

hood of the chromosomes, thus providing a clear and even background (Figure 2). Consequently, this technique not only improves the fine banding detail and the contrast, but it is also a very useful methodology for new techniques of cytological analyses, such as by computer recognition of polytene chromosome banding patterns.

The procedure is as follows (for beginners): 1. Quickly dissect third instar larvae in physiological saline. 2. Put the salivary gland in 45% acetic acid for 5–7 sec. 3. Fix in 1N HCl for ~30 sec. 4. Stain in lacto-aceto-orcein for 30 ~ 40 min on a slide. 5. Warm (~35°C) the slide for 10 sec. 6. Transfer the excessively stained gland to lacto-acetic acid (1 part lactic acid and 1 part 60% acetic acid) on a siliconized slide. 7. Wash the gland at least 3 times in lacto-acetic acid, and mount it in lacto-acetic acid. 8. Cover with a siliconed cover slip and squash with thumb pressure. 9. Seal with nail polish for storage.

*Preparation of lacto-aceto-orcein stain.* A) 1 part saturated 'Gurr's orcein natural' (Esbe laboratory supplies, Toronto, Canada) in concentrated lactic acid. B) 1 part saturated Gurr's orcein natural in concentrated glacial acetic acid. C) 1 part distilled H<sub>2</sub>O. Solutions A) and B) should be heated (not boiled) and filtered separately before combining. Add distilled water for a 1:1:1 ratio.

**Zusammenfassung.** Es wird eine verbesserte Methode zur Herstellung von Quetschpräparaten von Speicheldrüsenchromosomen beschrieben. Die Methode gibt scharfe Bilder der feinsten Chromosomenbänder auf klarem Hintergrund.

JONG SIK YOON, R. H. RICHARDSON and  
M. R. WHEELER

*Department of Zoology, University of Texas,  
Austin (Texas 78712 USA), 6 November 1972.*

<sup>1</sup> Research supported by U.S. Public Health Service Research Grants No. GM-11609 and GM-19616 from the National Institute of General Medical Sciences.

<sup>2</sup> T. S. PAINTER, *Science*, N.Y. 78, 585 (1933).

<sup>3</sup> H. D. STALKER, *Drosoph. Inf. Serv.* 42, 119 (1967).

<sup>4</sup> R. J. SCHUELLEIN, *Drosoph. Inf. Ser.* 34, 119 (1950).

<sup>5</sup> B. NICOLETTI, *Drosoph. Inf. Serv.* 33, 181 (1959).

<sup>6</sup> J. S. YOON, K. RESCH and M. R. WHEELER, *Genetics*, Princeton 71, 70 (1972).

## Zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Bodenproben

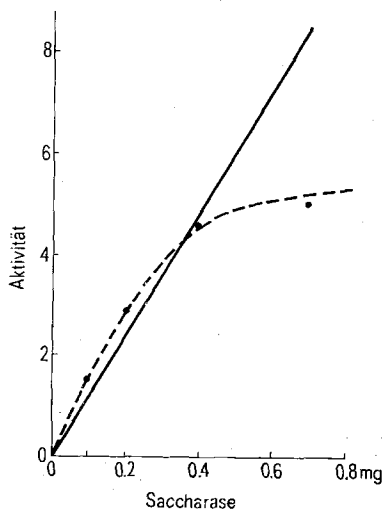
Zu den oft angewendeten Aktivitätsuntersuchungen von im Boden vorkommenden Enzymen gehört die Bestimmung der Saccharaseaktivität<sup>1,2</sup>. Man misst dabei die Wirksamkeit des Enzyms unter Vermeidung einer natürlichen Mikroorganismenvermehrung in einem spezifischen Substrat, einer Saccharoselösung, durch Bestimmung der in einer Zeiteinheit anfallenden Reaktionsprodukte.

Die von den oben genannten Autoren beschriebene Methode wurde in einigen Einzelheiten, auf die dann im weiteren eingegangen werden soll, geändert. Im einzelnen wurde so verfahren, dass die zu untersuchende Probe, 2 g lufttrockener und auf 2 mm gesiebter Boden, bzw. eine

Saccharaselösung, in 10 ml Phosphatpuffer (pH 5,4) gegeben werden. Als Substrat wird 2 ml einer 20%igen Saccharoselösung hinzugefügt und anschliessend bei 37°C bebrütet. 1 h vor Ablauf der gewählten Inkubationszeit wird 10 ml aqua dest. zugegeben und die Probe weiter bei 37°C belassen. Zur Messung wird die Probe etwa 10 min bei 2500 g zentrifugiert und anschliessend filtriert. 10 ml dieses Filtrats werden zusammen mit 4 ml Fehlingscher Lösung und 5 ml aqua dest. zum Sieden gebracht. Nach dem Abkühlen werden 5 ml 15%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 3 ml 20%iges KJ zugegeben. Titriert wird mit einer Mikrobürette gegen 0,1 n Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Stärke als Indikator.

Zunächst wurde die Saccharaseaktivität einer Bodenprobe einerseits in der Bodensuspension gemessen und zum anderen wurde die Suspension nach der Inkubationszeit zur Titration zentrifugiert und filtriert. Dabei zeigt sich, dass die Aktivität im Filtrat geringer ist als in der Suspension, da vermutlich ein Teil der Reaktionsprodukte an Bodenpartikeln adsorbiert werden. In beiden Fällen besteht jedoch eine lineare Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von der Inkubationsdauer für den untersuchten Zeitraum vom 2 bis 24 h. Dies bedeutet auf der einen Seite eine methodische Verbesserung, denn die Titration ist im Filtrat erheblich genauer durchzuführen als in der Bodensuspension, auf der anderen Seite ist demnach auch eine Verkürzung der Inkubationszeit von den bisher üblichen 24 h auf 2 h möglich. Damit wird der Einfluss unerwünschter Effekte, wie z.B. die Neuproduktion von Enzym und die Verwertung von Reaktionsprodukten während der Inkubation durch in der Probe lebende Mikroorganismen weitgehend eingeschränkt.

Wird bei 2stündiger Inkubation die Bodeneinwaage, und damit die Enzymmenge variiert, so zeigt sich die zufordernde direkte Proportionalität zwischen gemessener Aktivität und Bodeneinwaage (Tabelle I).



Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymmenge. ○—○, theoretische Aktivität des verwendeten Präparates; ○---○, gemessene Aktivität. Die Aktivität der Saccharase wurde in ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gemessen.

<sup>1</sup> E. HOFMANN und A. SEEGERER, *Biochem. Z.* 322, 174, (1951).

<sup>2</sup> E. HOFMANN, *Z. Pfl. Ernähr. Düng. Bodenkd.* 56, 68 (1952).

Eine weitere Kontrolle der Methode wurde vorgenommen, indem als Enzym das Präparat Saccharase (Fa. SERVA – Nr. 26357) verwendet wurde. Die Figur zeigt, dass die Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge bis zu einem Titrationswert von etwa 5 ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  nahezu identisch mit den nach der Aktivitätsangabe des Enzympräparates errechneten Werten ist. Daraus geht hervor, dass die hier beschriebene Methode in diesem Bereich zur Bestimmung der Saccharaseaktivität geeignet ist.

Um zu verhindern, dass während der Inkubationszeit durch die in der Probe vorhandenen Mikroorganismen noch weiterhin Enzym produziert wird, empfehlen einige Autoren<sup>3,4</sup> die Zugabe von Toluol zum Ansatz. Die Wir-

kung des Toluols ist jedoch durchaus umstritten<sup>5</sup>. Um zu untersuchen, wie sich der Zusatz von Toluol zum Versuchsansatz bei einer Inkubationszeit von 2 h auswirkt, wurden die Proben mit 5%, 15% und 25% Toluol versetzt. Die erzielten Ergebnisse liessen keinerlei Einfluss des Toluols erkennen, alle Ansätze zeigten die gleichen Saccharaseaktivität wie der Ansatz ohne Toluol. Da so die schon oben aufgestellte Behauptung, dass während einer nur 2stündigen Inkubation keine nennenswerte Produktion an Saccharase erfolgen kann noch unterstützt wird, kann somit auf den Einsatz von Toluol verzichtet werden.

Es ist bekannt, dass Tannin Enzyme zu inhibieren vermag<sup>6,7</sup>. Dieser Effekt konnte auch für Saccharase beobachtet werden (Tabelle II). Durch eine Zugabe von Boden zum Versuchsansatz sollte untersucht werden, inwieweit der Boden der Inhibierung der Saccharase durch das Tannin entgegenwirken kann. An anderer Stelle<sup>8</sup> ist bereits darüber berichtet worden, dass diese Schutzfunktion für Katalase zu beobachten ist. Wie aus Tabelle II hervorgeht, ist im Falle der Saccharase durch Boden keine Reduzierung der durch Tannin hervorgerufenen Hemmung festzustellen.

*Summary.* A method, qualified for determination of saccharase activity in soil samples, is described.

CH. KUNZE und H. RICKART

Tabelle I. Saccharaseaktivität in Abhängigkeit von der Bodeneinwaage

Bodeneinwaage	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml)	ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pro g Boden
1 g	0,49	0,49
2 g	0,98	0,49
3 g	1,37	0,46
4 g	1,82	0,46

Tabelle II. Hemmung der Saccharaseaktivität durch Tannin

Tannin im Ansatz (%)	Saccharaseaktivität Reine Enzymlösung (%)	Enzymlösung und Boden (%)
0	100	100
0,5	27	30
1,0	20	16
2,0	0	0

*Botanisches Institut der Universität*

*Senckenbergstrasse 17–21, D–63 Giessen (Germany),*

*15 November 1972.*

<sup>3</sup> E. HOFMANN, in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Ed. H. U. BERGMAYER; Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962), p. 904.

<sup>4</sup> T. BECK und H. POSCHENRIEDER, *Pl. Soil* 18, 346 (1963).

<sup>5</sup> D. CLAUS und K. MECHSNER, *Pl. Soil* 12, 195 (1960).

<sup>6</sup> W. L. PORTER und J. SCHWARZ, *Fd Res.* 27, 416 (1962).

<sup>7</sup> V. SCHNEIDER und U. W. HALLER, *Planta* 94, 134 (1970).

<sup>8</sup> C. KUNZE, *Ecol. Plant.* 6, 197 (1971).

## An underwater Food Dispenser for Conditioning Fish

Recently a two-alternatives reward conditioning on directional hearing in cod was carried out under a moored raft in a fjord. The cod was kept in a triangular netting cage (Figure 1) about 4 m down the surface.

Two food dispensers were required, that met the following conditions: a) remote operation; b) instant appearance of the food on activation without appreciable mechanical perturbation or the occurrence of other spurious stimuli; c) being not too bulky and not too dense or incompressible as compared to water, to reduce acoustic scattering; d) containing about 15 pieces of food per magazine; e) reliable operation and, if necessary, a simple trouble-shooting; f) possibility to refill the magazines without lifting the cage with the fish, in order to avoid disturbance of the fish.

The system shown in the Figures 1–3 works successfully. The food dispensers are mounted on a rectangular perspex frame (a) that can slide as an elevator along 2 (parallel) of the 3 paired nylon lines suspending the netting cage (Figure 1), by means of the pulling line (b). Both basic corners at the upper side of the cage have a perspex covering with a hole (c), to allow the entrance of the food (actually the frame (a) rests on the cage).

The food dispenser consists of a turnable, disc-shaped feeding magazine (d) in a housing (e) shaped as a pill-box (both made of perspex; Figures 2 and 3). The disc contains 18 radially drilled holes ( $\varnothing$  8 mm; length 12.5 mm): the chambers (f) for the pieces of food. Each chamber has a lateral hole (g). In any of 18 distinct angular positions of the disc, the lateral hole of the downwards directed chamber communicates with the hose connection (h). To activate the food dispenser, the piece of food is blown out of the chamber by means of a shortlasting water current (this principle has been applied previously by Dr. K. OLSEN, Havforskninginstituttet, Bergen, Norway, with a tubular type of magazine). To direct the water downwards from the raft to the dispenser via a PVC hose (i), a 12V D.C. solenoid valve (Lucifer, Geneva, type 121 A 52; not shown in the figures) is opened shortly. The water comes from a container (a 5 l bottle with bottom outlet) hanging about 2 m above the surface (for sufficient excess pressure). The adequate current strength in the hose is adjusted by means of a tap at the bottom outlet.

A mechanical stepping device allows turning of the magazine until the next chamber with food is just over