

Table II

Exposure time	Conditions	P/O ratio	Atom percent N_2^{15} excess
15 min	Substrate: 20 μ moles α -ketoglutarate. Dialyzed extract. Acceptor system: 5 μ moles glucose + 3 mg hexokinase + 2.5 μ moles ADP	0.45—0.50	0.020—0.028
20 min	Similar conditions. Mannose substituted for glucose in the acceptor system	0.38—0.48	0.021—0.031
20 min	Similar conditions. Undialyzed extract substituted for dialyzed extract	0.47—0.55	0.030—0.031

Each flask contained 1.0 ml extract (15 mg protein), 20 μ moles substrate, 12 μ moles phosphate, 30 μ moles NaF, 15 μ moles $MgCl_2$. Gas phase: 10% N_2^{15} (32 atom excess), 20% O_2 , 70% He. Other conditions were described in Table I.

The data in Table I show the effect of substrate on oxidative phosphorylation. The P/O ratios obtained with succinate and fumarate as substrates agree with those obtained by HARTMAN, BRODIE, and GRAY³. Although the P/O ratios with α -ketoglutarate were consistently higher than with these two substrates, they never reached the values reported by these authors. Experiments with dialyzed and undialyzed extracts gave approximately the same P/O values. However, undialyzed extracts did show a small phosphate uptake in the absence of added acceptor. The replacement of mannose by glucose in the acceptor system did not alter the P/O ratio.

The atom percent N_2^{15} excess data presented in Table II, indicate a small but significant incorporation of N_2^{15} . Substitution of other substrates for α -ketoglutarate had no effect in the amount of N_2^{15} incorporated. Although all extracts studied consistently showed a P/O ratio in the ranges indicated for the various systems, not all extracts incorporated N_2^{15} .

We conclude that previous attempts to obtain consistent fixation of N_2^{15} by cell free extracts of the azotobacter (see, for example, MAGEE and BURRIS⁴) did not arise from lack of oxidative phosphorylation.

Supported in part by grant E-1417 from the National Institutes of Health, Public Health Service.

A. TEMPERLI and P. W. WILSON

Department of Bacteriology, University of Wisconsin
Madison, Wisc., (U.S.A.), May 15, 1958.

Zusammenfassung

Zellfreie Extrakte von *Azotobacter vinelandii* O wurden auf ihr Vermögen zur oxydativen Phosphorylierung und Stickstofffixierung untersucht. Obwohl alle Präparate die Fähigkeit zur oxydativen Phosphorylierung besaßen und einige davon in der Lage waren Stickstoff zu fixieren, konnte zwischen den beiden Vorgängen – unter den geschilderten experimentellen Bedingungen – keine Abhängigkeit gefunden werden.

⁴ W. E. MAGEE and R. H. BURRIS, J. Bact. 71, 635 (1956).

Eintritt und Mechanismus phagenhemmender Wirkungen

Verschiedene, von uns¹ aufgefundene, phagenhemmende Stoffe besitzen Wirkungen gegenüber T_1 Phagen und nicht gegenüber den anderen Coliphagen, andere zeigen

¹ L. NEIPP, W. KUNZ und R. MEIER, Exper. 13, 74 (1957).

eine Wirksamkeit gegen $T_1, 3, 5$ und 7 , nicht auf die $T_2, 4, 6$ Phagen. Es schien zur Aufklärung dieser Wirkungsspezifität erwünscht, die Wirkungsbedingungen solcher Substanztypen genauer abzuklären. Es wurde zunächst die zeitliche Relation des Wirkungseintrittes zu Phagen- und Bakterienentwicklung untersucht.

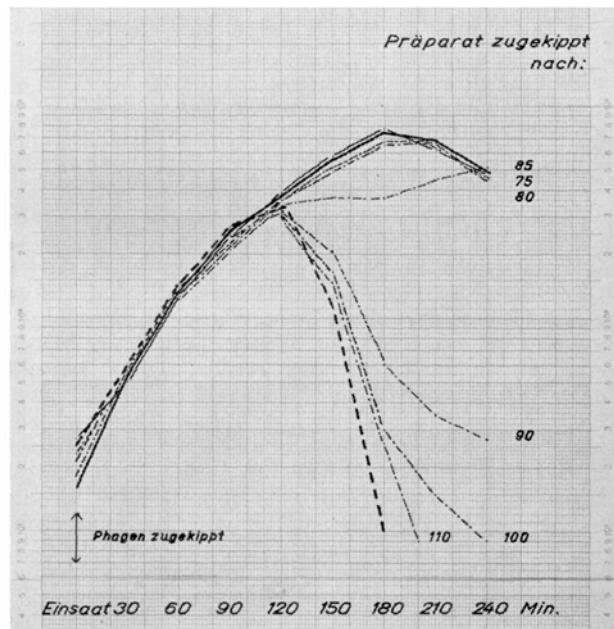


Abb. 1. 15858/E + *Coli* 207 1:60 + Phagen 10⁸ in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:5000).

Bakterien-Kontrolle
Phagen-Kontrolle
Präparaten-Kontrolle
Bakterien + Phagen + Präparat

Mit Hilfe der von uns angewandten Methode der Atmungsmessung nach WARBURG ist diese Untersuchung leicht und sicher durchzuführen.

Methodik. Im Hauptaum des Warburggefäßes befindet sich die Bakterienkultur in Difco Bouillon 6%; im 1. Anhang die Phagensuspension. Ein zweiter Anhang dient zur Aufnahme der Wirksubstanz. Das Mittelstück des Warburggefäßes wird zur Neutralisation des entstehenden CO_2 mit KOH-Lösung beschickt. Warburggefäß und Manometer werden mit O_2 durchlüftet und bei 37° C im Warburgapparat eingehängt. Nach erfolgtem Temperaturausgleich und Erreichen des gewünschten Bakterienwachstums (Einsaat), werden die Phagen und danach, in bestimmten Intervallen, die Wirksubstanz zugekippt. Als Testorganismen wählten wir:

1. *Esch. coli* 207 mit entsprechenden Phagen;
2. *Esch. coli* Delbrück mit der T-Reihe.

Ergebnisse. Es wurde mit dieser Methode eine grosse Zahl von Stoffen untersucht. Über das typische Ergebnis mit einem Präparat Nr. 15858 E wird berichtet. Es zeigt

im Reagenzglas folgendes Wirkungsspektrum gegenüber den verschiedenen Phagen (siehe Tab. I).

Wie bereits beschrieben¹ ist die Differenz der Empfindlichkeit zwischen diesen verschiedenen Phagen deutlich. Am empfindlichsten ist T₁ und am resistentesten sind

Tabelle I

<i>Esch. coli</i> 207		<i>Esch. coli</i> Delbrück							
Bakterien	Phagen	Bakterien	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
3,3	5,1	3,9	5,8	0	5,1	0	5,1	0	4,8

Werte: Wirksame Konzentration in -log ausgedrückt.

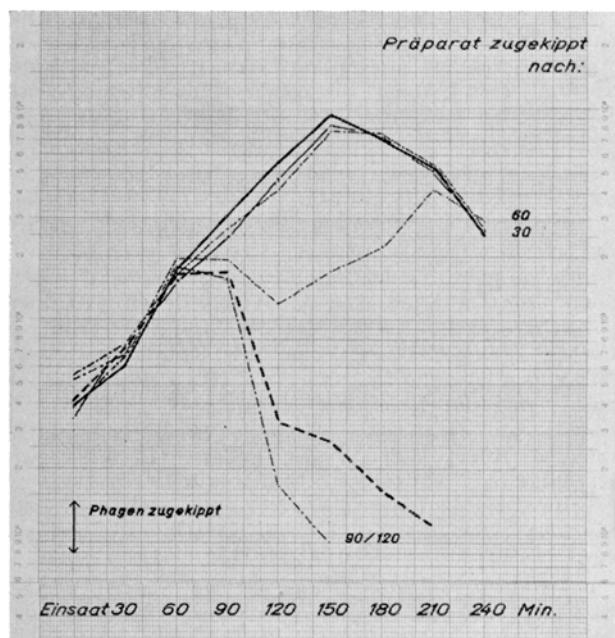


Abb. 2. 15858/E + *Coli* Delbrück 1:40 + T¹ Phagen 10⁶ in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:30000).

Bakterien-Kontrolle
Phagen-Kontrolle
Präparaten-Kontrolle
Bakterien + Phagen + Präparat

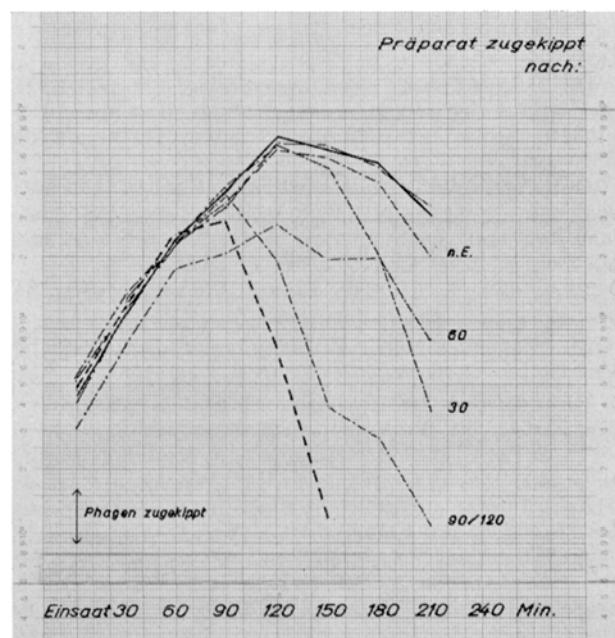


Abb. 3. 15858/E + *Coli* Delbrück 1:40 + T⁵ Phagen 10⁸ in Difco Bouillon 6% (Präparat Konzentration 1:30000).

Bakterien-Kontrolle
Phagen-Kontrolle
Präparaten-Kontrolle
Bakterien + Phagen + Präparat

Tabelle II

Phagenentwicklung ohne bzw. unter Einwirkung von Präparat 15858 E (Werte: Anzahl Phagen pro cm³/Kultur).

Versuchsdauer	Phagenentwicklung ohne Präparat-Einwirkung		Präparat 15858 nach Erreichung der «Einsaat» zugekippt		Präparat 15858 E 1 h nach der Einsaat zugekippt	
	Gesamte Phagen	Freie Phagen	Gesamte Phagen	Freie Phagen	Gesamte Phagen	Freie Phagen
Einsaat	2,8 × 10 ³	4,0 × 10 ²	5,7 × 10 ³	3,4 × 10 ³	5,7 × 10 ³	2,0 × 10 ²
1/2 Stunden	1,6 × 10 ⁶	1,4 × 10 ⁶	0,5 × 10 ³	0,1 × 10 ³	—	—
1 Stunde	3,9 × 10 ⁸	1,1 × 10 ⁸	3,5 × 10 ³	0,5 × 10 ³	9,8 × 10 ⁸	4,3 × 10 ⁶
1 1/2 Stunden	1,1 × 10 ¹¹	6,4 × 10 ¹⁰	0,5 × 10 ³	0,5 × 10 ³	1,2 × 10 ⁹	2,8 × 10 ⁷
2 Stunden	1,9 × 10 ¹¹	6,1 × 10 ¹⁰	0,3 × 10 ³	0,4 × 10 ³	4,1 × 10 ⁸	7,3 × 10 ⁴
2 1/2 Stunden	—	—	—	—	4,3 × 10 ⁸	7,4 × 10 ⁴

T_2 , T_4 , T_6 , 207, T_3 und T_5 sind gleich empfindlich, nur T_7 besitzt eine «intermediäre» Stellung zwischen der geraden und ungeraden Reihe.

Zunächst war notwendig festzustellen, ob der untersuchte Stoff eine direkte phagozide Wirkung besitzt. Zu diesem Zwecke wurden die Phagensuspensionen zu verschiedener Konzentration derselben, die oberhalb der bakteriziden Wirkung liegt, zugesetzt und bis zu 24 h inkubiert. Die Phagen blieben nach dieser Einwirkungszeit virulent. Eine einfache phagozide Wirkung als Ursache des Effektes kann somit ausgeschlossen werden.

Die Befunde über den Wirkungseintritt ergeben sich aus den anliegenden Kurven. Bei der Versuchsanordnung tritt Bakteriolyse ohne Hemmstoff nach $1\frac{1}{2}$ bis 2 h ein. Volle Schutzwirkung gegenüber der Phagenwirkung tritt nach Zusatz der Hemmstoffe noch dann ein, wenn der Zusatz 30 min vor der Lyse erfolgt. Es ist möglich, dass in gewissen Konzentrationen auch noch geringere Intervalle des Zusatzes vor der definitiven Lyse wirksam sind. Die Wirkung tritt somit bis zu einem ganz bestimmten Entwicklungspunkt der Phagen, beziehungsweise der Bakterien ein.

Die Bestimmungen der Phagenmenge (siehe Tab. II) im Verlauf der Hemmversuche ergab, dass die untersuchten Stoffe bei unbeeinträchtigtem Wachstum der Bakterien eine Vermehrung der Phagen verhindern. Die Hemmung der Phagenentwicklung ist sofort oder mindestens nach einer Einwirkungszeit von ungefähr 30 min manifest. Kurz nach der Zugabe der Wirksubstanz kann noch ein leichtes Ansteigen des Phagentitors festgestellt werden; danach bleibt die Gesamt-Phagenmenge statio-när. Meist tritt ein Rückgang der freien Phagen auf.

Die phagenhemmende Wirkung beruht daher auf einer Entwicklungshemmung der Phagen.

Verhinderung der Lyse tritt solange ein, als die Zahl der Phagen die für komplette Lyse notwendige Menge nicht erreicht. Die relative Abnahme der freien Phagen gegenüber den gesamten kann dafür sprechen, dass die Phagen in einer unwirksamen Form am Bakterium adsorbiert werden und dadurch ihre Vermehrung ausbleibt, oder dass keine wirksamen freien Phagen gebildet und abgegeben werden. Da die Phagen selbst offenbar nicht beeinflusst werden, können die Stoffe spezifisch auf einen Mechanismus der Bakterien wirken, der für die Phagenentwicklung massgebend ist. Die früher geäusserte Auf-fassung über den Wirkungsmechanismus der untersuchten Stoffe wird durch diese Befunde bestätigt; über analoge Befunde mit weiteren Stoffen wird später berichtet werden.

Für überaus sorgfältige Durchführung der Versuche sind wir Fr. M. TRITSCHLER zu grossem Dank verpflichtet.

R. MEIER, L. NEIPP und W. KUNZ

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, 28. Juli 1958.

Summary

The described antiphage substance: bis-[[4-[4-(3-diethylamino-propylamino)-6-methyl-2-pyrimidyl-amino]-phenyl]-sulphone tetrahydrochloride tetrahydrate produces its effect not through a direct phagocytic action but indirectly through an inhibition of the phage production. The effect is complete during the whole logarithmic growth phase as long as the phage concentration is kept under the limit, critical for bacteriolytic.

Ähnlichkeit und Unterschied Leukozytenemigrationsfördernder Wirkung gram-positiver und gram-negativer Bakterien

Polysaccharide aus gram-negativen Bakterien und ihren Kulturfiltraten besitzen auf Leukozyten zwei Wirkungen:

1. Bei gleichmässiger Verteilung im Milieu, zirkuläre Auswanderungsförderung.

2. Bei exzentrischer Anbringung des Polysaccharids eine gerichtete Auswanderung der Leukozyten.

Auf Grund unserer Befunde ist anzunehmen, dass beide Reaktionen auf dem gleichen Wirkungsmechanismus beruhen¹. Aus gram-positiven Bakterien isolierte Polysaccharide wurden bisher unwirksam gefunden², nur bestimmte Filtrate von «Plasma»-Kulturen zeigen chemotaktische Wirkung³.

Gram-negative und gram-positive *lebende* Bakterien, exzentrisch zu Leukozyten angebracht, bewirken, wie die Polysaccharide gram-negativer Bakterien, eine gerichtete Auswanderung⁴. Es wurde bisher nicht untersucht, ob mit lebenden Bakterien eine zirkuläre Auswanderungsförderung der Leukozyten erreicht werden kann.

Die Feststellung scheint aber von besonderer Wichtigkeit, ob die Wirkung gram-negativer lebender Bakterien mit derjenigen ihrer Polysaccharide völlig identisch ist, und ob diese mit derjenigen lebender gram-positiver Keime in jeder Beziehung übereinstimmt. Um diesen Nachweis zu erhalten, sind die verschiedenen genannten Versuchsvarianten für gram-positive und gram-negative, lebende Keime durchzuführen. Zur Untersuchung von Wirkungen lebender Bakterien auf Zellen ist die Einhaltung genau ausgearbeiteter Versuchsbedingungen notwendig, um spezifische Wirkungen von «Nährboden-konkurrenzphänomenen» von anderen Effekten, wie pH-Änderung, Fibrinolyse, Toxinproduktion usw. zu trennen. Es muss ferner ausgeschlossen werden, dass wirksames Nährbodenmaterial mit den Bakterien eingeschleppt wird⁵.

Folgende Versuchsanordnung hat sich als geeignet erwiesen: 24 h alte Ei-Bouillon (gram-positive Keime) oder Glucose-Bouillon (*Proteus vulg. OX₁₉*) Kulturen werden zentrifugiert, die Nährmedien abgehebert und die Bakterien in der gleichen Menge Tyrodelösung aufgenommen. Diese Bakterienaufschwemmung wurde als Ausgangslösung für die Überschichtungsversuche benutzt. Bei Züchtung der Keime auf synthetischen Nährböden wurde die 24 h alte Kultur direkt als Ausgangslösung verwendet. Von diesen Ausgangslösungen wurden Tyrodeverdünnungen hergestellt. Verwendete Keime: *Proteus vulg. OX₁₉*, *Enterococc. faecalis* 51, *Staph. haemolyticus* b3, *Streptococc. pyogenes* 36.

Die Versuchsergebnisse sind für *Proteus vulg. OX₁₉* und *Streptococc. pyogenes* 36 in der Tabelle zusammengestellt. Die beiden andern angegebenen gram-positiven Keime verhalten sich ähnlich wie *Streptococc. pyogenes*.

Das Resultat der Versuche ist eindeutig. Es ergibt sich mit lebenden gram-negativen Bakterien in dieser Anord-

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Naunyn-Schmiedeberg Arch. 234, 102 (1958).

² R. MEIER und B. SCHÄR, Hoppe-Seyl. Z. 307, 103 (1957).

³ R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134/E (1941).

⁴ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9 (3), 93 (1953). - B. SCHÄR, F. W. KAHNT und G. HUBER, Helv. physiol. Acta 15 (1), 116 (1957). - R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. Pharmak. 224 (2), 104 (1955).

⁵ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 13, 492 (1957).