

piert werden, während erst für größere Schwankungen (etwa oberhalb 30 mm Hg) die Schwimmblasenwand zu- ständig wäre¹.

S. DIJKGRAAF

Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, den 20. Dezember 1949.

Summary

Like other Physostomi, *Phoxinus laevis* reacts to artificial pressure decrease by giving off gas bubbles from the swimbladder through the air duct («Gasspuck-reflex»). This reaction is partly released by *proprioceptive* stimuli (extension of the swimbladder), partly by *exteroceptive* stimulation (passive upward displacement). Concerning the first category of stimuli it has been stated that pressure perception in the labyrinth—connected with the swimbladder by the Weberian ossicles—plays a part at minor pressure decreases. For the rest, direct perception of the swimbladder extension is shown to be of great importance. In the latter case probably sensible nerve endings in the wall of the swimbladder are stimulated.

¹ Vgl. auch MOEHRES (l. c., S. 39).

Fixation of Free Nitrogen by Insects

The main-object of the present paper is to offer a proof that pure cultures of symbionts from the larvæ of a series of insects are able to fix atmospheric nitrogen. The insects in question include the bark beetles (*Ips* sp.), *Sitodrepa panicea*, *Tribolium navale* (from flour), clothes moths, a moth living in dry mushrooms (*Ephestia*?) and also partially *Drosophila melanogaster*. The symbionts studied are *Torulopsis-Cryptococcus*¹—which we propose to call *Sulcia*—occurring in masses in the fatbodies of *Ips*, *Sitodrepa*, *Tribolium navale*—*Azotobacter* (*Azot. Sulci*) occurring under similar conditions in the fatty tissues of clothes moths and of *Ephestia*; we also found in some preparations of the latter insect a *Torulopsis*. Moreover, a *Torulopsis* was discovered (Fig. 3, HEIDENHAIN, magnification c. 400) in the larvæ of *Drosophila*.

Azotobacter, appearing in cultures in the form of occasional thick rods, cocci or irregular sarcina-like clusters, etc., were found in the larvæ of *Ips* which we have previously studied closely in other parts of the bodies. Fig. 1 shows a microtome section from an egg of *Ips typographus*, FLEMMING, HEIDENHAIN + aniline-safranin + inversely staining after tannin and potassium antimonyl tartrate with gentiana. From top to bottom: *Torulopsis* (black), small coccus (*Azotobacter*, photo indistinct) red, magn. c. 1000. Fig. 2 the coccus and the zooglae of symbiotic, very minute bacteria stained blue, magn. c. 400, photographed by O. JIROVEC.

The eggs of *Ips* were preferred to culture tests following sterilization with sodium ethyl mercuric thiosalicylate. Instead of larvæ we also used the pupæ of other insects. The culture of *Torulopsis* was made with decoctions of white beans, peptone and sucrose and was kept pure with penicillin. We are at present unable to include other microbial isolates. In 1949 we showed² by means of VIRTANEN-TOTH's method that the larvæ of three species of the destructive spruce bark beetle (*Ips*) can fix free nitrogen in definite phases of their life,

notably before their symbionts are digested. In our fixation experiments we used succinic acid¹ for inducing some oxidation processes. Vitamins, which were also supposed to play a part in this process were supplied as "bioklein", a Czechoslovak product from barley germs and containing mainly vitamin B₁. Glutamate (as sodium salt) together with asparagin provided the amids. The solutions contained: (1) succinic acid 200 cc., ·2%, bioklein, ·5 g, sucrose, 3%; (2) substitute ·2% glutamate for bioklein; (3) substitute ·1% asparagin for bioklein. To each a ·3% K₂HPO₄ and K₂CO₃ solution was added to make the p_H = 7·5.

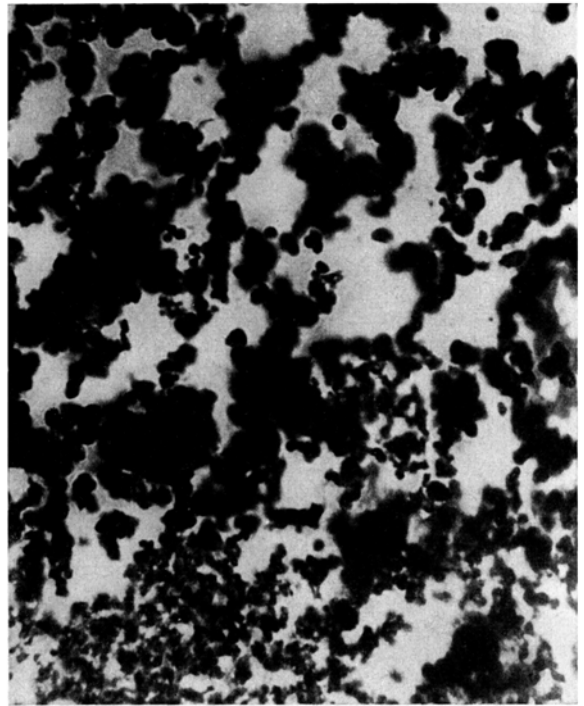


Fig. 1. — Microtome cross-section through the same egg of *Ips typographus*. Above: *Torulopsis* (black-HEIDENHAIN); below: *Coccus* (*Azotobacter*) (red-safranin), c. 1000 ×.

The cultures were kept in conical flasks at 18° C or above, with access of air, H₂SO₄. The N-content was determined after a week by Kjeldahl's method and the results were as follows:

Torulopsis in clothes moth; increase in N compared with initial content, (1) max. 213%; min. 21%; unaerated 8%, (2) 54% (control 14 mg N) aerated.

Ephestia (1) 14%; 5·4%.

Tribolium (1) max. 114%; min. 13%. (2) 19%.

Ips typographus (1) max. 55%; unaerated 1%. (2) 7%.

Sitodrepa (1) 7% (in the hot weather the culture contents became somewhat concentrated). (2) unaerated 20%.

Coccus small (*Azotobacter*) (2) 11%. Large (*Azotobacter*) (3) 20% (control 13·86 mg N). (2) unaerated 3·4%.

All cultures of *Torulopsis* and *Azotobacter* fixed free nitrogen; those with glutamate (2) to a lesser degree. Differences in quantities fixed is likely to depend upon the amount initially present in the cultures. E. g.:

Clothes Moth (1) (a) control 3·7 mg N, final 11·6. 50 cc., increase 213%. (b) control 5·32 mg N, final 6·44. 100 cc., increase c. 21%.

Tribolium (1) (a) control 2·2 mg N, final 4·7. 50 cc., increase 114%. (b) control 5·6 mg N, final 6·3. 100 cc., increase c. 13%.

¹ A. T. HENRICI *et al.*, *Moulds, Yeasts, Actinomycetes*, p.308 (1947).

² J. PEKLO and J. ŠATAVA, *Nature* 163, 336 (1949).

¹ L. TOTH and T. Z. CSAKY, *Exper.* 4, 73 (1948).

These results agree with those of TOTH and others¹ with regard to different N-content in the media and the rates of fixation of N in pure cultures of *Aphis* symbionts (see also the observations of PEKLO and ŠATAVA²). Or they depend of the method of aeration.

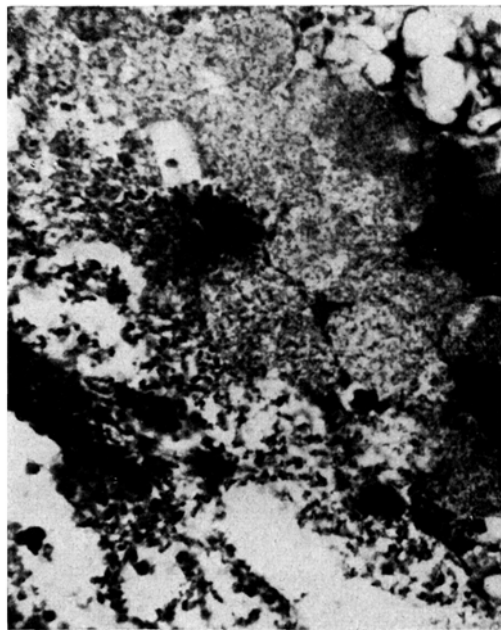


Fig. 2. – From left to right: *Coccus-Azotobacter* (safranin). Symbiotic bacterium (inverse staining: tannin, K-SbTart. Gentiana). c. 400 ×.

Preliminary experiments with *Drosophila* mixed cultures (*Torulopsis* and symbiont bacterium) show (1) 3% (un-aerated) increase, (2) (un-aerated) 5% increase.

H. ZIKES³ found that a *Torula* occurring on leaves was able to fix free nitrogen. H. SCHANDERL⁴ succeeded in cultivating a yeast symbiont from *Rhagium* from the gut mycetomes (gut diverticula), not from the adipose tissue, and claims that he found 25% fixation of nitrogen during two months. M. BLEWET and G. FRAENKEL⁵ believe that *Tribolium confusum* and *Ephestia elutella* do not contain intracellular symbionts and that therefore some vitamins are indispensable for their growth; compare, however, an illustration in BUCHNER⁶ demonstrating a bacterial mycetome in *Tribolium confusum* (from the larvæ of *Tribolium navale* we have isolated it). On the contrary, in our species of *Tribolium* and moths there are considerable quantities of symbionts in the fatty tissues. The same authors found that *Sitodrepa* eggs after sterilizing can be brought almost to complete growth by adding some vitamins, especially 10% of yeast to their sterile cultures. In them the symbionts (occurring in diverticula) were supposed to be absent. Sterilizing with alcohol-chloramin may, however, weaken the biochemical activities of egg symbionts (e. g. of *Torulopsis*). Its presence in the fatty tissue has hitherto been overlooked even by BUCHNER⁶, p. 362

seq. and his students. BREITSPRECHER isolated from the diverticula of *Ernobius mollis* a *Torula*, from *Sitodrepa* a yeast-like fungus. BENECKE and SPECHT (1933) found *Torula* in the eggs of *Lecanium corni*. On the other hand it is also possible that fixation of free N₂ by our symbionts was fostered by certain vitamins. Their activity for *Radicicola* was already suggested by VIRTANEN. Thus, the question of intracellular symbiosis and vitamin requirements (BLEWET and FRAENKEL) deserves to be re-investigated. Recently, KAMEN and GEST¹ used biotin and *d,l*-malic acid in studying the fixation of N₂ by *Rhodospirillum*.

In the summer of 1948 we analysed two collections of a small cerambycid (young and old larvæ) by VIRTANEN-TOTH's "survival method", but with negative results. No *Torulopsis* was present in the fatty tissues.

An Ambrosia symbiosis. *Xyleborus dispar* L. from apple trees consumes an *Ambrosia* fungus in young wood; in old, dry stems there is no fungus present. Isolation from *Ambrosia* offered us the fungus and a small *Torulopsis*. Its pure cultures fixed 24% of free N₂ in a week. The *Ambrosia* structure of the fungus was artificially produced on yeast agar by colonies of *Torula*. The same fungus appeared in the fatbodies of *Xyleborus*.



Fig. 3. – Longitudinal section through a larva of *Drosophila melanogaster* population. HEIDENHAIN. *Torulopsis*, c. 100 ×.

Its presence here may have some significance in the life of the insect in dry wood.

JAROSLAV PEKLO² and Jiří ŠATAVA

Prague, November 1, 1949.

Zusammenfassung

In einer früheren Arbeit hatten die Autoren festgestellt, daß die Larven von verschiedenen Borkenkäfern

¹ L. TOTH and T. Z. CSAKY, Exper. 4, 73 (1948).

² J. PEKLO and J. ŠATAVA, Nature 163, 336 (1949).

³ H. ZIKES, Sitzber. kgl. Akad. Wiss., Wien 118, 1091 (1909).

⁴ L. TOTH, A. WOLSKY, M. BATORI, and B. BATYKA, Z. vgl. Physiol. 30, 300 (1942–44).

⁵ M. BLEWET and G. FRAENKEL, Proc. Roy. Soc. B. 132, 212 (1944).

⁶ P. BUCHNER, Tier und Pflanze in Symbiose (II. Aufl., 1930).

¹ M. D. KAMEN and H. GEST, Science 109, 560 (1949).

² Permanent address of Prof. J. PEKLO: Prague XII, Chodská 3 II.

(*Ips*) imstande sind, elementaren Stickstoff zu assimilieren. Die Verfasser berichten in der vorliegenden Mitteilung über stickstoffbindende, massenhaft vorkommende Symbionten in den Larvenfettkörpern von *Ips spec.*, *Sitodrepa panicea*, *Tribolium navale*, der Kleidermotte, einer Motte aus trockenen Steinpilzen und von *Drosophila melanogaster*. Die Symbionten werden als *Torulopsis* identifiziert. Auch *Azotobacter*, die ebenfalls in *Ips* gefunden wurden, fixieren freien Stickstoff. Im Zusammenhang hiermit wird die Bedeutung der *Ambrosiasymbiose* von *Xyleborus dispar* erörtert.

Korrelation zwischen der Affinität wasserlöslicher Substanzen zu Wolle und ihrer bakteriziden Wirksamkeit

Wir haben kürzlich¹ über eine Korrelation berichtet, welche sich einerseits auf die Affinität wasserlöslicher Substanzen zu Wolle, andererseits auf die antibakterielle Wirksamkeit derselben Substanzen bezogen hat. Bei sieben verschiedenen Substanzen der anionaktiven Reihe – es handelt sich um Netz-, Wasch- und Möttenschutzmittel – konnte festgestellt werden, daß die antibakterielle Wirksamkeit einer jeden Substanz um so größer war, je größere Werte ihre Affinität in neutralem, wäßrigem Milieu zu Wolle aufwies.

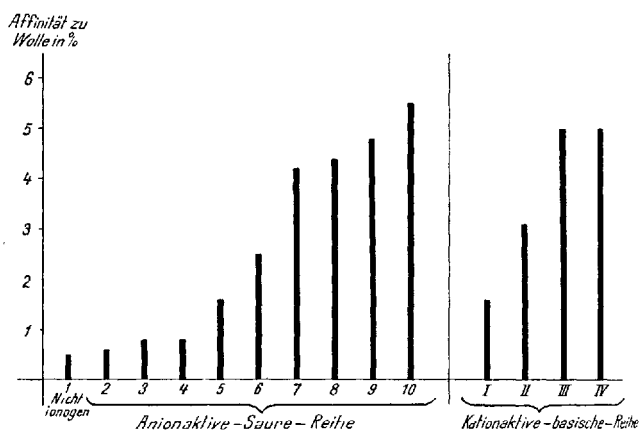
Es galt nun, dieselbe Gesetzmäßigkeit auch für kationaktive Substanzen festzustellen. Außerdem war es wünschenswert, die Bestimmung der Affinität der verschiedenen Substanzen zu Wolle zu einer exakteren und trotzdem leicht reproduzierbaren Methode auszuarbeiten.

Bei der Bestimmung der Affinität einer Substanz zu Wolle gingen wir folgendermaßen vor:

Trocknen von ca. 1 g schweren Wollsträngen (es handelt sich um gewaschene, nichtchlorierte und ungebleichte Strickwolle) im Exsikkator über CaCl_2 bis zur Gewichtskonstanz, d. h. ca. 48 Stunden. Nach dem Wägen der Stränge (auf einer Mettler-Waage bis auf $\frac{1}{10}$ mg Genauigkeit²) werden sie einzeln mit je 20% der zu prüfenden Substanz (berechnet auf das Wollgewicht) in einer Flotte 1:50 (also in 50 cm³ Wasser) bei 90° 10 Minuten unter zeitweiligem Rühren mit einem Glasstab behandelt. Nach dreimaligem Auswaschen mit heißem und dann kaltem Wasser werden die Stränge an der Luft vorgetrocknet und dann in den Exsikkator gebracht, wo sie so lange weitergetrocknet werden, bis die Leerprobe (gleichbehandelter Strang, aber ohne Substanzzusatz) das gleiche Gewicht aufweist, wie vor der Behandlung. Sodann werden alle Stränge in der gleichen Reihenfolge – wie vor der Behandlung – gewogen und die Gewichtszunahme in Prozenten ausgerechnet.

Mit dieser verbesserten Methodik haben wir folgende anion- und kationaktive Substanzen³ einerseits auf ihre Affinität zu Wolle⁴, andererseits – unter Zuhilfenahme der in unserer ersten Mitteilung beschriebenen Routinemethode – auf ihre bakterienabtötende Wirkung (innert 5 Minuten) gegenüber *Staph. aur. haem.* (Gram-pos.) und *B. paratyphi* B. (Gram-neg.) getestet:

Aus der graphischen Darstellung der Affinitätswerte der getesteten Substanzen zu Wolle ergibt sich folgendes Bild:



Diskussion. Wir haben also die Korrelation: *größere Affinität zu Wolle – größere antibakterielle Wirksamkeit* für die anionaktive Reihe bestätigt und auch auf die kationaktive Reihe ausdehnen können.

Diese Korrelation gilt nur von bestimmten minimalen Affinitätswerten an aufwärts. Selbstverständlich dürfen anionaktive Substanzen nur untereinander verglichen werden; dasselbe bezieht sich auch auf die kationaktiven Substanzen.

Unter den antibakteriell unwirksamen, anionaktiven Substanzen weist auch das nichtionogene Furacin¹ eine entsprechend niedrige Affinität zu Wolle auf. In der Tat ist aber das Furacin eine bakteriostatisch² wirksame Substanz. Hiemit zeigt sich, daß die oben besagte Korrelation folgendermaßen neu formuliert werden muß: *größere Affinität zu Wolle – größere bakterizide Wirksamkeit.*

Wie bei Farbstoffen in der Wollfärberei, vermag Salzzusatz die Affinität einer anionaktiven Substanz gegenüber Wolle zu steigern und damit parallel wird auch die bakterizide Wirkung erhöht. Als Beispiel siehe Mitin FF³ Wirksubstanz (Wksz) und Mitin FF Handelsprodukt (mit entsprechendem Salzzusatz). Der Beweis für diese Versuche wird in einer späteren Publikation gegeben werden.

Über die antibakterielle Wirkung der optischen Bleichmittel Blankophor WT⁴ Wksz und Tinopal BV⁵ sowie des Disazofarbstoffes Neutraltuchblau RV ist in der Literatur nichts bekannt. Die Bestimmung der Affinität dieser Produkte zu Wolle (siehe Tabelle) schließt eine bakterizide Wirkungsmöglichkeit in prognostischer Hinsicht zum vornherein aus; im Abtötungsversuch konnten wir diese Vermutung denn auch bekräftigen.

In der kationaktiven Reihe führte die Demonstration der Korrelation: *größere Affinität zu Wolle, größere bakterizide Wirkung u. a.* zur Aufdeckung der bakteriziden Wirksamkeit des Farbstoffes Visbaschwarz B⁶ und eines Textilhilfsmittels, des Sapamin KW⁷. Bradosol⁷ und Desogen⁶ erweisen sich so in bezug auf ihre Affinität zu Wolle wie auch bezüglich ihrer bakteriziden Wirkung als gleichwertig.

¹ R. FISCHER, S. SEIDENBERG und U. P. WEIS, Helv. chim. acta 32, 8 (1949).

² Und innert 20 Sekunden Wägedauer pro Strang.

³ Für die Überlassung der Substanzen danken wir der Ciba AG. und J. R. Geigy AG., Basel, sowie der Eaton Lab. Inc., Norwich, New York, bestens.

⁴ Die Affinitätsbestimmungen wurden dreifach in Serien ausgeführt; die Resultate sind Durchschnittswerte.

¹ Eaton Lab., Inc. Norwich, New York.

² M. C. DODD und W. B. STILLMAN, J. Pharmacol. a. Exp. Therap. 82, 11 (1944).

³ P. LÄUGER, Helv. chim. acta 27, 71 (1944); Geigy AG., Basel.

⁴ J. Soc. Dyers a. Col. 62, 322 (1946); 64, 35 (1948).

⁵ Geigy AG., Basel.

⁶ Geigy AG., Basel.

⁷ Ciba AG., Basel.