

E_4 isozyme. The lamprey may differ from other fish in possessing only the A_4 isozyme in the adult tissues².

It is not possible, from our data, to exclude the hypothesis that the E gene is present but its product is undetectable in some fish. Future work should reveal whether the existence of a retinal specific LDH E_4 isozyme is indicative of a fundamental difference in the

visual metabolism between teleosts and other vertebrates.

During the mid-Triassic, the teleosts began to successfully compete with the fresh water holosteans, and then underwent adaptive radiation in both fresh water and marine environments³². The E gene may have arisen in teleosts prior to this diversification through a duplication of the B gene⁵⁻⁷. Because the fossil record is incomplete, there is some disagreement about the phylogenetic arrangement of teleost orders and whether they arose monophyletically^{33,34} or polyphyletically³⁵. Nevertheless, the orders Cypriniformes, Anguilliformes, and some Clupeiform families are regarded as primitive teleosts^{33,34}. The absence of the LDH E_4 isozyme in species of these orders may be due to their being in an evolutionary line which never possessed the E locus. Alternatively, these orders may have lost the E gene function which they once possessed.

This present study also suggests that the use of isozymes as genetic markers is a powerful procedure for the investigation of evolutionary relationships³⁶.

Résumé. Un troisième locus génétique indique la présence d'un unique isozyme de déshydrogénase lactique ne fonctionnant que dans les tissus neuraux des Téléostéens, surtout dans la rétine neurale. La fonction de gène ne se manifeste pas dans les ordres de poissons primitifs. Ces résultats suggèrent une différence de métabolisme rétinien entre les Téléostéens et les classes de poissons plus primitifs.

G. S. WHITT and J. J. HOROWITZ

Department of Zoology, University of Illinois,
Urbana (Illinois 61801, USA), 31 August 1970.

Primitive fish which lack a functional LDH E locus

	Scientific name	Common name
<i>Class Agnatha</i>		
Order Myxiniformes		
Family Myxinidae	<i>Myxine glutinosa</i>	Atlantic hagfish
Family Petromyzontidae	<i>Polistrema stoutii</i> <i>Petromyzon marinus</i>	Pacific hagfish Sea lamprey
<i>Class Chondrichthyes</i>		
Order Squaliformes		
Family Heterodontidae	<i>Heterodontus francisci</i>	Horn shark
Family Scyliorhinidae	<i>Cephaloscyllium uter</i>	Swell shark
Family Carcharhinidae	<i>Mustelus canis</i> <i>Triakis semifasciata</i>	Smooth dogfish Leopard shark
Order Rajiformes		
Family Rajidae	<i>Raja eglanteria</i>	Clearnose skate
Family Myliobatidae	<i>Myliobatis freminvillei</i>	Bullnose ray
<i>Class Osteichthyes</i>		
Subclass Crossopterygii		
Order Dipnoi	<i>Protopterus annectens</i> <i>Lepidosiren paradoxa</i>	African lungfish South American lungfish
Subclass Actinopterygii		
Superorder Chondrostei		
Order Acipenseriformes		
Family Polyodontidae	<i>Polyodon spathula</i>	Paddlefish
Superorder Holostei		
Order Semionotiformes		
Family Lepisosteidae	<i>Lepisosteus platostomus</i>	Shortnose gar
Order Amiiformes		
Family Amiidae	<i>Amia calva</i>	Bowfin

³² B. SCHAEFFER, Ann. N.Y. Acad. Sci. 167, 5 (1969).

³³ G. J. NELSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 167, 18 (1969).

³⁴ W. A. GOSLINE, Copeia 186 (1965).

³⁵ P. H. GREENWOOD, D. E. ROSEN, S. H. WEITZMAN and G. S. MYERS, Bull. Am. Mus. nat. Hist. 131, 339 (1966).

³⁶ Acknowledgments. This research was supported by NSF grant No. GB-16425.

Über die Speicherung von Lipiden durch Knallgasbakterien

Dass höhere Organismen unter günstigen Ernährungsbedingungen Lipide, insbesondere Triglyceride, als Reservestoffe speichern können, ist seit langem bekannt. Auch Bakterien vermögen unter speziellen Ernährungsbedingungen Reservestoffe zu bilden und intrazellulär anzuhäufen. Viele Bakterien akkumulieren ein ungewöhnliches Lipid, Poly- β -hydroxybuttersäure (PHBS); es ist nur bei Prokaryonten gefunden worden. Die Frage, ob Bakterien Triglyceride oder andere Ester langketiger Fettsäuren als Speicherstoffe anhäufen können, ist meist verneint worden. Die Frage nach einer Speicherung von Estern langketiger Fettsäuren durch Bakterien ist allerdings noch nicht systematisch bearbeitet worden. Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage bieten sich Knallgasbakterien an.

Knallgasbakterien können chemolithoautotroph wachsen, d.h., sie verwenden die Knallgasreaktion (Oxydation von molekularem Wasserstoff durch molekularen Sauerstoff) als Energiequelle zur Assimilation von CO_2 ; sie

können jedoch auch von geeigneten organischen Verbindungen heterotroph leben, z.B. von den unter günstigen Ernährungsbedingungen gespeicherten Stoffen. Da Knallgasbakterien aus leicht zugänglichem anorganischem Material organisches Material aufzubauen können und weil sie eine günstige Bilanz ihres Gasstoffwechsels aufweisen, diskutiert man ihre Verwendung in der Raumfahrttechnik¹.

Die verwendeten Bakterienstämme Hydrogenomonas H 16 und Stamm 11/x speichern unter günstigen Ernäh-

¹ H. G. SCHLEGEL, Raketentech. Raumforsch. 8, 65 (1964). – L. H. BONGERS, Aerospace Med. 35, 139 (1964). – L. H. BONGERS und B. KOK, Devs. ind. Microbiol. 5, 183 (1964). – J. F. FOSTER und J. H. LITCHFIELD, Biotech. Bioeng. 6, 441 (1964). – D. W. JENKINS, in Proc. 16th Int. Astronaut. Congr. (Gordon and Breach, New York 1966), Vol. 4, p. 229. – J. SHAPIRA und A. D. MANDEL, Nature, Lond. 217, 1061 (1968).

rungsbedingungen Poly- β -hydroxybuttersäure (PHBS)² bzw. Kohlenhydrate (Polysaccharide)³, die unter ungünstigen Ernährungsbedingungen oxydativ abgebaut werden. Hydrogenomonas H 16 ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium und ist hinsichtlich seiner morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften relativ gut untersucht worden². Stamm 11/x ist erst kürzlich isoliert worden und noch wenig erforscht; er ist als grampositives, sporenlloses, bewegliches Kurzstäbchen beschrieben worden⁴.

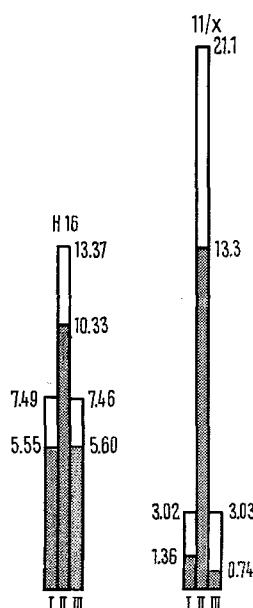
Die Bakterienkulturen ließ man unter reichlichem Nährstoffangebot und unter Begasung mit CO₂, H₂ und O₂ bis zum Ende der logarithmischen Phase wachsen. Dann teilte man den Ansatz in 3 Teile: ein Teil (I) wurde sofort der chemischen Analyse zugeführt, ein anderer Teil (II) wurde zunächst weiter mit CO₂ und Knallgas versorgt, um eine «Speicherphase» zu erhalten, und ein dritter Teil (III) wurde stark belüftet, um einen oxydativen Abbau der Reservestoffe zu erzwingen («Verarmungsphase»).

Im folgenden wird der PHBS-Gehalt mit dem Gehalt an anderen Lipiden verglichen; diese werden der Einfachheit halber als Lipide schlechthin bezeichnet; die PHBS also als besondere Substanz nicht den Lipiden (im engeren Sinne) zugeordnet. Bei Stamm H 16 haben wir die Werte für den PHBS- und den Lipidgehalt auf die Bakterientrockenmasse abzüglich der jeweiligen PHBS- und Lipidmasse bezogen. Während der Speicherphase fanden wir eine Zunahme des PHBS-Gehaltes um das etwa 20fache, dann während der Verarmungsphase eine Verminderung auf den etwa 50. Teil. Parallel mit der Deponierung von PHBS während der Speicherphase war eine Zunahme des Totallipidgehaltes um das 1,8fache und in der Verarmungsphase ein Rückgang auf den ursprünglichen Wert festzustellen (Figur).

Bei Stamm 11/x wurden die entsprechenden Werte auf den Proteingehalt bezogen. Man fand bei der Speicherung neben einer Zunahme des Kohlenhydratgehaltes auf das etwa 5fache eine Zunahme des Totallipidgehaltes auf das etwa 7fache. In der Verarmungsphase erfolgte wieder eine Abnahme des Totallipidgehaltes, die der Abnahme des Kohlenhydratgehaltes parallel ging.

Die Art der Aufarbeitung brachte es mit sich, dass die Lipide zweizeitig extrahiert wurden, und zwar zunächst mit einem stärker apolaren Lösungsmittel (Chloroform), anschliessend mit einem polaren Lösungsmittel (Äthanol-Diäthyläther 3:1, V/V). Es ist klar, dass die zunächst mit Chloroform extrahierbaren Lipide lockerer an Zellbestandteile gebunden sind («locker gebundene Lipide») als die anschliessend mit Äthanol-Äther extrahierten Lipide («fest gebundene Lipide»). In beiden Fällen handelt es sich dennoch um «freie Lipide» im Sinne der für Bakterienlipide geltenden Nomenklatur, da zur Extraktion keine hydrolysierenden Massnahmen angewendet worden sind. Ähnliche Extraktionsverfahren werden gebraucht, um Einblicke in die funktionelle Bedeutung der Lipide in Erythrocytenmembranen zu erhalten⁵. Es ist zu vermuten, dass die fest gebundenen Lipide konstante Membranbestandteile sind, während die locker gebundenen Lipide entweder nur oberflächlich an membranöse Zellbestandteile gebunden oder als echte Reservestoffe anzusprechen sind. Wir fanden eine Zunahme beider Lipidfraktionen während der Speicherphase beider Bakterienstämme. Hierbei ist in Stamm 11/x die Zunahme der locker gebundenen Lipide besonders ausgeprägt (Figur); d.h., das Verhältnis der locker gebundenen zu den fest gebundenen Lipiden bleibt bei der Speicherung in Stamm H 16 etwa konstant, nimmt aber bei der Speicherung in Stamm 11/x um mehr als das Doppelte zu. In der Verarmungsphase kommt es zu einem Rückgang aller Lipidwerte auf etwa die ursprünglichen Verhältnisse. Der Anteil der Phosphatide an den beiden Lipidfraktionen und den Totallipiden ändert sich während der Speicherung und Verarmung in Stamm H 16 nicht, während sich in Stamm 11/x eine relative Abnahme des Phosphatidgehaltes der Totallipide bei Speicherung ergab. Letzterer Befund ist auf die stärkere Vermehrung der locker gebundenen Lipide zurückzuführen, die einen wesentlich geringeren Phosphatidgehalt aufweisen als die fest gebundenen Lipide. Da man Phosphatide ausschliesslich als Membranbestandteile ansehen darf, ist dieser Befund ein Hinweis darauf, dass bei Stamm 11/x tatsächlich eine Speicherung von Depot-Lipiden erfolgt, während die geringere Lipidzunahme bei Stamm H 16 auf eine vorwiegende Vermehrung von Membranlipiden hinweist.

Diese Auffassung wird durch folgende Untersuchungsergebnisse gestützt. Locker und fest gebundene Lipide wurden vereinigt und säulenchromatographisch in 2 Fraktionen zerlegt, nämlich in die der Neutrallipide und die der polaren Lipide, die vorwiegend aus Phosphatiden besteht. In allen Wachstumsphasen von Stamm H 16 macht der Neutrallipidanteil nur 4–5% der Totallipide aus, während in der logarithmischen und in der Speicherphase von Stamm 11/x die Neutrallipide etwa 70% und in der Verarmungsphase etwa 30% der Totallipide aus-



Gehalt an Lipiden (ausser PHBS) in verschiedenen Wachstumsphasen. I, Ende des logarithmischen Wachstums; II, Speicherphase; III, Verarmungsphase. Schraffiert: locker gebundene Lipide; nicht schraffiert: fest gebundene Lipide. Bei Stamm H 16 ist der Lipidgehalt in Prozent der Bakterientrockenmasse nach Abzug der Massen von PHBS und von anderen Lipiden angegeben, bei Stamm 11/x in Prozent des Proteingehaltes.

² H. G. SCHLEGEL, Adv. comp. Physiol. Biochem. 2, 185 (1966).

³ D. HERMANN, unveröffentlicht (1967).

⁴ U. EBERHARDT, Arch. Mikrobiol. 66, 91 (1969).

⁵ K. PARPART, J. Cell. comp. Physiol. 79, 248 (1942). – B. ROELOFSON, Thesis, Utrecht (1968). – J. SCHRÖFFEL, O. W. THIELE und J. KOCH, XIIth Internat. Conf. Animal Blood Groups, Budapest, 1970.

machen. Die geringfügige Vermehrung der Lipide in der Speicherphase von Stamm H 16 betrifft also alle Lipidklassen annähernd gleichmäßig, zumal auch bei der dünnsschichtchromatographischen Auf trennung der Neutrallipide und der polaren Lipide keine wesentlich verschiedenen Lipidmuster in den verschiedenen Wachstumsphasen zu finden waren. Wir möchten daher annehmen, dass die Lipidvermehrung bei Stamm H 16 nicht auf einer echten Speicherung beruht, sondern auf einer Neubildung von Membranlipiden. Eine solche Neubildung wird notwendig, da die bei Speicherung angehäufte PHBS in intrazellulären, wahrscheinlich mit Membranen umgebenen Grana deponiert wird. Bei Stamm H 16 sind solche Granamembranen bisher zwar noch nicht gesichert worden, aber in anderen Bakterienarten (*B. cereus* und *B. megaterium*) wurden sie elektronenmikroskopisch nachgewiesen⁶. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen an Stamm H 16⁷ geht hervor, dass sich bei beginnender Speicherung die einzelnen PHBS-Grana vergrössern und erst bei fortschreitender Speicherung miteinander verschmelzen. Bei beginnender Speicherung dürften sich daher die Granamembranen vergrössern, während bei der späteren Verschmelzung der Grana keine weitere Vergrösserung der Granamembranfläche stattfindet. Diese Vorstellung steht im Einklang mit unseren Befunden; denn wir fanden zu Beginn der Speicherphase die grösste Lipidzunahme, die um so geringer wird, je stärker die PHBS-Speicherung zunimmt.

Die beträchtliche Lipidvermehrung bei Stamm 11/x bei gleichzeitiger Speicherung von Kohlenhydraten sehen wir als echte Speicherung von Depot-Lipiden an. Denn die in der Speicherphase angehäuften Lipide bestehen überwiegend aus Neutrallipiden und diese zu über 80% aus Triglyceriden. Die Triglyceridnatur dieser Haupt-

komponente wurde durch ihre Verseifbarkeit, ihr dünnsschichtchromatographisches und säulenchromatographisches Verhalten sowie durch die enzymatische Glycerinbestimmung gesichert. Triglyceride sind im Bakterienreich durchaus selten; mit Sicherheit wurden sie bisher nur in Mycobakterien gefunden.

Summary. The ability to accumulate lipids was investigated in two strains of hydrogen oxidizing bacteria (*Hydrogenomonas* H 16 and strain 11/x). Along with the deposition of poly- β -hydroxybutyrate the amount of other lipids is shown to increase 1.8 times in strain H 16. It is suggested that the increase of the latter lipids is due to the formation of membrane lipids that are needed for the formation of membranes around the intracellular globules of poly- β -hydroxybutyrate. In strain 11/x the amount of lipids increases 7 times along with the storage of carbohydrates. In this case, the majority of lipids consists of triglycerides. It is suggested that there is a true storage of neutral fat in strain 11/x.

J. DREYSEL, O. W. THIELE
und D. HERMANN

*Physiologisch-Chemisches und
Mikrobiologisches Institut der Universität,
D-34 Göttingen (Deutschland), 17. Juli 1970.*

⁶ D. C. LUNDGREN, R. M. PFISTER und J. M. MERRICK, *J. gen. Microbiol.* 34, 441 (1964).

⁷ H. G. SCHLEGEL, G. GOTTSCHALK und R. VON BARTHA, *Nature, Lond.* 191, 463 (1961).

Effect of α -Tocopherol and Tocopheronolactone on Ethanol Induced Fatty Liver and Triglyceridemia

The ethanol-induced fatty liver is inhibited by α -tocopherol and it is assumed that this inhibition mechanism is probably developed by the antioxidant activity inherent in α -tocopherol^{1,2}. Tocopheronolactone, a water-soluble active metabolite of α -tocopherol, was found to increase the tissue ubiquinone level and to prevent the lipid peroxidation³. Thus, tocopheronolactone may also modify the ethanol-induced fatty liver. The present paper reports an attempt to elucidate the effects of α -tocopherol and tocopheronolactone on the fatty liver as well as the triglyceridemia after ethanol administration.

Female Wistar strain rats with an average weight of 200 g, kept on Clea MF rat diet, were used for the study. The animals were fasted for 8 h prior to receiving a single oral dose of ethanol (0.6 g/100 g of body weight as a 50% solution). Control rats were given an equivalent amount of either saline or isocaloric glucose. 10 mg/100 g body weight of α -tocopherol acetate and 6 mg/100 g body weight of equimolar tocopheronolactone (a synthetic product from the Eizai Co., Ltd., Tokyo, Japan) were dissolved in 0.1 ml of propylene glycol and administered i.p. at 26, 12 and 2 h prior to the administration of ethanol. In this case, control rats received propylenglycol i.p. The animals were sacrificed 10 h after the ethanol administration. In the Triton experiments, the animals were treated in the same manner as described above, except that α -tocopherol acetate dissolved in saline was administered i.m. 60 min before being sacrificed, the animals were given i.v. 50 mg/100 g body weight of

Triton (Triton WR 1339, Winthrop Lab., New York). Triglycerides in liver and plasma were determined by the method of SARDESAI and MANNING⁴. Serum lipoproteins were separated using agarose gel electrophoresis according to the method of NOBLE⁵. Hepatic contents of NAD and NADH₂ were determined by the method of CIOTTI and KAPLAN⁶.

Following the administration of ethanol, as seen from Table I, liver triglyceride levels were significantly elevated ($p < 0.01$). It was α -tocopherol that caused an inhibition of liver triglyceride accumulation as well as a hypertriglyceridemia. Tocopheronolactone did not show such activities. To investigate the cause for the elevated levels of serum triglycerides, serum lipoprotein patterns were observed by agarose gel electrophoresis. As shown in Figure 1, pre- β -lipoprotein and in a less degree chylomicron became larger in the ethanol plus α -tocopherol group. The results indicate that the most part of elevated

¹ N. R. DiLuzio, *Life Sci.* 3, 113 (1964).

² N. R. DiLuzio, *Lab. Invest.* 15, 50 (1966).

³ J. GREEN, A. T. DIPLOCK, J. BUNYAN, E. E. EDWIN and D. McHALE, *Nature, Lond.* 190, 318 (1961).

⁴ V. M. SARDESAI and J. A. MANNING, *Clin. Chem.* 14, 156 (1958).

⁵ R. P. NOBLE, *J. Lipid Res.* 9, 639 (1968).

⁶ M. M. CIOTTI and N. O. KAPLAN, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1957), vol. 3, p. 890.