37. Über die Wirkung eines mit ^{35}S indizierten Sulfathiazols auf Kulturen von Escherichia coli

von **H. Noll, J. Bang, E. Sorkin** und **H. Erlenmeyer.**

(20. XII. 50.)

Für die Deutung der Mechanismen, die für die bakteriostatische Wirkung von Verbindungen verantwortlich sind, ist die Frage nach der Aufnahme und Bindung solcher Hemmstoffe durch die Mikroorganismen aus dem Kulturmilieu von grosser Bedeutung. Durch die Verwendung von Stoffen, die mit radioaktiven Elementen indiziert sind, besteht die Möglichkeit, wie wir in früheren Untersuchungen[1]) gezeigt haben, exakte Angaben über den Umfang und die Art der Bindung solcher Stoffe durch die Bakterien in Erfahrung zu bringen.

Da für die chemotherapeutische Forschung das Problem der Einwirkung des p-Aminobenzolsulfonamids und seiner Derivate auf Bakterien von besonderem Interesse ist, haben wir für solche quantitativen Untersuchungen ein mit ^{35}S indiziertes 2-(p-Aminobenzolsulfonamido)-thiazol (d. i. Sulfathiazol, im folgenden mit ST abgekürzt) hergestellt. Im folgenden berichten wir über Untersuchungen mit dieser Verbindung, bei denen die Aufnahme durch Escherichia coli verfolgt wurde und bei denen wir weiterhin die Einwirkung eines Zusatzes von p-Aminobenzoesäure (PAB) auf eine solche Bindung ermittelt haben.

Über ähnliche Versuche mit Escherichia coli haben bereits *I. M. Klotz & J. B. Melchior*[2]) berichtet. Sie fanden, dass mit der von ihnen benutzten Methode keine Bindung des Sulfanilamids zu ermitteln war, ein Befund, der, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, durch die zu wenig empfindliche Messmethodik bedingt war.

I. Methodisches.

a) Darstellung des mit ^{35}S indizierten Sulfathiazols (ST).

Ausgangsmaterial war ein Ba ^{35}S-Präparat[3]).

Die Herstellung von mit ^{15}N indiziertem Thioharnstoff wurde bereits von *Plentl & Schönheimer*[4]) beschrieben. In Anlehnung an diese Synthese wurde an Cyanamid $H_2{}^{35}S$

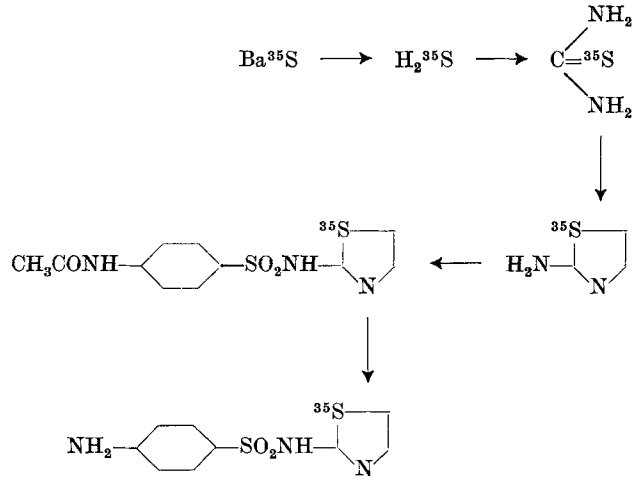
[1]) *H. Noll, E. Sorkin & H. Erlenmeyer*, Über die Wirkung eines mit ^{35}S indizierten 2-(p-Aminophenyl)-thiazols auf Kulturen von Tuberkelbazillen, Helv. **32**, 609, 1209, 1674 (1949); **33**, 23 (1950).

[2]) Arch. Bioch. **21**, 35 (1949); siehe auch *A. Lacassagne, Ng. Ph. Buu-Hoï, F. Zajdela & Ng. Dat Xuong*, C. r. **231**, 89 (1950).

[3]) Bezogen von der *U. S. Atomic Energy Commission*, Oak Ridge, Tennessee.

[4]) *A. A. Plentl & R. Schoenheimer*, J. Biol. Chem. **153**, 203 (1944).

in Gegenwart von Sb_2S_5 angelagert und der entstandene Thioharnstoff mit Dichloräther kondensiert. Umsetzung des so erhaltenen 2-Aminothiazols mit N-Acetylsulfanilsäurechlorid und Verseifung des Acetats lieferte das radioaktive ST-Präparat. Die Aktivität betrug ca. 20000 Stösse per Minute/mg.



b) Messmethode.

Die Radioaktivität der Präparate und der Bakterien-Proben wurde mit dem *Geiger-Müller*-Zähler (Electronic Counter Typ 6501, *Brüel & Kjaer*, Copenhagen, und GM-Tube Typ *Madsen*) gemessen. Das Zählrohr war mit Blei abgeschirmt, so dass die Nullzahl nicht mehr als 3 Stösse/min. betrug und somit noch sehr schwache Aktivitäten zuverlässig gemessen werden konnten.

Zur Messung der Radioaktivität wurden die Bakterien durch Abzentrifugieren isoliert, im Heizschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschliessend im Achatmörser zu einem feinen homogenen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde in kreisrunde Schalen aus dünnem, poliertem Aluminiumblech von 1,36 cm^2 Bodenfläche und ca. 100 mg Gewicht eingewogen und dann in diesen Schalen mit einem Schieber, der sich in einer mit dem Zählrohr verbundenen Schiene bewegt, unter dem Zählrohrfenster placiert. Dabei ist wegen der Selbstabsorption darauf zu achten, dass das Bakterienpulver die Bodenfläche möglichst gleichmässig bedeckt.

Um die Aktivitäten von Proben verschiedener Gewichte miteinander vergleichen zu können, wurden alle Proben auf gleiche Selbstabsorption reduziert. Dies geschah mit Hilfe einer graphisch ermittelten Eichkurve, welche für die gegebenen geometrischen Verhältnisse und den benützten Apparat die Funktion der Selbstabsorption festlegt. Es hat sich gezeigt[2]), dass die Form der Selbstabsorptionskurve ausser von den geometrischen Verhältnissen der Apparatur auch etwas von der Korngrösse des Bakterienpulvers abhängt. Darauf ist beim Pulverisieren zu achten.

Die Messgenauigkeit hängt bei dieser Methode hauptsächlich vom Probengewicht ab. Der statistische Fehler der registrierten Impulszahl wurde unter $\pm$ 2% gehalten, indem bei allen Proben bis auf mindestens 3000 Impulse gezählt wurde. Der vom Probengewicht abhängige Messfehler ist im Bereiche der „unendlich dicken Schicht", wo die Totalaktivität vom Probengewicht unabhängig wird, am kleinsten und mit $\pm$ 5% anzugeben. Die Probengewichte wurden daher so gewählt, dass sie praktisch in diesen Bereich fallen, d. h. grösser als 20 mg, entsprechend ca. 15 mg/cm^2.

Die Berechnung des ST-Gehaltes aus der Probenaktivität erfolgte auf Grund eines Modellversuchs[1]). Das Prinzip dieses Versuchs besteht darin, dass man zu einer abgewogenen Menge von getrockneten und pulverisierten inaktiven Bakterien eine bekannte Menge ST-Lösung hinzufügt und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels und erneuter Durchmischung der Bakterien die Aktivität bestimmt. Man erhält so für ein bestimmtes Probengewicht eine Aktivität, die einer bekannten Menge ST entspricht und kann dann umgekehrt aus der gemessenen Aktivität einer Probe mit unbekanntem ST-Gehalt und gleichem Trockengewicht auf die Menge des eingedrungenen ST schliessen, indem sich dann die Aktivitäten wie die entsprechenden ST-Mengen verhalten. Bei Proben verschiedenen Gewichtes muss natürlich zuvor wiederum auf gleiche Selbstabsorption korrigiert werden.

Aus 6 Modellversuchen wurde ein Umrechnungsfaktor F bestimmt, mit welchem man die auf Absorption von 25 mg reduzierte Stosszahl/mg einer Probe multiplizieren muss, um den Gehalt an γ ST/mg zu erhalten. Der Mittelwert dieser 6 Messungen ergab

$$F = 0{,}232.$$

Der Effekt der Aktivitätsabnahme infolge des radioaktiven Zerfalles wurde dadurch eliminiert, dass von Beginn der Messungen an ein ST-Standard Präparat mitgeführt wurde, gegen welches alle Proben gemessen wurden.

c) Bakterienkulturen.

Wegen des raschen und anspruchslosen Wachstums verwendet man für die verschiedensten Untersuchungen im Laboratorium mit Vorliebe Escherichia coli. Da die verschiedenen Stämme dieser Bakterien jedoch alle Empfindlichkeitsgrade gegen Sulfonamide aufweisen können, haben wir für unsere Versuche einen besonders empfindlichen Stamm ausgewählt, der durch ST in unserem synthetischen Medium noch in einer Verdünnung von 1:160000 vollständig gehemmt wurde.

Das für unsere Versuche verwendete synthetische Medium hat folgende Zusammensetzung:

NH_4Cl	1,0 g	NaOH	3,57 g
$MgSO_4,7H_2O$	0,1 g	Milchsäure (d.h. 9,2 cm³ einer 90-proz. Lösung)	10,2 g
KH_2PO_4	3,0 g	Aqua dest.	ad 1000 cm³
$Na_2HPO_4,2H_2O$	7,0 g		pH 6,6

II. Versuche über die Bindung des ST und über den Wascheffekt.

Eine erste Reihe von Versuchen hatte zum Ziel festzustellen, ob und in welchem Masse E. coli Sulfathiazol aus einem flüssigen synthetischen Nährmedium zu binden vermag.

Die experimentelle Schwierigkeit liegt bei solchen Untersuchungen in der Isolierung des zur Messung zu bringenden Bakterienmaterials, das durch Waschen von der anhaftenden radioaktiven Nährlösung zu befreien ist.

Unter Verwendung des oben angegebenen flüssigen, synthetischen Mediums wurden in einer ersten Serie 5 Kolben à 50 cm³ und in einer zweiten Serie 4 Kolben à 50 cm³ inokuliert. Zur Verbesserung des Wachstums wurde bei allen Versuchen ein kontinuierlicher Luftstrom durchgeblasen. Nach 20 Stunden Zuchtdauer wurden die Bakterien niederzentrifugiert und wieder in 5 bzw. 4 Kolben à 50 cm³ Nährmedium, enthaltend 0,1 mg ST/cm³ aufgeschwemmt und 15 Stunden bei 36° inkubiert. Der Inhalt eines jeden Kolbens wurde dann auf 2 Zentrifugengläser (a und b) verteilt und die Bakterien niederzentrifugiert. Anschliessend wurde nach folgendem Schema gewaschen.

[1]) Einzelheiten cf. Diss. *H. Noll*, Basel 1950.

1. Serie. 2. Serie.

	Kolben															
	1.		2.		3.		4.		5.		1.		2.		3.		4.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
cm^3 H_2O	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	10	10	10	10	10	10
				10		10		10						10		10		
						10		10								10		
								10										
cm^3 C_2H_5OH*)										10								10

*) 96-proz. Äthylalkohol.

Messresultate.

1. Serie. **Tabelle 1.**

Proben Nr.	Gew., mg	γ ST/mg	Proben Nr.	Gew., mg	γ ST/mg	γ ST/mg a–b	Probengewicht a+b mg
1a	15,4	0,115	1b	28,2	0,891	—	43,6
2a	33,8	0,080	2b	33,1	0,067	0,013	66,9
3a	19,3	0,054	3b	19,7	0,043	0,011	39,0
4a	25,3	0,072	4b	19,7	0,024	0,048	45,0
5a	16,9	0,062	5b	20,0	0,041	0,021	36,9

2. Serie. **Tabelle 2.**

Proben Nr.	Gew., mg	γ ST/mg	Proben Nr.	Gew., mg	γ ST/mg	γ ST/mg a–b	Probengewicht a+b mg
1a	20,5	0,064	1b	24,7	0,78	—	45,2
2a	22,7	0,069	2b	18,4	0,042	0,026	41,1
3a	18,6	0,067	3b	20,5	0,060	0,007	39,1
4a	17,4	0,071	4b	25,2	0,046	0,025	42,6

Bei der Isolierung der Bakterien durch Zentrifugieren ist es unvermeidlich, dass nach Abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit ein kleiner Rest der radioaktiven Nährflüssigkeit bzw. des Waschwassers im Zentrifugenglas mit den Bakterien zurückbleibt. Die gemessene Aktivität der getrockneten Bakterien setzt sich daher aus der Bakterienaktivität und Aktivität der restierenden Flüssigkeit zusammen. Auf Grund der oben angegebenen Waschversuche ist es aber möglich, durch Bestimmung der Aktivität der restierenden Flüssigkeit (Restaktivität) den Anteil der reinen Bakterienaktivität an der gemessenen Gesamtaktivität zu ermitteln.

In Figur 1 ist der Log. der gemessenen Gesamtaktivität gegen die Anzahl der Waschungen aufgetragen. Man entnimmt Figur 1, dass nach dem 1. Waschen mit 10 cm^3 Wasser die Aktivität stark abfällt, bei weiterem Waschen dagegen nur noch wenig. Daraus folgt, dass die Aktivität der Bakterien klein ist gegenüber der Lösungsaktivität. Unter Voraussetzung des ungünstigsten Falles, dass nämlich die gesamte gemessene Aktivität

der ungewaschenen Bakterien der restierenden Lösungsaktivität zuzuschreiben ist, kann man aus der bekannten Lösungsaktivität (1 cm³ Lösung enthält 100 γ ST) die restierende Flüssigkeitsmenge zu kleiner als 0,5 cm³ berechnen. Daraus ergibt sich bei jedem Waschen mit 10 cm³ Wasser ein Verdünnungsfaktor von ca. 20, bezogen auf die ST-Konzentration des Waschwassers. Da sich diese restierende Lösungsmenge gleichmässig auf die Bakterienmasse verteilt, ist der Anteil der Restaktivität pro mg Bakterien Trockengewicht um so grösser, je kleiner die Bakterienmasse. Dies ist bei den Korrekturen zu berücksichtigen.

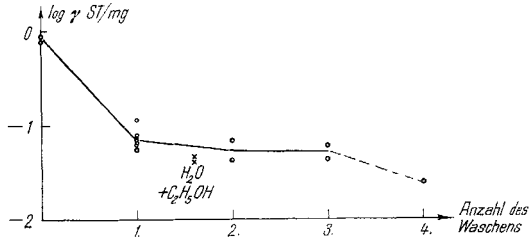


Fig. 1.

Man darf nun bei den konstanten Versuchsbedingungen annehmen, dass nach dem 1. Waschen mit 10 cm³ Wasser wiederum höchstens 0,5 cm³ Restflüssigkeit nach dem Zentrifugieren zurückbleibt. Wenn nun weiterhin die Annahme gelten soll, dass die hierauf gemessene Gesamtaktivität der Bakterien (in γ ST/mg und bei konstanter Bakterienmasse) ausschliesslich von der Waschwasseraktivität stammt, dann müsste infolge der Verdünnung die Aktivität auf mindestens $^1/_{20}$, nach dem 2. Waschen auf mindestens $^1/_{400}$ der vor dem Waschen gemessenen Aktivität abfallen. Dass dies nicht der Fall ist, sondern die gemessenen Gesamtaktivitäten bedeutend höher liegen, geht deutlich aus Tabelle 1 und Figur 1 hervor und beweist, dass die Bakterien tatsächlich messbare Mengen ST aufnehmen. Man sieht ausserdem aus Figur 1, dass schon nach dem 2. Waschen die Restaktivität infolge der Verdünnung so klein wird, dass sie gegenüber der reinen Bakterienaktivität verschwindet. Daher fällt die Summenkurve für die Gesamtaktivität in Figur 1 zwischen 1. und 2. noch etwas, bis die Lösungsaktivität verschwindet und sich höchstens noch Diffusionsverluste bemerkbar machen.

Als wesentliches Ergebnis kann man diesen Versuchen entnehmen, dass die Bakterien messbare Mengen Sulfathiazol aufnehmen. Die gemessenen Konzentrationen nach zwei- und dreimaligem Waschen mit 10 cm³ destilliertem Wasser ergeben ein Mittel von 0,048 γ/mg Trockengewicht bei einer ST-Konzentration von 1:10000 (100 γ/cm³) in der Nährlösung. Umgerechnet auf das Lebendgewicht der Bakterien ergibt dies ca. 0,01 γ/mg, also eine rund 10mal geringere Konzentration als in der umgebenden Nährflüssigkeit (0,1 γ/mg). Bei der Diskussion der Abweichungen der Einzelwerte ist zu beachten, dass die Proben aus unter sich verschiedenen Parallelkulturen stammen, in welchen das Bakterienwachstum etwas differiert, da die Luftzuleitung nicht immer ganz konstant gehalten werden konnte. Damit sind auch die Absorptionsbedingungen für das ST nicht ganz konstant. Bei den für solche Versuche notwendigen grossen Inocula wird bei der angewendeten ST-Konzentration die Bakteriostase nicht mehr manifest. Der Bakterienzuwachs während der Inkubation mit ST beträgt ca. 20%.

Weiterhin ist aus den Resultaten zu ersehen, dass aus dem nach einmaligem Waschen mit 10 cm³ Waschflüssigkeit ermittelten Aktivitätswert durch Substraktion eines konstanten Faktors die von den Bakterien festgehaltene Menge des ST zu ermitteln ist.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird auch das negative Resultat von *Klotz & Melchior* verständlich. Die von diesen Autoren verwendete Methode gestattet nach ihren Angaben den Nachweis von minimal 0,2% der zugefügten Aktivität oder 300 γ auf $50 \cdot 10^9$ Bakterien. Rechnet man 10^9 Bakterien zu 1 mg Trockengewicht, so bedeutet dies 6 γ/mg Bakterientrockengewicht. Die in unseren Versuchen nachgewiesene Menge von 0,05% der zugefügten Gesamtmenge liegt somit unter dem von jenen Autoren geforderten Grenzwert, wobei zu berücksichtigen ist, dass wir mit einer 30mal kleineren Lösungsaktivität gearbeitet haben. Es ist die in unseren Versuchen nachgewiesene ST-Konzentration/mg Bakterientrockengewicht rund 100-mal kleiner als die in den Versuchen von *Klotz & Melchior* minimal nachweisbare Sulfanilamid-Konzentration. Aus diesem Vergleich ist zu entnehmen, dass für solche Versuche mit sehr kleinen Aktivitäten das von *Klotz & Melchior* benützte *Lauritzen*-Elektroskop zum Nachweis nicht genügt.

III. Abhängigkeit der St-Aufnahme von der Inkubationszeit bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Bakterienwachstums.

Ein Kolben mit 200 cm³ des synthetischen Mediums wurde inokuliert und die Bakterien während 20 Stunden unter Durchlüftung gezüchtet, dann niederzentrifugiert und in frischem Nährmedium mit 0,1 mg ST/cm³ aufgeschwemmt (196 cm³ F-Medium + 4 cm³ 0,5-proz. ST-Lösung). Bei fortgesetzter Inkubation unter Durchlüftung werden Proben à 35 cm³ nach 2–4–8–12 und 22,5 Stunden entnommen.

Die Aktivität der Bakterien wurde nach einmaligem Waschen mit 10 cm³ Wasser in der üblichen Weise bestimmt.

Messresultate.

Tabelle 3.

Zeit h	Proben-gewicht, mg	γ ST/mg gemessen	korrigiert max.	korrigiert min.	korrigiert mittel	Wachstum mg Bakt./cm³
2	34,7	0,088	0,084	0,070	0,077	0,98
4	30,1	0,093	0,088	0,072	0,080	0,84
8	38,9	0,072	0,068	0,056	0,062	1,06
12	63,0	0,041	0,039	0,031	0,035	1,70
22,5	42,1	0,057	0,055	0,048	0,052	1,85

Da einmaliges Waschen mit 10 cm³ Wasser nicht genügt, um die Bakterien von der anhaftenden Lösungsaktivität vollständig zu befreien, wurden die Resultate auf Grund der Waschversuche in Tabelle 1 korrigiert. Die Differenzen 2a–2b usw. in Tabelle 1 wurden mit dem entsprechenden Probengewicht multipliziert und so die totale Aktivität

der restierenden Flüssigkeitsmenge bestimmt. Aus den Extremwerten 0,630 und 0,134 der so erhaltenen Werte lässt sich dann durch Division mit dem Bakteriengewicht, auf das sich diese Restaktivität verteilt, ein maximaler und minimaler Betrag errechnen, welcher von dem nach einmaligem Waschen gemessenen Aktivitätswert abzuziehen ist.

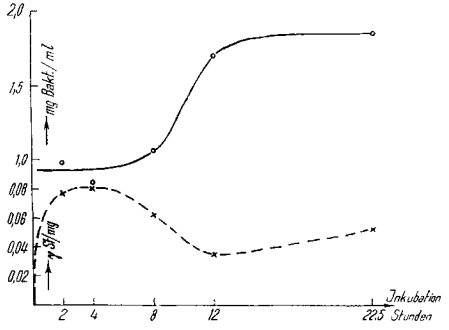


Fig. 2.

In Figur 2 sind die per mg Bakterientrockengewicht gemessenen ST-Konzentrationen zusammen mit dem gleichzeitig gemessenen Massenzuwachs der Bakterien als Funktion der Inkubationszeit aufgetragen. Wie man sieht, erreicht die ST-Konzentration in den Zellen schon in den ersten zwei Stunden praktisch den Endwert und bleibt dann bis zum Ende der Ruhephase („Lag-phase" 4—6 Std.) konstant. Mit dem Einsetzen des Bakterienwachstums fällt jedoch bemerkenswerterweise die ST-Konzentration in den Bakterien ab und erreicht am Ende der Bakterienvermehrung ihren Tiefpunkt, um während der anschliessenden Ruhephase allmählich wieder anzusteigen. Während sich die Bakterien in der Wachstumsphase auf das Doppelte vermehren, sinkt die ST-Konzentration (bezogen auf das Bakterientrockengewicht) auf ungefähr die Hälfte ab.

IV. Aufnahme von ST in Gegenwart von PAB.

In einem Vorversuch wurde die ST-Empfindlichkeit des verwendeten Colistammes nach der Agar-Cup-Methode auf Agar mit synthetischem Medium bestimmt. Parallel dazu wurde auf gleiche Weise die Reduktion der ST-Empfindlichkeit bei Zusatz von 0,25–0,5–1,0 und 2,0 γ PAB per cm^3 Substrat gemessen. Es ergaben sich hierbei die folgenden Zahlenwerte.

Tabelle 4.

γ PAB pro cm^3 Substrat . .	0,25	0,50	1,0	2,0
Reduktionsfaktor der ST-Empfindlichkeit . . .	16,6	30,9	57,2	131,5

Der Hauptversuch galt der Frage, ob sich die beobachtete Reduktion der ST-Empfindlichkeit bei Zusatz der gleichen PAB-Konzentrationen in einer Abnahme der ST-Aufnahme durch die Bakterien im Sinne der Verdrängungstheorie bemerkbar macht.

3 Kolben à 200 cm³ synthetischen Mediums wurden inokuliert und während 24 Stunden bei 36° unter Durchlüftung inkubiert. Die gewachsenen Bakterien wurden dann abzentrifugiert und die aus den drei Kolben gesammelte Menge in einem grossen Kolben mit 400 cm³, d. h. in $^2/_3$ des ursprünglichen Volumens, frischem synthetischem Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden in 5 Kolben je 48 cm³ abpipettiert und unter Hinzufügen von ST und PAB das Volumen auf 50 cm³ ergänzt, so dass jeder Kolben eine ST-Konzentration von 100 γ/cm³ sowie eine PAB-Konzentration von 0–0,25–0,5–1,0 und 2,0 γ/cm³ enthielt. Die 5 Kolben wurden darauf während 18 Stunden bei 36° unter Durchlüftung inkubiert. Zur Kontrolle der Inoculumsgrösse wurden weitere 48 cm³ der Stammsuspension in ein Zentrifugenglas abgemessen und die Bakterien abzentrifugiert, getrocknet und gewogen. Das Inoculum ergab ein Trockengewicht von 54,6 mg.

Am Ende der Inkubation wurde der Inhalt eines jeden Kolbens gleichmässig auf zwei Zentrifugengläser verteilt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Bakterien jeweils in dem einen der Gläser ohne zu waschen sofort getrocknet und gewogen (a) und die Aktivität bestimmt; in dem andern der beiden Parallelproben wurde zuvor noch mit 10 cm³ H_2O einmal gewaschen (b) und dann ebenfalls die Aktivität gemessen. Zur Kontrolle wurde ausserdem bei (a) die Aktivität von 0,025 cm³ Medium und bei (b) die Aktivität eines gleichen Aliquots Waschwasser bestimmt. Die Messresultate sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

Proben Nr.	Proben Gew., mg	Probengewicht a+b	Akt. von 0,025 cm³ Mediumwaschwasser	Verdünnungsfaktor	γ PAB/cm³	γ ST/mg
1a	32,8	62,7	34,1	21,6	2,0	0,928
1b	29,9		1,58			0,100
2a	36,1	63,6	34,3	22,3	1,0	0,928
2b	27,5		1,54			0,102
3a	33,9	61,1	31,7	17,9	0,5	0,994
3b	27,2		1,77			0,136
4a	29,8	58,6	34,5	17,3	0,25	0,980
4b	28,8		2,0			0,113
5a	32,4	62,9	32,3	26,8	0	0,804
5b	30,5		1,2			0,167

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass das Bakterienwachstum in allen Kolben nahezu gleich ist; verglichen mit dem Inoculum beträgt der Zuwachs ca. 20%. Bei dem verwendeten grossen Inoculum ist dieser Zuwachs nicht merklich beeinflusst von der zugesetzten PAB-Konzentration (cf. 1 und 5).

Zur Beurteilung der in den Bakterien gemessenen ST-Konzentrationen ist es wiederum notwendig, wegen der nach einmaligem Waschen an den Bakterien anhaftenden Lösungsaktivität eine Korrektur anzubringen. Aus der Kontrolle der Lösungs- und Waschwasseraktivität erhält man durch Division einen Verdünnungsfaktor, welcher angibt, wievielmal geringer die ST-Konzentration des Waschwassers verglichen mit der Lösungsaktivität ist. Da die zugesetzte Waschwassermenge bekannt ist (10 cm³), kann man aus der gemessenen Verdünnung die vor dem Zusatz des Waschwassers im Zentrifugenglas zurückgebliebene Lösungsmenge sehr einfach berechnen. Der Durchschnitt der restie-

renden Lösungsmenge errechnet sich so zu 0,51 cm³ mit den Extremwerten 0,39 bzw. 0,61 cm³. Berechnet man die gleiche Restflüssigkeit aus der Aktivität der ungewaschenen (a)-Proben unter der zulässigen Annahme, dass die gesamte Aktivität auf das Waschwasser entfällt, so erhält man einen Mittelwert von 0,31 cm³ mit den Extremwerten 0,26—0,34 cm³. Es ist leicht verständlich, dass die so errechneten Restmengen kleiner sind als die aus den Verdünnungsfaktoren experimentell direkt bestimmten, denn beim Trocknen der Bakterien im Zentrifugenglas setzt sich nach dem Verdunsten der radioaktiven Restflüssigkeit ein Teil der radioaktiven Substanz an den Glaswänden fest, so dass also nicht die gesamte in der restierenden Flüssigkeitsmenge enthaltene Radioaktivität zur Messung gelangt. Der an den Bakterien haftende Anteil der Restaktivität beträgt durchschnittlich 60%. Dies ist bei der Korrektur der Bakterienaktivität nach nur einmaligem Waschen zu berücksichtigen.

Nimmt man nun an, dass die nach dem ersten Waschen im Zentrifugenglas zurückbleibende Waschwassermenge wiederum höchstens 0,6 cm³ beträgt (durch Verdünnungsmessungen ermittelter Extremwert), so erhält man für die Korrektur eine untere Grenze. Die Begrenzung des Streuungsbereiches nach oben wird durch die in Tabelle 5 angeführten ST-Werte gegeben, welche für den Extremfall zutreffen, dass keine Waschwasseraktivität an den Bakterien zurückbleibt. Auf Grund des Mittelwertes der restierenden Flüssigkeitsmenge und der für jede einzelne Messung bestimmten Verdünnungsfaktoren sowie des zugehörigen Bakterientrockengewichtes wird eine Korrektur für den wahrscheinlichsten Wert berechnet. Die korrigierten Werte sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6.

Proben-Nr.	γ ST/mg Bakterientrockengewicht maximaler Wert	minimaler Wert	wahrscheinlichster Wert	γ PAB/cm³
1b	0,100	0,044	0,058	2,0
2b	0,102	0,043	0,058	1,0
3b	0,136	0,062	0,080	0,5
4b	0,113	0,041	0,059	0,25
5b	0,167	0,123	0,134	0

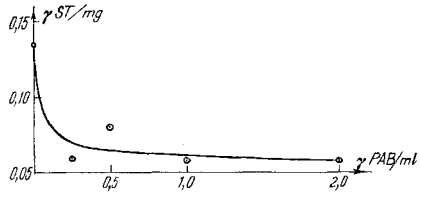


Fig. 3.

In Figur 3 sind die in den Bakterien gemessenen ST-Werte als Funktion der dem Medium zugesetzten PAB-Konzentrationen aufgetragen. Man sieht deutlich, dass die von den Bakterien gebundenen ST-Konzentrationen bei Zusatz von steigenden PAB-Konzentrationen stark abfallen, wie nach der Verdrängungstheorie zu erwarten ist.

Die Beobachtung, dass der Abfall nicht asymptotisch gegen Null erfolgt, sondern dass ein Grenzwert von ca. 0,058 γ ST/mg Bakterien-

trockengewicht sich einstellt, ist ein Hinweis dafür, dass die gemessene Aktivität sich zusammensetzt[1]) aus:

1. dem Anteil, der wohl in die Zelle eingedrungen, aber dort frei vorhanden ist, und

2. dem von den spezifischen Rezeptoren in der Zelle gebundenen Anteil. Man hat demnach folgende Gleichgewichte für das Zustandekommen der vorliegenden Verteilung zu berücksichtigen:

Aussenflüssigkeit		Zellinneres
(ST)	$\rightleftharpoons$	(ST) frei $\rightleftharpoons$ (ST + Rezeptor) gebunden
(PAB)	$\rightleftharpoons$	(PAB) frei $\rightleftharpoons$ (PAB + Rezeptor) gebunden

Bei Zusatz von PAB wird infolge des dynamischen Gleichgewichtes ST von den Rezeptoren verdrängt und dadurch die freie ST-Konzentration im Zellinnern erhöht. Da die freie ST-Konzentration im Zellinnern sich aber ihrerseits im dynamischen Gleichgewicht mit der ST-Aussenkonzentration befindet, diffundiert die frei gewordene ST-Menge wieder bis zur Gleichgewichtskonzentration nach aussen.

Nimmt man an, dass sowohl Sulfathiazol als auch PAB von E. coli gebunden wird, so lässt sich aus den ermittelten Aktivitätswerten das Verhältnis der „Dissoziationskonstanten„ der hierbei gebildeten Verbindungen auf Grund der folgenden Überlegungen errechnen[2]).

1. $B + S \rightleftharpoons BS$
2. $B + A \rightleftharpoons BA$
3. $BS + A \rightleftharpoons BA + S$

B = bindender Rezeptor in den Bakterien,
A = PAB,
S = Sulfonamid (ST),
BS = an Rezeptor gebundenes Sulfonamid,
BA = an Rezeptor gebundenes PAB.

Nach Einführung der Dissoziationskonstanten und der entsprechenden Konzentrationen:

$$4.\quad k_1 = \frac{(B)\cdot(S)}{(BS)},$$

$$5.\quad k_2 = \frac{(B)\cdot(A)}{(BA)},$$

$$6.\quad k_3 = \frac{(BA)\cdot(S)}{(BS)\cdot(A)} = \frac{k_1}{k_2}.$$

In unserem Versuch ist (S) bekannt und konstant, (A) ist die unabhängig Veränderliche und nimmt in bekannten Intervallen zu von (A) = 0 bis (A) = 2,0 γ/cm^3. (BS) ist als abhängig Veränderliche die uns interessierende Massgrösse und verhält sich im Verdrängungsgleichgewicht gemäss Gl. 6:

$$7.\quad (BS) = \frac{(BA)\cdot(S)}{k_3\cdot(A)}.$$

[1]) *K. A. Jensen & K. Schmith,* Kemisk Maanedsblad 'og Nordisk Handelsblad for Kemisk Industri No 5, p. 75 (1942).

[2]) Bei der Kompliziertheit biologischer Systeme liegt der Sinn solcher, auf stark vereinfachten Annahmen beruhender Berechnungen in der Gewinnung eines Modells, nach welchem man sich die Wechselwirkung zwischen ST und PAB vorstellen kann.

Bezeichnet man die Konzentration der besetzten Rezeptoren bei (A) = 0 mit $(BS)_0$, dann gilt im Verdrängungsgleichgewicht bei konstantem (S) und (B) zugleich mit Gl. 7:

$$8.\quad (BA) = (BS)_0 - (BS).$$

Setzt man diesen Wert für das unbekannte (BA) in Gl. 7 ein, so erhält man:

$$9.\quad (BS) = \frac{[(BS)_0 - (BS)]\cdot(S)}{k_3\cdot(A)}\ ;\quad \text{einfache Umformung ergibt}$$

$$10.\quad \mathbf{(BS) = \frac{(BS)_0}{1 + k_3 \frac{(A)}{(S)}}}\ .$$

Diskussion.

Von den in Gl. 10 vorkommenden Grössen werden (BS) und $(BS)_0$ gemessen, (A) und (S) sind bekannt. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, die unbekannte Konstante $k_3 = k_1/k_2$ experimentell zu bestimmen. Das vorliegende Versuchsmaterial ist jedoch zu klein, um eine solche Bestimmung zu gestatten.

Man sieht ferner aus Gl. 10, dass (BS) in Abhängigkeit von der Veränderlichen (A) die Funktion einer Hyperbel darstellt. Ob nun in unseren Versuchen der qualitativ festgestellte Aktivitätsabfall durch eine Hyperbel beschrieben werden kann, lässt sich ebenfalls nicht mit Sicherheit entscheiden. Dass aber die Aufstellung einer solchen Formulierung zur Beschreibung der Beobachtungen eine gewisse Berechtigung hat, scheint vor allem aus den in Fig. 3 wiedergegebenen Resultaten der später diskutierten Agar-Cup-Versuche hervorzugehen.

Bei der Diskussion der Möglichkeit einer k_3-Bestimmung aus solchen Versuchen muss ausserdem noch darauf hingewiesen werden, dass die beiden Konstanten k_1 und k_2 nicht die Bedeutung von rein chemischen Dissoziations- resp. Affinitätskonstanten haben, sondern zusammengesetzte Grössen sind, in welchen auch Vorgänge der Permeation von der Aussenflüssigkeit ins Zellinnere und der Ionisation enthalten sind. Versteht man so in Gl. 4 und 5 unter (S) und (A) die freien Innenkonzentrationen, dann kann man unter Einführung eines Verteilungs- bzw. Permeationskoeffizienten q und q′ schreiben

$$(S) = q\cdot(S)_a \qquad (S)_a, (A)_a \ldots \text{Aussenkonz.}$$
$$(A) = q'\cdot(A)_a$$

und durch Einsetzen in Gl. 10

$$11.\quad (BS) = \frac{(BS)_0}{1 + \frac{k_1}{k_2}\frac{q'}{q}\frac{(A)_a}{(S)_a}}$$

Man sieht sofort, dass nur unter der Bedingung $q = q'$ die Verhältniszahl k_3 wirklich das Verhältnis der Dissoziationskonstanten k_1 und k_2 ausdrückt[1]). Nach den Theorien von *Bell & Roblin*[2]) und *Klotz*[3]), wonach PAB und Sulfonamide nur in nicht ionisierter Form ins Zellinnere eindringen können, wären q und q' vom Dissoziationsgrad, d. h. vom pH der Lösung und ihrem eigenen pk abhängig. Schon weil PAB und ST verschiedene pk-Werte haben, ist es unwahrscheinlich, dass $q = q'$. Es lässt sich daher auf Grund dieser Versuche nicht entscheiden, in welchem Umfange in dem errechneten k_3 die Verschiedenheit im Permeationsvermögen bzw. in der Rezeptoraffinität der beiden konkurrierenden Stoffe zum Ausdruck kommt.

Als Bedingung der Bakteriostase muss man fordern, dass (BS) einen gewissen Schwellenwert überschreitet, den man als bakteriostatische Grenzkonzentration $(BS)_g$ bezeichnen kann[4])[5]). Für die bakteriostatische Grenzkonzentration gilt dann nach Gl. 10:

$$12.\quad (BS)_g = \frac{(BS)_0}{1 + k_3 \frac{(A)_g}{(S)_g}}$$

(BS) wird also durch ein bestimmtes Verhältnis (A)/(S) festgelegt.

Dass für die bakteriostatische Grenzkonzentration das Verhältnis (A)/(S) tatsächlich über einen weiten Konzentrationsbereich konstant ist, bestätigen die Versuche mit der Agar-Cup-Methode (Tabelle 4[6])). Diese Methode besteht darin, dass man in eine Agarplatte mit einem Korkbohrer zylinderförmige Löcher schneidet, welche nachher mit ST-Lösung angefüllt werden. Infolge Diffusion bildet sich um diese Löcher ein stetiges Konzentrationsgefälle. Nach Inoculation und Inkubation der Platte beobachtet man um die Löcher kreisrunde, gegen das gleichmässige Bakterienwachstum scharf abgegrenzte Hemmzonen, deren Radius genau gemessen werden kann und ein Mass für die bakteriostatische Grenzkonzentration liefert.

Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Bakteriostase als „Wirkung" ein Produkt von Zeit und Konzentration ist. Eine Bestimmung der bakteriostatischen Grenzkonzentration am Rande der

---

[1]) Wenn die bei E. coli zu beobachtende unterschiedliche Sulfonamid-Empfindlichkeit nicht auf einen Unterschied in der PAB-Eigenproduktion zurückzuführen ist — in welchem Falle Gleichung 10 nicht mehr gelten würde — so kann dieser Wert als charakteristisch für E. coli angesehen werden. Eine Publikation von Untersuchungen über diese Frage ist in Vorbereitung.

[2]) Am. Soc. **64**, 2905 (1942).

[3]) Am. Soc. **66**, 459 (1944); siehe auch *Cowles*, Yale J. Biol. Med. **14**, 599 (1942).

[4]) *Klotz*, loc. cit.

[5]) *Noll*, Diss. Basel 1950, p. 54.

[6]) *J. Bang*, Acta Dermato-Venereologica **28**, 357 (1948); *J. Bang & O. Bentzen*, Acta Pharmacologica et Toxicologica **3**, 252 (1947).

Hemmzone ist nicht einfach, weil ja die ST-Konzentration in einem bestimmten Abstand r vom Loch als Zentrum nicht konstant ist, sondern sich mit der Zeit ändert. Der Konzentrationsablauf als Funktion von Zeit und Radius kann nach den Diffusionsgesetzen berechnet werden[1]). In einer besonderen Studie ist dieser Konzentrationsablauf bei der Agar-Cup-Methode mit Hilfe des ^{35}S-indizierten Sulfathiazols experimentell gemessen worden[2]).

Bei Zugabe von PAB bei den Agar-Cup-Versuchen wird der Hemmzonenradius entsprechend kleiner. Die in Tabelle 4 angegebene Reduktion der Empfindlichkeit gibt an, wievielmal grösser man nach PAB-Zusatz die ursprüngliche ST-Konzentration machen muss, um den gleichen Hemmzonenradius zu erhalten wie ohne PAB-Zusatz.

Aus diesen Versuchen geht ferner hervor, dass für (A) = 0,25 γ/cm^3:

$$13. \quad \frac{(S)_{g\,0{,}25}}{(S)_{g\,0}} = 16{,}3;$$

d.h., dass bei (A) = 0,25 γ/cm^3 (S) 16,3mal grösser gemacht werden muss, um die gleiche Hemmung zu erzielen wie bei (A) = 0.

Nach Gl. 10 müsste aber für ein bestimmtes (A) > 0 (S) $= \infty$ gemacht werden, um (BS) = $(BS)_0$ zu erhalten, d. h. es ist unmöglich, alle PAB vollständig von den Rezeptoren zu verdrängen. Durch entsprechende Erhöhung von (S) in Gl. 10 kann man jedoch beliebig nahe an $(BS)_0$ herankommen. Aus den Versuchen in Tabelle 4 geht nun hervor, dass für $(S)_{g\,0{,}25} = 16{,}3 \cdot (S)_{g\,0}$ (Gl. 13) diese Annäherung genügt, um den messbar gleichen Hemmzonenradius zu erzielen wie mit $(S)_{g\,0}$ bei (A) = 0.

Das für die bakteriostatische Grenzkonzentration charakteristische Verhältnis (A)/(S) erhält dann in der Versuchsreihe Tabelle 4 die Werte[3])

$$\frac{0{,}25}{16{,}3\,(S)_{g\,0}} \cdot \frac{0{,}5}{30{,}9\,(S)_{g\,0}} \quad \text{usw.}$$

Nach Gl. 12 und nach den Überlegungen zur bakteriostatischen Grenzkonzentration sollte dieses Verhältnis konstant sein[4]). Prüft man diese Forderung nach, indem man die experimentell ermittelten

---

[1]) *J. Vesterdal*, Estimation and Standardization on Penicillin, København 1947.

[2]) *J. Bang*, Veröffentlichung im Druck.

[3]) $(S)_{g\,0}$, d.h. bakteriostatische Grenzkonzentration von ST bei PAB-Konzentration = 0.

[4]) Für die Gültigkeit einer linearen Beziehung hat als weitere Bedingung zu gelten, dass die Diffusion des ST in der Agarplatte proportional zur eingefüllten Konzentration erfolgt, solcherart, dass beispielsweise bei Zugabe der doppelten ST-Konzentration in den Cup sich die während der Diffusion in jedem Punkt der Platte auftretenden Konzentrationen entsprechend verdoppeln. Nach den Diffusionsgleichungen, in welchen die Konzentration als konstanter Faktor auftritt, trifft diese Bedingung also ebenfalls zu.

(S)-Werte in einem Koordinatensystem gegen die (A)-Werte aufträgt (Fig. 4), so erhält man eine Gerade. Die Forderung der Theorie wird also durch das Experiment bestätigt.

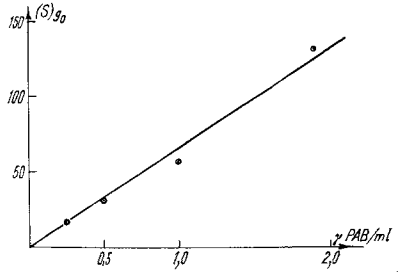


Fig. 4.

Wir danken Herrn Dr. *Maaløe* für zahlreiche Anregungen und Diskussionen auch an dieser Stelle bestens.

Zusammenfassung.

Es wird die Synthese eines mit ^{35}S indizierten 2-(p-Aminobenzolsulfonamido)-thiazols (ST) angedeutet und dessen Aufnahme durch Escherichia coli beschrieben.

Die durch die Bakterien aufgenommenen ST-Konzentrationen sind von der Inkubationszeit abhängig und lassen sich durch Behandlung der Bakterien mit destilliertem Wasser nicht herauswaschen. Zusatz von steigenden PAB-Konzentrationen zum ST enthaltenden Nährmilieu bewirkt eine Reduktion der ST-Aufnahme. Es stellt sich hierbei in den Bakterien eine ST-Grenzkonzentration ein, die durch weiteren PAB-Zusatz nicht mehr reduziert wird. Daraus wird geschlossen, dass die gemessene Aktivität sich aus einem in der Zelle freien und einem reversibel an die spezifischen Rezeptoren gebundenen Anteil zusammensetzt.

Die Resultate werden auf Grund des Massenwirkungsgesetzes mathematisch behandelt und im Sinne der Verdrängungstheorie interpretiert. Ein Zahlenwert für die Verdrängungskonstante k_3 wurde bestimmt. Zur Kontrolle unternommene Versuche nach der Agar-Cup-Methode werden zur Bestätigung der Theorie ins Diskussionsergebnis einbezogen.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel
und Staatliches Seruminstitut, Kopenhagen.