

quello isolato dall'ARNAUDI e classificato come *Flavobacterium dehydrogenans*<sup>1</sup>.

L'interesse biologico di queste azioni microbiche non risiede soltanto nel fatto che per la prima volta venivano descritti schizomiceti capaci di attaccare le sterine, ma anche e specialmente perchè l'ossidazione da essi provocata si realizza con caratteri di alta specificità, sicchè è possibile la loro utilizzazione da un punto di vista industriale, per alcune trasformazioni che hanno luogo nel corso della sintesi degli ormoni sessuali. Essi infatti consentono, diversamente dai reattivi chimici ad azione non selettiva, l'ossidazione dei gruppi alcolici secondari e quindi permettono l'ottenimento di rendimenti assai più elevati.

I caratteri biologici di questi batteri sono per sè stessi assai interessanti e sembrano avere uno stretto legame con le loro proprietà biochimiche. Essi elaborano un pigmento giallo citrino che è racchiuso nella capsula del batterio e non diffonde nei liquidi e che si forma esclusivamente alla luce. Tale pigmento sembra legato alle capacità respiratorie ed ossidative del batterio, in quanto quelli intensamente pigmentati per esposizione alla luce diffusa, determinano un minore abbassamento del potenziale *redox* del mezzo nutritivo di quelli privi di pigmento perchè cresciuti al buio ed inoltre metabolizzano con intensità assai più accentuata il glucosio e l'alcole etilico di quelli non pigmentati. Parallelamente si può constatare che la deidrogenazione del deidroandrosterone è più debole od anche nulla se si impiegano stipiti privi di pigmento. Viceversa, culture abbondantemente pigmentate e trattate per 3 ore a 56° C si sono mostrate ancora capaci della ossidazione sopra citata, onde l'attività ossidativa risulterebbe legata al pigmento più che ai processi vitali del batterio. Va inoltre rammentata la notevole resistenza che presenta il *Flavobacterium dehydrogenans* all'alcole etilico (7%), all'acetone (9%) ed all'acqua ossigenata, che nella misura del 0,025% addizionata al brodo-lievito, non ne arresta la moltiplicazione.

Nel 1944 ERCOLI e MOLINA<sup>2</sup> hanno osservato un particolare comportamento biochimico in altri due *Flavobacterium* morfologicamente assai simili al *dehydrogenans*. Uno, denominato *Flav. androstendionicum*, capace di ossidare l'androstendiolo in androstenedione, avente cioè l'attitudine a deidrogenare i due ossidrilici alcoolici secondari in posizione C3 e C17, mentre non può ossidare l'androstenediolo a testosterone, ossidazione provocata invece dal *Flav. dehydrogenans*. Il secondo, denominato *Flav. carbonilicum*, dimostrante invece un potere ossidante intermedio fra quello esplicato dal *Flav. dehydrogenans* ed il *Flav. androstendionicum*. Esso infatti, messo ad agire sull'androstendiolo, determina la formazione di una miscela di testosterone e di androstenedione. È da tenere presente però che non sono stati determinati i livelli di potenziale *redox* ai quali vennero realizzate da MOLINA ed ERCOLI le ossidazioni con tali batteri e non si può escludere *a priori* che le condizioni ambientali nelle quali l'ossidazione si svolge, non intervengano a determinare una più o meno intensa azione ossidante. Se così fosse, i due germi sopra citati rientrerebbero evidentemente nella specie *Flav. dehydrogenans*.

La capacità ossidante dei flavobatteri si estrinseca però anche su altre sostanze oltre alle sterine. Notevole è l'azione di alcuni di essi sopra la glicerina che viene intensamente acidificata e su diversi idrati di carbonio

i quali rimangono, parimenti alla glicerina inerti dal punto di vista fermentativo e risultano invece più o meno intensamente acidificati. Anche più interessante è il fatto che alcuni idrocarburi e loro derivati possano essere utilizzati dai flavobatteri in via ossidativa. È stato possibile infatti far crescere diversi flavobatteri in soluzioni saline nutritive, nelle quali l'unica fonte di carbonio era costituita da toluolo, xilolo, paraffina, acido benzoico, acido salicilico ed acido fenico.

Alcune esperienze attualmente in corso di esecuzione ci fanno supporre che fra i commensali dei cellulolitici aerobi ossidanti la cellulosa del terreno, siano largamente rappresentati anche i *Flavobacterium* e che la loro presenza non sia senza significato nello svolgimento di questo importante processo degradativo.

CARLO ARNAUDI

Istituto di Microbiologia agraria e tecnica dell'Università di Milano, 2 marzo 1946.

### Summary

A few *Flavobacterium*, among them *Flav. dehydrogenans*, present oxidative activities upon sterins from the serie of sexual hormones, acting in a selective manner. These microorganisms have a scarce fermentative capacity against carbohydrates and an eminent oxidative action upon hydrocarbures and their derivatives as toluol, xylol, paraphine, benzoic acid, salicylic acid, phenol.

The pigment of *Flav. dehydrogenans*, which is exclusively elaborated at diffusive light, is straightly fixed at oxidative processes determined by the bacterium.

### Sur certaines conditions de la transformation du type antigénique et de l'équipement enzymatique d'un colibacille, sous l'effet d'un principe inducteur de nature thymonucléique issu d'un autre colibacille (mutation « dirigée »)

Depuis les travaux de GRIFFITH, on connaît la possibilité, pour un pneumocoque, de changer de type et récemment AVERY, MACLEOD et MCCARTY ont découvert la nature thymonucléique du principe inducteur grâce auquel un type de pneumocoque peut imposer sa propre spécificité à un autre type en voie de mutation. BERRY a retrouvé des phénomènes comparables dans le domaine des virus (virus de SHOPE-SANARELLI). A notre tour, nous avons vu un type de colibacille imposer sa propre spécificité et quelques-uns au moins de ses caractères enzymatiques à un autre type de colibacille, et cela grâce à l'entrée en jeu d'un principe inducteur thymonucléique<sup>1</sup>. Il est assez vraisemblable que des transformations du même ordre sont susceptibles de se produire, avec plus ou moins de facilité, chez toutes les bactéries et tous les virus, et qu'elles jouent quelque rôle dans l'évolution naturelle des flores microbiennes saprophytes et pathogènes. Mais il convient d'éviter une erreur de perspective et de ne pas tomber dans un mobilisme exagéré: de pareilles mutations « dirigées » semblent garder un caractère exceptionnel et les types antigéniques demeurent usuellement stables, conservant ainsi, en pratique, toute leur valeur d'« espèces élémentaires ». C'est ce que nous voudrions montrer à propos des colibacilles.

<sup>1</sup> C. ARNAUDI, Boll. I. S. M. (1942); Centr. Bakt., II. Abt. 105 (1942).

<sup>2</sup> L. MOLINA e A. ERCOLI, Boll. I. S. M. (1944).

<sup>1</sup> Exper., I, 334 (1945).

Les colibacilles donnent lieu à un très grand nombre de types antigéniques distincts, dont chacun est caractérisé par la constitution de son polysaccharide somatique. Mais il semble exister des groupes parmi tous ces types, basés sur la spécificité des matières protéiques de la cellule bactérienne; toutefois la question est encore en pleine étude dans notre laboratoire. Les colibacilles  $C_1$  et  $C_2$  dont il a été question dans notre précédente note, appartiennent à un même groupe et il y a tout lieu de penser que la possibilité d'une mutation dirigée ne dépasse pas le cas de deux germes très voisins l'un de l'autre. Mais à beaucoup près, cette condition n'est pas suffisante pour qu'une pareille mutation puisse s'installer; il faut encore, selon toute probabilité, que le germe intéressé soit dans un certain état d'instabilité dont la nature intime nous échappe complètement. Ainsi, nous avons toujours échoué dans nos tentatives répétées pour transformer  $C_1$  rough en  $C_2$  smooth, grâce à une nucléoprotéine ou à un acide nucléique extraits de  $C_2$ . D'autre part, parmi les assez nombreuses variantes qu'il est possible de distinguer dans  $C_2$  rough, en se basant sur l'aspect des colonies, une seule (forme à très petites colonies) se montre sensible à l'extrait provenant de  $C_1$ , et peut se transformer sous son action en  $C_1$  smooth. Quant à  $C_1$  rough, ce n'est qu'assez exceptionnellement qu'on obtient son passage à  $C_1$  smooth, sous l'effet du même extrait<sup>1</sup>. Ces faits rappellent absolument ceux qui ont été vus dans le domaine des pneumocoques.

Il convient de noter, toutefois, que l'échec d'une tentative de mutation dirigée peut fort probablement tenir aussi à des causes autres que la trop grande stabilité du germe considéré. Notre technique de préparation de l'extrait inducteur comporte une courte autolyse du colibacille tué par le toluène, à 37° C ou mieux à la température ordinaire (quelques heures), une courte digestion pepsique vers  $p_H$  2 et à la température ordinaire (quelques heures) et des précipitations fractionnées en milieu alcoolique et acide. Cela offre bien des possibilités d'altération de l'acide thymonucléique hautement polymérisé, tant par voie enzymatique (thymonucléase bactérienne) que par voie purement chimique (en particulier action des acides et des alcalis). AVERY et ses collaborateurs ont rencontré des difficultés du même ordre dans le cas du pneumocoque, mais ils ont pu les tourner en recourant à une extraction des germes par le désoxycholate de sodium. Il semble beaucoup moins aisé d'obtenir les nucléoprotéines du colibacille et même le procédé par autolyse échoue totalement ou presque totalement avec la grande majorité des germes: ou bien on n'extraît à peu près rien, ou bien les enzymes dégradent complètement l'acide nucléique au fur et à mesure de sa libération. Dans les cas les plus favorables ( $C_1$  par exemple), les pertes en acide nucléique hautement polymérisé sont certainement énormes et sans doute faut-il attribuer à ce fait l'activité relativement basse de nos préparations du principe inducteur nucléique de  $C_1$ : activité limitée à des dilutions de quelques centaines de *milliers* de fois, alors que les préparations homologues d'AVERY se montrent agissantes jusqu'à des dilutions atteignant plusieurs centaines de *millions* de fois. Nous ajouterons que, chez le colibacille, le principe actif paraît nettement moins sensible aux enzymes bactériens et à l'acidité tant qu'il est encore en combinaisons protéiques.

<sup>1</sup>  $C_2$  smooth passe très facilement à l'état  $C_2$  rough, dans les cultures usuelles sur bouillon et sur gélose, en donnant lieu à de nombreuses variantes quant à l'aspect des colonies. Dans les mêmes conditions le passage de  $C_1$  smooth à  $C_1$  rough est assez fréquent, mais ne présente pas le spectre complexe de variantes auquel donne lieu  $C_2$ .

Nous nous sommes posé la question de savoir si quelque relation de caractère statistique ne pourrait pas être établie entre la concentration du milieu de culture en principe nucléique inducteur et la fréquence d'apparition du mutant. Nous poursuivons l'étude du problème, mais nous nous heurtons à une grosse difficulté pratique: la forme rough originelle pousse en dépôt cohérent au fond des tubes, même sur les milieux non salés, alors que le mutant smooth donne lieu à une culture diffuse envahissant le milieu. Comment, dans ces conditions, établir avec quelque exactitude et par l'artifice des repiquages sur gélose (colonies isolées) les proportions respectives des deux formes? Ajoutons enfin que dans le cas du colibacille, la transformation est capable de s'opérer encore au sein des cultures en bouillon peptoné usuel; l'adjonction de sérum sanguin ne paraît pas présenter l'utilité fondamentale qu'elle revêt dans le cas du pneumocoque.

En résumé, nous apportons, nous semble-t-il, la preuve d'une *possibilité* de mutation dirigée sous l'action d'un principe thymonucléique, chez les colibacilles<sup>1</sup>. Mais la manifestation du phénomène demeure fort contingente par suite, tout à la fois, de l'inégale faculté de mutation des divers germes et de la grande imperfection de nos techniques actuelles. Venant s'ajouter aux remarquables observations sur le pneumocoque qui se sont échelonnées des travaux de GRIFFITH à ceux d'AVERY et ses collaborateurs, nos observations sur le colibacille contribuent à démontrer, de façon plus générale, la réalité même des mutations chez les bactéries — êtres dépourvus de sexualité — réalité qui ne peut plus être mise en doute dans le cas des microorganismes plus élevés en organisation et doués de sexualité, depuis les belles études récentes de BEADLE et TATUM sur la moisissure *Neurospora* et de SPIEGELMAN et LINDEGREN sur la levure.

ANDRÉ BOIVIN, ALBERT DELAUNAY,  
ROGER VENDRELY et YVONNE LEHOULT

Institut Pasteur (Paris-Garches), le 6 mars 1946.

### Summary

The transformation of antigenic and enzymatic properties of a bacteria can be produced by the action of an inductor thymonucleic factor, which comes from a related bacteria. However, this transformation is only possible when the bacteria which must undergo the "mutation dirigée" is in a state of pronounced instability, the determinism of which is still unknown. We find to-day the greatest difficulties to isolate, without destroying it, the inductor factor, because it is very sensitive to bacterial enzymes and to the delayed action of acids and bases.

<sup>1</sup> Seul l'acide nucléique provenant du germe inducteur se montre actif (acide nucléique de  $C_1$  dans le cas du passage de  $C_2$  à  $C_1$ ). Toutes les tentatives faites pour utiliser d'autres acides nucléiques d'origine bactérienne (bactéries non apparentées), végétale ou animale, ont échoué.

### Einfluß antianaphylaktisch wirkender Stoffe auf die Antikörperproduktion

Um Antiseren von möglichst hohem Titer zu gewinnen, ist es erforderlich, den Tieren das Antigen zu wiederholten Malen und in geeigneten zeitlichen Intervallen zu injizieren. Durch solche Reinjektionen kann die Antikörperbildung vermehrt angeregt werden. Leider