

comparable, since they have been obtained by different counting methods. The average figure of $5 \cdot 10^6$ p. ml represents only the number of rumen inhabitant micro-organisms of the goat which are able to grow in the absence of a nitrogen source in the culture medium. This, however, is a specific experimental condition, neither physiological nor optimum, and, as the cultivating procedure by no means resembles the natural condition in the rumen, the correct number of the nitrogen-fixing bacteria of the rumen may be higher.

Change in the diet, from winter fodder to grass, was accompanied by a sudden decrease in the number of the nitrogen fixers, and, it lasted 5–6 weeks, until a new provisional average figure of $2 \cdot 10^5$ p. ml was established.

The microorganisms cultivated from the rumen of the same goat, and on the same nitrogen-free agar medium, reveal colonies of different colour, shape, and size. Microscopical examination has shown that each type of colony contains another bacteria strain. The most common strain forms gelatinous yellowish-coloured colonies of 2 mm in diameter on the surface of the slant agar.

To test the nitrogen-fixing capacity of these bacteria, nitrogen-free culture liquid was inoculated with bacteria suspensions of the different strains¹. The increase in nitrogen fixed is quite considerable in each case. There results an average value of 10 mg p. l of culture liquid, starting from 2 mg p. l. The differences between the various strains of bacteria from the goat in respect of nitrogen-fixing ability are not so remarkable as, for instance, those in the case of the cow.

As there exist together in the rumen of the same goat several different strains of nitrogen-fixing bacteria, the question arises, whether the nitrogen fixation is not more effective in mixed culture. Three different strains were tested in all seven possible combinations, but no remarkable differences could be observed. However it cannot be concluded that the information derived from this experiment is applicable to the natural condition in the rumen.

The greatest part of the total nitrogen fixed by the cultivated bacteria of the goat rumen, is present as plasma protein of the bacteria. This is separable by Seitz filter. A smaller part of the fixed nitrogen, on the contrary, is able to pass through the sterilizing filtering film. The percentage of the non-bacteria nitrogen is highest on the second day of the experiment (c. 30%) attains its minimum on the 4–5th day and then rises again. This later rising-phase can perhaps be explained by bacteriolysis, but the second day maximum may be due to other causes.

The presence of nitrogen fixing bacteria in the rumen raises the question of the possibility of nitrogen of the air entering the metabolism of ruminants by means of bacterial activity in the rumen. There is now some evidence to disprove this. It is a well-known characteristic of all nitrogen-fixing bacteria that in the presence of bound nitrogen no fixation occurs. The level at which no more fixation takes place is very low, being in the case under consideration below 30 mg p. l of culture medium. Against this the bacteria-free rumen liquid of the same goat shows nitrogen amounts as much as 300 mg p. l or more. It seems therefore improbable that fixation of the molecular nitrogen of the atmosphere can take place in the rumen, at any rate directly and under normal feeding conditions.

L. TÓTH

Microbiological Institute, Uppsala-Ultuna, August 27, 1949.

¹ L. TÓTH, Exper. 4, 395 (1948).

Zusammenfassung

In einer mit Pansenflüssigkeit der Ziege beimpften stickstofffreien Nährlösung ist in 10 Tagen eine Stickstoffanreicherung von rund 200 % festzustellen.

Aus der Pansenflüssigkeit der Ziege, die durch eine permanente Pansenfistel entnommen wird, lassen sich verschiedene Typen stickstoffbindender Bakterien her-auszüchten.

Diese Bakterien vermögen in stickstofffreier Nährlösung Luftstickstoff zu binden. Der Mittelwert der Stickstoffanreicherung beträgt dabei rund 10 mg pro l Nährlösung bei einem Ausgangswert von 2 mg pro l.

Das Ausmaß der Stickstoffanreicherung ist nicht nennenswert verschieden, wenn zur Beimpfung nur ein einziger Typ oder mehrere differente Typen der gezüchteten stickstoffbindenden Bakterien verwendet werden.

Die Zahl der keimungsfähigen Bakterien (auf stickstofffreiem Nährboden) variiert bei demselben Tier und bei gleichem Futter nur in geringem Maße und beträgt bei Winterfutter durchschnittlich $5 \cdot 10^6$ pro ml Panseninhalt. Beim Übergang zu Grünfutter sinkt die Zahl der Bakterien zunächst steil ab und erst nach 5–6 Wochen erreicht sie wieder einen neuen provisorischen Durchschnittswert von $2 \cdot 10^5$ pro ml.

Der gebundene Stickstoff besteht zum größeren Teil aus körpereigenen Stickstoffverbindungen der Bakterien. Den Rest (bis zu 30 %) machen wohl andere stickstoffhaltige Verbindungen aus.

Unter normalen Bedingungen dürfte im Pansen keine Fixation von Stickstoff stattfinden, da der Stickstoffgehalt der bakterienfreien Pansenflüssigkeit viel höher ist als die obere Stickstoffgrenze bei der die gezüchteten Bakterien Stickstoff zu binden vermögen.

Antibacterial Activity of Liver Extracts against β -hemolytic Streptococcus

In the course of investigations on the distribution of penicillin in the body, we observed that mashies prepared from normal rat livers have an antibacterial activity against β -hemolytic Streptococcus. The tissue mashies were prepared in (1:1 parts) 1 % phosphate buffer $p_H 6.0$ either by hand grinding with a mortar and pestle, or by mechanical grinding, as described by us elsewhere¹. The serial dilution technique (RAMMELKAMP) with β -hemolytic Streptococcus, Strain 4, (Group A, Type 3) as test organism, and rabbit red cells as indicator of hemolysis, was employed. The readings were verified by streaking all tubes on blood agar plates. In fifty experiments liver mashies gave an inhibition of growth up to the fourth serial dilution tube (which corresponded to the inhibition induced by 0.0125 units of penicillin). Expressed in terms of penicillin effect the average inhibition of the liver mashies would be equivalent to 0.22 units of penicillin per gram of liver—which is a relatively high antibacterial activity. That this was a specific inhibition of β -hemolytic Streptococcus by rat liver was demonstrated by (1) failure of identically prepared kidney, lung, spleen, heart, brain, and muscle mashies to show any antibacterial activity, and (2) failure of all organ mashies tested, including liver, to inhibit the growth, when *Bacillus subtilis* (3 R 9675), *Klebsiella pneumoniae* (9997), and *Staphylococcus aureus* (209) were used as test organisms.

¹ B.S. SCHWARTZ and M.N. LEWIS, J. Lab. a. Clin. Med. 33, 904 (1948).

It also has been noted that a more constant and greater inhibition of the hemolytic *Streptococcus* is obtained with a finer dispersion of liver tissues, such as that produced by mechanical grinding.

M. N. LEWIS and B. S. SCHWARTZ

Department of Pharmacology and Chemotherapy, Warner Institute for Therapeutic Research, New York, August 12, 1949.

Riassunto

Le sospensioni di fegato di ratto esplicano attività antibatterica *in vitro* verso lo *Streptococcus* β -emolitico. Tale azione è di una certa specificità in quanto sospensioni preparate allo stesso modo di rene, polmone, milza, cuore, cervello e muscoli sono inattive di fronte a questo microorganismo. Inoltre le medesime sospensioni, compresa quella di fegato di ratto, sono inattive se cimentate con *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Données histochimiques sur les phosphatases alcalines chez *Acanthochites fascicularis* L.

L'importance des phosphatases dans le métabolisme des Mollusques est connue (voir en particulier MANIGAULT¹, mais nous n'avons pas trouvé, dans les périodiques qui nous ont été accessibles, de recherches histochimiques, permettant une localisation à l'échelle cellulaire. Aussi nous a-t-il paru intéressant de compléter nos études histologiques sur les Polyplacophores (GABE et PRENANT²), par la mise en évidence histochimique des phosphatases alcalines chez *Acanthochites fascicularis* L.

L'étude a porté sur des exemplaires aimablement récoltés à notre intention par le Prof. E. FISCHER et par M. A. FRANC (Laboratoire maritime de Dinard). Les pièces ont été fixées à l'alcool et à l'acétone, incluses à la paraffine et débitées en coupes sériées. L'enzyme a été mis en évidence suivant GOMORI³; en cas de besoin, les pièces ont été décalcifiées par le citrate d'ammonium à 5%. L'abondance toute particulière du fer figuré chez les Chitons oblige à éliminer cette cause d'erreur par la pratique successive de la réaction de GOMORI et de celle du bleu de Turnbull sur la même préparation (ARVY et GABE⁴).

Comme nous l'avons montré dans nos travaux précédents, les fixateurs à base d'alcool ou d'acétone conservent très mal les structures cellulaires chez les Polyplacophores. C'est dire que la localisation intracellulaire de la diastase est souvent malaisée.

Le tégument est très pauvre en phosphatase; seules certaines des granulations des cryptes glandulaires épidermiques donnent la réaction de Gomori. Les esthètes n'en contiennent pas, de même que l'épithélium de la face ventrale du pied; celui des versants latéraux du pied est doué d'une activité phosphatasique discrète. Les branchies sont dépourvues de phosphatase.

Parmi les épithéliums de la poche buccale, seul celui du versant dorsal donne la réaction, quand on a soin d'éliminer l'erreur due au fer. L'épithélium de la gaine radulaire est dépourvu de phosphatase et sa coloration en noir est due à la présence de calcium et de fer figuré.

Par contre, la glande à sucre est très riche en phosphatase alcaline; les cellules pariétales donnent la réaction dans les régions supra-nucléaires alors que les cellules des villosités noircissent en totalité (fig. 1). Ces localisations diffèrent entièrement des granulations noires après

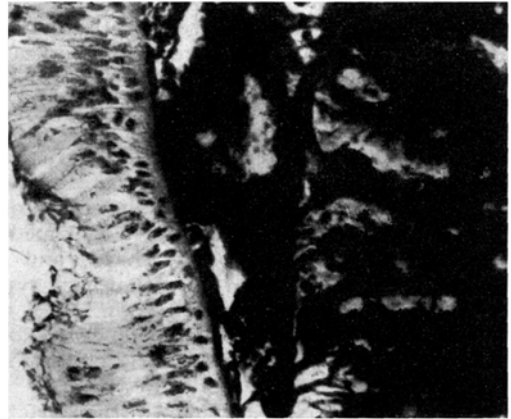


Fig. 1. – Glande à sucre (à droite) et bande ciliée de l'estomac (à gauche). Fixation à l'alcool, réaction de Gomori. Remarquer l'intensité de la réaction dans les villosités de la glande à sucre. Photomicrographie, 400 diamètres.

action du sulfure d'ammonium, signalées dans un travail précédent. Dans l'œsophage postérieur, la réaction est localisée dans une bande étroite au pôle apical des cellules.

Les bandes ciliées de l'épithélium gastrique sont dépourvues de phosphatase; les régions non ciliées donnent fortement la réaction; comme dans le cas de l'œsophage, l'activité phosphatasique est localisée au pôle apical de la cellule. Dans l'intestin antérieur, qui, du point de vue cytologique, se rapproche des régions non ciliées de l'estomac, la réaction est également intense. Le foie est dépourvu de phosphatase histochimiquement décelable (fig. 2).

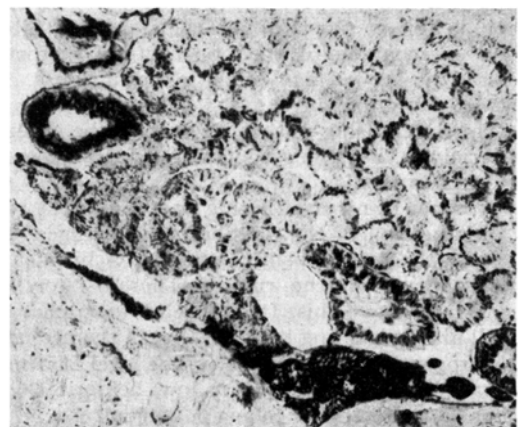


Fig. 2. – Pied et masse viscérale d'*Acanthochites fascicularis*. Fixation à l'acétone, réaction de Gomori. Le tissu conjonctif et musculaire du pied est à peu près dépourvu d'activité phosphatasique (les grains noirs sont dus à la présence de fer figuré). Réaction intense du rein (entre le pied et la masse viscérale), des régions proximales de l'intestin postérieur (angle supérieur gauche). Réaction moins intense des régions distales de l'intestin postérieur, compte tenu de la présence de fer figuré. La teinte noire des cellules basales des tubuli hépatiques est due à la présence de calcium. Photomicrographie, 30 diamètres.

¹ P. MANIGAULT, Ann. Inst. océanographique 18, 331 (1939).

² M. GABE et M. PRENANT, Arch. Anat. micr. 37, 136 (1948); Acta morph. Neerl. 6, 404 (1949); Arch. Biol. 60, 39 (1949); Arch. Anat. micr. 37, 65 (1949); Ann. Sci. nat. zool., sous presse (1949); C. R. Ass. Anat., sous presse (1949); La Cellule, 53, 99 (1949).

³ G. GOMORI, Amer. J. Clin. Pathol. 16, 347 (1946).

⁴ L. ARVY et M. GABE, Bull. Histol. appl., sous presse (1949).