

1° *Bourgeonnement des feuilles végétatives*

## Dimension du bourgeon le premier jour

0,8	0,7	0,9	0,6	1,1	0,9	0,5	0,8	0,9	1,0	Moyenne: 0,8 mm
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----------------

## Dimension du bourgeon le cinquième jour

Conc. 0,001 %	2,1	2,4	2,3	2,0	1,3	2,6	3,4	3,2	1,0	1,7	Moyenne: 2,2 mm
Témoin	1,3	1,4	1,7	1,0	1,6	1,3	1,2	1,3	1,8	0,6	Moyenne: 1,3 mm

## Dimension du bourgeon le dixième jour

Conc. 0,001 %	4,3	4,1	4,5	4,3	4,0	4,2	4,1	3,2	4,5	3,1	Moyenne: 4,0 mm
Témoin	2,6	2,4	2,3	3,2	1,9	4,0	2,0	2,2	2,0	1,5	Moyenne: 2,4 mm

2° *Allongement de la nervure principale*

## Longueur de la nervure le premier jour

3,2	3,3	4,0	3,9	3,6	4,4	4,3	3,3	4,2	3,2	Moyenne: 3,7 mm
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----------------

## Longueur de la nervure le cinquième jour

Conc. 0,001 %	5,6	4,3	5,2	5,8	3,0	5,1	5,0	3,9	4,8	6,3	Moyenne: 4,9 mm
Témoin	4,0	4,3	3,7	4,1	3,8	4,4	4,0	3,9	4,2	3,6	Moyenne: 4,0 mm

## Longueur de la nervure le dixième jour

Conc. 0,001 %	7,1	6,2	6,0	6,1	5,8	6,3	5,0	7,2	6,2	6,3	Moyenne: 6,2 mm
Témoin	4,6	4,5	5,2	5,0	4,7	3,3	4,6	4,4	4,2	4,8	Moyenne: 4,5 mm

## Longueur de la nervure le vingtième jour

Conc. 0,001 %	15,0	15,2	15,1	13,9	14,8	16,0	15,0	15,2	15,1	17,3	Moyenne: 15,3 mm
Témoin	10,1	10,2	10,3	10,3	10,0	9,2	10,1	10,6	8,9		Moyenne: 9,0 mm

L'action de l' $\alpha$ -naphthacétylglycinate de K est compliquée, il semble cependant qu'il doit y avoir un maximum de croissance entre 0,005 et 0,001. Nous essayons les concentrations 0,006, 0,007, 0,008, 0,009. (Il est extrêmement difficile de réaliser de telles concentrations, nos résultats ne sont donc qu'approximatifs):

0,006 % Taille légèrement supérieure, en moyenne 3,5 mm pour 3,0 mm

0,007 % Taille nettement supérieure, en moyenne 4,5 mm pour 3,0 mm

0,008 % Taille nettement supérieure, en moyenne 4,5 mm pour 3,0 mm

0,009 % Taille légèrement supérieure, en moyenne 3,5 mm pour 3,0 mm

Pour des concentrations inférieures, la taille reste d'environ 3,0 mm

VI. – *Conclusions*

L' $\alpha$ -naphthacétylglycinate de K, administré à une concentration voisine de 0,001 % de substance active et stimule la croissance de *Salvinia natans* (L.) All. Les témoins sont placés dans une solution de même  $p_H$ . Pour d'autres concentrations, on constate une diminution de la taille des diverses parties de la plante, et en particulier une variation des sporocarpes. La nervure principale de la feuille aquatique, sous l'action de ce produit, à la concentration indiquée, exagère sa croissance. Mais cette nervure joue le rôle d'une véritable racine aquatique. Une telle remarque permet d'interpréter l'action particulière de l' $\alpha$ -naphthacétylglycinate de K.

Laboratoire de botanique de l'Université de Lausanne, 4 septembre 1948.

P. E. PILET

*Summary*

Potassium- $\alpha$ -naphthacetylglycinate, administered in a concentration of approximately 0,001 % active sub-

stance, stimulates the growth of *Salvinia natans* L. The controls are placed in a solution of the same  $p_H$ . With other concentrations we notice a diminution in the size of the different parts of the plant, and particularly a variation of the sporocarps. The chief rib of the aquatic leaf, under the action of this product in the concen-

tration mentioned, increases its growth. But this rib plays the part of a real aquatic root.

This observation allows us to interpret the peculiar action of potassium- $\alpha$ -naphthacetylglycinate.

**Oxydation du cholestérol***Activité biochimique des Flavobacteria*

Sur les propriétés physiologiques des *Flavobacteria* et tout particulièrement sur leur pouvoir oxydant, l'un de nous a déjà fait paraître quelques notes<sup>1</sup>. Ces travaux de même que ceux de ERCOLI<sup>2</sup> ont mis en évidence le pouvoir oxydant de *Flavobacterium dehydrogenans* sur les hydroxystérides qui sont transformés par lui en céto-dérivés correspondants.

<sup>1</sup> C. ARNAUDI, Zbl. Bakt., II. Abt. 105, 352 (1942); Exper. 2, 138 (1946); Schweiz. Z. Path. Bakt. 9, 607 (1946).

<sup>2</sup> A. ERCOLI, Hoppe Seylers Z. physiol. Chemie 270, 266 (1941).

Des recherches ultérieures<sup>1</sup> ont démontré que plusieurs souches de bactéries appartenant au genre *Flavobacterium* peuvent utiliser, par oxydation, des substances organiques diverses: glucides, polyalcools de même que des hydrocarbures et leurs dérivés.

En effet, ces bactéries peuvent se multiplier dans des solutions salines dont l'unique source de carbone est représentée par des glucides ou respectivement par de la glycérine, du toluolène, du xylol, de la paraffine, de l'acide benzoïque, de l'acide salicylique ou de l'acide phénique. Ce comportement laissait prévoir la possibilité d'une action directe de ces organismes sur le cholestérol. Dans ce but des expériences avaient été exécutées précédemment, mais avec un résultat négatif, par ARNAUDI et ERCOLI<sup>2</sup> en employant soit *Flavobacterium dehydrogenans*, soit *Bacterium steroidiclasium*. Cette dernière espèce avait démontré une activité énergique sur le déhydroandrostérone, dont la molécule en est profondément désagrégée.

En 1944, au cours d'une intéressante recherche sur la disparition de la cholestérine du sol, G. E. TURFITT<sup>3</sup> a pu obtenir *in vitro* l'oxydation de la cholestérine en cholesténone, en employant une souche de *Proactinomyces* sp. qui serait, suivant l'opinion de cet auteur, confirmée par ses travaux ultérieurs<sup>4</sup>, l'unique microorganisme du sol capable d'opérer cette transformation.

Une série d'observations préliminaires, exécutée sur 16 souches de bactéries du genre *Flavobacterium* nous a permis de constater que trois entre elles pouvaient se multiplier par étapes, dans des milieux de culture minéraux ou le cholestérol constituait la source unique de carbone. L'une des trois, la souche Ar. 3 (identifiée par la suite avec *Flavobacterium maris* HARRISON<sup>5</sup>) possédait une capacité de multiplication très élevée; c'est pour cette raison que cette espèce a été employée au cours des recherches ultérieures.

Au cours d'une première série d'expériences, le microbe a été cultivé dans 10–15 cm<sup>3</sup> de solution nutritive minérale additionnée de cholestérol, disposée en couche très mince présentant ainsi une large surface de contact à l'air. Du bout d'un temps variant entre 15 et 20 jours, on a recherché les cétones, en employant dans ce but la réaction de ZIMMERMANN<sup>6</sup>.

Parallèlement, on a procédé à des expériences de contrôle au cours desquelles la même recherche avait lieu sur le liquide de culture stérile, maintenu dans les mêmes conditions et pendant la même durée. Le résultat positif, obtenu plusieurs fois, c'est-à-dire: la constatation de la formation de corps cétoniques du cholestérol sous l'action de l'Ar. 3, nous a engagé à renouveler les essais avec des quantités plus fortes. Les essais ont été exécutés au moyen de ballons pourvus d'une cloison poreuse permettant l'aération. Le milieu de culture choisi avait la composition suivante: phosphate monopotassique 2,5 g; chlorure de calcium 0,1 g; sulfate de magnésium 0,3 g; chlorure de sodium 6 g; asparagine 3 g; H<sub>2</sub>O distillée à 1000 cm<sup>3</sup>,  $p_H = 6,5$ . Le liquide était ensuite abondammentensemencé avec la souche Ar. 3, provenant d'une culture sur gélose au cholestérol de 5–6 jours.

On amena la température du ballon à 25–26°C et après 24 heures de l'ensemencement, on commença à

oxygéner modérément. Après 3–4 jours il fut déjà possible de constater un développement assez intense du bactérium. Le liquide de culture avait l'aspect très trouble et présentait une coloration jaune orange intense due au pigment bactérien. C'est à ce moment que l'on ajouta le cholestérol. Il avait été préparé au préalable en suspension colloïdale, en égouttant dans de l'eau distillée chaude une solution acétonique de cholestérol. Avant d'employer la suspension, c'est-à-dire avant de l'ajouter au milieu de culture, on éloigna tout l'acétone et on contrôla sa disparition. La concentration du cholestérol utilisé dans cette réaction, varie, suivant les essais de 0,5 à 2 par 1000.

L'oxygénation a été poursuivie pendant 15 à 25 jours, d'après les modalités d'expérience. Le matériel était ensuite filtré avec du papier couvert d'une mince couche de CaCO<sub>3</sub>; on desséchait à 37–40°C et on continuait l'extraction en Soxhlet pendant 8–10 heures.

Une fois l'éther évaporé, le matériel brut obtenu fut soumis au réactif de GIRARD<sup>2</sup>, qui permet de séparer le cholestérol résiduel des produits cétoniques d'oxydation éventuellement formés. Comme on le voit dans la description des expériences, on a pu identifier seulement le cholesténone, qui s'est produit pendant l'oxydation du cholestérol en pourcentages variables.

On a observé en général que l'extraction par l'éther met en solution aussi les produits de lyse et le pigment des microorganismes; au cours de la séparation par le réactif de GIRARD, ces produits passent en grande partie dans la fraction non cétonique, tandis qu'une petite fraction vient à se trouver dans la portion cétonique, sous forme d'huile de couleur jaune-rougeâtre, qui rend difficile la cristallisation du produit qu'il accompagne, surtout lorsqu'il s'agit de petites quantités.

#### 1<sup>re</sup> expérience

On porte dans un ballon à cloison poreuse 500 cm<sup>3</sup> du liquide de culture préparé avec une double quantité de sels et on l'ensemence abondamment avec la souche Ar. 3 (provenant de plaques de gélose-cholestérine). On prépare à part une suspension de cholestérine avec 500 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O stérile à 80°C, en introduisant en petites portions une solution acétonique de la substance. La troisième partie de cette suspension est ajoutée tout de suite au petit ballon à cloison poreuse, que l'on met dans un bain thermostatique à 26°C. 24 heures après, on commence à introduire l'oxygène et cet apport doit continuer pendant toute la durée de l'expérience. A intervalles de 8 jours, on ajoute la cholestérine restante en deux portions alternées. Au bout de 23 jours, on filtre le liquide de culture avec du papier couvert d'une mince couche de CaCO<sub>3</sub>; on dessèche à 37–40°C et on extrait avec de l'éther en Soxhlet pendant 8–10 heures.

Une fois l'éther évaporé, on obtient 770 mg de résidu que l'on traite avec 0,75 g du réactif P de GIRARD, 15 cm<sup>3</sup> d'alcool éthylique absolu et 1,5 g d'acide acétique pur. On réchauffe pendant à peu près une heure. Après refroidissement, on verse le tout dans 48 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O contenant 22,5 cm<sup>3</sup> de NaOH N (quantité qui suffit à neutraliser les 9/10 de l'acide acétique présent) et 30 g de glace. On vérifie que la solution ne rende pas bleu l'indicateur au bleu de bromthymol et on extrait à trois reprises avec de l'éther. La fraction étherée, après lavage avec de l'eau, desséchement sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporation du dissolvant, donne 573 mg de fraction non cétonique. A la solution acquise résiduelle, on ajoute de l'HCl jusqu'à réaction nettement acide au rouge de Congo. On laisse reposer pendant à peu près une heure et on répète l'extraction avec de l'éther, jusqu'à épuisement. La fraction étherée donne – après lavage avec de la soude diluée, de l'eau, desséchement sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporation du dissolvant – un résidu cétonique de 256 mg, constitué par de longs cristaux jaunâtres, accompagnés d'une petite quantité d'une huile jaune rougeâtre.

<sup>1</sup> C. ARNAUDI et C. COLLA, Soc. it. Biol. sper., Séance du 21 novembre 1944.

<sup>2</sup> C. ARNAUDI et A. ERCOLI, Boll. Ist. Sier. milanese 20, 137 (1941).

<sup>3</sup> G. E. TURFITT, Bioch. J. 38, 692 (1944).

<sup>4</sup> G. E. TURFITT, J. Bact. 54, 557 (1947); Bioch. J. 42, 376 (1948).

<sup>5</sup> J. HARRISON, Canadian J. Researches 1, 232 (1929).

<sup>6</sup> W. ZIMMERMANN, Klin. Wschr. 17, 1103 (1938).

<sup>1</sup> Vu le peu de solubilité, soit du produit de base, soit de celui des produits éventuellement obtenus, le traitement du liquide résultant de la filtration a eu lieu seulement lorsque c'était nécessaire.

<sup>2</sup> A. GIRARD et G. SANDULESCO, Helv. chim. acta 19, 1095 (1936).

2<sup>e</sup> expérience

Culture par agrandissement. Souche Ar. 3. Liquide de culture à double concentration de sels nutritifs. Concentration de la cholestérine: 2 par 1000. Volume final = 4900 cm<sup>3</sup>. Durée de l'expérience: 18 jours. Substance totale recueillie = 9,071 g. Portion cétonique = 1,239 g (rend. 13,64%). Le produit recristallisé de l'alcool méthylique-acétone (3:2) donne p. f. = 80–81°C qui n'est pas abaissé par le mélange avec le <sup>14</sup>C cholesténone.

3<sup>e</sup> expérience

Culture par agrandissement. Souche Ar. 3. Liquide de culture à double concentration de sels nutritifs. Concentration de la cholestérine: 0,625 par 1000. Volume final = 4000 cm<sup>3</sup>. Durée de l'expérience: 1 mois. Substance totale recueillie = 2,141 g. Portion cétonique = 0,236 g (rend. 11,02%). Le produit recristallisé de l'alcool méthylique-acétone (3:2) donne p. f. = 80°C en mélange.

Il résulte de ces observations que le pouvoir oxydant des microorganismes appartenant au genre *Flavobacterium* a réellement une extension remarquable, puisqu'il agit même sur des substances qui, comme le cholestérol, présentent une grande résistance aux attaques des microorganismes et des enzymes. Il est donc tout à fait justifié de poursuivre et d'approfondir les expériences entreprises avec ce bacille.

CARLO ARNAUDI et CESARINA COLLA

Institut de microbiologie générale, agricole et technique de l'Université de Milan, le 23 septembre 1948.

## Summary

Continuing his experiences upon the oxidative activities of organisms belonging to genus *Flavobacterium*, the author reports the conditions in which *Flavobacterium maris* effects the oxidation of cholesterol to cholestenone. This transformation is obtained within 20 days with yields which vary from 11 to 13%.

## On the Hemagglutinins of Beans and of Influenza Virus

We have extracted the hemagglutinin contained in the seeds of *Papilionaceæ*<sup>1</sup> in the form of a substance soluble in organic solvents, and have applied essentially the same method to the extraction of the hemagglutinin of influenza virus<sup>2</sup>. The tests were made by SALK's method<sup>3</sup>.

The vegetable hemagglutinin was extracted by soaking and grinding commercial dried beans in water, precipitating at  $p_H$  5.0 with an equal volume of ethanol, and treating the precipitate with iso-propanol. After thorough stirring, the mixture was centrifuged, and the resulting water-clear supernatant found to have hemagglutinating activity in high titer. The solution could be dried and the active material redissolved in organic solvents without loss.

With influenza virus the method was as follows: To 50 ml of infected allantoic fluid was added 1.25 ml of *N* acetic acid, which lowered the  $p_H$  to 5.0. To this was

then added 50 ml of ethanol and the mixture was allowed to stand some thirty minutes until clear flocculation occurred. The precipitate was collected by centrifugation, the supernatant discarded, and the tubes allowed to drain. The precipitate was then treated with 5 ml of iso-propanol. The water-clear supernatant, obtained after stirring and centrifuging, contained the hemagglutinin. As with bean hemagglutinin, the solution could be dried and the active material redissolved in organic solvents. The method was equally successful with virus purified by ultracentrifugation, whereas normal allantoic fluid yielded a hardly visible precipitate and no agglutinin.

The apparent yield of the procedure was in general much higher than would have been expected from the original, suggesting that red cells were much more susceptible to the agglutinin in finely dispersed suspension than to the same substance attached to particles (whether virus or ground seeds), so that the actual percentage of hemagglutinin removed remained unknown. Both bean and virus purified hemagglutinins proved extremely sensitive to traces of normal serum. Normal, as well as group A immune ferret serum, in dilution of 1:20,000, still caused appreciable inhibition of group A virus extracted hemagglutinin.

The purified hemagglutinins could be removed from solution by adsorption on red cells, but the amount of red cells needed was considerably larger than that required for the adsorption of virus under the same conditions. Red cells from which virus had been eluted, and which had become, as shown by HIRST, unable to adsorb virus, gave only suggestive evidence of being less able to adsorb a small amount of extract. Cells agglutinated by an excess of virus extract could be returned to their native state simply by heating to 45°C for a few minutes.

These facts show that the hemagglutinins of *Papilionaceæ* and of influenza virus are not proteins, and suggest that the two substances are of similar nature. According to BURNET and collaborators<sup>1</sup> the hemagglutinins of vaccinia and of ectromelia virus are phospholipidic complexes.

J. BOURDILLON

From the Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany, November 30, 1948.

## Résumé

On a obtenu l'hémagglutinine des semences de papilionacées et celle du virus de l'influenza en solution dans les solvants organiques, par essentiellement la même méthode d'extraction. Ces deux substances semblent être apparentées.

<sup>1</sup> F. M. BURNET, *Nature* 158, 119 (1946). – F. M. BURNET and W. C. BOAKE, *J. Immunol.* 53, 1 (1946). – F. M. BURNET and J. D. STONE, *Australian J. Exp. Biol.* 24, 1 (1946). – J. D. STONE, *Australian J. Exp. Biol.* 24, 191 (1946); 24, 197 (1946).

<sup>1</sup> K. LANDSTEINER and H. RAUBITSCHKE, *Centralbl. Bakt. Orig.* 45, 660 (1908). – O. WIENHAUS, *Biochem. Z.* 18, 228 (1909). – E. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* 11, 47 (1912). – M. EISLER and L. PORTHEIM, *Z. Immunitäts.* 47, 59 (1926). – K. LANDSTEINER, *The specificity of serological reactions*, rev. ed. (Cambridge, Harvard University Press, 1945), p. 5.

<sup>2</sup> G. K. HIRST, *Science* 94, 22 (1941); *idem.* *J. Exp. Med.* 75, 49 (1942). – L. MCCLELLAND and R. HARE, *Canad. Pub. Health J.* 32, 530 (1941). – G. K. HIRST, *J. Exp. Med.* 76, 195 (1942).

<sup>3</sup> J. E. SALK, *J. Immunol.* 49, 87 (1944).

## Un nuovo metodo specifico di determinazione della attività antianemico pernicioso

L'unica prova specifica e decisiva dell'azione anti-perniciosa di una sostanza è data dalla sua capacità di avviare l'emopoiesi megaloblastica verso la normoblastosi; manca però sino ad oggi un metodo fondato su tale capacità; che dia perciò garanzie di specificità, se si escludono le prove sull'ammalato di anemia pernicioso.