

2. Im System $\text{Cu}(\text{OH})\text{Cl} - \text{Ni}(\text{OH})\text{Cl}$ treten nur zwei Krystallarten auf:

a) $\text{Cu}(\text{OH})\text{Cl}$, in dem ca. 15 Atomprozent der Kupfer- durch Nickelionen ersetzbar sind,

b) $\text{Ni}(\text{OH})\text{Cl}$, in dem ca. 10 Atomprozent der Nickel- durch Kupferionen ersetzbar sind.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden ermöglicht durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes*.

Bern, Institut für anorg., analyt. und physikal. Chemie.

221. Über die Wirkung eines mit radioaktivem ^{35}S indizierten 2-(p-Aminophenyl)-thiazols auf Kulturen von Tuberkelbazillen III

von H. Erlenmeyer, H. Noll und E. Sorkin.

(20. VI. 49.)

Wir haben in einer vorangegangenen Mitteilung¹⁾ über Versuche, in denen 2-(p-Aminophenyl)-thiazol (APT) auf Kulturen von BCG in Gegenwart von Serum zur Einwirkung kam, berichtet. Wie wir fanden, wird bei einer Versuchsdauer von 16 Tagen bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol. APT/l und in Gegenwart von 10% Serum in der Nährlösung von den Bakterien eine $0,035 \gamma \pm 20\%$ APT/mg Bakterien Trockengewicht entsprechende Menge von ^{35}S aufgenommen. Mit dieser Aufnahme ist jedoch keine Hemmung des in Form einer Tiefenkultur erfolgten Wachstums der Bakterien verbunden.

Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, als bei Oberflächen-Kulturen in Nährlösungen ohne Zusatz von Serum bereits mit einer Aufnahme von einer ca. 7mal kleineren Menge von radioaktivem Schwefel — d. i. entsprechend $0,005 \gamma$ APT/mg Bakterien Trockengewicht — eine wachstumshemmende Wirkung verbunden ist.

Wir berichten im folgenden über eine Reihe von weiteren Versuchen, die unternommen wurden, um die Verhältnisse bei dieser Wechselwirkung zwischen APT und Bakterien näher zu analysieren.

I. Oberflächen-Kulturen in serumhaltiger Nährlösung.

Inokuliert man Nährlösungen, die 10% Serum enthalten, mit Tuberkelbazillen derart, dass kleine Stücke einer Kultur vorsichtig auf die Oberfläche gesetzt werden, so wächst ein solches Inokulum

¹⁾ 1. Mitteilung siehe H. Noll, E. Sorkin und H. Erlenmeyer, *Helv.* **32**, 609 (1949) und 2. Mitteilung siehe H. Erlenmeyer, H. Meyer, H. Noll und E. Sorkin, *Helv.* **32**, 1209 (1949). Über experimentelle Einzelheiten siehe Diss. H. Noll, Basel 1949.

und es gelingt, Oberflächenkulturen zu erhalten, die sich normal in Form einer zusammenhängenden Haut entwickeln. Impft man nun auf diese Weise eine Nährlösung, die 10% Serum und noch weiterhin APT in einer Konzentration von 10^{-5} oder mehr Mol. im Liter enthält, so erweist sich für ein auf die Oberfläche gesetztes Inokulum APT trotz der Gegenwart von Serum als wachstumshemmender Faktor. Es gilt demnach, dass APT in Gegenwart von Serum Oberflächenkulturen hemmt, während, wie erwähnt, die Tiefenkulturen durch die gleichen Mengen APT im Wachstum nicht beeinflusst werden.

II. Vergleich von Oberflächen-Kulturen in serumhaltiger Nährlösung und von Tiefen-Kulturen in serumhaltiger Nährlösung.

Da man die individuellen Stoffwechselbedingungen für die Bakterien, soweit sie von der Nährlösung abhängen, bei den „Oberflächen“- und bei den „Tiefen“-Versuchen in identischem Milieu als gleichartig zu betrachten hat, so muss das verschiedenartige Verhalten der Bakterien in diesen beiden Kulturformen gegenüber APT als besonders charakteristisch hervorgehoben werden.

Besonders deutlich wird dieser Unterschied, wenn man die Menge des ^{35}S , die von den an der Oberfläche ruhenden Bakterien in einer Serum- und APT-haltigen Nährlösung aufgenommen wird, ermittelt und mit den für gewachsene Bakterien aus Tiefenkulturen gefundenen Werten vergleicht. Es zeigt sich zwischen den Bakterien — bezogen auf mg Trockengewicht — aus den Oberflächenkulturen und den Tiefenkulturen ein ausgeprägter Unterschied, wie aus der folgenden Gegenüberstellung hervorgeht.

Tabelle 1.

Nährlösung	<i>Sauton</i> +10% S.	<i>Sauton</i> +10% S.	<i>Lockemann</i> +10% S.	<i>Lockemann</i> +10% S.
APT	10^{-4} Mol./l	10^{-4} Mol./l	10^{-4} Mol./l	10^{-4} Mol./l
Kultur	Tiefe	Oberfläche	Tiefe	Oberfläche
Versuchsdauer	40 Tage	38 Tage	16 Tage	24 Tage
Wachstum	+	-	+	-
Aktivität der isolierten Bakterien.	0,167 γ APT	0,875 γ APT	0,035 γ APT	0,323 γ APT
Genauigkeit	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$

Die Deutung der mit diesen Versuchen ermittelten Unterschiede zwischen den an der Oberfläche und den in der Tiefe im gleichen Kulturmilieu sich befindenden Bakterien in bezug auf die Bindung von aktivem Schwefel pro mg Bakterien Trockengewicht ist nicht einfach zu geben. Es ist denkbar, dass dieser Unterschied in einer Verschiedenheit der Bakterien zu suchen ist.

Tabelle 2.

Nr.	Verbindung	Formel
1	5-(p-Aminophenyl)-thiazol.	
2	p-Aminodiphenyl.	
3	2-(p-Aminophenyl)-thiazol.	
4	3-(p-Aminophenyl)-pyridin	
5	4-(p-Aminophenyl)-thiazol.	
6	p-Phenetidin	
7	p-Aminodiphenylmethan	
8	β -Naphthylamin	
9	2-(p-Aminophenyl)-penten-(1) ¹	
10	5-Aminocumaron.	
11	p-Toluidin.	
12	2-(p-Aminophenyl)-propen ¹	
13	p-Aminodiphenyl-carbinol-methyl- äther	
14	4,4'-Diaminodiphenyl-sulfon.	
15	p-Aminobenzamidin ¹).	

¹) Über diese Verbindungen wird in einer folgenden Mitteilung näher berichtet.

Im Zusammenhang mit dieser Diskussion seien noch einige experimentelle Befunde angeführt, die zugunsten einer solchen Auffassung angeführt werden können.

Vergleicht man von einer grösseren Zahl von solchen $\text{NH}_2 \cdot \text{R}$ -Verbindungen, deren wachstumshemmende Wirkung durch das Serum vermindert wird, die für eine totale Wachstumshemmung notwendigen Konzentrationen, und zwar: die in Oberflächenkulturen ohne Serumzusatz (*Lockemann*) ermittelten mit den in Tiefenkulturen in serumhaltigen Nährlösungen (*Kirchner*) ermittelten Werten¹⁾, so fällt auf, dass die Konzentrationswerte bei den Oberflächenkulturen ohne Serum sehr stark streuen, während die Tiefenkulturen in Gegenwart von Serum alle gleich sind²⁾.

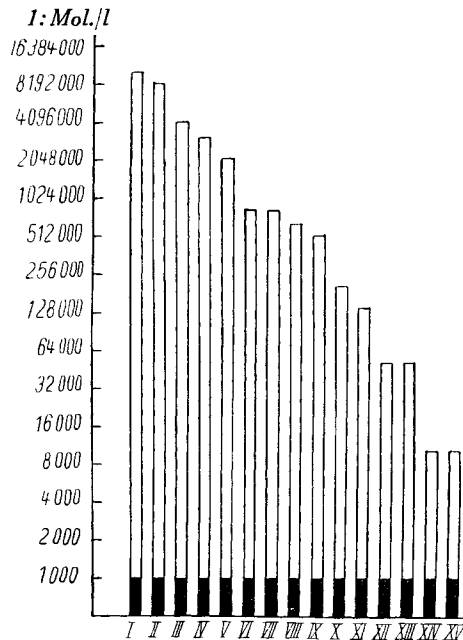
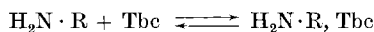


Fig. 1.

□ Totale Hemmung in *Lockemann*-Oberflächenkultur
 ■ Totale Hemmung in *Kirchner*-Tiefenkultur

Bringt man die Streuungen in den Oberflächenkulturen mit der verschiedenen Lage der Gleichgewichte



¹⁾ *E. Suter, H. Erlenmeyer, E. Sorkin und H. Bloch, Schw. Z. Path. und Bakt. 11, 193 (1948); H. Erlenmeyer, C. Becker, E. Sorkin, H. Bloch und E. Suter, Helv. 30, 2058 (1947).*

²⁾ Über eine Gruppe von Verbindungen, die auch bei Tiefenkulturen in Serumgegenwart Streuungen zeigt, soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

— die durch die Unterschiede in den chemischen Strukturen bedingt sind — in Zusammenhang, so würde andererseits die Gleichförmigkeit der mit Tiefenkulturen in Gegenwart von Serum ermittelten Werte dafür sprechen, dass hier keine Gleichgewichte dieser Art mehr wirksam sind, dass hier also möglicherweise die für die spez. Bindung der $H_2N \cdot R$ -Gruppe in den Bakterien notwendigen Haftstellen — die in den Bakterien der Oberflächenkulturen vorhanden sind — fehlen.

III. Vergleich von Oberflächenkulturen auf Nährlösungen ohne Serumzusatz mit Oberflächenkulturen auf Nährlösungen mit Serumzusatz.

Für das Verständnis der Eigenart der vorstehenden zum Vergleich mit Tiefenkulturen verwendeten Oberflächenkulturen auf Nährlösungen mit Serumzusatz war es wichtig, diesen Typus von Oberflächenkultur seinerseits mit Oberflächenkulturen auf Nährlösungen ohne Serumzusatz zu vergleichen. Die folgenden Versuche mit radioaktivem APT geben über die Ähnlichkeit dieser beiden Typen von Oberflächenkulturen Aufschluss.

Tabelle 3.

Nährlösung	<i>Sauton</i> ohne Serum	<i>Sauton</i> + 10% Serum
APT	10^{-4} Mol./l	10^{-4} Mol./l
Kultur	Oberfläche	Oberfläche
Versuchsdauer	34 Tage	38 Tage
Wachstum	—	—
Aktivität der isolierten Bakterien	0,773 γ APT	0,875 γ APT
Genauigkeit	$\pm 3\%$	$\pm 3\%$

Die Ergebnisse zeigen, dass in bezug auf die Aufnahme von aktivem Schwefel die beiden Oberflächenkulturen als annähernd gleichwertig zu betrachten sind. Bei beiden Typen erfolgt eine Bindung des Schwefels, trotzdem das vorhandene APT ein Wachstum verhindert.

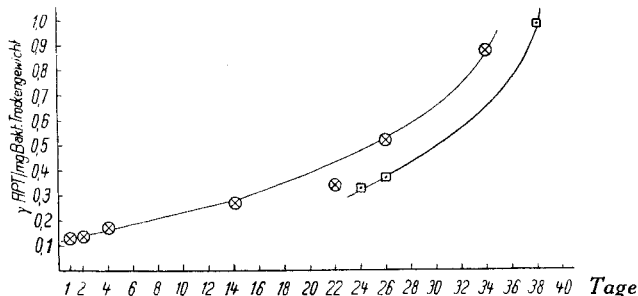


Fig. 2.

Oberflächenkulturen.

⊗ *Sauton* ohne Serum. ◻ *Sauton* mit Serum.

Die bei solchen Versuchen aufgenommene Menge von ^{35}S hängt von der Versuchsdauer ab. Die Bakterien in Oberflächenkulturen aus den beiden Typen von Nährlösungen verhalten sich hierbei, wie aus Figur 2 zu entnehmen ist, sehr ähnlich.

Diese vergleichenden Versuche sind weiterhin ein Beleg für die Annahme, dass die Aufhebung der hemmenden Wirkung des APT durch Serum bei Tiefenkulturen nicht durch eine Bindung des APT an das Serum erklärt werden kann, da erstens bei einer Oberflächenkultur der gleichen Nährlösung das Serum diese Wirkung nicht entfaltet und, da zweitens durch die Aufnahme vergleichbarer Mengen von aktivem Schwefel auch aus der serumhaltigen Nährlösung das Vorhandensein von wirksamem APT in Gegenwart von Serum belegt ist.

IV. Auswaschversuche mit isolierten Bakterien aus Oberflächenkulturen in Nährlösungen mit und ohne Zusatz von Serum.

Um zu erfahren, ob der ermittelten quantitativen Übereinstimmung von Oberflächenkulturen auf Nährlösungen ohne und mit Serumzusatz in bezug auf die Aufnahme von aktivem Schwefel auch eine qualitative chemische Gleichwertigkeit des gebundenen Schwefels entspricht, haben wir Versuche zur Charakterisierung der ^{35}S enthaltenden Verbindungen unternommen.

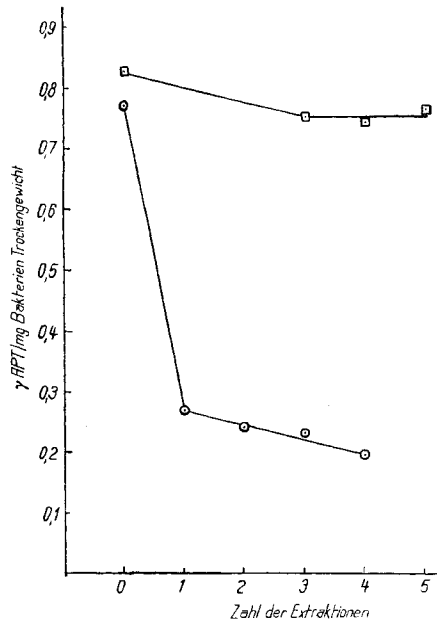


Fig. 3.

Oberflächenkulturen.

○ BCG in Sauton ohne Serum. □ Smegmabazillen.

Zu diesem Zwecke wurden die aus solchen Kulturen mit der früher beschriebenen Arbeitsweise isolierten Bakterien einer Extraktion unterworfen. Während beim Waschen mit Wasser die Aktivität der Bakterien nur langsam abnimmt, konnte durch Extraktion mit Alkohol ein schnellerer Aktivitätsabfall erzielt werden. Es zeigte sich aber bemerkenswerterweise bei diesen Versuchen, dass nur ein Teil des Schwefels, ca. 60—80%, in einer extrahierbaren Form gebunden ist, während ein anderer Teil derart gebunden ist, dass er durch Alkohol nicht auswaschbar ist. Es stellt sich demnach bei solchen Versuchen nach wiederholten Waschungen mit Alkohol eine praktisch konstante, nicht weiter reduzierbare Aktivität ein. Aus Figur 3 ist zu entnehmen, in welcher Weise die Aktivität solcher Bakterien bei einer Folge von Waschversuchen absinkt und sich eine praktisch konstante Restaktivität einstellt.

Führt man einerseits mit Bakterien aus Oberflächenkulturen in Nährlösungen ohne Serumzusatz und andererseits mit Bakterien aus Oberflächenkulturen in Nährlösungen mit Serumzusatz solche Extraktionsversuche durch, so zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Bakterien aus den beiden Typen von Oberflächenkulturen.

Tabelle 4.

Nährlösung	<i>Sauton</i> + 10% Serum	<i>Sauton</i> ohne Serum
APT	10 ⁻⁴ Mol./l	10 ⁻⁴ Mol./l
Kultur	Oberfläche	Oberfläche
Versuchsdauer	38 Tage	34 Tage
Wachstum	—	—
Aktivität der isolierten Bakterien.	0,875 γ APT	0,773 γ APT
Restaktivität	0,326 γ APT	0,269 γ APT
entsprechend	38%	35%
Genauigkeit	\pm 3%	\pm 3%

V. Abhängigkeit der Restaktivität von der Versuchszeit.

In Reihenversuchen mit verschieden langer Versuchsdauer konnte gezeigt werden, dass der Wert der bei solchen Waschversuchen mit Alkohol sich einstellenden konstanten Restaktivität mit der Einwirkungsdauer des APT sich ändert. (4 Kulturen nach 4 Zeiten.)

Über das Verhalten von wachsenden Smegma-Oberflächenkulturen gegenüber radioaktivem APT.

Die bisher beschriebenen Versuche haben die Verschiedenheit von Tuberkelbazillen an der Oberfläche und in der Tiefe in serumhaltigen Nährlösungen belegt. Für die Deutung dieser Versuche war es erwünscht, noch weiteres Vergleichsmaterial zu erhalten. Wir haben daher noch einige Experimente mit Smegma-Kulturen durchgeführt.

Tabelle 5.

Nährlösung	<i>Sauton</i> ohne Serum			
APT	10 ⁻⁴ Mol./l			
Kultur	Oberfläche			
Versuchsdauer Tage	1	2	4	14
Wachstum	—	—	—	—
Aktivität der isolierten Bakterien	0,133	0,146	0,176	0,267 γ APT
Restaktivität	0,018	0,017	0,030	0,054 γ APT
entsprechend	14%	12%	17%	20%
Genauigkeit	\pm 3%			

Mit Smegmabazillen erhält man in serumfreien Nährlösungen Kulturen, die die Eigenschaft haben, dass sie erstens an der Oberfläche wachsen, und dass sie zweitens durch APT in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden.

Die wachsenden Smegma-Oberflächenkulturen nehmen nun in Gegenwart von radioaktivem APT gleichfalls erhebliche Mengen von ³⁵S auf. Bei Waschversuchen mit Alkohol zeigt sich aber, dass von dieser Aktivität durch Alkohol nur ca. 10% extrahiert werden können, während 80—90% in einer Form gebunden sind, die mit Alkohol nicht herauszulösen ist.

Tabelle 6.

Nährlösung	<i>Sauton</i> ohne Serum	<i>Sauton</i> ohne Serum
APT	10 ⁻⁴ Mol./l	10 ⁻⁴ Mol./l
Kultur	Oberfläche	Oberfläche
Versuchsdauer	6 Tage	5 Tage
Wachstum	+	+
Aktivität der isolierten Bakterien	0,827 γ APT	0,522 γ APT
Restaktivität	0,75 γ APT	0,41 γ APT
entsprechend	91%	79%
Genauigkeit	\pm 3%	\pm 3%

Vergleicht man die hier gefundenen Werte mit den Werten, die bei Oberflächenkulturen und Tiefenkulturen von Tbc erhalten wurden (siehe Tab. 7 und 8), so gewinnt man den Eindruck, dass die durch

Tabelle 7.

Bakterien	Smegma	BCG	BCG	BCG	BCG
Nährlösung	<i>Sauton</i> ohne Serum		o. Se.	mit Se.	mit Se.
APT	10 ⁻⁴ Mol./l		10 ⁻⁴ Mol./l		
Kultur	Oberfl.	Oberfl.	Oberfl.	Oberfl.	Tiefe
Wachstum	+	—	—	—	+
Versuchsdauer Tage	5	4	14	24	16
Aktivität der isolierten Bakt. γ APT	0,522	0,176	0,267	0,323	0,035

Tabelle 8.

Bakterien	Smegma	BCG
Nährlösung	<i>Sauton</i> ohne Serum	<i>Sauton</i> ohne Serum
APT	10 ⁻⁴ Mol./l	10 ⁻⁴ Mol./l
Kultur	Oberfläche	Oberfläche
Wachstum	+	—
Versuchsdauer	5 Tage	4 Tage
Aktivität der isolierten Bakterien	0,522 γ APT	0,176 γ APT
Restaktivität	0,41 γ APT	0,03 γ APT
entsprechend	79%	17%

Isotopenversuche zu ermittelnde Aufnahmegeschwindigkeit sowohl als auch die Bindungsform des ³⁵S als charakteristische Merkmale¹⁾ für den Bakterienstoffwechsel angesehen werden können.

Zusammenfassung.

Das Verhalten von *Mycobacterium tuberculosis* gegenüber einem mit ³⁵S indizierten 2-(p-Aminophenyl)-thiazol wird unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Die isolierten Bakterien aus solchen Versuchen werden mit Alkohol gewaschen, um die von den Bakterien aufgenommenen, den ³⁵S enthaltenden Verbindungen zu charakterisieren.

Universität Basel, Anstalt für anorganische Chemie
und Staatliches Seruminstitut Kopenhagen
(Dir. *J. Ørskov*).

222. Komplexe XVII.

Die Diaminocyclohexan-N,N'-Tetraessigsäuren als Komplexbildner für Erdalkalien

von G. Schwarzenbach und H. Ackermann.

(20. VI. 49.)

Im Verlauf der letzten Jahre haben wir zahlreiche Derivate der Imino-diessigsäure hergestellt und ihr Vermögen, mit Erdalkalien Komplexe zu bilden, quantitativ untersucht. Wir konnten dabei keine einzige Substanz finden, die das Komplexbildungsvermögen der Äthylendiamin-tetraessigsäure I erreichte. Es ist nun aber in den Forschungslaboratorien der Firma *J. R. Geigy AG.* — die Mitteilung

¹⁾ Erwähnt sei, dass auch ³⁵S, als Sulfat einer Nährlösung zugefügt, von den Bakterien in einer nicht auswaschbaren Form gebunden wird.