

sure. The crude residue (20 mg) was dissolved in a few ml of 0.1N NaOH solution and re-extracted with ether. The ethereal extract was evaporated to dryness and the crude diol was refluxed with HCl in aqueous methanol (methanol: water: conc. HCl = 5:5:1) for 2 h. The solution was extracted several times with petroleum ether (b.p. 30°–50°C), washed with 5% sodium bicarbonate, dried over anhydrous magnesium sulphate and evaporated. A portion of this oily residue was redissolved in water, the solution adjusted to pH 10 and treated with 2,6-dichloroquinone-chloroimide and *n*-butanol. The organic layer showed λ_{max} 655 nm. In the same conditions authentic 2-, 3- and 4-hydroxybiphenyls showed λ_{max} (in *n*-butanol) 655, 673, 662 nm, respectively. 2-, 3- and 4-hydroxybiphenyls were run on a thin silica-gel layer, activated at 100°C for 1/2 h. Petroleum ether (b.p. 30°–50°C) and ethyl ether 1:1 were used as developing solvent. The spots, detected by spraying with 0.5% potassium permanganate solution, showed Rf 0.52, 0.33, 0.40, respectively. TLC of the phenolic mixture obtained by dehydration of the crude diol gave two spots: the larger one showing Rf 0.52, the other very small with Rf 0.33. Gas-chromatography of 2-, 3- and 4-hydroxybiphenyls was performed by a Carlo Erba GT mod. 200 Gas-chromatograph, with a flame ionization detector. Column: stainless steel, 2 m $\times$ 2 mm I.D., packed with 10% SE on Chromosorb W (60–80 mesh). Temperatures: column 210°C, detector 230°C, injector 250°C. Carrier gas nitrogen at 1 atm (40 ml/min). Hydrogen at 0.8 atm and air at 1.4 atm. In these conditions the peaks of 2-, 3- and 4-hydroxybiphenyls showed retention times of 3.75, 4.40, 4.45 min, respectively. Gas-chromatography of the residue from the acidic treatment of biphenyl diol gave two peaks at retention times 3.75 and 4.40 min, relative amounts 95:5. The mass spectrum of the first compound ($m/e = 170$) was wholly superimposable upon that of an authentic sample of 2-hydroxybiphenyl. The spectrum of the second component of the mixture ($m/e = 170$) could not be compared with the spectra of 3- and 4-hydroxybiphenyls owing to the poor amount relative to the bleeding of the column.

In other experiments the mother liquors from the extraction were acidified to pH 3 and re-extracted with ethyl ether. The crude oily residue (70 mg) was heated with a few ml of petroleum ether (b.p. 30°–50°C), the liquid phase decanted and the solvent evaporated. White crystals were obtained after repeated crystallization from *n*-pentane (m.p. 120°C, undepressed by admixture with authentic benzoic acid). Elemental analysis was as follows: for $C_7H_6O_2$ calc. 68.80% C; 4.92% H; found 69.14% C; 4.95% H. IR, UV and mass spectra were identical with those of benzoic acid.

In Warburg experiments, cells of *Ps. putida* grown on biphenyl were simultaneously induced to oxidize biphenyl and benzoic acid, not 3,4-dihydroxybiphenyl and phenylpyruvic acid. Only the cells grown on phenylpyruvic acid

were simultaneously induced to oxidize this compound. Catechol is oxidized by *meta*-cleavage with an enzymatic system that is constitutively present.

Conclusions. Like other aromatic hydrocarbons, biphenyl undergoes oxygenation to a diol. The diol isolated from biphenyl cultures of *Ps. putida* is shown to be 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl. In effect the dehydration product of this diol was identified as 2-hydroxybiphenyl. A small amount was also found of a compound with the same TLC and GLC features as 3-hydroxybiphenyl. The further degradation of the diol leads to the production of benzoic acid through a series of unidentified compounds.

Recently LUNT and EVANS⁶ found that a gram-negative bacterium oxidized biphenyl to phenylpyruvic acid with the intermediary formation of 2,3-dihydroxybiphenyl and α -hydroxy- β -phenylmuconic semialdehyde. The metabolism of biphenyl by *Ps. putida* is different after the intermediary production of 2,3-diol as we isolated benzoic acid from the cultures and showed that the cells grown on biphenyl are simultaneously induced to oxidize benzoic acid in Warburg experiments, not phenylpyruvic acid. Only the cells grown on phenylpyruvic acid are simultaneously induced to oxidize this compound.

Research is in progress in order to clarify the metabolic pathway from the diol to benzoic acid.

Riassunto. La degradazione del bifenile da parte di *Ps. putida* inizia con la formazione di un diolo cui si attribuisce la struttura di 2,3-diidro-2,3-diossibifenile, in quanto, per disidratazione a caldo con acido cloridrico, si trasforma in 2-ossibifenile e tracce di 3-ossibifenile. Il diolo viene ulteriormente degradato ad acido benzoico. Le cellule di *Ps. putida* cresciute su bifenile sono simultaneamente indotte ad ossidare al Warburg il bifenile e l'acido benzoico, non il 3,4-diossibifenile e l'acido fenilpiruvico. Le stesse cellule contengono una metapirocatecasi costitutiva.

D. CATELANI, C. SORLINI and V. TRECCANI

*Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica,
Università di Milano, Via Celoria 2,
20133 Milano (Italy), 30 April 1971.*

¹ This work was supported by a grant of C.N.R. (Consiglio Nazionale delle Ricerche), for the International Biological Program.

² D. CATELANI, G. MOSSELMANS, J. NIENHAUS, C. SORLINI and V. TRECCANI, *Experientia* 26, 922 (1970).

³ V. TRECCANI, E. GALLI, D. CATELANI and C. SORLINI, *Z. allg. Mikrobiol.* 8, 65 (1968).

⁴ O. WARBURG and W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 370, 384 (1941).

⁵ E. BOYLAND and G. H. WILTSHIRE, *Biochem. J.* 53, 424 (1953).

⁶ D. LUNT and W. C. EVANS, *Biochem. J.* 118, 54P (1970).

Zum phototaktischen Laufverhalten junger Honigbienen (*Apis mellifica* L.)

Bevor Stockbienen zum Sammeldienst übergehen, machen sie mehrere Orientierungsflüge. Sie beginnen damit etwa am 5. Lebenstag (RÖSCH¹, SAKAGAMI²). Eigene Beobachtungen und Experimente zeigen, dass junge Stockbienen vor ihrem 1. Orientierungsflug ebenso wie ausfliegende Sammelbienen (JACOBS-JESSEN³) positiv phototaktisch gestimmt sind.

Phototaktische Laufversuche sollen zeigen, ob und inwieweit sich in den ersten Lebenstagen adulter Bienen die

Reaktion gegenüber geringen Lichtintensitäten ändert. Bienen des 1.–6. Lebenstages wurden am Tage in einem verdunkelten Raum (bei 26°C) mit einer Versuchsanordnung getestet, wie sie in Figur 1 dargestellt ist (nach SCHRICKER⁴). Eine positive Reaktion war ein ununterbrochener Lauf durch das beleuchtete Rohr. Als Versuchstiere dienten um 0 Uhr $\pm$ 2 h im Brutschrank geschlüpfte Bienen, die zu dieser Zeit bei sehr schwachem Rotlicht gekäfigt und mit einem Pollen-Futtermittelge-

misch bei 26°C bis zum jeweiligen Versuchstag ohne Licht gehalten wurden. Während des Versuchs wurden die Tiere weder gedrückt noch berührt: sie liefen bei sehr schwachem Licht ($< 0,05$ Lux) von der Wabe (eine Rückwand des Käfigs bestand aus einem eingepassten Stück Bienenwabe) in einen Erlenmeyer-Kolben und wurden darin an die Entscheidungsstelle angesetzt. Am Ende des Rohres liefen sie wieder in das Gefäß. Die Bienen eines Käfigs (4–6) wurden nacheinander jeweils 3mal bei jeder Lichtintensität getestet, so dass zwischen den Läufen einer Biene stets einige Minuten lagen. An der Entscheidungsstelle wurden in zeitlicher Folge 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 Lux geboten.

Das Ergebnis zeigt die Figur 2: Bienen, die nach dem Schlüpfen nur kurz (beim Käfigen) einem sehr schwachen Rotlicht ausgesetzt waren, zeigen in Abhängigkeit vom Alter eine unterschiedliche Zahl positiver Reaktionen gegenüber geringen Lichtintensitäten. Am 1. Lebenstag laufen die Bienen so gut wie gar nicht zum Licht. Am 2. Lebenstag wählen sie ab 0,2 Lux signifikant häufiger das beleuchtete Rohr und erreichen bei 0,8 Lux schon 68% positive Reaktionen. Am 3. und 4. Lebenstag unterscheidet sich die prozentuale Häufigkeit phototaktischer Läufe nicht. Die Werte für den 5. und 6. Lebenstag zeigen auch keine auffälligen Unterschiede. Die gemeinsame Kurve liegt bis 0,4 Lux signifikant über der des 3. und 4. Lebenstages und scheint sich im oberen Bereich einem Grenzwert zu nähern. Bei 0,8 Lux kommt es zu einer Annäherung der Werte für Bienen des 2.–6. Lebenstages. Eine Erklärung für die geringe Zahl phototaktischer Läufe von Bienen an ihrem 1. Lebenstag sollen morphologische und physiologische Untersuchungen der Augen geben. Eine gesicherte Wahl des beleuchteten Glasrohrs zeigen Bienen am 5. und 6. Lebenstag schon bei 0,1 Lux, am 3. und 4. Lebenstag bei 0,4 Lux, am 2. Lebenstag erst bei 0,8 Lux und Bienen an ihrem 1. Lebenstag in dem untersuchten Bereich gar nicht. Die Grössenordnung der im Versuch gewählten Lichtintensitäten dürfte den natürlichen Lichtverhältnissen im Stockinneren sehr nahe kommen. In einer leeren Beute wurden bei einer Beleuchtungsstärke von 1000 Lux aussen vor dem Flugloch im Zentrum des Brutnestbereiches 0,12 Lux gemessen.

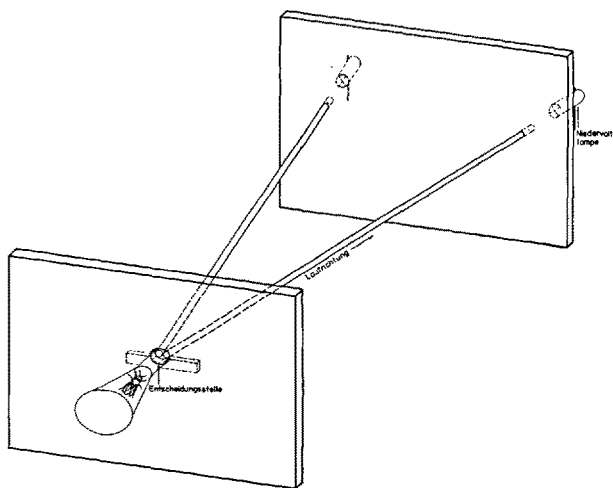


Fig. 1. Versuchsanordnung des Wahlversuchs zwischen einem Glasrohr, durch das Licht geschickt wird und einem, das im Dunkeln endet. Als Lichtquelle dient eine Niedervoltlampe, deren Lichtintensität über einen Transformator variiert wird. Die Beleuchtungsstärken wurden mit einem Luxmeter (Lange, Berlin) im Messbereich 0–10 Lux gemessen. Die Glasrohre (Länge: 50 cm; Kaliber: 10 mm) steigen in Laufrichtung leicht an und sind durch Blenden gegen das Licht der Lampe abgeschirmt.

Die starke Leistungssteigerung bezüglich des Verhaltens gegenüber geringen Lichtintensitäten ab 5. Lebenstag mag mit einer Erklärung sein für die Durchführung des 1. Orientierungsfluges in diesem Alter. Weitere Untersuchungen über die Orientierungsleistungen beim Übergang von der Stockperiode zur Sammelperiode sind im Gange.

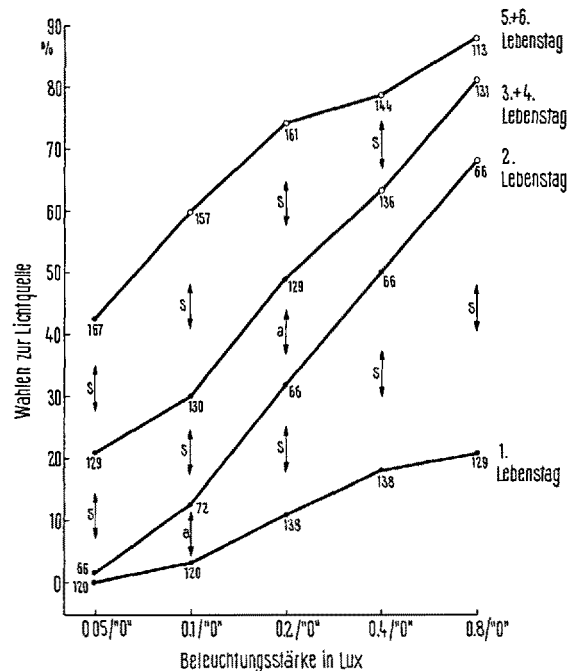


Fig. 2. Bestimmung der Schwellenintensität, die einen photoaktiven Lauf auslöst. Abszisse: Lichtintensität (Lux) in dem beleuchteten gegenüber dem unbeleuchteten Rohr «O» an der Entscheidungsstelle; Ordinate: prozentuale Häufigkeit positiver Reaktionen (bezogen auf die Zahl der möglichen Läufe, die für jeden Wert angegeben ist); s, zwischen den beiden Häufigkeiten signifikanter Unterschied; a, Unterschied statistisch auffällig (KOLLER⁵); o, die Seitentendenz zur Lichtquelle ist statistisch gesichert (HASSENSTEIN⁶).

Summary. The number of phototactic runs towards low light intensities of young bees (*Apis mellifica* L.) depends on their age. On the 1st day there is almost no response. After the 4th day a light intensity as low as 0.1 Lux induces a phototactic run. This increase of response coincides with the performance of the 1st exercise flight.

J. VOLLBEHR

Freie Universität Berlin, I. Zoologisches Institut,
Königin-Luise-Strasse 1–3,
D-1 Berlin 33 (Deutschland), 29. März 1971.

¹ G. A. RÖSCH, Z. vergl. Physiol. 2, 604 (1925).

² S. F. SAKAGAMI, Jap. J. Zool. 11, 138 (1953).

³ S. F. JACOBS-JESSEN, Z. vergl. Physiol. 41, 603 (1959).

⁴ B. SCHRICKER, Z. vergl. Physiol. 49, 446 (1965).

⁵ S. KOLLER, Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, Steinkopff, Darmstadt 1969, p. 71.

⁶ B. HASSENSTEIN, Z. vergl. Physiol. 33, 311 (1951).