötungsversuche, durchgeführt an mehreren grampositiven und gramnegativen Testbakterien, stützen somit auch die Hypothese einer Lipoidschranke⁷ in der Grenzfläche der Bakterienzelle. Die Verwendung von Hexan zur Ermittlung des Verteilungsgleichgewichtes ist nur als grobes Modell zu betrachten.

H. HESS und P. SPEISER

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel, 3. September 1958.

Summary

The rôle of the partition coefficient for the bactericidal efficiency of phenols and aromatic alcohols is stressed. It is postulated that these compounds in any concentration should have identical bactericidal effects if they attain the same molar concentration in a lipoid phase after distribution. It is proposed to use this postulate for a new approach to test phenolic and alcoholic disinfectants. p-chloro- β -phenetyl alcohol reveals a high bactericidal effect due to a favourable distribution coefficient combined with a water solubility of nearly 0.5%.

⁷ P. MITCHELL und J. MOYLE, J. gen. Microbiol. 5, 981 (1951).

Oxidative Phosphorylation and Nitrogen Fixation by Cell-Free Extracts of the Azotobacter

Several investigators (SLATER, TISSIERES and SLATER, ROSE, and OCHOA¹) have demonstrated coupled oxidative phosphorylation by fractionated extracts of *Azotobacter vinelandii*. HYNDMAN *et al.*² using crude extracts of the same organism coupled phosphorylation with the oxidation of molecular hydrogen. HARTMAN, BRODIE, and GRAY³ found that the addition of ATP and Mg⁺⁺ stabilized the very labile oxidative phosphorylation system in sonic extracts of this organism. Some investigators have attributed the failure to obtain cell free preparations of the azotobacter that will consistently incorporate N₂¹⁵ to a lack of a readily available energy source. Therefore, the capability of a cell free preparation of *A. vinelandii* O, prepared by the method of HARTMAN, BRODIE, and GRAY³, to fix N₂¹⁵ was determined.

Table I

Substrate	Oxygen μ atoms	Δ Pi μ moles	P/O ratio
Succinate . . .	7.3—8.0	3.0—4.0	0.41—0.50
Fumarate . . .	8.5—10.0	3.1—4.5	0.36—0.45
α -Ketoglutarate	6.1—7.1	2.9—4.4	0.47—0.61

Each flask contained 1.0 ml dialyzed cell extract (14 mg protein), 20 μ moles substrate, 12 μ moles phosphate, 25 μ moles NaF, 15 μ moles MgCl₂.

Acceptor system: 5 μ moles mannose + 3 mg hexokinase and 2.5 μ moles ADP. Gas phase: air. Incubation time: 10 minutes. Δ Pi indicates inorganic phosphate disappearance. All values have been corrected for endogenous respiration.

The techniques described by these investigators were used for growing cells of *A. vinelandii* O and for the preparation of the crude cell free extract. Protein was estimated by the biuret reaction of GORNALL *et al.*⁴ and inorganic phosphate in the TCA soluble fraction of the reaction mixture by the method of FISKE and SUBBAROW⁵. The N₂¹⁵ concentration was determined by measuring the ratio of mass 28/29 in a Consolidated Nier mass spectrometer. Oxygen uptake was determined by the conventional Warburg method. The reaction time varied from 10 to 20 minutes and was stopped by addition of 0.5 ml of 20% TCA.

¹ E. C. SLATER, Repts. 3rd Intern. Congr. Biochem. Brussels, 264 (1955). — A. TISSIERES and E. SLATER, Nature 176, 736 (1955). — I. A. ROSE and S. OCHOA, J. biol. Chem. 220, 307 (1956).

² L. A. HYNDMAN, R. H. BURRIS, and P. W. WILSON, J. Bact. 65, 522 (1953).

³ P. E. HARTMAN, A. F. BRODIE, and C. T. GRAY, J. Bact. 74, 319 (1957).

⁴ A. C. GORNALL, C. J. BARDAWILL, and M. M. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

⁵ C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).