

Zusammenfassung.

Natürliches Argon enthält 0,337 % ^{36}A . Es wird das Dampfdruckverhältnis der Isotope ^{36}A und ^{40}A bei 83,8°K zu 1,006 berechnet und eine Rektifikationsanlage beschrieben, die mit etwa 130 theoretischen Böden für ^{36}A einen totalen Trennfaktor von 1,94 besitzt und täglich 15 l Argon mit $\sim 0,6\%$ ^{36}A zu liefern vermag.

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.

256. Recherches sur la pénicillinase I.

Dosage spectrophotométrique de la pénicillinase

par Pierre Baudet et Emile Cherbuliez.

(13 X 53)

La pénicillinase est une peptidase bactérienne, spécifique d'un genre particulier de liaison peptidique, la liaison β -lactame-thiazolidine de toutes les pénicillines (I). La β -lactame de la desthiopénicilline (II) semble ne pas être hydrolysée par l'enzyme¹). La spécificité enzymatique serait donc liée aussi à la présence du groupement thiazolidinique. Le reste hydrocarbure R influence faiblement la vitesse de la réaction²); la pénicillinase agit même en son absence, puisque la pénicine (If) est hydrolysée par l'enzyme en acide pénicique (formule probable III)³).

Les acides pénicilloïques (IV) résultant de l'action de la pénicillinase ont été identifiés aux acides pénicilloïques produits par l'hydrolyse alcaline des pénicillines. La transformation de la penténylpénicilline (Ib) par la pénicillinase de *Bacillus subtilis* donne naissance à un produit que le chlorure mercurique décompose en pénicillamine (V), 2-penténylpénilloaldéhyde (VI) et anhydride carbonique comme il le fait pour l'acide pénicilloïque naturel⁴) correspondant. — Nous observons que le produit résultant de l'inactivation de la benzylpénicilline (Ia) par la pénicillinase de *Bacillus cereus* consomme le même nombre d'équivalents d'iode (8,3 équivalents à pH 6,8) et possède les mêmes coefficients d'extinction moléculaire dans l'ultra-violet que l'acide benzylpénicilloïque naturel⁴), ce qui prouve une fois de plus que l'hydrolyse alcaline ménagée est identique dans son effet à l'hydrolyse enzymatique.

Pour le dosage de la pénicillinase, on s'est adressé à des méthodes bactériologiques⁵) aussi bien que chimiques. Les méthodes chimiques sont actuellement d'une application aisée puisqu'on dispose facilement de pénicilline pure.

On a utilisé le dosage alcalimétrique⁶) qui suit l'apparition du carboxyle α de l'acide pénicilloïque lors de l'incubation de la pénicilline par l'enzyme.

La transformation de l'acide pénicilloïque en acide pénilloïque (VII) entraîne la libération d'anhydride carbonique dont le volume est mesuré dans l'appareil de Warburg²).

¹) *E. Chain*, Antibiotics, Oxford University Press.

²) *R. J. Henry & R. D. Housewright*, J. Biol. Chem. **167**, 559 (1947).

³) *Kin'ichio Sakaguchi & Sawao Murao*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **23**, 411 (1950).

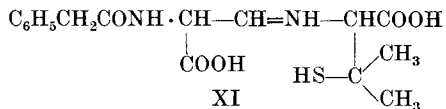
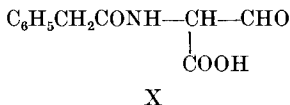
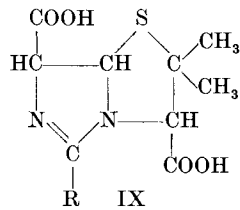
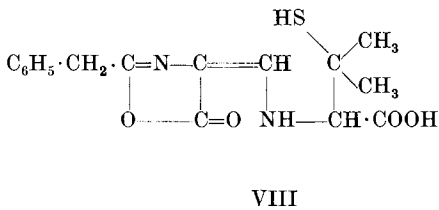
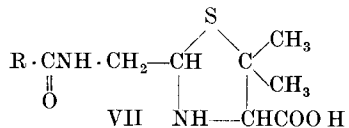
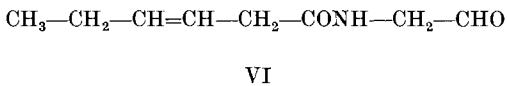
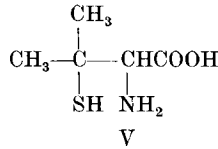
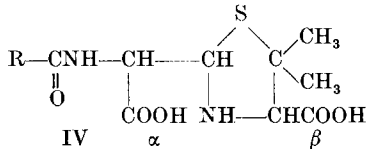
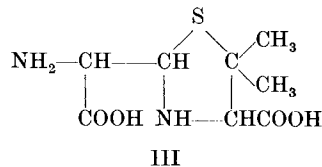
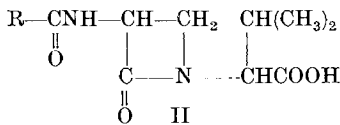
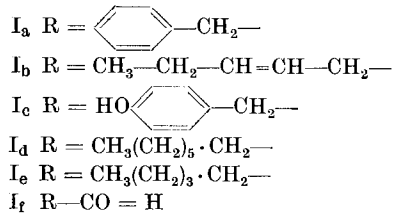
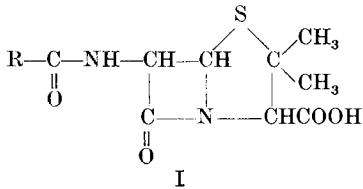
⁴) «Naturel» indique que l'acide pénicilloïque en question est formé par hydrolyse alcaline d'une pénicilline.

⁵) *E. P. Abraham*, The Enzyme **1**, Part 2, Chap. 37, p. 1170.

⁶) *R. Mustagh & G. B. Levy*, Am. Soc. **67**, 1042 (1945).

Péneau, Phillippe & Benoist¹⁾ dosent la pénicillinase en se servant de la différence de consommation d'iode de la benzylpénicilline et de l'acide benzylpénicilloïque. A la fin de l'incubation, une quantité donnée d'iode est introduite dans le mélange, puis, après un temps d'oxydation, la quantité d'iode résiduelle est titrée au thiosulfate.

Levy²⁾ a proposé de suivre l'inactivation enzymatique de la benzylpénicilline par des mesures automatiques (rotogrammes) des changements de l'activité optique dans la solution incubée de pénicilline; ce procédé est précis, mais exige un appareillage compliqué.



Nous proposons de mesurer l'activité de la pénicillinase au moyen des variations intervenant dans les coefficients d'extinction du spectre ultra-violet de la benzylpénicilline sous l'influence de l'enzyme. Ce

1) H. Péneau, J. Phillippe & D. Benoist, *Ann. Pharm. Fr.* **9**, 419 (1951).

2) G. B. Levy, *Anal. Chem.* **23**, 1089 (1951).

procédé est simple, précis et rapide; on mesure directement l'absorption propre des substrats sans traitement préalable.

La benzylpénicilline possède 2 groupements chromogènes dans l'ultra-violet; l'un est caractéristique du reste benzyle et absorbe entre 275 et 245 $m\mu$, l'autre est plus particulièrement propre aux pénicillines; nous l'attribuons au carbonyle β -lactamique¹). Cette bande s'étend de 260 $m\mu$ à 240 $m\mu$ et au-delà de 240 $m\mu$ elle se confond en partie avec une bande de l'acide phénylacétique (fig. 1).

Sous l'action de la pénicillinase, les absorptions de la benzylpénicilline entre 262,5 et 240 $m\mu$ disparaissent progressivement de telle sorte qu'à la fin de la réaction il n'apparaît plus dans cette région que la bande pratiquement pure du groupe benzyle de l'acide benzylpénicilloïque (fig. 1).

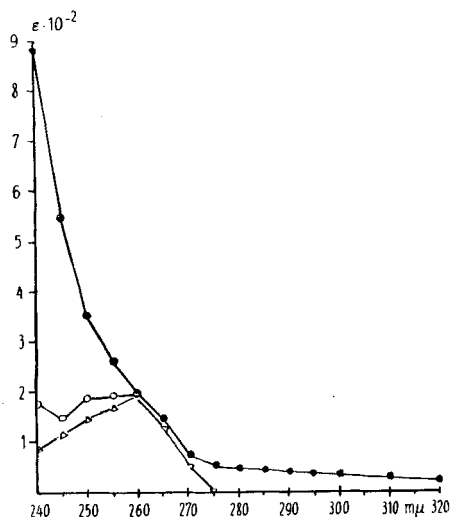


Fig. 1.

Spectre UV du benzylpénicillinate de potassium (●—●), du benzylpénicilloate de potassium (○—○) (obtenu par hydrolyse enzymatique de la pénicilline) et du phénylacétate de potassium (△—△) à 0,05% de concentration, dans le tampon phosphate m/30, à pH 6,8.

Or, à 262,5 $m\mu$, les coefficients d'extinction moléculaire de la benzylpénicilline et de l'acide benzylpénicilloïque sont identiques, de sorte que l'absorption à cette longueur d'onde ne change pas au cours de la transformation de la benzylpénicilline. D'autre part, à 240 et 262,5 $m\mu$ les coefficients d'extinction moléculaire de l'acide D-benzylpénicilloïque sont pratiquement les mêmes si bien que l'absorption à 262,5 $m\mu$ indiqué d'emblée l'absorption qu'atteindra la solution à 240 $m\mu$ après transformation intégrale de la benzylpénicilline. Il s'ensuit que le coefficient d'extinction à 240 $m\mu$, dimi-

¹) A paraître.

nué du coefficient d'extinction à $262,5\text{ m}\mu$, est une mesure directe de la quantité de benzylpénicilline restant en solution (voir fig. 2).

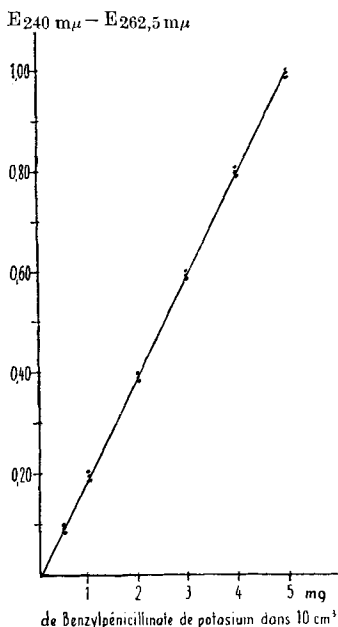


Fig. 2.

Relation entre la concentration de PGK¹⁾ et la différence des coefficients d'extinction à 240 et à $262,5\text{ m}\mu$, dans le tampon phosphate m/30, de pH 6,8; cuve de 1 cm.

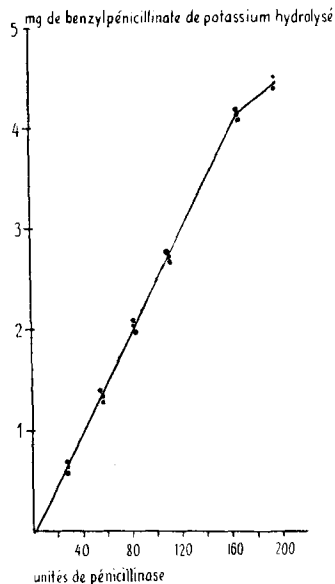


Fig. 3.

Relation entre la quantité de benzylpénicillinate de potassium hydrolysé et le nombre d'unités de pénicillinase.

Mode opératoire.

1. *Réactifs.* a) Solution de benzylpénicillinate de potassium (1595 unités/mg) de 0,1%, de pH 6,5;

b) tampon phosphate m/15 de pH 6,8;

c) solution de pénicillinase contenant 20 à 320 unités/cm³.

2. *Matériel.* a) Tubes d'incubation 18 × 180 mm en pyrex, sans lèvres;

b) porte-tubes circulaires pour 12 tubes d'incubation, en aluminium;

c) godets de verre de 11 × 15 mm pouvant contenir 0,5 cm³ de la solution de pénicillinase;

d) pipettes de 0,5 cm³ pour répartir la solution enzymatique dans les godets;

e) pipettes automatiques Gerber²⁾ de 5 cm³;

f) bain-marie thermostaté à $37^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$;

g) bain-marie à 90°.

3. *Technique du dosage.* 5 cm³ de la solution a) sont introduits dans 5 cm³ du tampon phosphate (solution b)³⁾. Dans un godet de verre on introduit 0,5 cm³ d'une solution de pénicillinase contenant 20 à 320 unités/cm³.

¹⁾ Benzylpénicillinate de potassium.

²⁾ Gerber & Co., Ausstellungsstrasse 88, Zürich.

³⁾ On peut mélanger d'avance la solution de pénicilline et du tampon mais ce mélange doit alors être utilisé dans les 4 à 6 jours qui suivent sa préparation.

La solution de PGK¹) est portée dans le bain-marie de 37°. Après 10 min., le godet contenant la solution enzymatique est introduit dans la solution de PGK (pour l'introduction simultanée de plusieurs godets, voir p. 2062). Le mélange est rendu homogène par agitation dans le bain thermostatique. Exactement 60 min. après l'introduction de l'enzyme, la solution est plongée dans le bain-marie à 90° pendant 5 min. pour l'inactivation de l'enzyme, puis refroidie aussitôt dans de la glace fondante. Un tube recevant 0,5 cm³ d'eau distillée à la place de la prise enzymatique, sert de témoin. Il est traité comme les solutions incubées.

Le coefficient d'extinction de la solution à la fin de l'incubation est mesuré à 240 et à 262,5 m μ au moyen du spectrophotomètre DU de *Beckman*, dans une cuve de 1 cm d'épaisseur.

4. *Unité de pénicillinase*. Nous avons adopté une unité analogue à celle définie par *Pénau* et coll.²⁾; 100 unités représentent la quantité d'enzyme qui inactive 50% d'une solution de benzylpénicillinate de potassium (5 mg dans 10,5 cm³)³⁾, à 37°, en 60 min., à pH 6,8. La seule modification apportée par nous est de fixer le pH à 6,8 au lieu de 7.

5. *Calculs*. En présence d'un excès de substrat, la quantité de pénicilline transformée dans un temps donné est proportionnelle à la quantité d'enzyme mise en œuvre (fig. 3). La proportionnalité entre la quantité d'acide pénicilloïque et la quantité d'enzyme se maintient jusqu'à une transformation d'env. 80% de benzylpénicilline mise en œuvre. Tant qu'on se trouve dans cette gamme de dégradation, les relations suivantes permettent de connaître la quantité de benzylpénicilline restant après 60 min. et par conséquent, la quantité de pénicilline hydrolysée.

Si

D_1 = coefficient d'extinction⁴⁾ à 240 m μ diminué du coefficient d'extinction à 262,5 m μ (à la fin de l'incubation) pour le témoin;

D_2 = coefficient d'extinction à 240 m μ diminué du coefficient d'extinction à 262,5 m μ à la fin de l'essai avec l'enzyme;

c = concentration initiale (et du témoin) de PGK (5 mg dans 10,5 cm³)³⁾;

x = concentration finale de PGK (en mg dans 10,5 cm³) à la fin de l'essai avec l'enzyme;

on a: $x = c \cdot D_1/D_2$, et $c - x$ = concentration de PGK hydrolysé à la fin de l'essai avec l'enzyme.

D'après la définition de notre unité, 100 unités correspondent à l'absorption $D_1/2$ à 240 m μ (disparition de la moitié de la benzylpénicilline); le nombre d'unités U dans la prise de la solution enzymatique s'exprime alors comme suit: $U = 100 \cdot (c - x)/0,5 \cdot c$.

Avec une prise de 0,5 cm³ de solution de pénicillinase diluée d fois à partir de la solution originelle de l'enzyme, cette dernière contient $U \cdot d/0,5$ unité par cm³.

Dans nos conditions de travail, la concentration de l'enzyme ne doit pas dépasser 320 unités/cm³ puisqu'au-delà, la dégradation du substrat dépasse la limite de 80%.

Applications.

A. Au cours d'une recherche sur la purification de la pénicillinase, nous avons appliqué notre méthode de détermination de l'activité de la pénicillinase à de nombreux échantillons et solutions de pénicillinase de *Bacillus cereus* (NRRL B 569), de pureté très variable (voir tableau II). Il n'y a aucune interférence propre de ces diverses préparations, aux concentrations utilisées, avec le spectre de la benzylpénicilline. Les sels utilisés

¹⁾ Benzylpénicillinate de potassium.

²⁾ *H. Pénau, J. Phillippe & D. Benoist*, Ann. Pharm. Fr. **9**, 419 (1951).

³⁾ Pour des dosages en série, nous utilisons des pipettes automatiques pour les prélèvements de la solution de pénicilline et de tampon; pour cette raison nous travaillons avec le volume final de 10,5 cm³ (5 cm³ + 5 cm³ + 0,5 cm³).

⁴⁾ Tous les coefficients d'extinction doivent être corrigés par un facteur qui dépend de la cuve utilisée et de la longueur d'onde. Ces facteurs sont calculés sur la base de la différence d'absorption, à chacune des longueurs d'onde utilisée, des cuves remplies d'eau, par rapport à la cuve de référence avec le dissolvant pur.

pour la purification de la pénicillinase¹⁾ (acétate de sodium, sulfate d'ammonium, sulfate de calcium, chlorure de sodium) ne perturbent pas le dosage; par contre la présence d'acétone doit être évitée à cause de son absorption dans la région spectrale utilisée.

Tableau I.

Mesures spectrophotométriques de la dégradation de la benzylpénicilline dans les conditions standard en présence de quantités croissantes de pénicillinase.

Nombre d'unités	Conc. de l'enzyme brute γ N/cm ³	D_t	$c-x$	Moyenne de $c-x$	% de PGK inactivé
28	0,066	0,880	0,60	0,62	12,4
		0,875	0,63		
		0,870	0,65		
56	0,132	0,752	1,34	1,30	26,0
		0,740	1,30		
		0,748	1,26		
84	0,192	0,620	1,90	1,93	38,6
		0,604	1,98		
		0,614	1,93		
112	0,264	0,450	2,75	2,70	54,0
		0,460	2,70		
		0,474	2,63		
140	0,330	0,305	3,48	3,45	69,4
		0,313	3,43		
		0,296	3,52		
168	0,384	0,166	4,17	4,13	82,6
		0,180	4,10		
		0,176	4,12		
196	0,528	0,105	4,47	4,46	89,2
		0,105	4,47		
		0,109	4,45		

Tableau II.

Produits	D_t			Nombre d'unités par cm ³		
P ₁ S ₁ ²⁾	0,465	0,470	0,435	214	212	206
P ₁ S ₂ (sol.)	0,520	0,550	0,535	192	180	186
E ₁ (sol.)	0,440	0,420	0,425	112	116	115
E ₂ (sol.)	0,760	0,780	0,765	96	88	94,5
E ₃ (sol.)	0,685	0,682	0,690	126,5	126	124
E ₄ (sol.)	0,690	0,680	0,700	125	127	132
E ₈ (sol.)	0,720	0,710	0,735	112	116	108
E ₉ ³⁾	0,740	0,740	0,720	104	104	112
E ₁₁ ⁴⁾	0,880	0,890	0,870	48	44	52
E ₃ c.l. (sol.)	0,210	0,220	0,212	316	311	314

¹⁾ P. Baudet & G. Hagemann, Purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus*, Exper., sous presse.

²⁾ Activité/mg azote total = 31 000.

³⁾ Activité/mg azote total = 325 000.

⁴⁾ Activité/mg azote total = 700 000.

B. *Variations de l'activité de la pénicillinase de Bacillus cereus avec le pH.* Selon nos déterminations, le pH d'activité maximum d'une préparation de pénicillinase de *Bacillus cereus* d'une activité de 31000 unités/mg N total se trouve à 6,5 (voir fig. 4) comme *Péneau et coll.*¹⁾ l'avaient déjà observé. Dans ces essais, nous n'avons pas travaillé à des pH inférieurs à 6 car alors la formation de benzylpénicillénate rend impossible les déterminations spectrophotométriques. Le spectre UV. du benzylpénicillinate de potassium n'est pas modifié entre pH 6 et 8.

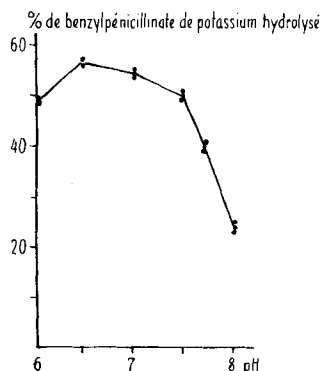


Fig. 4.

Variations de l'activité de la pénicillinase de *Bacillus cereus* (NRRL B 569) en fonction du pH.

Observations concernant les opérations.

Certaines précautions doivent être observées en vue d'une reproductibilité satisfaisante des résultats.

1. Les tubes de dosage, les godets de verre, doivent être nettoyés après chaque détermination dans le mélange chromique.

2. Il faut éviter toute contamination du matériel de dosage avec du fer, p.ex. lors du séchage des tubes et des godets dans les étuves, le Fe^{+3} étant un inhibiteur de la pénicillinase.

3. Lorsque l'on travaille en série (12 à 24 tubes) il est nécessaire d'introduire les prises de l'enzyme (0,5 cm³) dans les tubes, au même temps. On y parvient à l'aide d'un disque percé d'orifices circulaires dont le diamètre est identique à celui des tubes d'incubation; ce disque est ajusté sur le porte-tubes circulaire, de façon que chacun des trous du disque se trouve superposé à un tube. Un second disque pivotant autour de l'axe du porte-tubes et percé d'orifices identiques, est placé sur le premier disque. Le disque mobile est placé de telle manière que ses orifices se trouvent décalés par rapport aux trous du disque fixe. On place alors les godets porteurs des différentes prises de l'enzyme dans les trous du disque mobile, puis par une légère rotation du disque mobile, on fait tomber au moment voulu tous les godets en même temps dans les tubes d'incubation correspondants (voir fig. 5).

4. La désactivation de l'enzyme par 5 min. de chauffage à 90° ne produit aucune altération du substrat à la condition que le pH de la solution initiale de pénicilline soit toujours compris entre 6 et 7. En effet, il suffit que le pH de cette solution soit inférieur à 6 pour que la pénicilline donne naissance à des produits de dégradation (voir sous 5).

Il existe des milieux²⁾ (p.ex. gélatinés) dans lesquels la pénicillinase est thermostable; la désactivation enzymatique devrait alors être effectuée par l'action d'un inhibiteur,

¹⁾ H. Péneau, J. Phillippe & D. Benoist, Ann. Pharm. Fr. **9**, 419 (1951).

²⁾ Eileen E. D. Manson & M. R. Pollock, J. Gen. Microb. **8**, 163 (1953).

pour autant que celui-ci ne trouble pas le spectre ultra-violet de la benzylpénicilline. Nous n'avons pas étudié ce point particulier.

Le fluorure de sodium proposé par *Pénau*¹⁾ comme inhibiteur n'a aucun effet vis-à-vis de la pénicillinase de *Bacillus cereus* que nous avons utilisée.

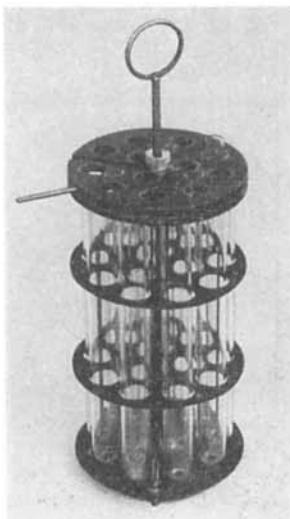


Fig. 5.

Appareil à 12 tubes pour l'introduction simultanée des prises de réactif dans des tubes à essais. A titre d'exemple, trois godets ont été placés sur le disque mobile (muni d'une tige de manœuvre) et un godet a déjà été introduit dans un des tubes.

5. Conservation des solutions de pénicilline. Aux pH que présentent les solutions non tamponnées de benzylpénicillate de potassium dans l'eau distillée (pH 5,4—5,6), la pénicilline se transforme lentement en thiazolidine-oxazolone formant à son tour l'acide benzylpénicillénique (VIII) caractérisé par une forte absorption à 320 $m\mu$ ($\epsilon = 26000$). Cette transformation peut s'accompagner de la formation de l'acide benzylpénillique (IX), isomère de la benzylpénicilline (I) et qui possède également une absorption très élevée dans la région utilisée du spectre. Ces réactions sont lentes à 2°; la fig. 6 montre l'augmentation du coefficient d'extinction à 320 $m\mu$ à pH 5,5 au cours du temps, dans une solution de benzylpénicillinate de potassium. L'influence du pH sur la vitesse de cette dégradation peut être suivie par le développement du coefficient d'extinction à 320 $m\mu$ (voir fig. 7).

On évite ces réactions parasites en conservant les solutions de pénicilline à pH 6,5 puisqu'à un pH d'au moins 6 les solutions sont stables (voir fig. 7). La détermination de l'absorption à 320 $m\mu$ constitue un critère particulièrement sensible de la stabilité du substrat.

Une observation faite par *Levy*²⁾ pourrait faire craindre des complications au cours de l'incubation, observation selon laquelle l'acide benzylpénicilloïque serait instable dans le milieu réactionnel et se transformerait en produit secondaire dont la formation serait d'ailleurs accélérée par l'addition d'un équivalent de chlorure mercurique. Or, les seuls produits de dégradation dont on ait à envisager la formation en l'occurrence, sont la pénicillamine (V) et le benzylpénaldlate (X) qui apparaissent simultanément ou le benzylpénamaldlate (XI). On sait que le benzylpénaldlate et le benzylpénamaldlate sont caractérisés par une forte absorption à 270 et à 282,5 $m\mu$ au pH 6,8. Comme nous constatons que

¹⁾ L. c.

²⁾ *G. B. Levy*, *Anal. Chem.* **23**, 1089, (1951).

le spectre UV. de nos solutions ne montre plus aucune variation une fois que la pénicilline a disparu, et ceci même après 48 h. d'incubation supplémentaire, nous concluons à l'absence d'une altération de l'acide benzylpénicilloïque dans nos conditions de travail.

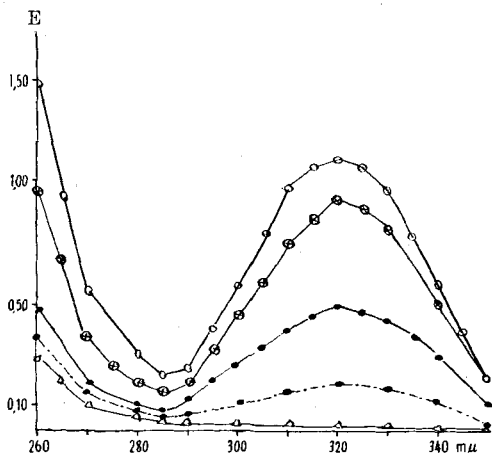


Fig. 6.

Formation du benzylpénicillénate de potassium dans une solution de PGK à 0,1%, à pH 5,5, à 2°, en fonction du temps en jours, révélée par la modification du spectre UV.

- △ — au moment de la dissolution du PGK (0,05%)
- — après 1 jour
- — après 13 jours
- — après 28 jours
- — après 39 jours

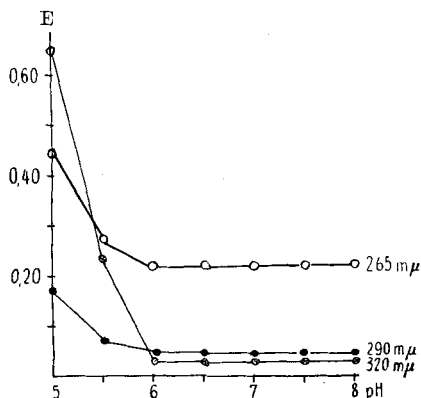


Fig. 7.

Influence du pH sur la formation du benzylpénicillénate de potassium à partir de la benzylpénicilline: extinction à 265, à 290 et à 320 mμ d'une solution de PGK à 0,05% après un séjour de 60 min. à 37°, à divers pH.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'Encouragement des recherches scientifiques de la Confédération* et le *Fonds National Suisse de la recherche scientifique* de l'aide qu'ils nous ont accordée.

Nos remerciements s'adressent également à M. le Dr *Guy Hagemann*, Directeur des Laboratoires de recherches de la *Société Française de la Pénicilline (Laboratoires Roussel)*, Romainville, Seine, France, à qui nous sommes redevables d'une quantité importante de benzylpénicilline et de pénicillinase.

SUMMARY.

Benzylpenicilline has a very marked absorption at $240\text{ m}\mu$, as compared with benzylpenicilloic acid, its degradation product by penicillinase. The diminution of the extinction, which a solution of benzylpenicilline presents progressively at this wave length in the presence of penicillinase, is proportional to the amount of penicilline transformed. The final value of the extinction at $240\text{ m}\mu$ after complete hydrolysis of the penicilline primitively present can be determined immediately by measuring the not varying extinction at $262,5\text{ m}\mu$, as at this wave length the extinction of benzylpenicilloic acid is equal to its extinction at $240\text{ m}\mu$, and the extinctions of equivalent quantities of benzylpenicilline and benzylpenicilloic acid are the same. A method of determination of penicillinase based on these facts is described.

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève.

Bei der Redaktion eingelaufene Bücher:

(Die Redaktion verpflichtet sich nicht zur Besprechung der eingesandten Werke.)

Livres reçus par la Rédaction:

(La rédaction ne s'engage pas à publier des analyses des ouvrages qui lui sont soumis.)

Folia Pharmaceutica. Folya Farmasötika. Editeur *Mâlik Zâfir*. Vol. II, Nos 10–11 (1953); numéros de 20 p., 17×24 cm. Istanbul. Prix 10 Kurus le numéro.

Dérivés Cellulosiques. Par *G. Champetier*, Professeur à la Faculté des Sciences, Directeur des Etudes à l'École Supérieure de Physique et de Chimie industrielle de Paris. (Matériaux de Synthèse. Collection publiée sous la direction de *Pierre Piganiol*.) Préface de *Jacques Duclaux*, Membre de l'Institut. XII+270 p., 14×22 cm, 36 figures. 2^e édition, relié toile. *Dunod*, 92, rue Bonaparte, Paris VI, 1954. Prix ffr. 1960.—

Fixação do nitrogênio atmosférico pelas descargas elétricas. Par *Oswaldo de Lazzarini Peckolt*, *Rubem do Nascimento*, *Sebastião Luiz de Oliveira e Silva*. Separata da Revista Brasileira de Farmacia, Ano XXXIII, No. 6, Junho-1952. 7 p., $16 \times 22,5$ cm.

Die Tertiärlamelle von Holzfasern und ihre Erscheinungsformen bei Coniferen. Von *Hans Bucher*, Dr. phil., Chemiker. Untersuchungen aus dem Laboratorium der *Cellulosefabrik Attisholz AG.*, vorm. *Dr. B. Sieber*, Attisholz bei Solothurn (Schweiz). 53 p.+112 Abbildungen, 17×24 cm. Buchdruckerei Habegger AG., Derendingen, 1953.
