

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE.  
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES.

---

N° 9.

Novembre

1905.

---

- Sommaire:** 53. MM. FR. KRZYSZTAŁOWICZ et M. SIEDLECKI. Contribution à l'étude de la structure et du cycle évolutif de *Spirochaete pallida* Schaud.  
54. MM. T. MOLDENHAUER et I. TARCHANOFF. Sur la radio-activité induite et naturelle des plantes et sur son rôle probable dans la croissance des plantes.  
55. M. F. TONDERA. Sur l'influence du courant d'air sur les pousses en croissance.  
56. M. L. MARCHLEWSKI. Sur l'origine de la choléhématine.  
57. MM. L. MARCHLEWSKI et LAD. MATEJKO. Études sur la bixine.
- 

Séance du lundi 6 Novembre 1905.

PRÉSIDENCE DE M. N. CYBULSKI.

53. MM. FR. KRZYSZTAŁOWICZ et M. SIEDLECKI m. c. **O budowie i rozwoju *Spirochaete pallida* Schaud.** (*Contribution à l'étude de la structure et du cycle évolutif de *Spirochaete pallida* Schaud.*). Note préliminaire.

(Planche XVIII.)

Ce printemps MM. Schaudinn et Hoffmann<sup>1)</sup> firent paraître un travail dans lequel ils démontrent que dans les lésions syphilitiques on trouve des spirilles à caractères constants. Dans l'article que nous avons publié dans la Revue médicale polonaise<sup>2)</sup> et dans les „Monatshefte für praktische Dermatologie“ nous avons constaté également, que dans les accidents syphilitiques primitifs et secondaires on peut aisément découvrir des spirilles en plus ou moins grande quantité. En outre, nous avons fait remarquer qu'en dehors de ces spirilles isolés, on en rencontre par groupes, par chapelets en colonne, qu'il y en a de beaucoup plus gros que ceux, qu'on signale ordinairement; enfin nous avons décrit des spirilles bifurqués et comme entrelacés. Nous observions à ce propos, que la bifurcation de ces

<sup>1)</sup> Schaudinn et Hoffmann. Arbeit. aus dem Kais. Ges. Amte 1905.

<sup>2)</sup> a) Krzysztalowicz i Siedlecki. Przegląd lekarski 1905; b) mêmes auteurs: Monatshefte f. prakt. Dermat. 1905.



spirilles peut être considérée comme une période de la division longitudinale, se passant d'une manière analogue à celle qu'avait décrite Schaudinn<sup>1)</sup> chez le *Spirochaete ziemannii*.

Après notre publication parut toute une série de travaux sur le même sujet, qui en termes plus ou moins exprès ont affirmé la présence des spirilles dans les divers accidents de la syphilis récente et de la syphilis héréditaire.

Toute fois, Schaudinn et Hoffmann ont constaté dans leurs recherches la présence de deux espèces de spirilles dont ils indiquent, comme suit, les caractères particuliers: „l'une de ces espèces se distingue par ce que les spirilles vivants sont très réfringents, que leur forme est plus constante et d'aspect plus raide, que leurs spires sont moins aiguës, plus larges et qu'ils se colorent en même temps avec facilité par tous les colorants employés pour colorer les autres spirilles (violet de gentiane, fuchsine phéniquée, teinture de Romanowsky etc.). C'est pour cela que cette variété a été dénommée „type foncé“. On n'a pas découvert de spirilles de ce genre dans les accidents syphilitiques proprement dits, mais toujours (5 cas) dans les condylomes acuminés. L'autre espèce est composée de spirilles qui, pendant la vie, sont fort délicats et réfractent faiblement la lumière, qui sont pourvus de spires plus étroites et plus aiguës et se colorent difficilement par les procédés précédents. Cette seconde variété a été désignée sous le nom de „type pâle“; on l'a rencontrée dans toutes les productions syphilitiques étudiées; jusqu'ici on n'est pas parvenu à découvrir des différences plus accusées entre ces deux variétés. Ce n'est que l'observation du développement de ces parasites qui pourrait définitivement nous apprendre, si nous avons affaire à deux espèces distinctes“. Schaudinn propose dans le cas, où il serait établi que ce sont bien deux types différents, d'attribuer dans le système zoologique au premier type le nom de *Spirochaete refringens*, au second celui de *Spirochaete pallida*.

Dans un travail qui vient de paraître, Schaudinn<sup>2)</sup> nous soumet une description plus détaillée des caractères morphologiques des deux espèces de spirilles et appelle tout spécialement l'attention sur cette particularité, que le *Spir. pallida* possède aux deux extrémités du corps des cils, qui font défaut chez le *Spir. refringens*;

<sup>1)</sup> Schaudinn. Arb. aus dem Kais. Ges. Amte 1904.

<sup>2)</sup> Schaudinn. Deutsch. med. Wochsch. 1905.



ainsi que sur les différences qui existent dans la disposition de la membrane ondulante chez les deux types.

Au cours de nos études sur les accidents siphilitiques, souvent compliqués, se produisant aux parties génitales de l'homme ou de la femme, nous y avons constaté de spirilles fort différents du spirille pâle; aussi, conformément à l'opinion de MM. Schaudinn et Hoffmann nous les avons considérés comme spirochète réfringent. En dehors des particularités, signalées par Schaudinn, et surtout de sa faculté de se colorer fortement, il faut encore remarquer l'épaisseur du spirille, identique dans toute sa longueur, et l'absence des extrémités en pointe qui caractérisent le spirille pâle. Les spires, d'ordinaire plus larges, inégales, d'une épaisseur beaucoup plus considérable et sans amincissements, comme cela a lieu chez le spirille pâle, une coloration uniforme fortement prononcée, enfin l'extrémité obtuse, telles sont les caractères distinctifs du spirille réfringent dont la forme se rapproche beaucoup plus de celle des autres spirilles connus que de celle du spirochète pâle.

Il est aisé de reconnaître le spirille pâle au premier coup d'oeil à son corps filiforme, pointu aux deux extrémités, non moins qu'à ses spires resserrées et aiguës. Ces particularités sont si tranchées que dans les préparations il est très facile de discerner les deux formes, si l'on a sous les yeux les formes typiques, non modifiées par le développement. Néanmoins, en certaines périodes de son existence *Spirochaete pallida* peut modifier sa forme à un degré assez prononcé et c'est alors que les différences entre les deux espèces s'atténuent sensiblement.

Comme on le sait, le *Spirochaete pallida* peut se mouvoir très rapidement, tantôt se portant en avant, en tournant autour de son axe, tantôt se pliant. Au cours de ces mouvements son corps peut se raccourcir légèrement et, par cela même, devenir plus gros, tandis que ses spires ne sont plus aussi serrées et aussi aiguës que précédemment. Chez les individus vivants, au moment de la contraction, le corps entier ressort plus énergiquement et alors il réfracte assez bien la lumière. Dans les préparations on voit fort souvent un épaississement assez considérable du corps à l'endroit soumis à la contraction; souvent aussi presque tout le corps est contracté, et alors une seule, ou bien quelquefois les deux extrémités s'étirent en filaments extrêmement fins absolument semblables à des cils. Nos dessins (fig. 1) représentent les diverses phases du mouvement du spirille



pâle. Il en ressort que la forme typique du spirille (*spirochète*) ne devient apparente que lorsque tout le corps est distendu; au moment de la contraction au plus haut degré, les spirilles prennent une forme un peu analogue à celle d'un petit flagellé (p. ex. *Micromonas*).

En comparant entre elles ces formes diverses on s'aperçoit que l'épaisseur du spirille n'est pas une particularité assez constante pour qu'on puisse la considérer comme un caractère spécifique; de plus, puisque le spirille en état de contraction réfracte assez fortement la lumière et se colore d'une façon assez intense, il ne reste plus pour le distinguer du *Spirochaete refringens* qu'une seule différence tranchée, à savoir: les terminaisons effilées des extrémités.

Dans son dernier travail, Schaudinn (l. c.) décrit les cils terminaux du *Spirochaete pallida*. Néanmoins, le dessin schématique que ce savant nous soumet, ne permet pas de penser que ce qu'il décrit comme cils, soit une autre chose, que l'extrémité effilée du corps du Spirille pâle. Sur nos préparations colorées par la méthode de Giemsa et surtout par celle de Marino, nous avons trouvé fort souvent des formes absolument semblables à celles que Schaudinn décrit sous le nom de cils (fig. 1); nous ne pouvons cependant les considérer que comme une des phases de l'allongement du corps.

Le mouvement du Spirochète pâle, qui souvent peut se porter en avant très vite, sans qu'il se modifie pourtant alors d'une façon bien apparente, permet de supposer que cet animal possède une sorte d'appareil locomoteur. Schaudinn, en effet, admet l'existence d'une membrane ondulante, courant en spirale tout le long de son corps. Sur nos préparations nous avons observé souvent des contours pâles, entourant l'axe fortement teinté du corps du spirille, mais il ne nous a pas été donné jusqu'ici de constater l'existence d'une membrane ondulante; nous pensons pourtant que les remarques de Schaudinn sont tout à fait autorisées.

D'après les descriptions connues du *Spirochaete pallida*, il a été impossible de déterminer exactement l'endroit, où se trouve le noyau du spirille. Dans notre dernière notice nous avons laissé aussi cette question sans la résoudre. Ce n'est qu'à l'aide d'une petite modification de la méthode de Marino<sup>1)</sup> que nous sommes parvenus

<sup>1)</sup> Les préparations fixées à l'alcool absolu ou bien à l'acide osmique, ont été placées dans de l'alcool méthylique pendant 10 minutes, après quoi seulement nous les avons colorées par la méthode de Marino.



à discerner dans les spirilles certaines parties du corps de structure différente, qu'il faut certainement considérer comme leur noyau<sup>1)</sup>. Nous les avons observées d'abord dans les spirilles dont le corps n'était pas uniformément plissé, mais était redressé à peu près vers la moitié de sa longueur (fig. 1). Ces spirilles sont très abondants et si l'on réussit à bien colorer la préparation, on y voit toujours un petit espace clair à l'endroit sans pli. A cet endroit les côtés du spirille sont droits ou gonflés d'une façon presque insensible, et ses contours se dessinent d'une façon extrêmement délicate, tandis que le centre même du corps semble percé de part en part. Avec une certaine expérience on peut apercevoir cet espace clair presque dans chaque spirille, pourvu que la préparation ne soit pas trop fortement teintée, ou que les spires du sujet ne soient pas trop serrées. Nous avons observé ces corps chez des spirilles provenant aussi bien de l'accident primitif que des éléments éruptifs secondaires. Ils sont très apparents chez les spirilles légèrement contractés et plus gros que d'ordinaire, où ils se manifestent comme un espace clair, arrondi. Avec une bonne lumière et une certaine expérience on peut les voir sur toutes les préparations, quelle que soit la méthode mise en usage pour les colorer.

A notre avis cet espace, vide en apparence, répond entièrement au noyau cellulaire. On sait que chez beaucoup de protozoaires, surtout dans le groupe de Sporozoaires, le noyau est très souvent pauvre en chromatine. Chez les Coccidies, par exemple, on reconnaît parfois seulement les contours du noyau se détachant du protoplasma cellulaire; toute la chromatine est contenue dans le caryosome et dans la membrane nucléaire. Nous pensons que c'est aussi le cas des noyaux de *Spirochaete pallida*, et qu'ils ne contiennent que très peu de chromatine; c'est pourquoi dans les préparations ils ont l'apparence d'espaces vides.

Il est cependant très possible que la totalité de substance chromatique, contenue dans le spirille, ne soit pas renfermée dans ce noyau transparent. Souvent nous avons remarqué des traces d'une coloration plus foncée, ou même parfois des corpuscules extrêmement ténus, fortement colorés, comme une sorte de caryosome, sur

<sup>1)</sup> MM. Wechselmann et Löwenthal ont remarqué également chez certains individus de *Spir. pallida*, à l'aide de l'ultramicroscope des formations qu'ils considèrent comme noyau. (Cité d'après Hübner Dermatol. Zeitsch. 1905).



un des côtés du noyau transparent. Mais ce sont des choses si fines, si difficiles à contrôler et à apercevoir que nous ne saurions affirmer actuellement rien de positif à leur sujet.

Le *Spirochaete pallida*, dans la période où il a la forme typique d'un spirille, est une cellule avec un noyau, capable de se contracter et par cela même de modifier la forme de son corps dans une mesure assez considérable. Ces propriétés permettent déjà de le discerner des bactéries et de le placer plutôt parmi les Protozoaires.

Dans la période de son existence où *Spirochaete pallida* a la forme caractéristique d'un spirille, il peut se reproduire par division. Dans notre dernière note nous avons décrit ce mode de reproduction et donné un dessin représentant ce stade; aujourd'hui Schaudinn confirme nos observations.

Le plan de division chez *Spirochaete pallida* passe tout le long du corps (fig. 2) de telle sorte que le spirille se divise en deux parties égales. Cette division commence à une des extrémités du corps, de manière qu'au début l'animal a l'aspect d'une fourche. Les mouvements et les contractions qui caractérisent cette espèce ne cessent pas pendant tous les stades de la division; aussi lorsque ce travail de séparation des deux cellules filles est assez avancé, elles peuvent s'enrouler l'une autour de l'autre (fig. 2), ainsi que le font d'autres espèces des spirilles.

Enfin la séparation fait des progrès tels, que les spirilles ne se tiennent plus que par une de leurs extrémités. A cette période les phénomènes de la séparation peuvent subitement s'arrêter et les deux animaux restent liés par une de leurs extrémités (fig. 2, 3). Ils peuvent rester enlacés mutuellement, ou encore se redresser et se placer sur un seul axe, donnant ainsi l'image d'un seul spirille fort long<sup>1)</sup>. Toutefois, d'après les rétrécissements du corps et surtout d'après les noyaux particuliers à chacun des fragments, il est aisé de reconnaître chacun des spirilles et de le distinguer d'un seul spirille allongé. Il est fort possible que les spirilles ne cessant pas d'être en communication puissent encore une fois se diviser. On voit souvent sur les préparations des colonies du spirille composées de deux individus, autour desquels s'enroulent les autres; souvent aussi on voit

<sup>1)</sup> Les spirilles très longs ont été considérés comme une sorte de colonie par Wechselmann et Löwenthal. (l. c.).



plusieurs spirilles réunis sur une seule ligne (fig. 3). De cette façon il est possible que les colonies se forment par voie de division.

La division peut contribuer à multiplier le nombre des individus, par voie de reproduction agame. Ce n'est pas cependant le procédé unique de reproduction de cet animal; en examinant les préparations faites des matériaux puisés chez des malades présentant des accidents syphilitiques exceptionnellement graves ou négligés pendant longtemps, nous avons trouvé toute une série des formes des spirilles qui permettent de penser que cet animal peut modifier son aspect et passer par tous les stades de la reproduction sexuelle. Après avoir étudié ces formes sur nos préparations, nous avons pu ensuite les rechercher et les rencontrer dans des matériaux frais et observer l'animal vivant, sa forme et ses mouvements.

Pour la première fois nous avons rencontré ces formes dans une grande lésion syphilitique primitive dans la fosse rétroglandulaire; cette ulcération était en partie gangrenée à cause d'une infection surajoutée, mais lorsqu'il nous a été donné de l'observer elle commençait déjà à se cicatrifier et à guérir spontanément. Plus tard nous avons rencontré ces formes chez d'autres malades atteints d'accidents secondaires négligés pendant longtemps et tout spécialement dans les papules érosives purulentes qui n'étaient pas traitées depuis deux mois.

Le meilleur colorant de ces corps est le bleu de Marino, après le traitement préalable de la préparation par l'alcool méthylique; mais on peut les voir sur des préparations colorées par d'autres méthodes, même par l'hématoxyline de Böhmer. Leur structure et ses détails se sont montrés les mêmes aussi bien dans les préparations desséchées que dans celles fixées par les vapeurs d'acide osmique.

\*  
\*  
\*

Nous avons déjà fait remarquer plus haut que le *Spirochaete pallida* peut se raccourcir considérablement par contraction de son corps, et qu'au moment où cette contraction est très prononcée, elle a quelque ressemblance avec un petit flagellé. En examinant les préparations provenant des matériaux ci-dessus décrits, nous y avons rencontré des corps d'une forme analogue à celle des spirilles ordinaires contractés, mais en différant par les dimensions et par les détails de leur structure. Tandis que chez un spirille ordinaire, au



moment de sa contraction la plus violente, la longueur du corps est 30—40 fois plus considérable que son épaisseur, les spirilles en question sont beaucoup plus gros (fig. 4, 6), leur épaisseur, en effet, au point où elle est la plus forte, est à peu près d'un vingtième de leur longueur. Leur corps fusiforme, d'une longueur de  $7\ \mu$  environ, a une de ses extrémités terminée en filament assez long, et l'autre à terminaison beaucoup moins aiguë. Du côté de cette dernière extrémité, au quart environ de la longueur totale, et en même temps à l'endroit de la largeur maxima, se trouve un noyau bien apparent. Ce noyau a l'aspect d'une vésicule ovoïde à contours fort tranchés et d'une coloration foncée; il semble complètement transparent ou parfois légèrement teinté en bleu, mais sans contenir toutefois un réseau chromatique bien distinct. A l'une des extrémités du noyau, tournée vers la partie allongée du corps de l'animal, se trouve un corpuscule se colorant en rouge par la méthode de Marino (fig. 4). Tout le corps de l'animal dans ce stade se colore à peu près entièrement d'une façon uniforme; toutefois chez les spirilles d'une dimension assez grande on peut reconnaître une sorte de filament, de coloration foncée, courant le long de la surface du corps, ou entourant ce dernier de tours légèrement spiraux et aboutissant à l'endroit où se trouve le corpuscule rougeâtre près du noyau (fig. 4 a, b).

Un simple coup d'oeil jeté sur les fig. 4 et 6 suffit pour être convaincu de la ressemblance des ces formes avec les animaux appartenant au genre *Trypanosoma*. Le petit corpuscule fortement teinté en rouge rappelle tout à fait le blépharoblaste des trypanosomes, et le filament foncé sur le corps n'est que le bord de la membrane ondulante.

En nous appuyant sur ces observations, nous pouvons avancer que le *Spirochaete pallida* peut, à un certain moment de son existence, passer par le stade trypanosome.

Les recherches exécutées sur les individus vivants écartent toute incertitude sur ce sujet. Ces spirilles vivants réfractent la lumière assez fortement, quoique un peu plus faiblement que *Spirochaete refringens*, et il est assez facile d'étudier leur structure et leurs mouvements. Leur corps allongé est d'ordinaire légèrement recourbé en arc et seule son extrémité pointue opère quelques légers mouvements serpentins; malgré les changements peu prononcés de la forme du corps, ces animaux se meuvent assez vivement, grâce à la mem-



brane ondulante. Ils tournent sur place ou s'avancent, en décrivant avec tout leur corps une ligne en spirale; leurs mouvements présentent une grande analogie avec ceux du trypanosome.

Les détails de la structure, non moins que le mode caractéristique du mouvement, ne peuvent être bien constatés que chez des sujets de grandes dimensions, parvenus à l'état de développement complet; chez les individus plus petits la membrane ondulante n'est que peu apparente, et c'est seulement d'après les mouvements de l'animal qu'on peut supposer chez lui l'existence de cet organe. Les sujets très petits se rapprochent, quant à leur structure et à leur forme, des spirilles contractés (fig. 6). Cette transition graduelle entre les spirilles et les trypanosomes, permet à penser que ces derniers proviennent des spirochètes par croissance. Il est alors très probable que tous les organes visibles chez les trypanosomes se trouvent aussi chez les spirochètes, mais ils y sont trop fins pour que l'on puisse les y constater et les y étudier.

La constatation de se fait que les trypanosomes et les spirochètes appartiennent à un seul et même cycle évolutif d'un animal, jette une vive lumière sur la nature de ces formes que nous désignons sous le nom de *spirilles* ou *spirochètes*. Ce ne sont point des bactéries, ainsi qu'on le croyait jusqu'à ce temps, mais ce sont des Protozoaires appartenant au groupe des Flagellés. Nos recherches exécutées sur le *Spirochaete pallida* confirment l'opinion de Schaudinn<sup>1)</sup>, qui, comme nous, met les spirilles au nombre des Protozoaires.

Le trypanosome qui représente une forme du développement du *Spirochaete pallida*, peut être placé dans le système des Protozoaires, à côté des autres animaux du même genre, et nous proposons pour cette espèce le nom de *Trypanosoma luis*.

Arrivé au stade trypanosome l'animal ne perd pas la faculté de la reproduction agame. Il peut se multiplier par division longitudinale, laquelle commence par la bifurcation de la partie plus effilée de son corps (fig. 5). Quelles sont les modifications auxquelles serait soumise chacune de ces parties du corps pendant la division — nos recherches ne nous ont pas encore permis de répondre à cette question. Nous pouvons pourtant faire remarquer que, dans les stades où commence la division du corps du trypanosome, il ne nous a pas été donné de distinguer son noyau, et seulement en certains points

1) Schaudinn. Arb. aus dem Kais. Ges. Amte 1904.



de son corps une coloration plus foncée était perceptible (fig. 5, a), probablement causée par des changements dans le noyau.

Comme nous le verrons plus loin, dans l'évolution de *Spirochaete pallida* le stade trypanosome joue le rôle de la cellule femelle ou macrogamète.

Sur les mêmes préparations où nous avons observé *Trypanosoma luis*, nous avons vu aussi des spirilles qui de prime abord semblaient différer énormément de la forme type du *Spirochaete pallida*. Beaucoup plus longs et un peu plus gros que les individus moyens, ils présentaient (fig. 7, 8) chacun quelques noyaux fort accusés, où il était beaucoup plus aisé, que chez les autres formes, de constater les contours bien tranchés et le corpuscule fortement coloré. Les deux extrémités de ces formes allongées se terminaient en pointes et même en plusieurs cas s'étiraient en filaments. Chez certaines d'entre elles les noyaux étaient assez nombreux (fig. 7); chez d'autres ils l'étaient moins (fig. 8). Le corps de ces formes était d'une épaisseur uniforme dans toute sa longueur, et il n'était pas possible de reconnaître un amincissement dans des espaces entre les noyaux; leurs spires étaient un peu plus larges que chez les spirilles ordinaires.

A côté de ces formes allongées à noyaux multiples, nous avons rencontré aussi fort souvent des formes très petites, courtes (longueur  $3 \mu$  environ) et très minces, terminées en pointe à leurs deux extrémités et absolument semblables à une des spires isolée de l'animal allongé à noyaux multiples, dont nous venons de parler (fig. 9 a, b). Le corps de ces courts animalcules est d'ordinaire seulement arqué ou recourbé légèrement en un pli sinueux. Dans les préparations bien colorées, on voit chez eux un noyau, de structure identique à celle que nous avons observée chez les individus à plusieurs noyaux. Souvent aussi ces petites formes se rencontrent par groupes, réunies bout à bout par leurs extrémités, et alors leur disposition rappelle celle d'un grand spirille à noyaux multiples, mais s'en distingue toutefois par des rétrécissements, se manifestant entre deux individus. Ces petites formes peuvent aussi se diviser longitudinalement, après quoi les individus filles peuvent parfois rester liés par leurs extrémités. Il est possible que leurs divisions se succèdent avec une grande rapidité, de telle sorte qu'un animal, provenant d'une forme déjà très petite, pas encore parvenu à la taille de la cellule mère, commence à se diviser à son tour. A cause de



cette division répétée, les dimensions de ces petits spirilles s'amoin-  
drissent à un tel degré que l'on ne peut plus les étudier dans leurs  
détails même avec le secours des grossissements considérables.

En comparant la série de formes de transition entre les grands  
spirilles à noyaux multiples et les petits, nous sommes parvenus  
à la conclusion suivante: les petits individus sont produits par le  
fractionnement des grandes formes à noyaux multiples en fragments  
mononucléaires.

Il est facile de s'expliquer la formation des formes à noyaux  
multiples, si l'on se rappelle que les spirilles de structure ordinaire  
peuvent après leur division rester liés l'un à l'autre; les divisions  
ultérieures de ces spirilles, ainsi attachés, peuvent donner naissance  
à des colonies. Si entre les individus, réunis en colonie, survient  
une liaison plus étroite, ils doivent former un individu complète-  
ment uniforme à plusieurs noyaux. Nous supposons toutefois qu'au  
moment où s'opère entre ces spirilles cette liaison étroite, ils doi-  
vent éprouver certaines modifications, qui amènent ultérieurement  
la colonie en dissolution à former des petits individus courts et non  
des spirilles proprement dits.

Étudiés sur des matériaux frais, ces petits individus ont l'aspect  
de petits serpents, réfractants assez fortement la lumière, et se meu-  
vent d'une manière très caractéristique. Ils tournent sur place, virant  
sans cesse autour de leur axe vertical; s'ils s'avancent, ils opèrent  
ce mouvement en décrivant une ligne en spirale, formée des tours  
très serrés et d'une très petite étendue.

Ces petites formes jouent à notre avis le rôle des cellules mâles  
ou microgamètes. Quoique nous les ayons rencontré tout aussi bien  
dans des infiltrations primitives syphilitiques que dans des accidents  
secondaires, surtout dans les papules sèches et les papules érosives,  
il ne nous a été permis de discerner leur rôle que dans un seul  
cas, à savoir, dans des matériaux pris d'une fort grande ulcération  
primitive qui commençait à se cicatrifier spontanément.

Dans les préparations faites avec le liquide provenant de cette ulcé-  
ration ces petites formes étaient attachées aux grands individus que  
nous avons précédemment décrits sous le nom de *Trypanosoma luis*.  
A côté des grands individus on voyait un petit spirille en croissant,  
qui (fig. 10) au commencement seulement touche, par une des ses  
extrémités, le corps du trypanosome; puis la limite entre les deux  
formes s'efface et l'on ne voit plus que l'extrémité du spirille en



croissant ressortant sur le côté du trypanosome; les deux individus finissent ensuite par se confondre complètement (fig. 10).

Jusqu'ici nous ne sommes pas parvenus à observer d'autres modifications dans les noyaux des individus qui se fusionnent, que seulement la disparition apparente de l'appareil nucléaire dans la période, où sur le côté du grand individu reste visible seulement l'extrémité du petit.

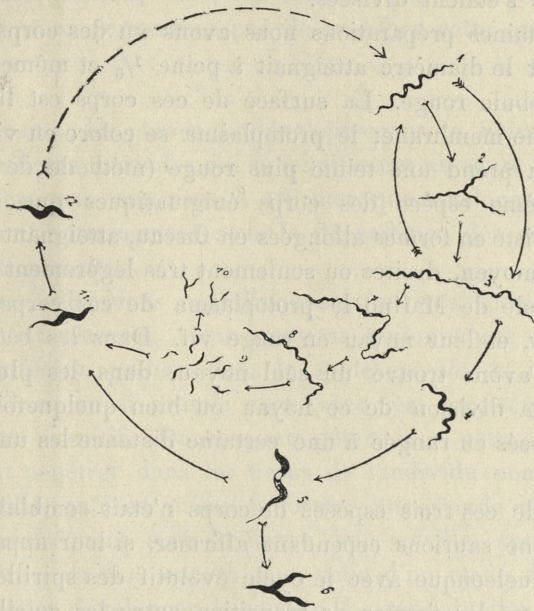
Il ne nous a pas été non plus possible de savoir ce que devient le Trypanosome après la fécondation. En observant ce malade, chez lequel nous avons pu voir *Spirochaete pallida* dans la période de sa reproduction sexuelle, quelques jours après la découverte de ces phénomènes nous n'avons constaté plus rien que la présence des spirilles ordinaires, et encore ceux-ci étaient-ils fort rares. A notre avis, après la fécondation, *Trypanosoma luis* peut vraisemblablement passer par une période de repos sous une autre forme que celle d'un spirille ou d'un trypanosome, et probablement sous la forme de kyste ou de spore. Mais de quelle façon puisse se produire cette transformation et quelle forme peut prendre ce spore, il ne serait, pensons-nous, possible de le trouver qu'en observant la marche normale de la maladie chez un malade qui ne serait soumis à aucun traitement; il est possible alors que l'examen des singes, surtout des anthropoïdes auxquels la syphilis est inoculable, conduirait dans cette voie à des résultats précieux. Des recherches de ce genre demandent à être exécutées sur une grande échelle et pendant un espace de temps assez prolongé: nous nous voyons forcés de les remettre à plus tard.

Done, quoique le sort du *Trypanosoma luis* après sa fécondation nous soit resté inconnu, nous pouvons néanmoins, en nous appuyant sur les faits que nous venons de rapporter, ainsi que sur ce que nous savons de l'histoire du développement des autres protozoaires, présenter brièvement comme suit le cycle de son évolution (voir le dessin schématique).

La forme du *Spirochaete pallida* découverte par Schaudinn (1) peut se multiplier par division longitudinale (2—3), et de cette manière la quantité des individus peut augmenter considérablement; les divisions répétées représentent le cycle de l'évolution agame ( $\rightleftharpoons$ ). Après quelques divisions consécutives quelques-uns des individus se raccourcissent (4) et se transforment peu à peu en trypanosomes (5), qui, eux aussi, peuvent se multiplier par division (6).



D'autres individus de *Spirochaete pallida* après plusieurs divisions consécutives, peuvent donner naissance à une colonie (7—8) qui peut ensuite se résoudre en petits individus en forme des petits serpents (9), aptes également à se reproduire par division. Les trypanoso-



mes (= macrogamètes) et les petits spirilles (= microgamètes) s'unissent entre eux (11—12); après que les phénomènes de la fécondation sont terminés, survient probablement une période de repos pendant laquelle l'animal prend une autre forme du corps, peut être de kyste ou de spore; de ce stade de repos peut surgir de nouveau et directement un individu en forme de spirochète proprement dit.

Dans le schéma du cycle évolutif nous avons marqué par une ligne interrompue ces périodes de développement dans lesquels, pensons-nous, le parasite doit prendre la forme d'un stade de repos. En étudiant les préparations, provenant de diverses manifestations, syphilitiques récentes, nous avons rencontré quelques espèces de formes variées, dont nous ne saurions actuellement déterminer la signification.

La première espèce de ces formes (fig. 11 a) qui se trouve tout aussi bien dans les accidents primitifs que dans les éruptions secondaires, était composée des corps allongés, approximativement de la



longueur de la moitié du diamètre du globule rouge, en forme d'un croissant, arrondis à leurs deux extrémités. Leur protoplasma se colorait fortement en rouge-foncé, et au centre du corps on voyait le noyau. Parfois deux de ces formes restaient réunies, comme si préalablement elles s'étaient divisées.

Dans certaines préparations nous avons vu des corps (fig. 11 b) arrondis dont le diamètre atteignait à peine  $\frac{1}{6}$  et même  $\frac{1}{8}$  du diamètre du globule rouge. La surface de ces corps est lisse, comme entourée d'une membrane; le protoplasma se colore en violet, tandis que le noyau prend une teinte plus rouge (méthode de Marino).

La troisième espèce des corps énigmatiques que nous avons aperçus, consiste en formes allongées en fuseau, atteignant la longueur d'un spirille moyen, droites ou seulement très légèrement recourbées; par la méthode de Marino le protoplasma de ces corps se colorait en bleu clair, et leur noyau en rouge vif. Dans les bâtonnets plus courts nous avons trouvé un seul noyau, dans les plus longs on remarquait la division de ce noyau ou bien quelquefois plusieurs noyaux disposés en rangée à une certaine distance les uns des autres (fig. 11 c)<sup>1</sup>.

Aucune de ces trois espèces de corps n'était semblable aux bactéries; nous ne saurions cependant affirmer, si leur apparition reste en rapport quelconque avec le cycle évolutif des spirilles, car nous n'avons pas vu les formes de transition entre les spirilles, à n'importe quel degré de leur développement, et ces corps.

Nous avons observé les formes les plus curieuses dans un liquide séreux extrait d'une vésicule produite sur une papule sèche par une légère cautérisation (fig. 12). C'étaient des formes allongées, recourbées en ondulations irrégulières, formes beaucoup plus longues et beaucoup plus larges que les spirilles ordinaires; aux extrémités de ces corps on apercevait une sorte d'élargissement, peu prononcé sur quelques-uns, sur d'autres, au contraire, très apparent, très grand et étiré en un prolongement amiboïde irrégulier (fig. 12). Le protoplasma de ces formes se colorait en teinte bleuâtre et l'on y voyait quelques noyaux disposés soit dans la partie allongée, soit dans le prolongement amiboïde.

Nous n'avons pu jusqu'ici établir la signification des formes ci-

<sup>1</sup>) Il est possible que les formes mentionnées par Löwenthal soient du même genre que celles que nous avons étudiées. (Löwenthal, cité d'après Hübner l. c.).



dessus décrites; quelques-unes d'entre elles ressemblent un peu aux figures que donne Siegel dans ses travaux sur *Cytorrhycles luis* (p. ex. dans les Münch. Med. Wochsch. 1905). Il est fort possible qu'un de ces corps énigmatiques soit réellement une forme évolutive du *Spirochaete pallida*; mais les données que nous possédons actuellement ne nous permettent pas de trancher cette question.

En comparant les phases du développement du *Spirochaete pallida* avec les accidents morbides qui se manifestent au cours de la syphilis, nous nous croyons autorisés à affirmer que quelques-uns des ces accidents sont certainement sous la dépendance des certains stades évolutifs du parasite.

Dans les infiltrations syphilitiques primitives, spécialement dans celles qui sont récentes, nous trouvons toujours une grande quantité de *Spirochaete pallida* dans le stade spirille, et il est évident que sa présence en si grande abondance, est précisément la cause de l'accident primitif. Donc, pour déterminer cette infiltration le parasite doit pénétrer dans les tissus de l'individu non infecté sous une forme telle, qu'il en puisse se former une grande quantité d'individus, par conséquent sous la forme d'un spirille, apte à la reproduction agame, ou bien encore sous celle d'un stade de repos, d'où peut sortir et se développer le spirille. La reproduction agame, contribuant à la multiplication des individus du spirochète, devient ainsi la cause des accidents primitifs locaux.

Il est hors de doute qu'à l'état de spirille le parasite peut se répandre dans l'organisme, car on a trouvé des spirilles dans des ganglions lymphatiques tuméfiés, situés près du siège de l'infection initiale. Toutefois nous croyons que l'invasion du parasite dans l'organisme entier, invasion qui détermine l'apparition des accidents secondaires, ne commence à s'opérer avec force qu'après l'achèvement du cycle de reproduction sexuelle et vraisemblablement après la constitution d'un stade de repos (spore). Sous la forme de ce stade résistant, le parasite peut être transporté dans diverses parties de l'organisme; poussé par le courant de la lymphe ou du sang, ce parasite ne saurait avoir aucune action nuisible sur les tissus à travers lesquels il passe; ce n'est que lorsqu'il s'arrête, se fixe, et que de lui se forment des nouveaux spirochètes, que commencent à se manifester les accidents secondaires. L'éclosion des manifestations



secondaires est donc en rapport avec la formation d'une grande quantité de spirilles, qui se multiplient par voie de reproduction agame et proviennent d'un spirille descendant directement d'un stade de repos.

Déterminer les relations qui existent entre les manifestations tardives de la syphilis et l'évolution du parasite serait certainement une chose fort intéressante; malheureusement les recherches ne nous ont pas jusqu'ici donné une solution satisfaisante de cette question.

Travail du Laboratoire d'anatomie comparée de l'Université Jagellonne de Cracovie.

### Explication des figures:

Toutes les figures ont été faites d'après les préparations séchées et fixées à l'alcool. Les contours des figures ont été dessinés le plus soigneusement à l'aide de la chambre claire d'Abbe, d'un objectif apochromatique de Zeiss  $\frac{2.00}{1.30}$  et de l'oculaire compensateur Nr. 12. Les détails ont été étudiés avec les grossissements moins forts.

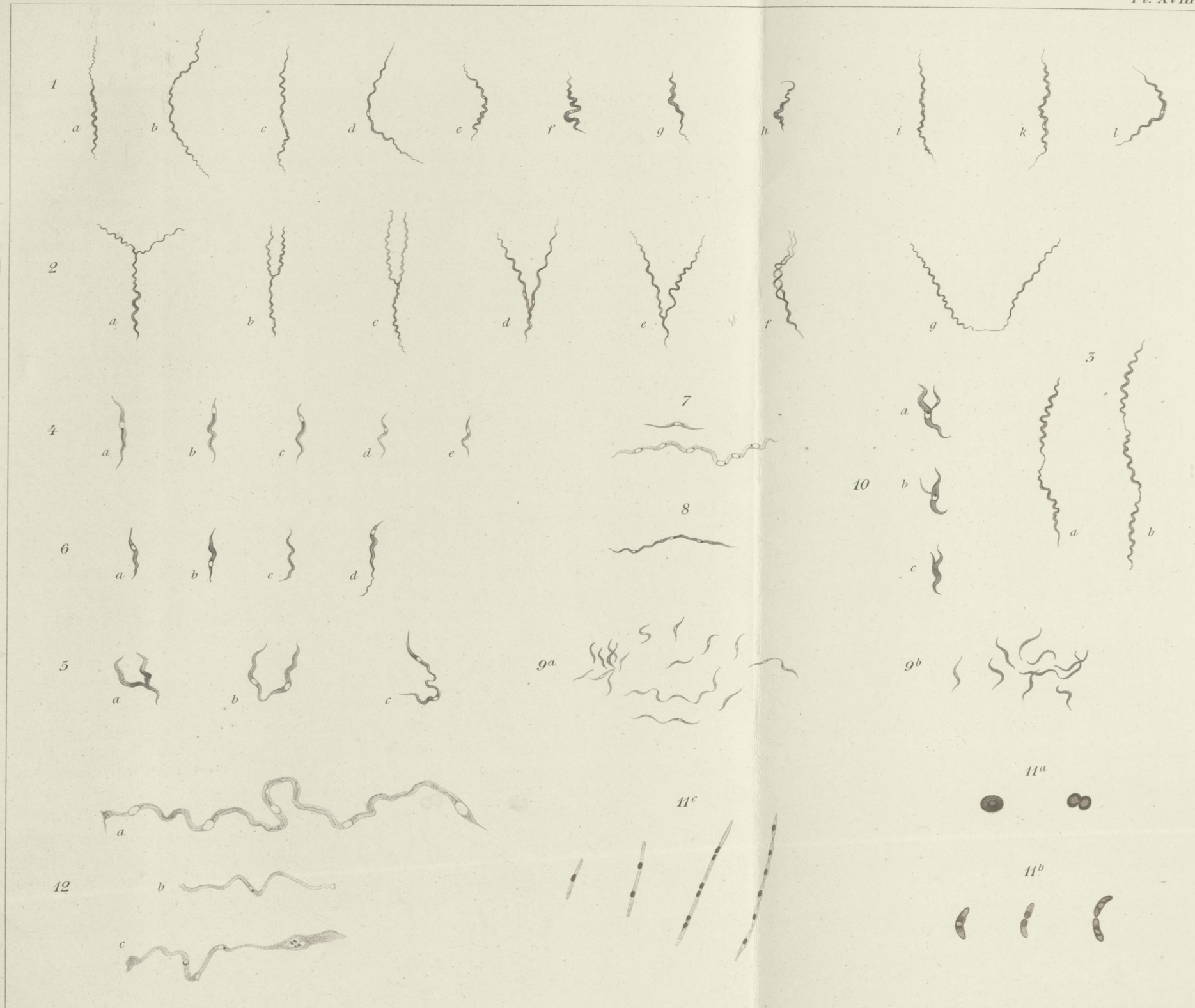
1. Différentes formes de *Spirochaete pallida*.
2. Stades de la division de *Spirochaete pallida*.
3. Colonies des spirilles.
4. *Trypanosoma luis*. Accident primitif. Bleu Marino.
5. Division de *Trypanosoma luis*. Sclerosis initialis. Bleu Marino.
6. *Trypanosoma luis* d'une papule érosive. Bleu Marino.
7. Individu à plusieurs noyaux. Sclerosis initialis. Bleu Marino.
8. Le même stade d'une papule. Bleu Marino.
9. Petits spirilles (Microgamètes). Sclerosis initialis. Bleu Marino.
10. Stades de fécondation. Sclerosis initialis. Bleu Marino.
11. Corps énigmatiques d'une papule érosive. Bleu Marino.
12. Corps amiboïdes d'une vésicule provoquée sur une papule sèche. Bleu Marino.

- 
54. MM. I. TARCHANOFF et T. MOLDENHAUER. O promieniotwórczości indukowanej i naturalnej roślin i o prawdopodobnym jej wpływie na rozwój roślin. (*Sur la radio-activité induite et naturelle des plantes et sur son rôle probable dans la croissance des plantes*). Communication préliminaire. Mémoire présenté par M. N. Cybulski m. t.

Nous présentons ici un bref aperçu des résultats obtenus dans une longue série d'expériences, faites dans cet ordre d'idées, sur les graines en germination et sur les plantes elles-mêmes en différentes périodes de croissance.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude de











la propriété des graines et des plantes de devenir radio-actives sous l'influence de l'émanation du radium, et la seconde — à l'étude de leur radio-activité naturelle. Pour constater la radio-activité des objets soumis à l'expérience, nous nous servions de la méthode électroscopique, ainsi que de la méthode photographique.

Pour soumettre les graines et les plantes à l'influence de l'émanation nous les placions dans des tubes en verre dans lesquels circulait un courant d'air, contenant de l'émanation du radium. Nous nous servions dans ce but de l'appareil construit par nous et décrit dans l'article: „Die Combination der Radiotherapie mit der Organotherapie“ (Berliner klin. Wochenschrift, 1905, Nr. 16). La durée de l'exposition des graines et des plantes à l'émanation variait d'un quart d'heure jusqu'à deux ou trois heures.

§ 1. Voici les résultats des expériences sur la radio-activité induite des graines et des plantes soumises à l'émanation.

1) Les graines des céréales — du blé, de l'orge, de l'avoine, du seigle etc., ainsi que du pois etc., préalablement humectées, après une demie-heure d'action de l'émanation deviennent franchement radio-actives, ce qui se manifeste par leur capacité de décharger l'électroscope et d'impressionner la plaque photographique. Un des pôles des graines des céréales est toujours plus radio-actif que l'autre: c'est justement celui sur lequel va apparaître la racine de la plante future. De toutes les parties, dont est constituée la graine, ce sont surtout les minces, transparentes pellicules internes du tégument qui deviennent les plus radio-actives; ensuite vient l'embryon inclus dans la graine et, en dernier lieu, l'amidon. Cette radio-activité induite des graines se conserve pendant plusieurs jours.

2) Les jeunes plantes, dès les premiers jours de leur sortie de la graine, soumises à l'action de l'émanation, présentent une radio-activité induite qui se manifeste d'une façon inégale dans les différentes parties de la plante: les bouts des racines deviennent ordinairement très radio-actifs, tandis que la tige de la plante, ainsi que les petites feuilles se montrent presque inactives. Il est à remarquer aussi, que parmi les racines multiples d'une plante donnée il s'en trouve qui ne manifestent aucune radio-activité, tandis que les autres racines voisines sont très actives et déchargent promptement l'électroscope et donnent de belles images photographiques. La décharge de l'électroscope se produit beaucoup plus facilement, si nous approchons vers la boule de l'électroscope le bout terminal de



la racine, et non sa surface longitudinale; tandis que pour l'impression photographique le mode d'application de la racine ne joue aucun rôle et l'on obtient toujours les mêmes résultats positifs. Tout les essais photographiques se faisaient suivant la même méthode: une plaque sensible était enveloppée de tous les côtés dans une feuille de plomb, dans laquelle on avait découpé une lettre de l'alphabet; ces endroits découpés donnaient un passage libre aux rayons vers la plaque, et la plante était placée au-dessus d'eux. C'est de

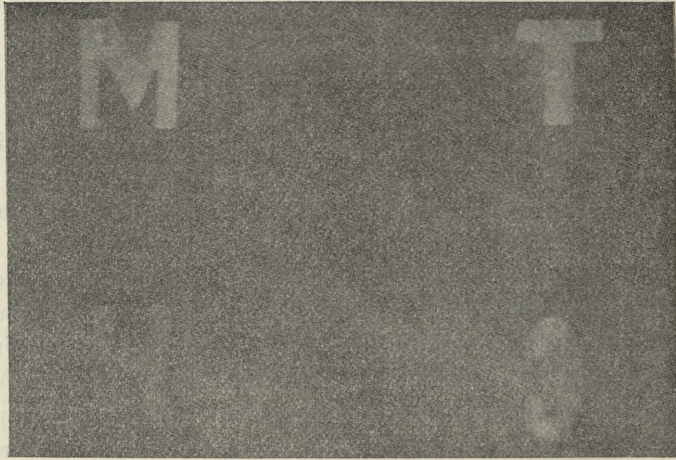


Fig. 1.

Différentes photographies obtenues par l'action des graines et des racines de jeunes plantes sur la plaque sensible.

cette façon qu'ont été obtenues les photographies, présentées dans ce mémoire (Fig. 1). Il suffit de soumettre les plaques sensibles pendant 5 à 15 minutes à l'action des plantes ou des graines radio-actives (dans une chambre noire) pour obtenir des résultats nets.

3) En exposant à l'émanation du radium (bromure de radium) différentes parties des plantes tout à fait développées — racines, tiges, feuilles et fleurs — on obtient les résultats suivants: les racines deviennent fortement radio-actives, les tiges — beaucoup moins, même à la surface de section transversale; la radio-activité des feuilles se montre à peine, et les fleurs restent inactives: elles ne manifestent aucune trace de radio-activité. Cette distribution de la radio-activité est un phénomène constant. Ce fait s'observe aussi quand



on étudie la radio-activité des coupes transversales des différentes parties de la plante.

Il nous paraît donc probable que la substance si sensible à l'émanation du radium et capable de devenir radio-active sous son influence n'est pas distribuée d'une manière uniforme dans toutes les parties de la plante, mais qu'elle se trouve surtout dans les racines et qu'à partir de là elle diminue progressivement, en remontant vers les feuilles et les fleurs. La graine même contient cette substance capable de devenir radio-active.

§ II. Les expériences qui suivent sur la radio-activité naturelle des plantes viennent à corroborer en partie l'opinion précédente. Elles ont été faites sur des graines et des plantes normales qui n'avaient subi aucune influence artificielle de l'émanation du radium.

1) La graine sèche de l'orge, de l'avoine, du blé etc., présente autant qu'elle reste intacte, une très faible radio-activité; mais il suffit de débarrasser la graine de son enveloppe extérieure, de saisir les pellicules translucides qui sont accolées en dedans à cette enveloppe et de les approcher de la boule de l'électroscope pour obtenir une prompte décharge électrique. Les autres parties de la graine sèche ne manifestent qu'une faible radio-activité. Il y aurait donc dans la graine même, déjà avant sa germination, une substance radio-active localisée surtout dans les pellicules internes mentionnées ci-dessus. Ces pellicules, outre leur action sur l'électroscope, agissent aussi sur la plaque photographique et donnent des photographies. Il est donc naturel que les graines contenant à l'état normal une substance radio-active présentent une augmentation de la radio-activité sous l'influence de l'émanation du radium.

2) Étant donnée la radio-activité naturelle de la graine même avant la germination, il serait facile de comprendre la radio-activité des parties de la plante qui se développent pendant la germination. Ce serait surtout le cas quand les graines germent non dans le sol, mais sur du papier à filtrer imbibé d'eau. En premier lieu ce sont les racines qui poussent et dans la plupart des cas elles manifestent une radio-activité nette. Cette radio-activité naturelle se distribue entre toutes les parties de la plante en croissance, et ensuite dans la plante complètement développée, de la même manière que dans le cas de la radio-activité artificielle, décrite dans le premier paragraphe de ce mémoire. Elle est plus accusée dans les racines et diminue en montant vers les feuilles et les fleurs. En général, la



radio-activité naturelle des plantes diminue pendant la croissance et atteint son minimum vers la fin du développement. Sous l'influence de l'émanation du radium la radio-activité naturelle des plantes subit une augmentation. C'est pour cela que les effets radio-actifs des plantes soumises à l'émanation sont toujours plus accentués — par rapport à l'électroscope de même qu'à la plaque photographique.

§ III. Les expériences ultérieures, avec la dissection des plantes et de leurs parties différentes, nous ont démontré que les organes qui tout en restant intègres ne manifestent aucune radio-activité, comme par exemple les feuilles, en donnent des preuves très nettes après leur dissection. Si l'on dissocie les nervures des feuilles, par exemple, et si l'on agit avec ces nervures mises à nu sur la boule de l'électroscope, on reçoit une vive décharge d'électricité. Il en est de même, si l'on dissocie les pellicules internes de la tige d'une céréale quelconque: ces pellicules sont aussi nettement radio-actives. Donc la substance radio-active pénètre presque toutes les parties de la plante, quoique son action directe ne puisse se manifester grâce aux autres tissus qui entrent dans la composition des organes. Et il n'y a que les racines qui dans leur état intègre manifestent une radio-activité accentuée.

§ IV. Quelle est la nature des radiations que manifestent les plantes en général? Correspondent-elles aux rayons qu'émet le radium, ou présentent-elles des rayons d'un ordre différent?

Avant tout, il nous est possible d'affirmer que ces radiations végétales ne présentent pas un phénomène vital, car les pellicules internes de la paille, c'est à dire d'une substance déjà morte, montrent une radio-activité très prononcée. Ensuite, les racines radio-actives de l'orge, du seigle, de l'avoine, à l'état de germination, ayant été soumises à la température d'ébullition et, par conséquent, étant définitivement tuées, après une certaine période d'abaissement de leur radio-activité, la recupèrent complètement. De ces deux séries d'expériences il résulte que la radio-activité ne peut être attribuée aux phénomènes vitaux de l'organisme végétal. Cette radio-activité est donc un phénomène simplement physique. En ce qui concerne la nature intime de ces rayonnements végétaux, savoir: se rapportent-ils aux rayons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  du radium ou sont-ils d'un ordre différent, nous n'avons pu tirer de nos expériences aucune conclusion décisive. Voici quelques expériences qui peuvent présenter un intérêt. Une mince feuille d'aluminium ou de papier interposée entre



la plaque photographique et les racines radio-actives laisse agir ces dernières sur la plaque sensible. Donc, les radiations végétales passent à travers de l'aluminium et sont retenues par une feuille de plomb. Il est facile de constater la cumulation des effets produits par les radiations végétales sur la plaque photographique, ainsi que sur l'électroscope: plusieurs racines radio-actives agissant ensemble

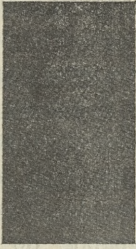


Fig. 2.  
Effet photographique  
d'une racine.

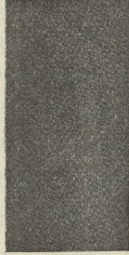


Fig. 3.  
Effet photographique  
de deux racines.

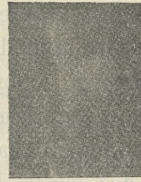


Fig. 4.  
Effet photographique  
de trois racines.

donnent un effet plus prononcé que chacune d'elles séparément. (Fig. 2, 3, 4).

Comme une particularité de ces radiations végétales nous avons remarqué les faits suivants: elles se manifestent d'une manière plus intense à l'air libre et disparaissent presque complètement quand les racines sont serrées entre deux plaques de verre ou de carton, bien que leurs bouts soient libres. Ensuite, l'action des radiations végétales sur un électroscope chargé se manifeste d'abord d'une manière beaucoup plus intense que celle des préparations du bromure de radium, mais ensuite cette action s'affaiblit et devient très lente; tandis que la décharge de l'électroscope provoqué par les sels de radium se fait d'une manière régulière depuis le commencement jusqu'à la fin.

Il y a un fait encore qui serait peut-être d'une grande importance: c'est que les radiations végétales peuvent provoquer, comme le radium, une radio-activité induite dans d'autres corps mis en contact avec les parties radio-actives des végétaux. Ainsi, une mince feuille de papier à cigarettes, mise en contact avec des racines radio-actives, après un certain temps devient aussi radio-active et peut agir sur une plaque sensible. Peut-être ce fait trouverait une application pratique pour préparer de la ouate ou d'autres substances



radio-actives employées en médecine. Il se peut aussi que les graines des céréales, surtout du seigle, de l'orge et de l'avoine, à l'état de germination, grâce à leur radio-activité accentuée trouveront aussi une application pratique dans les cas, où l'on a besoin d'une cure radio-active.

§ V. Après tout ce qui a été dit, il ne reste aucun doute que le monde végétal est muni de forces radio-actives, à partir de la graine jusqu'à la plante complètement développée. Il est naturel de se demander, si cette radio-activité joue un rôle quelconque dans la vie des plantes, dans leur développement. On ne peut rien affirmer avant que des observations directes ne soient faites sur ce sujet. Mais il y aurait beaucoup de raisons à travailler dans cette direction, car d'un côté les expériences de Mr. Bohn nous ont fait déjà connaître l'action accélératrice du radium sur le développement des oeufs de différents animaux et leur capacité de provoquer une parthénogenèse jusqu'à un certain degré de développement; de l'autre côté, les expériences du Prof. A. Poehl sur la culture des plantes médicinales à Tsarskoïé Sélo, près de St. Pétersbourg, sur un sol nettement radio-actif lui ont fourni des résultats surprenants par la richesse de la culture obtenue. En analysant ces plantes médicinales, nous les avons trouvées toujours plus radio-actives que les plantes correspondantes, mais cultivées sur d'autres sols moins radio-actifs.

Il est donc naturel de supposer qu'un sol radio-actif agisse sur les graines des plantes ou par l'induction radio-active, ou, directement, par l'introduction des matières radio-actives, et que cette radio-activité des graines joue un rôle important dans le développement ultérieur des plantes. Il n'y a aucun doute que les expériences prochaines vont résoudre cette question.

- 
55. M. F. TONDERA. O wpływie prądu powietrza na pędy rosnące. (*Über den Einfluß des Luftstromes auf wachsende Sprosse*). (*Sur l'influence du courant d'air sur les pousses en croissance*). Mémoire présenté par M. E. Godlewski m. t.

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß Topfpflanzen, welche am Fenster in unveränderter Stellung durch längere Zeit belassen werden, ihre jungen Sprosse dem Lichte entgegenkrümmen, oder heliotropisch gekrümmt werden. Die Untersuchungen



über die heliotropischen Krümmungen, die auf verschiedene Art angestellt wurden, waren bislang ein Gegenstand so allseitiger und eingehender Forschungen, daß sich kaum noch etwas wesentlich neues in dieser Hinsicht auffinden ließe. Dennoch führt die Untersuchung der Krümmungen der am Fenster stehenden Topfpflanzen, wenn man die Beobachtungen nicht mit dem Eintritte der Nacht unterbricht, sondern weiter verfolgt, zu der Wahrnehmung, daß die Sprosse, welche in raschem Wachstum begriffen sind, in der Dunkelheit einer weiteren Krümmung gegen die Fensterscheibe unterliegen. Die Krümmung wächst während der Nacht, wenngleich die Lichtwirkung vollkommen ausgeschlossen wird. Diese Erscheinung habe ich zuerst im J. 1903 an jungen Sprossen von *Lathyrus odoratus* beobachtet; die Art *Melandryum album*, *Linum usitatissimum* und viele andere, die ich bald nachher untersucht habe, wiesen ebenfalls diese Krümmung auf.

Prüft man die Ursachen, durch welche diese nächtliche Krümmung hervorgebracht wird, so findet man, daß sie weder als eine Nachwirkung des Heliotropismus aufzufassen ist, noch durch die Temperaturerniedrigung, welche in der Nähe der Fensterscheibe während der Nacht eintritt, hervorgerufen wird. Dies läßt sich durch einfache Versuche feststellen. Wird nämlich der heliotropisch gekrümmte Sproß weit vom Fenster gestellt, so erleidet er während der Nacht keine weitere Krümmung. Aus genauen Messungen der Temperatur am Fenster ergibt sich, daß während der Sommernächte die Temperatur erst dicht in der Nähe der Fensterscheibe (5—10 cm) eine Erniedrigung um  $1^{\circ}$ — $1.5^{\circ}$  C. erfährt. An den Sprossen der Topfpflanzen läßt sich dagegen auch in der Entfernung von 20—30 cm von der Fensterscheibe das Wachsen der Krümmung in der Nacht beobachten. Es erübrigt schließlich die Vermutung, daß die Sprosse unter der Einwirkung eines gelinden Luftstromes gekrümmt werden, welcher durch die Abkühlung der Fensterscheibe an der Innenseite derselben während der Nacht hervorgebracht wird. Die Luftschichte, welche in unmittelbarer Berührung mit der Fensterscheibe sich befindet, wird nämlich durch die erfolgte Abkühlung dichter, sie fällt daher auf den Boden des Fensters. Bald wird sie aber durch die nachströmenden Luftschichten verdrängt und es entsteht ein Luftstrom, welcher in dem unteren Teile des Fensters gegen das Zimmer gerichtet ist. Unter dem Einflusse dieses Luftstromes stellt sich die nächtliche Krümmung der wachsenden Sprosse ein.



Diese Vermutung zu prüfen, habe ich einen Versuchskasten hergestellt, in welchem die in lebhaftem Wachstum begriffenen Pflanzen beliebig lang der Einwirkung des Luftstromes unter Ausschluß aller übrigen äußeren Einflüsse ausgesetzt werden konnten.

Auf die Beschreibung des Versuchskastens und seine Verwendung werde ich später zurückkommen; vorerst will ich einige Untersuchungen schildern, welche ich am Fenster angestellt habe.

Zur Bestimmung sogar sehr geringer Abweichungen der Sprosse von ihrer ursprünglichen Stellung habe ich folgendes Verfahren angewendet. In einem dunklen Zimmer stellte ich eine Petroleumlampe mit flacher Flamme derart auf den Tisch, daß die scharfe Kante der Flamme der untersuchten Pflanze zugewendet war. Der Schlagschatten der Pflanze trat auf weißem Papier, welches an einer vertikal gegenübergestellten Glasscheibe ausgebreitet war, sehr scharf hervor. Vor und nach jedem Versuche wurden die Schattenumrisse fixiert, wodurch der Unterschied der Stellung des Sprosses sofort auffiel. Selbstredend mußte während der Feststellung des Schattens vor und nach dem Versuche die Entfernung und die Orientierung der Lampe, der Pflanze und der Glasscheibe genau eingehalten werden. Bei einigen Versuchen wurde im Laufe der Untersuchung die Stellung des Schattens mehrmals festgestellt, um den Fortschritt der Krümmung beobachten zu können.

Für diese Untersuchungen wurden vorwiegend krautige, jugendliche Sprosse der Stauden oder Kräuter mit ausgiebigem Wachstum verwendet. Zahlreiche Versuche führten mich zur Erfahrung, welche ich hier mit Nachdruck betonen muß, daß die gesamten Versuche nur an solchen Pflanzen gelingen, welche ein rasches Wachstum aufweisen, was sich nach dem Höhenunterschiede der Schatten vor und nach dem Versuche beurteilen läßt. Bei den Sprossen mit ergiebigem Wachstum wird der Schatten der Sproßspitze schon nach zweistündiger Untersuchung den ursprünglichen Schatten um einige Millimeter überragen.

#### *Lupinus albus.*

Drei junge 12, 13 und 16 cm hohe Pflanzen, welche in gemeinsamem Topfe wuchsen, wurden in der Nacht des 10. Mai am verdunkelten Fenster so aufgestellt, daß die von der Glasscheibe 10, 13·5 und 18 cm entfernt waren. Die Temperatur des Zimmers be-



trug  $16.5^{\circ}\text{C}$ ., die der äußeren Luft nur  $5^{\circ}\text{C}$ .. Die Krümmung der Sprosse wurde nach Verlauf von zwei Stunden bestimmt; die Sproßspitzen neigten sich um 9, 19 und 11 mm gegen die Fensterscheibe, wobei sich die Krümmung auf die obere Hälfte der Sprosse erstreckte.

*Lythrum Salicaria.*

Ein Exemplar von 20.5 cm Höhe wurde in der Entfernung 12 cm von der verdunkelten Fensterscheibe während der Nacht aufgestellt. Der Unterschied zwischen der Temperatur des Zimmers und der der äußeren Luft betrug anfänglich nur  $2.1^{\circ}\text{C}$ ., stieg aber bald auf  $3^{\circ}\text{C}$ .. Die Stellung des Sprosses wurde während der Untersuchung zweimal festgestellt. Nach drei Stunden erstreckte sich die positive Krümmung, also gegen die Fensterscheibe, beinahe auf den ganzen Stengel, wobei die Sproßspitze um 9 mm von der ursprünglichen Stellung verschoben war.

*Melandryum album.*

Eine im Blumentopfe gezogene, 19 cm. hohe Pflanze, wurde nach Feststellung der Richtung des Stengels in der Nacht vom 19. Juni am verdunkelten Fenster in einer Entfernung von 11 cm von der Fensterscheibe aufgestellt. Die Temperatur des Zimmers betrug  $20^{\circ}\text{C}$ ., die der äußeren Luft  $10^{\circ}\text{C}$ .. Nach Verlauf von 4 Stunden neigte sich der Stengel in seiner ganzen Länge gegen die Fensterscheibe; die Verschiebung der Sproßspitze betrug 16 mm

*Linum usitatissimum.*

Drei in einem Blumentopfe gezogene Exemplare von 11, 13 und 15 cm Höhe wurden am 8. Juni abends am verdunkelten Fenster gestellt. Die mittlere Entfernung der Pflanzen von der Fensterscheibe belief sich auf 26 cm. Der Thermometer zeigte im Zimmer  $19^{\circ}\text{C}$ ., an der freien Luft  $9^{\circ}\text{C}$ .. Nach Verlauf von 5.5 Stunden wurde die Krümmung bestimmt. Die Sprosse waren gegen die Fensterscheibe geneigt, und zwar betrug die Neigung des höchsten Exemplars an der Sproßspitze 13 mm., des mittleren 7 mm., des kleinsten 10 mm.

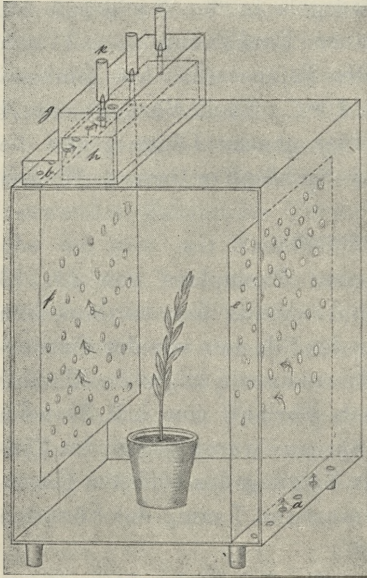
In zahlreichen Versuchen, welche ich an anderen Arten angestellt habe, waren die Ergebnisse analog; der Unterschied bestand lediglich in der verschiedenen Größe der Krümmung sowie in der Länge der Strecke, auf welche sich die Krümmung ausdehnte.



Aus dem Verhalten der Pflanzen in den angeführten Versuchen erhellt, daß die Krümmung, welche die am Fenster stehenden Topfblumen nach längerer Zeit erfahren, durch zweierlei äußere Einflüsse bedingt ist: sie entsteht nämlich durch die heliotropische Krümmung am Tage und durch die Einwirkung des Luftstromes während der Nacht.

### Untersuchungen im Versuchskasten.

Wie ich oben erwähnt habe, ist die Annahme des gelinden Luftstromes, welcher nachts am Fenster durch Abkühlung der Luftschichten erzeugt wird, eine Vermutung, welche erst nachgewiesen werden muß. Ich habe den Beweis in dieser Form zu liefern gesucht, daß ich die Pflanzensprosse der Einwirkung eines Luftstromes aussetzte und ihr Verhalten in demselben untersuchte. Es erwies sich dabei, daß die wachsende Sprosse in gelindem Luftstrom die nämliche Krümmung erfahren, welche die am Fenster stehende Sprosse während der Nacht aufweisen.



Behufs Prüfung des Einflusses der Luftströmung auf Sprosse, die in lebhaftem Wachstum begriffen sind, habe ich einen Versuchskasten hergestellt, in welchem dieselben durch beliebige Zeit der Einwirkung des Luftstromes, unter Ausschluß aller anderen Einflüsse ausgesetzt werden konnten.

Der aus Holz gefertigte 38 cm hohe, 22 cm breite und 20 cm tiefe Versuchskasten ist derart eingerichtet, daß die innere Luft in andauernde, gleichmäßige Bewegung versetzt wird. Zu diesem Behufe sind zwei Reihen von runden Löchern zu zwei gegenüberliegenden Seiten der unteren und der oberen Wand gebohrt (*a*, *b*). Die obere Löcherreihe ist durch eine, luftdicht an die obere Kastenwand anschließende Blechbüchse



überdeckt. Diese Büchse ist mit drei Windpfeifen versehen (*i*), in welche drei Flammen der langen Weingeistlampe (*h*) münden. Während des Brennens der Flammen wird durch die entweichende Luft in dem Versuchskasten ein Luftstrom hervorgerufen, welcher durch die untere (*a*) und die obere (*b*) Löcherreihe passieren muß, um in die Blechbüchse zu gelangen und zur Speisung der brennenden Flammen zu dienen. Um die schiefe Richtung des Stromes in eine horizontale zu verwandeln, wurden zwei siebartig durchlöchernte Kartonwände (*e*, *f*) zu beiden Seiten im Versuchskasten angebracht. Mit Hilfe dieser Einrichtung entsteht ein Luftstrom, welcher eine genügend hohe und breite Luftmenge des Versuchskastes in Bewegung versetzt.

In dem Luftstrome, welcher auf diese Art erzeugt wurde, habe ich die jungen Sprosse der in Blumentöpfen eingesetzten Pflanzen untersucht.

Die Stärke des Luftstromes im Versuchskasten läßt sich mit Hilfe der Vergrößerung oder Verkleinerung der Flammen beliebig regulieren. Die Feststellung der Krümmung der Sprosse geschah auf die oben geschilderte Art: vor und nach dem Versuche wurden die Schattenumrisse des untersuchten Sprosses fixiert und die Abweichung von der ursprünglichen Stellung durch die Differenz der Schattenkonturen bestimmt. Die Versuche habe ich vorwiegend während der Nacht ausgeführt, um die tägliche größte Wachstumsperiode auszunützen.

Über das Verhalten der Pflanzen in dem Luftstrome liegen zur Zeit keine Beobachtungen vor: ich bin somit genötigt, meine Versuche zu schildern, ohne mich auf frühere Untersuchungen zu berufen. Folgende Beispiele dürften genügen, um die Beeinflussung der wachsenden Sprosse durch den Luftstrom darzulegen.

#### *Lupinus albus.*

In einem Blumentopfe gezogene Pflanzen von 13, 17 und 18 cm Höhe wurden in Versuchskastem drei Stunden lang der Einwirkung eines mäßigen Luftstromes ausgesetzt. Nach Verlauf dieser Zeit krümmten sich die Sprosse der Stromrichtung entgegen und zwar betrug die Verschiebung der Sproßspitzen 15, 13 und 12 mm. Bei dieser Krümmung wurden die Stengel in ihrer ganzen Länge gegen die Stromrichtung geneigt.

Der Kürze wegen werde ich fernerhin die Krümmungen, die



durch den Luftstrom erzeugt werden, mit positiv und negativ bezeichnen. Positiv ist die Krümmung, wenn der Sproß nach dem Versuche gegen die Stromrichtung geneigt ist.

*Lythrum Salicaria.*

Eine im Freien ausgewachsene Pflanze wurde in einen Blumentopf eingesetzt und, nachdem sie sich eingewurzelt hat, dem Versuche im Versuchskasten unterzogen. Nach Verlauf von drei Stunden betrug die positive Krümmung an der Spitze 8 mm. Nach weiteren drei Stunden ist die Krümmung auf 18 mm an der Sproßspitze gewachsen.

*Saponaria officinalis.*

Diese Staude war ebenfalls aus dem Freien gebracht und im Blumentopfe nach der Einwurzelung untersucht. Der Versuch dauerte  $3\frac{1}{2}$  Stunden. Die positive Krümmung trat mit Ausnahme des untersten Stengeltheiles an der ganzen Länge des Sprosses auf, wobei die Sproßspitze um 6 mm gegen die Stromrichtung verschoben war.

*Sisymbrium Sophia.*

Im Blumentopfe kultivierte, drei 9, 15 und 20 cm hohe Exemplare wurden drei Stunden lang der Stromeinwirkung im Versuchskasten ausgesetzt. Nach dieser Zeit stellte sich an allen Exemplaren die positive Wirkung ein, sie umfaßte den oberen Stengelteil und betrug an der Sproßspitze 4, 5 und 7 mm.

*Erigeron canadense.*

Drei im Freien ausgewachsene Pflanzen von 13·5, 14 und 15 cm Höhe wurden in schwachem Luftstrome des Versuchskastens drei Stunden lang belassen. Darauf wurde die Krümmung mittels Zeichnung festgestellt: sie betrug an den Sproßspitzen 7, 6 und 7 mm.

Ein anderer Versuch wurde in einer anderen Nacht mit derselben Pflanze in starkem Luftstrome angestellt. Alle drei Exemplare wurden durch den anhaltenden Druck des Luftstromes gebogen, sie nahmen daher eine negative Krümmung an.

Dieses Beispiel beweist, daß die positive Krümmung nicht durch einen starken, sondern durch einen gelinden, aber anhaltenden Luftstrom erzeugt wird. Bei stärkeren Luftströmen tritt die mechanische, negative Krümmung zutage.



### Die Krümmung der Pflanzensprosse im Luftstrom ist eine Wachstumserscheinung.

Ein sehr günstiges Untersuchungsobjekt für die Versuche im Versuchskasten bilden die jungen Pflanzen von *Linum usitatissimum*. Ich habe dieselben verwendet, um den Punkt, an welchem die erste Krümmung zum Vorschein kommt, zu ermitteln. Zu diesem Behufe habe ich folgenden Versuch angestellt.

An drei ca 14 cm hohen Pflanzen wurden die Stengel an der Strecke von 4 cm von der Sproßspitze angefangen durch Tuschemarken in Zonen von 5 zu 5 mm eingeteilt. Darauf wurden die Pflanzen 24 Stunden lang im Freien aufgestellt; nach dieser Zeit wurde der Zuwachs der einzelnen Zonen festgestellt. Die stärkste Streckung ist an allen Exemplaren an der zweiten unter der Sproßspitze befindlichen Zone aufgetreten — im Durchschnitt 15 mm — unter dieser Zone verringerte sich das Wachstum rasch nach unten so, daß es in der achten Zone unmerklich war.

Hierauf wurden die drei Pflanzen in dem Versuchskasten einem gelinden Luftstrome angesetzt, die Krümmung jede halbe Stunde bestimmt und gezeichnet. Nach anderthalb Stunden konnte man feststellen, daß die stärkste Krümmung des Stengels in der Entfernung von 28—32 mm von der Sproßspitze aufgetreten ist. Dieser Punkt fällt an die Grenze der zweiten und der dritten Zone und entspricht der Streckung, welche ungefähr um die Hälfte schwächer ist als die der zweiten Zone.

Bei weiterer Einwirkung des Luftstromes verflacht sich die anfänglich starke Krümmung, indem sie sich auf die unteren Stengelpartien ausdehnt. Endlich wird der ganze im Wachstum begriffene Teil des Sprosses schief gegen die Stromrichtung geneigt.

Der Punkt der ersten Krümmung fällt somit in den Bereich des starken Wachstums, liegt aber unterhalb der Zone des stärksten Wachstums.

Aus weiteren Versuchen, die ich behufs Ermittlung der näheren Ursache der geschilderten Krümmungen angestellt habe, läßt sich schließen, daß diese Krümmungen durch die psychrometrische Differenz der den Stengel während des Versuches umgebenden Luft hervorgerufen wird. Der junge Stengel, welcher in raschem Wachstum begriffen ist, scheidet durch seine Oberfläche große Mengen



Wasserdampf aus, welcher bei ruhiger Luft den Stengel umgibt und die weitere Transpiration verringert. Dadurch wird aber der Turgor der oberflächlichen Gewebe erhöht und das Wachstum des Stengels beeinflußt.

Wird nun der Stengel der Einwirkung des Luftstromes längere Zeit hindurch ausgesetzt, so wird der aus dem Stengel ausgeschiedene Wasserdampf von der vorderen und den seitlichen Oberflächen desselben fortgetragen; nur die Rückseite des Stengels wird vom Luftstrom verschont und von ausgeschiedenem Wasserdampf umgeben. An dieser Seite tritt ein erhöhtes Wachstum zutage, wodurch die Krümmung gegen den Luftstrom hervorgebracht wird.

Zu der Folgerung, daß diese Krümmung die Folge der psychometrischen Differenz in der nächsten Umgebung des Stengels ist, bin ich auf Grund folgender zweierlei Versuche gelangt. In einer Reihe von Versuchen wurde der Luftstrom, welcher im Versuchskasten auf die untersuchten Pflanzen einwirken sollte, durch eine eigens eingerichtete Büchse geleitet und mit Wasserdampf gesättigt. Die Krümmungen, welche während dieser Versuche an den Sprossen aufgetreten sind, waren entweder schwach positiv, oder gleich Null, oder sogar negativ.

Die zweite Reihe von Versuchen wurde derart ausgeführt, daß der gewöhnliche Luftstrom auf Pflanzensprosse einwirkte, deren Stengeloberfläche mit Lanolin bestrichen war. Die Ergebnisse dieser Versuche — 19 an Zahl — waren: 4 schwach positiv, 3 Null. 12 negativ.

Aus diesen Ergebnissen erhellt, daß der Luftstrom in dem Falle, wo der Stengel von Wasserdampf umgeben ist, die Erscheinung der Krümmung schwer, oder gar nicht hervorruft; an einem Stengel dagegen, welcher keinen Wasserdampf ausscheiden kann, läßt sich vorwiegend nur mechanische Krümmung beobachten. Diese Tatsachen beweisen, daß ein wesentlicher Zusammenhang zwischen der psychometrischen Differenz in der Umgebung des Stengels und den Krümmungen, die unter dem Einflusse des Luftstromes zum Vorschein kommen, existiert. Worin der Zusammenhang besteht, wurde schon oben erwähnt.

---



56. M. L. MARCHLEWSKI m. t. **O pochodzeniu cholehematyny.** (*The origin of cholehaematin*). (*Sur l'origine de la choléhématine*).

In my previous communications I have shown that cholehaematin Mac Munn's is identical with bilipurpurin, isolated from ox-bile by Löbisch and Fischler, and with phylloerythrine isolated by myself from faeces of cows fed exclusively with fresh grass. I pointed out that the latter is most probably a derivative of chlorophyll inasmuch as only faeces of cows fed with fresh grass contain this substance. In order to settle the question definitely it was necessary to ascertain the conditions of formation of cholehaematin in the bile. To this end I experimented with a sheep, which was provided with a biliary fistula and examined the composition of the outflowing bile under the influence of various foods. At first the bile of the grass fed sheep was examined. It was coloured brownish red and showed already in the raw state cholehaematin bands. In order to isolate the colouring matter I proceeded as follows: the bile was first evaporated to a syrup on the water bath and alcohol added. The filtrate from insoluble albuminous and other matters was again evaporated to dryness. The residue was next dissolved in water, acidulated with dilute sulphuric acid and, not taking notice of the slight milky emulsion produced, shaken up with ether. The latter took up a red colouring matter; after washing with small portions of water the ethereal solution was evaporated and the residue dissolved in alcohol. The alcoholic solution gave after standing for a short time a reddish precipitate, which was collected on a filter and washed several times with small quantities of alcohol. This precipitate represents comparatively pure cholehaematin viz. phylloerythrine, it possesses all the characteristic properties of the latter.

On the 5<sup>th</sup> of June the sheep was kept to dry food free from chlorophyll. On the 6<sup>th</sup> of June in the evening the first portion of bile was drawn and examined on the following day. The colour of the bile was green, and in its spectrum no bands of cholehaematin were observed, but instead a comparatively dark band in the red, corresponding to the wave lengths  $\lambda$  619 —  $\lambda$  655. Ether added to the bile did not cause any change of colour, but under its influence the band in the red disappeared and the band of cholehaematin came into view. The bile was next evaporated on the water-bath to a syrup, alcohol added and filtered. The filtrate possessed



a greenish yellow colour; it was evaporated again to dryness, dissolved in water and acidulated with hydrochloric acid, and finally extracted with ether. The ethereal solution appeared now yellowish and in its spectrum only the two most pronounced cholehaematin bands were distinguishable. The ether was again evaporated and the residue dissolved in a very small quantity of chloroform. The colour of this solution was yellowish brown, and the cholehaematin spectrum very badly pronounced; visible were only three bands, the first in the orange was absent. The next portion of bile was drawn on the 8<sup>th</sup> of June, in the evening and examined on the 9<sup>th</sup>, applying the same procedure as stated before. Cholehaematin proved to be still present although in very small quantities. On the 10<sup>th</sup> another portion of bile was drawn and examined on the following day. The quantity of cholehaematin present I determined approximately colorimetrically in the following manner. One milligram of pure phylloerythrine was dissolved in 100 ccm of chloroform and the strength of the coloration produced compared with that caused by cholehaematin, obtained from the bile. It was found that the latter could not have contained more than about 0.0005 gr. of the colouring matter. The bile drawn on the 13<sup>th</sup> of June still contained some cholehaematin, but certainly less than 0.0005 gr. The bile taken on the 15<sup>th</sup> did not contain at last any cholehaematin; instead another colouring matter was observed under the following circumstances. The first ethereal solution, obtained as described above gave on evaporation a green grease which dissolved in chloroform with a green colour. In the spectrum no cholehaematin bands were observed, but instead of those a band in the red; an addition of hydrochloric acid caused the green colour to be replaced by a yellow one, and the band at the same time disappeared.

On the 17<sup>th</sup> of June the animal was fed again with grass and the bile drawn and examined on the 20<sup>th</sup>. The bile appeared in greater quantities than in the former feeding period with dry food, which consisted of oats; its colour was yellowish brown and it showed without any further treatment the cholehaematin bands. From the 20<sup>th</sup> of June up to the 26<sup>th</sup> the bile was collected and the phylloerythrine contained in it determined colorimetrically; its quantity amounted to about 0.008 g.

The result of these experiments is quite clear: there cannot be



any doubt that the colouring matter called by Mac Munn cholehaematin and by Löbisch bilipurpurin, which, as has been shown, is identical with phylloerythrine, appears in the bile of herbivora only on condition that the animal is fed with fresh grass. The only conclusion which can be drawn from this fact is that cholehaematin, otherwise bilipurpurin or phylloerythrine is a derivative of chlorophyll and not a descendant of haemoglobin like the usual bile colouring matters, although, of course, in view of the proved close relationship of chlorophyll and haemoglobin, phylloerythrine and the blood colouring matter are by no means quite foreign to each other. However, I think, for the present, not being able to give the constitutional formula of cholehaematin, or for that matter of any coloured chlorophyll or haemoglobin derivatives, it will be useful to drop misleading names like „cholehaematin and bilipurpurin“ and use only the third „phylloerythrine“ which meets the existing facts best.

My best thanks are due to prof. N. Cybulski, who was kind enough to facilitate these researches by supplying me with a sheep provided with a biliary fistula

- 
57. MM. L. MARCHLEWSKI m. t. et LAD. MATEJKO. *Studia nad biksyną. Część I. (Studies on bixin, the colouring matter of Bixa Orleana. I part).* (*Études sur la bixine. I partie*),  
(Planche XIX.).

Bixin has been already frequently the object of more or less exhaustive researches. The most encouraging results were obtained by Etti<sup>1)</sup> and by Zwick<sup>2)</sup>, but despite the great amount of work spent upon the subject not much is known concerning the constitution of this interesting body. Our attention has been drawn to bixin through the following circumstances: it possesses an absorption spectrum which is not unlike the spectrum of lipochroms to which we count also the yellow colouring matters accompanying chlorophyll in green leaves, and it yields with conc. sulphuric acid a blue colouration. Analogously behave the lipochromes. The study of the latter sub-

<sup>1)</sup> Ber. XI p. 864.

<sup>2)</sup> Über den Farbstoff des Orleans, Würzburg 1899.



stances has interested one of us for a series of years, but the subject presents very great difficulties not only on account of their great susceptability towards chemical and physical influences but also because of the difficulties in obtaining larger quantities for examination. Bixin is a substance that may be obtained at a not very excessive price and in greater quantities, and we thought therefore that the examination of bixin might be of some use in tackling the problem of lipochroms. As it proved the study of bixin presents also very great difficulties and that its constitution must be rather complicated; we did not succeed in clearing it up, nevertheless we intend to publish our results having discovered a few new facts and succeeded in improving old methods which may facilitate further researches.

#### Method of preparation of pure bixin.

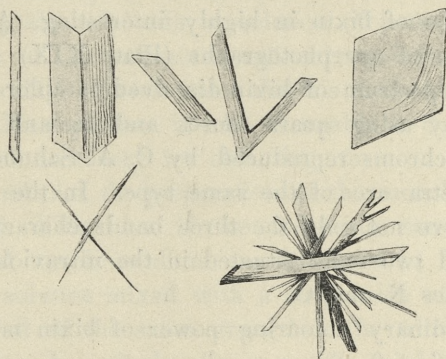
The oldest known method described by Etti, said to yield crystallized bixin did not prove successful at our hands. Zwicks method we found quite reliable but tedious. This author proceeds as follows. Commercial Orlean colour is first dried on a water bath, the powdered product is then extracted with boiling chloroform, filtered and the chloroform evaporated. The residue is dried on the water bath and extracted in a Soxhlet apparatus first with ligroin and then with chloroform. During the process of extraction Zwick noticed the formation of crystals, which were recrystallized again twice or three times from chloroform. The melting point of these crystals is according to Zwick  $189^{\circ}\text{C}$ .

We proceeded as follows. Orlean colour purchased from Messrs Alder & Co of Vienna, in the form of a brick red paste was dried thoroughly on the water bath and the dry substance obtained extracted in the cold with chloroform during 2 days. The first extract was drawn off, the chloroform regenerated and used again for the second extraction of the raw material. The residue of the first extract represents a soft, resinous mass, which will not solidify even after prolonged drying on the water bath; it contains most of the organic impurities of the crude colour and some bixin, but we found it not worth while to try to isolate the latter from this first fraction. The second chloroform extract whether obtained in the cold or at the boiling point of chloroform gave on evaporation a brittle dark red brown mass, which yielded without much trouble



a large crop of crystals in the following way. It was dissolved in hot chloroform and alcohol added and the whole heated on the water bath; as soon as a sufficient quantity of chloroform distilled off there appeared in the solution glittering crystals. At this point the heating was interrupted and the solution left to crystallize. In a few hours a mass of well developed rhomboides and rhombs is formed, which examined under the microscop did not appear quite homogenous: amongst the crystals we noticed brown amorphous masses. In order to get bixin quite free from any amorphous admixtures we repeated the crystallisation from a mixture of chloroform and alcohol several times. The crystallisation from boiling glacial acetic acid leads also to a perfect product.

Crystallized bixin represents when the crystals are small a bright red mass; in case the crystals are larger a brown red mass not unlike amorphous phosphorous. It melts when heated quickly at  $198^{\circ}$ , slower at  $191.5^{\circ}$ . The crystals examined under the microscop possess the following forms:



Pure bixin is but little soluble in cold chloroform, 100 g of the latter dissolve at  $25^{\circ}$  only 0.34 g of bixin. In alcohol, ether or glacial acetic acid it dissolves still less. Boiling glacial acetic acid takes it up readily. The best solvent is pyridine, next follows quinoline; boiling nitrobenzene dissolves it easily.

We made a great number of analysis of various preparations. Some of them may be quoted here:

- |    |          |      |          |                 |     |          |                  |
|----|----------|------|----------|-----------------|-----|----------|------------------|
| 1) | 0.1195 g | gave | 0.3269 g | CO <sub>2</sub> | and | 0.0839 g | H <sub>2</sub> O |
| 2) | 0.1175   | " "  | 0.3211   | " "             | " " | 0.0812   | " "              |
| 3) | 0.1200   | " "  | 0.3278   | " "             | " " | 0.0845   | " "              |



4)	0.1637	"	"	0.4491	"	"	"	0.1078	"	"
5)	0.1603	"	"	0.4404	"	"	"	0.1064	"	"
6)	0.1875	"	"	0.5149	"	"	û	0.1258	"	"

corresponding to:

1)	74.60%	c	7.77%	H
2)	74.32	"	7.65	" "
3)	74.47	"	7.74	" "
4)	74.82	"	7.31	" "
5)	74.92	"	7.37	" "
6)	74.89	"	7.45	" "
Middle	74.70%	c	7.55%	H.

These results agree well with those of former observers. Etti found 74.64% C and 7.66% H and Zwick 74.715% C and 7.81% H. The formula  $C_{28}H_{34}O_5$  proposed for the first time by Etti requires: 74.66% C and 7.55% H and seems to be in view of the above results well established.

### Optical properties of bixin.

The spectrum of bixin is highly interesting. A comparison of the reproduction of our photographs (Plate XIX) representing the the absorption spectrum of bixin dissolved in chloroform or alcohol and obtained by using quartz lenses and Iceland prism with the spectra of lipochroms reproduced by C. A. Schunck <sup>1)</sup> will show that these spectra are of the same type. In the bixin spectrum however we have not only the three bands characteristic for lipochroms but still two more situated in the ultraviolet in the region of the solar lines N and O.

The extraordinary colouring power of bixin is clearly demonstrated by the first 6 stripes on the photograph (plate XIX). The photographs were started with a solution of bixin in chloroform, containing in 1 cm 0.0001 g, thickness of layer 19 mm. This solution did not let through any light, similarly the next solution, containing 0.00005 g per centimeter, was not penetrated by light. The third solution, with the concentration of 0.000025 g per cm shows already a broad dark band and two very faint already mentioned bands in the extreme ultraviolet end of the spectrum. These bands were not noticed by former observers. The fourth

<sup>1)</sup> Proc. Roy. Soc. **63**, 389 (1898), **65**, (1899).



solution containing 0.000012 per ccm does already not show the two faint bands but a dark band which is dissolved into three when using a still more diluted solution (0.0000062 g per ccm), of which the darkest is situated in front of the F line, the second, fainter one past that line, and the third, faintest, in the neighbourhood of the k line.

The study of the bixin spectrum will no doubt facilitate the examination of foodstuffs adulterated (dyed) by it.

### The alkaline salts of bixin.

The alkaline salts were already twice the subject of investigations. Etti found that bixin may form two series of salts, the first contain one atom of metal, the others two. This author obtained the metallic compounds by the action of sodium carbonate or potassium carbonate on the alcoholic solution of bixin. Zwick, who repeated the experiments of the former observer could not get by this method any crystals, he obtained them however by a different method, namely by acting upon a bixin solution (prepared by using a 12% alcohol) with a solution of potassium hydroxide. The composition of the potassium salt corresponds to the formula  $C_{28}H_{32}K_2O_5 + 2H_2O$ . Zwick states that his method does not always lead to a crystalline product but he is unable to describe the conditions which are necessary for obtaining them.

We have found that the preparation of the monobasic salts does not present any difficulties if the following conditions are observed: 0.23 g of metallic sodium are dissolved in 75 cm of 70% alcohol and the solution mixed with a suspension of 4.5 g of bixin in 75 ccm alcohol of the same strength. The whole is heated on the water bath until a clear solution results, and quickly filtered. In the filtrate very soon the formation of glittering crystals takes place. These were filtered off, washed with a little alcohol, recrystallized from 70% alcohol and dried at 30°. Drying at a higher temperature is not advisable, the substance absorbs oxygen and alters its dark copper red colour, turning orange.

Analysis:

0.3040 g subst. gave	0.0481 g $Na_2SO_4$
found	theory $C_{28}H_{32}O_5Na$
Na: 5.12%	4.87%

The potassium salt may be obtained under the same conditions



as the sodium salt. We used 4.5 g of bixin 0.39 g of potassium and 150 cm of alcohol of 70%. It crystallizes in very thin needles grouped to stars, which possess a dark copper red colour.

	0.2463 g. subst. gave	0.0433 g $K_2SO_4$
	found	theory $C_{28}H_{33}O_5K$
K :	7.88%	7.99%.

#### Bixin contains a methoxyl group.

This fact has been discovered by Zwick. We repeated the necessary experiments and are in the position to confirm his result. The methoxyl determination was carried out according to the well known method of Zeisel.

	0.3750 g gave	0.2000 g AgI
	found	theory $C_{27}H_{31}O_4(OCH_3)$
$OCH_3$ :	7.01	6.90%.

#### Alkylation of bixin.

In view of the pronounced acid character of bixin we hoped to be able to introduce alkyl groups into its molecule but found, that although alkylating reagents do react with the substance it was impossible to isolate well defined bodies in a crystalline state.

We heated for instance 4 g of the sodium salt of bixin with 40 g of freshly distilled dimethylsulfate on the water bath. The dark violet-green colour of the solution turned after  $\frac{1}{2}$  hours heating to dark green and afterwards to olive-brown. After 2 hours the solution was poured into 50 cm of water and the resinous substance produced solidified after 24 hours. After filtering and washing with water we dried it at  $110^\circ$ . The substance possesses an olive brown colour, is easily soluble in chloroform, less in alcohol, difficultly soluble in benzene and ether. Sulphuric acid takes it up with a dark violet colour which turns after some time violet brown. As all attempts to crystallize this product were unsuccessful we extracted a portion with chloroform, evaporated the solution and analyzed the amorphous, lustrous mass obtained. The appended analysis will show that an alkylation process evidently took place and that the percentage of  $OCH_3$  found corresponds to the value required by methylbixin:

1)	0.2346 g gave	0.2315 g AgI
2)	0.2140 " "	0.2112 " "



	found	$C_{27}H_{30}O_3(OCH_3)_2$
1)	13.01% $OCH_3$	13.36% $OCH_3$
2)	13.02 " "	

Whether this substance represents really a chemical individuum, methyl-bixin, we cannot say with certainty, but we think it probable.

### Reduction of bixin.

The reduction of bixin has been tried by Etti and later on by Zwick, but the results were of little importance. We succeeded in obtaining a crystallized reduction product, which is however very unstable in the presence of air. Its preparation is rather tedious and the yields unsatisfactory.

We proceeded as follows: 5 g of bixin were heated with 100 cm of glacial acetic acid to the boiling point of the latter, and to the solution gradually added 10 g of zinedust. After a few minutes the original red brown colour of the solution turned bright orange; at this stage the vessel was closed with a stopper provided with a Bunsen ventil and heated on the water bath for 3 hours, and finally filtered. Very soon there were formed in the filtrate orange, glittering crystals; these were filtered off and dried over potassium hydrate in vacuo. The dry crystals were then washed with water and dried again over sulphuric acid in a current of carbon dioxide. Finally the product was recrystallized three times from glacial acetic acid and dried at first in a desiccator over conc. sulphuric acid in a current of carbon dioxide and finally in a U-tube at  $90^\circ$ , also in a current of carbon dioxide.

This reduction product represents a beautifully crystallized substance, orange in colour, possessing metallic lustre. Under the microscope it represent rhombs. The best solvent for it is glacial acetic acid; chloroform takes it up in small quantities only, still less alcohol and ether. An aqueous solution of potassium hydrate does not act upon the crystals, alcoholic takes it up readily. Melting point  $200.5^\circ$ , heating quickly  $208-210^\circ$ .

#### Analysis:

1)	0.1242 g	gave	0.0854 g $H_2O$ ,	0.3435 g $CO_2$
2)	0.1222 " "		0.0851 " " ,	0.3374 " "
3)	0.1430 " "		0.0986 " " ,	0.3949 " "



corresponding to

- 1) 7.64% H and 75.42% C
- 2) 7.73 " " " 75.30 " "
- 3) 7.66 " " " 75.31 " "

It is very difficult to find a formula which would be in harmony with the above results and express at the same time the relation of the reduction product to bixin. We must postpone therefore any definite statements in this respect until the time when our knowledge of the chemical nature of the reduction product is more complete, the more so as in view of the great changeability of the substance under the influence of air the above analytical results may not be absolutely reliable. That the reduction product of bixin undergoes some change under the influence of air can be noticed already by a superficial examination of preparations kept for some time in desiccators in the presence of air. The original bright orange colour gradually fades and after a few days an almost white substance results. This change takes place rapidly at a somewhat elevated temperature, for instance at 100°. With the change of colour goes hand in hand the fall of the melting point.

We have analyzed three samples of this changed product and the results point unmistakably to an oxidation process. All the samples were kept in the presence of air before being analyzed as long as an increase of their weight took place.

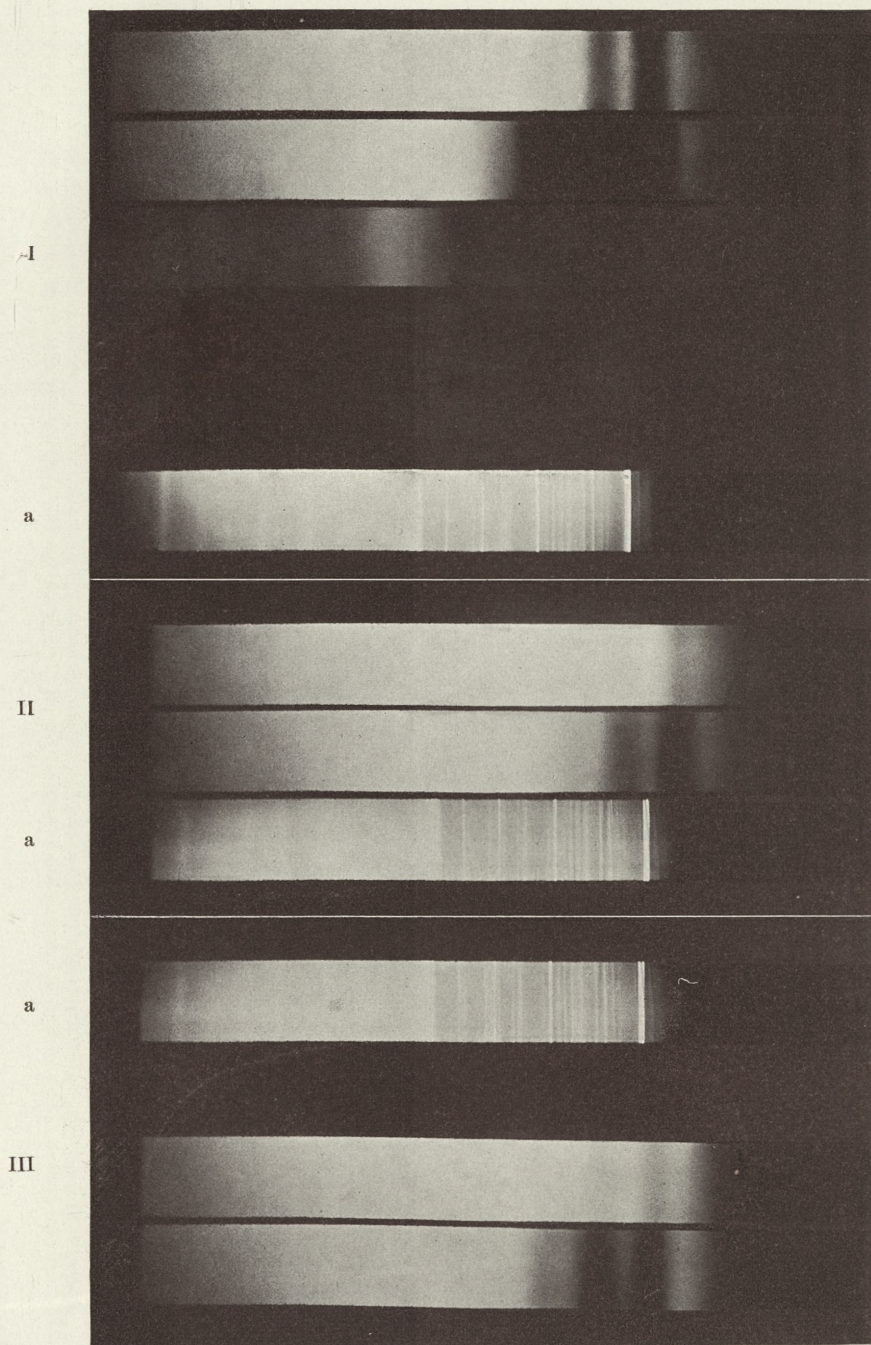
0.1611 g subst.	gave	0.0861 g H <sub>2</sub> O,	0.3438 g CO <sub>2</sub>
0.1088 " " "		0.0570 " " ,	0.2347 " "
0.1165 " " "		0.0618 " " ,	0.2507 " "

corresponding to:

- 1) 5.93% H, 58.20% C
- 2) 5.82 " " 58.83 " "
- 3) 5.88 " " 58.68 " "

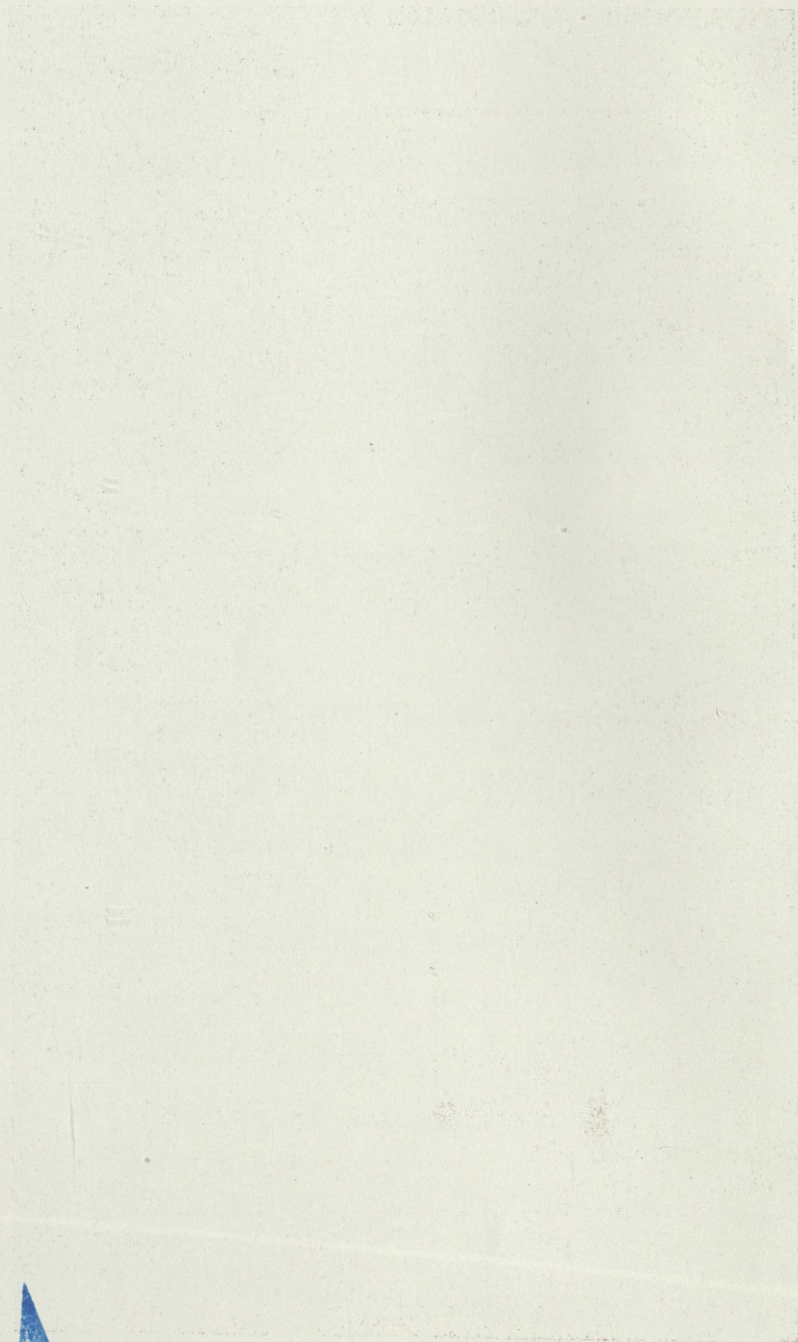
This behaviour of the reduction product of bixin is no doubt highly interesting as it supports the view formerly expressed concerning the relation of bixin to lipochroms. The latter are easily oxidisable; carotene for instance cannot be kept for any length of time in the presence of air and similarly behaves the reduction product of bixin. The study of the optical properties of the latter,





I. Bixin in chloroform.  
II. Bixin in chloroform.  
III. Bixin in alcohol.  
a) Hydrogen lines.





1918



which will be undertaken shortly, may yield additional supports of the above view<sup>1)</sup>.

The reduction leads to noncrystalline substances if the conditions described above are not fulfilled. If for instance more acetic acid is used and the solution poured into water a yellow precipitate is formed which is easily soluble in acetic acid and which could not be crystallized from any of the usually applied organic solvents.

In our next communication we hope to be able to add to the knowledge of the reduction product of bixin and to describe our studies concerning the action of phenylhydrazine and of water or alcohol at high temperatures under pressure, and also the hydrocarbons produced by distilling bixin with zinc dust.

<sup>1)</sup> It is also worthy of notice that under certain, hitherto not clearly ascertained conditions, bixin yields under the influence of reducing agents a substance possessing the scent of violets. According to Arnaud and other authors carotene when heated also emits the scent of violets.

---

Nakładem Akademii Umiejętności.

Pod redakcją

Członka delegowanego Wydziału matem.-przyr., Dra Leona Marchlewskiego.

Kraków. 1905. — Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod zarządem J. Filipowskiego.

20 Grudnia 1905.





