

glucose concentration 0.2%. Some of this culture liquid was added to the agar slant tubes. The bacterial coat was first lifted off and mixed with culture liquid, and then the solution was poured into an Erlenmeyer flask. After vigorous shaking a uniformly distributed suspension is obtained. This suspension is used to inoculate the liquid culture media of 125 ml Erlenmeyer flasks (in each 50 ml culture liquid + 2 ml suspension). Every day three of these flasks are analysed for total nitrogen by the PARNAS-WAGNER micro-Kjeldahl method. The analyses furnish the following data in respect to the nitrogen fixing capacities of the different strains:

Table I

Amount of nitrogen in 100 ml suspension of different strains of nitrogen fixing bacteria of cows, sheep, and horses

Day of experiment	mg N in 100 ml liquid culture medium inoculated with bacteria of the:					
	Cow			Sheep		Horse
	I. d.	V. f.	VI. f.	I. c.	I. e.	I. l.
Start	0.20	0.19	0.18	0.16	0.16	0.17
1st day	0.29	0.27	0.25	0.16	0.19	0.22
2nd day	0.38	0.40	0.28	0.19	0.23	0.35
3rd day	0.40	0.42	0.33	0.27	0.30	0.54
4th day	0.39	0.45	0.35	0.28	0.32	0.55
5th day	0.38	0.55	0.35	0.38	0.38	0.59
7th day	0.39	0.65	0.30	0.56	0.67	0.77
10th day	0.39	0.95	0.55	0.63	0.71	0.79
14th day	0.37	1.18	0.76	1.14	1.13	0.94
20th day	0.40	1.10	0.84	1.11	1.22	0.75

The given data are average values of 3 samples. The differences between these 3 values are statistically insignificant. The increase in nitrogen is most remarkable; this again shows that through these bacteria nitrogen of the air can enter into the metabolism of our farm animals. But the data also show that there are great differences in regard to nitrogen fixing ability between the different strains of bacteria even within the same animal (for instance cow I. d. and cow V. f.).

With regard to the nutrient solution, the question is raised whether succinic acid or glucose or both of them are indispensable for nitrogen fixation. Experiments in this line show that each of these substances alone or both together can effect nitrogen fixation. Glucose alone is more efficient than succinic acid alone. But none of them enables such vigorous nitrogen fixation as do both together.

During the period of fixation, the p_H value often drops, sometimes down to p_H 4.5. At this degree of acidity no more nitrogen fixation can take place, but if the optimum value (p_H 8.0) is experimentally reestablished, nitrogen fixation begins again. This is the case with strain Horse 1.1., where the p_H value dropped from 8.0 to 5.5 within four days. Re-establishment of the p_H value to p_H 8.0 through addition of $NaCO_3$ causes fixation to become vigorous again and results in the maximum amount of nitrogen or 1.8 mg per 100 ml of culture liquid, while the uncharged controls remain at 1.0 mg per 100 ml.

It is known that new-born animals do not possess any intestinal micro-organisms. They acquire them with the first lot of grass or hay, soiled by excrement. If this is so, the same nitrogen fixing bacteria may be found in the faeces too. Indeed, with the method described above, the cultivation of nitrogen fixing bacteria from cow excrements collected at the moment of defecation was

successful. This may be an explanation for DARH's¹ observation, that "the value of farmyard manure (cow dung) is due not only to its nitrogen content, but also to its power to fix nitrogen of the air".

Until recently it was considered impossible that the molecular nitrogen of the atmosphere could take any active part in the metabolism of animals. TÓTH, WOLSKY, and BÁTORI² were the first to show that fixation of free nitrogen of the air occurs in aphides. Since then nitrogen fixation has been found in many other species of insects containing symbiotic micro-organisms (TÓTH³). Our experiments show that the fixation of nitrogen by means of microorganisms is not limited to insects but exists also in farm animals.

I am indebted to the Swedish Wenner-Gren Foundation for a grant which has financed this work.

L. TÓTH

Microbiological Institute, Uppsala, Sweden, May 14, 1948.

Zusammenfassung

1. Aus steril entnommenem Inhalt des Pansens vom Rind, dem Schafe und des Colcums des Pferdes konnten auf einem stickstofffreien Agarnährboden verschiedene Stämme stickstoffbindender Mikroorganismen gezüchtet werden. 2. In stickstofffreier Nährlösung vermögen diese Rohkulturen Luftstickstoff in verschiedenen starkem Maße zu binden. 3. Als C-Quelle erwiesen sich Glukose und Bernsteinsäure als geeignet. Glukose allein ergibt bessere Resultate in der Stickstoffanreicherung als Bernsteinsäure allein. Noch besser aber wirken beide Substanzen zusammen. 4. Bei Stämmen mit ausgeprägter Fähigkeit, Stickstoff zu binden, fällt der p_H -Wert der Nährlösung manchmal so stark (bis 4,5), daß die Stickstoffbindung aufhört. Bei Wiederherstellung der ursprünglichen p_H -Verhältnisse (p_H 8,0) setzt sie wieder ein. 5. Die höchsten Werte der Stickstoffanreicherung erreichten 1,8 mg N pro 100 ml Nährlösung gegenüber einem Ausgangswert von 0,18 mg N pro 100 ml. 6. Ähnliche stickstoffbindende Mikroorganismen konnten ebenfalls aus frisch gesammelten Fäces des Rindes gezüchtet werden.

¹ N. R. DARH, Nature 159, 65 (1947).

² L. TÓTH, A. WOLSKY, and M. BÁTORI, Z. vergl. Physiol. 30, 67 (1942).

³ L. TÓTH, Monographs Natural Sciences, V, 1 (Budapest 1946).

Quelques propriétés basiques de la streptomycine

A la suite des résultats de S. COHEN¹ et des nôtres² relatifs à la formation de complexes insolubles entre la streptomycine et les acides nucléiques, nous avons recherché si ce n'était pas une propriété générale de la basicité de la streptomycine de donner des complexes insolubles avec des substances organiques à point isoélectrique acide. Nous avons ainsi obtenu de ces complexes avec l'acide tannique, la céphaline, des acides gras à longues chaînes (oléique, palmitique)³.

En ce qui concerne plus spécialement les phosphatides, signalons tout d'abord que nous n'avons pu obtenir de

¹ S. COHEN, J. Biol. Chem. 163, 511 (1947).

² F. GROS, B. RYBAK, M. MACHEBŒUF et U. RAMBECH, C. R. Acad. Sci. 226, 1550 (1948). – F. GROS et B. RYBAK, Helv. chim. acta (sous presse).

³ En ajoutant une solution de streptomycine à des émulsions en eau distillée ou même salée à 90/100 d'acide oléique ou palmitique amenées à p_H 7,5–8, on constate la formation d'un précipité très abondant qui floccule facilement et adhère aux parois du tube. Avec l'oléate de sodium, la glucosamine-HCl, la triméthylamine-HCl ou encore $CINH_4$ donnent une très importante précipitation.

complexes entre l'ovoléithine ou la lécithine du soja et la streptomycine-H Cl à p_H 7 ou 11. Ce fait provient sans doute de ce que la lécithine présente des fonctions acides trop faibles par suite de la neutralisation interne entre les groupements phosphoriques et la choline¹ contrairement à la céphaline qui se comporte comme un acide monobasique², dans ce dernier cas, on obtient rapidement avec la streptomycine un précipité abondant. Le zéphirol (chlorure de dodécylbenzyltriméthylammonium) et la sapamine (méthylsulfate d'oléylaminoéthyl-diéthylméthylammonium) donnent également des complexes insolubles avec la céphaline qui se redissolvent dans un excès de zéphirol ou de sapamine; par contre les complexes céphaline-streptomycine ne se redissolvent pratiquement pas dans un excès de streptomycine. Signalons que le chlorhydrate d'hydroxylamine donne un faible précipité avec les céphalines, par contre la *D*-glucosamine-HCl, le chlorhydrate de triméthylamine, l'hydrochlorure de guanidine, le chlorhydrate d'aniline, l'arginine, l'hexaméthylènetétramine ne donnent rien dans les mêmes conditions. D'autre part, ni les cénapses lipo-protéiques du sérum, ni l'antigène somatique des bactéries Gram moins (*Phytomonas tumefaciens*, *Eberthella typhosa* 0 901), ni les lipides extractibles du bacille de Koch par le méthylal ne donnent de complexes insolubles avec la streptomycine; enfin les acides folique, ascorbique, nicotinique et indolacétique, et le taurocholate de sodium se sont comportés identiquement.

Le complexe streptomycine-céphaline est soluble dans l'éther, en milieu alcalin (NaOH, NH_4OH , hydroxylamine-HCl, monoéthanolamine, hexaméthylènetétramine), en présence de sels neutres (ClNa, citrate), insoluble dans Cl_2Ca . Il se solubilise également par un court chauffage mais ne se reforme pas par refroidissement, contrairement au complexe streptomycine-acide nucléique. Si après refroidissement on ajoute de la streptomycine au milieu renfermant le complexe dissous, on ne constate aucune précipitation, par contre, l'addition de céphaline entraîne la réapparition du complexe. De plus, si on met en présence le complexe céphaline-streptomycine et de l'acide ribonucléique de levure et que l'on chauffe ce mélange, le complexe se solubilise et il se reforme un nouveau complexe par refroidissement qui, de toute évidence, ne peut être qu'un système streptomycine-acide nucléique. Ces faits montrent que le complexe streptomycine-céphaline (et vraisemblablement le complexe streptomycine-acide nucléique) se dissocie par chauffage en milieu neutre, mais, tandis que dans le cas acide nucléique, celui-ci ne se modifie pas, la céphaline se dénature par chauffage en présence de streptomycine (ni la streptomycine ni la céphaline chauffées, indépendamment à p_H 7, ne perdent leur propriété de combinaison réciproque; de plus, chauffée avec de la *D*-glucosamine-HCl et de la guanidine-HCl, la céphaline ne perd pas sa faculté de précipiter avec la streptomycine).

Peu soluble dans le taurocholate de sodium, le sel streptomycine-céphaline est insoluble dans l'alanine, le glycolle, la créatine, l'acide glutamique, le chlorure de guanidine, l'urée.

Signalons enfin que la trypaflavine donne également des complexes insolubles avec la céphaline et l'acide ribonucléique. Ces complexes, du type de ceux obtenus par CHARGAFF et ZIFF³, sont cependant insolubles à chaud contrairement aux complexes céphaline ou acide

nucléique-streptomycine. Ils se dissolvent à froid dans la solution de BANGA-SZENT-GYÖRGYI¹ en donnant une coloration orangée et dans la solution d'EDSALL-BANGA-SZENT-GYÖRGYI¹ en donnant une liqueur jaune à fluorescence verte.

De ces faits ressortent plusieurs conclusions ou spéculations:

1° On notera le parallélisme qui existe entre les sels céphaline-streptomycine et les sels céphaline-salmine (protamine) obtenus par CHARGAFF^{2,3}. Ceci nous conduit à considérer que, au cours du remaniement incessant dont sont l'objet les molécules d'une cellule vivante, la streptomycine pourrait se substituer aux protéines basiques-supports des ribo- ou désoxyribonucléoprotéines et ainsi inhiber le métabolisme des nucléoprotéines. Le fait que l'acide nucléique détoxifie la cellule intoxiquée par les acridines⁴ – et vraisemblablement par la streptomycine – justifierait cette hypothèse.

2° La mise en évidence de ces nouveaux complexes confirme pleinement notre point de vue quant à la formation de véritables sels entre la streptomycine et les acides nucléiques⁵ contrairement à la conception de complexes électro-adsorptifs défendue par MASSART et ses collaborateurs⁶.

3° L'activité anti-streptomycine du lipositol découverte par RHYMER et ses collaborateurs⁷ nous paraît relever, pour une grande partie, à la présence dans ce mélange complexe d'une importante proportion d'acide oléique⁸.

4° En poursuivant l'analogie entre les protéines basiques et la streptomycine, on se souviendra que d'après KOSSEL⁹ ce serait les groupements guanidiques des protéines basiques qui seraient responsables de leur toxicité, or:

a) La streptomycine possède par sa fraction streptidine des groupements guanidiques et,

b) MILLER et collaborateurs sur *E. coli*¹⁰ EULER et JAARMA sur *Proteus vulgaris*¹¹ ont montré que les protamines et les histones avaient des propriétés statiques. Sans insister autrement sur le mode d'action sur lequel nous aurons l'occasion de revenir prochainement, nous indiquerons ici les critères de toxicité de la streptomycine. A notre sens, la toxicité relève au moins de deux mécanismes:

1° un véritable choc neuroclastique lié à la formation de complexes insolubles avec les céphalines et amenant les troubles connus dans l'audition, la vision...

2° un choc pharmacodynamique, propriété générale des groupements guanidiques (contraction musculaire,

¹ I. BANGA et A. SZENT-GYÖRGYI, *Enzymologia* 9, 97 (1940).

² E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.* 125, 661 (1938).

³ Certaines différences sont à remarquer, par exemple: a) la possibilité d'obtenir des sels à p_H 10–11 entre la lécithine et la salmine (CHARGAFF) et l'impossibilité d'en obtenir dans les mêmes conditions avec la lécithine et la streptomycine; b) le fait que l'histone extraite du thymus précipite avec le taurocholate de sodium tandis que la streptomycine, même à 100 000 unités/ml, ne précipite pas.

⁴ H. McILWAIN, *Biochem. J.* 35, 1311 (1941).

⁵ F. GROS et B. RYBAK, *Helv. chim. acta* (sous presse).

⁶ L. MASSART, G. PEETERS, J. DE LEY, R. VERCAUTEREN et A. VAN HOUCKE, *Exper.* 3, 288 (1947); L. MASSART, G. PEETERS et A. VAN HOUCKE, *Exper.* 3, 289 (1947).

⁷ I. RHYMER, G. I. WALLACE, L. W. BYERS et H. E. CARTER, *J. Biol. Chem.* 169, 457 (1947).

⁸ D. W. WOOLLEY, *J. Biol. Chem.* 147, 581 (1943).

⁹ A. KOSSEL, *Protamine und Histone. Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiet der Biochemie* (Leipzig-Wien 1929).

¹⁰ B. F. MILLER, R. ABRAMS, A. DORFMANN et M. KLEIN, *Science* 96, 428 (1942).

¹¹ H. v. EULER et M. JAARMA, *Ark. Kemi* 23, 13 (1946).

¹ T. H. JUKES, *J. Biol. Chem.* 107, 781 (1934).

² H. RUDY et I. H. PAGE, *Z. Physiol. Chem.* 193, 251 (1930).

³ E. CHARGAFF et M. ZIFF, *J. Biol. Chem.* 131, 25 (1939).

paralysie centrale et périphérique...). Ce choc, que l'on retrouve dans l'intoxication par CCl_4 par exemple où il correspond à une accumulation de guanidine¹, peut être combattu par l'administration de cocaïne ou de novocaïne² et peut-être de glucose qui est un anticonvulsif dans les chocs guanidiques d'après ELLIS³.

B. RYBAK et F. GROS

Institut Pasteur, Paris, le 24 mai 1948.

Summary

Streptomycin forms an insoluble complex with organic substances of which the isoelectric point is situated in the acid range such as cephalin, oleic, palmitic, and tannic acid.

¹ J. W. TOMB et M. M. HELMY, *J. Trop. Med. Hyg.* 36, 265 (1933).

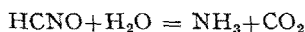
² E. FRANK et R. STERN, *Arch. exp. Path. Pharm.* 90, 168 (1921).

³ M. M. ELLIS, *Biochem. J.* 22, 941 (1928).

Cyanase, a new Enzyme Catalysing the Hydrolysis of Cyanate

It was recently found that some pharmacological properties of cyanate, e. g. the diuretic action in rats¹, was lost on incubation of cyanate with serum and organ extracts². This was partly due to binding of cyanate by certain proteins³, but the possibility remained that an enzymic destruction might have taken place as well. A further indication for the probable existence of a mechanism destroying cyanate in liver was obtained in recent experiments by DIRNHUBER and SCHÜTZ⁴, when small but significant amounts of cyanic acid were liberated and distilled from brain and other tissues, but no trace was recovered from either fresh liver tissue or after it was incubated under physiological conditions. An investigation was therefore undertaken to see whether an enzyme could be found in tissues which was capable of destroying cyanate.

An enzyme was found in liver, kidney and erythrocytes, capable of catalysing the hydrolysis of cyanic acid into ammonia and carbon dioxide, thus:



Aqueous extracts were made of organs from freshly killed rats or guinea pigs by grinding the organs with moistened sand and extracting the material with water. 0.4 M-phosphate buffer solution (p_H 6.3) was added to the centrifuged extract (1:5, v./v.); 0.2–0.3 ml of this mixture was placed into one side arm of a Warburg vessel. 0.2 ml of a freshly made 0.1 M aqueous solution of sodium cyanate was placed in the other side arm. Pure sodium cyanate was made from urea according to BADER, DUPRÉ, and SCHÜTZ⁵. 2.8–3.0 ml 0.4 M-phosphate buffer (p_H 6.3) were placed in the main compartment. It can be seen in Fig. 1 that both liver and kidney extracts were active in accelerating the hydrolysis of cyanate at p_H 6.3. Serum, or similarly made extracts of brain or muscle showed no activity at this p_H . No indication was yet found for the extracts

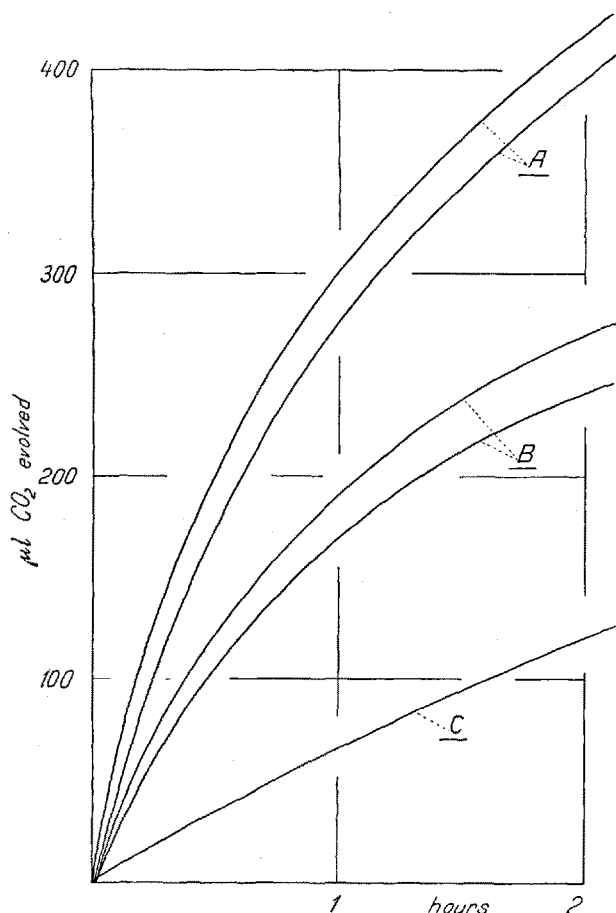


Fig. 1. – Hydrolysis of 1.3 mg sodium cyanate at p_H 6.3 (phosphate buffer, 0.4 M), in the presence of liver extract (A), and kidney extract (B). C = spontaneous hydrolysis.

having any catalytic action in the opposite direction.

The p_H optimum of the enzyme obtained from liver was found to lie in the region of 6.2–6.3. At p_H 5.5 the enzyme was inactive and at 6.8 its activity was reduced to less than 40% of that shown at 6.3. The enzyme obtained from liver and kidney was clearly thermolabile. Liver extract incubated for 15 min. at 65° was inactive.

The properties of this enzyme are being further investigated. We propose for this new enzyme the name of "cyanase".

An alternative way to show the activity of the enzyme, was by determining the decrease of cyanate present in the solution, on incubation of the latter with the enzyme. Using the recently developed manometric technique for the determination of cyanate¹, 3 M-acetate buffer (p_H 5) is added from one side bulb of a Warburg vessel to the enzyme substrate mixture contained in the main compartment. By this addition any carbonate and bicarbonate present is decomposed, with the consequent evolution of CO_2 . When working at room temperature equilibrium is attained again within 10 to 12 min. During this time only negligible amounts of cyanate are destroyed. When, after equilibration, 10% H_2SO_4 is added from the other side bulb, the further evolution of CO_2 then occurring is due to the hydrolysis of cyanate at this low p_H . From the evolved CO_2 the amounts of cyanate can be calculated, since carbonate and bicarbonate were decomposed before.

¹ P. DIRNHUBER and F. SCHÜTZ, *Biochem. J.* 42, 628 (1948).

¹ F. SCHÜTZ, *J. Physiol.* 105, 17, P (1946). – K. M. BIRCH and F. SCHÜTZ, *Brit. J. Pharmacol.* 1, 186 (1946).

² M. MILLINGTON and F. SCHÜTZ, in preparation.

³ S. B. HOLTHAM and F. SCHÜTZ, *Biochim. Biophys. Acta* (1948), in the press.

⁴ P. DIRNHUBER and F. SCHÜTZ, *Biochem. J.* 41, liv (1947); *Biochim. Biophys. Acta*, in the press, (1948a); *Biochim. Biophys. Acta*, in the press, (1948b).

⁵ R. BADER, D. J. DUPRÉ, and F. SCHÜTZ, in the press.