

Fehlen der Ascorbinsäure in *Rhodospirillum rubrum*

Ascorbinsäure wurde bisher in allen grünen Pflanzen gefunden. Möglicherweise kommt dem Redoxsystem Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure in diesen Organismen eine regulatorische Funktion zu¹. Die Morphogenese der Thylakoide (Chromatophoren) von *Rhodospirillum rubrum* kann in Dunkelkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase durch Absenken des Sauerstoffpartialdruckes induziert werden². Es wäre denkbar, dass an diesem Regulationsprozess ein Redoxsystem der Zelle beteiligt ist³. Es war deshalb von Interesse, zu untersuchen, ob Ascorbinsäure in diesem potentiell phototrophen Bakterium nachweisbar ist. Die Untersuchungen wurden mit aeroben (thylakoidfreien), semiaeroben (thylakoidhaltigen) Kulturen und an anaeroben (thylakoidhaltigen) Lichtkulturen durchgeführt.

Die Bakterien wurden vor dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, mit einer eiskalten Mischung von Methanol und wässriger Metaphosphorsäure versetzt, durch Ultraschall unter N₂ homogenisiert und nach Zentrifugation (0°C, 20000 g) im Überstand die Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol gemessen (pH 2,5; 578 nm)¹. Extrakte aus Zellen mit Thylakoiden reduzierten unter diesen Bedingungen etwa doppelt so stark wie Zellen ohne Thylakoide aus aeroben Kulturen.

Da diese Methode jedoch nicht völlig spezifisch für Ascorbinsäure ist, wurde versucht, die Ascorbinsäure chromatographisch zu identifizieren. Der Zelleextrakt wurde durch absteigende Papierchromatographie mit dem Laufmittel *n*-Butanol-Eisessig-H₂O (4:1:5) aufgetrennt und die Ascorbinsäure auf dem Chromatogramm durch sofortiges Entfärben einer äthanolischen Lösung von 2,6-Dichlorphenolindophenol nachgewiesen⁴. Jedoch liess sich im Bakterienextrakt keine der Testsubstanz Ascorbinsäure entsprechende Verbindung nachweisen.

Zur Sicherung wurde noch ein chemischer Nachweis durchgeführt⁵. Der Bakterienextrakt wurde mit Brom zur Oxydation der Ascorbinsäure behandelt. Unter sauren Bedingungen wird dabei der Lactonring geöffnet und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin das orangerote Osazon der Diketogulonsäure gebildet. Dieses wurde mit Äthylacetat extrahiert und mit Hilfe einer Kieselgelsäule von den Osazonen anderer Zucker abgetrennt. Die endgültige

Identifizierung des Osazons wurde über Dünnschicht- oder Papierchromatographie erreicht.

Mit dieser Methode konnten zwar die in Senfkeimlingen unter verschiedenen Lichtprogrammen (Dauerdunkel oder Dunkelrot)¹ nachgewiesenen Ascorbinsäuremengen quantitativ (Fehler < ± 10%) bestimmt werden. Bei Zellen von *R. rubrum* verliefen jedoch alle Nachweisversuche negativ, ganz gleich, unter welchen Bedingungen sie angezogen wurden.

Die papierchromatographische Methode weist spezifisch Ascorbinsäure nach, während bei dem chemischen Nachweis auch Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure miterfasst werden. Da Versuche mit beiden Methoden in jedem Fall negativ verliefen, muss man daraus schliessen, dass *R. rubrum* weder in aeroben und semiaeroben Kulturen noch in anaeroben Lichtkulturen dazu fähig ist, Ascorbinsäure oder ihre unmittelbaren Vorstufen zu synthetisieren. Die Resultate der photometrischen Methode widersprechen diesem Ergebnis nicht, da die Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol auch durch andere Substanzen verursacht werden kann.

Summary. Cells of *Rhodospirillum rubrum* were cultured aerobically or semiaerobically in the dark and anaerobically in the light. The investigation of acid extracts of these cells showed, that this bacterium contained no ascorbic acid under all conditions of cultivation.

J. SCHRÖDER

Botanisches Institut, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität, 78 Freiburg i.Br. (Deutschland), 14. Juli 1967.

- ¹ P. SCHOPFER, *Planta* 69, 158 (1966); *Planta* 74, 210 (1967).
- ² M. BIEDERMANN, G. DREWS, R. MARX und J. SCHRÖDER, *Arch. Mikrobiol.* 56, 133 (1967).
- ³ G. COHEN-BAZIRE, W. R. SISTROM und R. Y. STANIER, *J. cell. comp. Physiol.* 49, 25 (1957).
- ⁴ L. W. MAPSON und S. M. PARTRIDGE, *Nature* 164, 479 (1949).
- ⁵ M. FREED, *Methods of Vitamin Assay*, 3rd edn (Interscience Publishers, New York, London, Sydney 1966), p. 332.

Mechanical Properties of the Radula Protractor of *Busycon canaliculatum*

Cardiac muscle of the prosobranch gastropod *Busycon* (*Busycotypus*) *canaliculatum* Linné 1758, has been shown to possess those properties in its contractility cycle¹ and its length-tension diagram² which one might expect to be typical of heart muscle as contrasted to skeletal muscle or smooth muscle. It is possible to compare cardiac muscle of *Busycon* directly with phasic muscle of the same animal, since the buccal mass of gastropods contains 'voluntary'³ musculature.

Isolated radula protractors of *B. canaliculatum* were maintained at 15°C in a jacketed bath of artificial sea water aerated by a slow stream of air bubbles (Figure 1). Isometric tension was picked up on a Statham strain gauge and recorded on a Grass polygraph while the muscle was stretched by lowering the bath in 1 mm increments on a Palmer screw stand. A standardized method was adopted for measuring active tension at each length in which the muscle was first caused to twitch by

a 40 volt, 5 msec pulse from a Grass stimulator, allowed to rest 4 sec, tetanized at 6 pulses/sec, allowed to rest 4 sec again, and then caused to twitch once more. Nine muscles were used in all.

The results are displayed as a length-tension diagram in Figure 2. Active tetanic tension has a peak at about the length at which passive tension begins to rise steeply with further elongation (55 mm for this muscle). There is then a sharp drop in active tetanic tension as passive tension continues to increase. Attention is drawn to the twitch tension curve as well as the tetanic tension curve, since the object of this paper is to contrast the properties

¹ R. B. HILL, *Experientia* 23, 570 (1967).

² R. B. HILL, *Experientia* 23, 772 (1967).

³ H. LACAZE-DUTHIERS, *Arch. Zool. exp. gén.* (3) 6, 331 (1898).

of phasic muscle of *Busycon* with cardiac muscle, and length-tension diagrams for cardiac muscle are sometimes expressed in terms of single beats. Post-tetanic potentiation⁴ was slight and the pretetanic twitches are plotted. Although the twitch tension curve assumes the form of a plateau as plotted, it also rises steadily from zero resting tension, with the plateau height at a maximum when passive tension begins to rise steeply, and then gradually drops as passive tension rises steeply.

If the radula protractor length-tension diagram is compared to that for ventricular muscle of *B. canaliculatum*², the most pronounced difference is in the relation between passive tension and maximum active tetanic tension. Whereas for the radula protractor tetanic tension rises

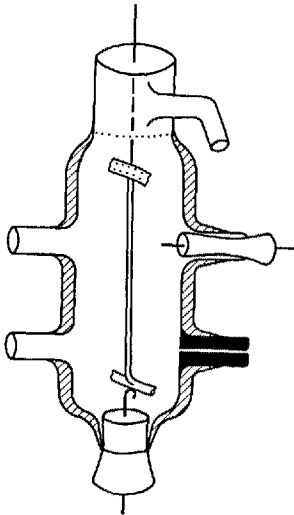


Fig. 1. Experimental arrangement of radula protractor mounted in a constant temperature, aerated bath with stimulating electrodes at bottom and side.

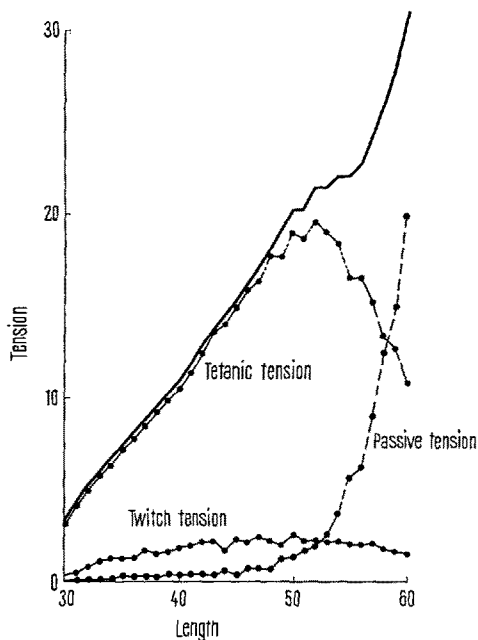


Fig. 2. Length-tension diagram for the isolated radula protractor of *Busycon canaliculatum*. Tension in g versus length in mm. The unlabelled heavy line represents total tension.

steeply over a range of lengths in which passive tension is either zero or only slightly elevated, tetanic tension of ventricular muscle rises with passive tension until the length is reached at which maximum contractile force is developed. For the radula protractor, maximum force is attained when passive tension has just begun to rise steeply and contractile force then drops off steeply with the rise of passive tension. Thus the length-tension diagram bears a closer resemblance to a diagram for smooth muscle⁵ than it does to one for skeletal muscle⁶. However, for *Busycon* heart muscle the length for maximum tetanic tension does not correspond to a length at which passive tension is negligible but rather to a length high on the slope of rising passive tension, not far from the length at which a muscle ring would break.

The results obtained with the radula protractor of *B. canaliculatum* may be compared with length-tension diagrams published for other molluscan non-cardiac muscles, namely: the anterior byssus retractor of *Mytilus edulis* (ABRM)^{7,8}, the funnel retractor muscle of *Octopus vulgaris*⁹, and the opaque portion of the adductor muscle of *Crassostrea angulata*¹⁰. The diagrams would be very similar if the radula protractor had a reference length (the shortest length of a muscle at which a definite resting tension can be detected) comparable to the reference lengths of the other 3 muscles. However, corresponding to its function in the operation of the radula¹¹, the radula protractor exerts passive tension well below its resting length in the relaxed proboscis of the whelk. If 49 mm is taken as 'resting length' for the muscle of the experiment of Figure 2, then the relation of passive tension to active tetanic tension is very much like that for the funnel retractor muscle⁹ or for phasic contractions of the ABRM⁷. The opaque adductor¹⁰ length-tension relationship is also such that considerable active tension is developed at lengths below that at which resting tension appears. Thus the radula protractor, as well as previously studied molluscan smooth muscles, differs from *Busycon* cardiac muscle in which active tension development only begins at lengths above that at which resting tension appears.

Zusammenfassung. Der Radula Protractormuskel von *Busycon canaliculatum* unterscheidet sich vom Herzmuskel, aber er verhält sich wie andere glatte Muskeln von andern Mollusken in der Beziehung zwischen passiver und aktiver Kraft.

R. B. HILL, ELIZABETH MARANTZ,
B. A. BEATTIE and J. M. LOCKHART

Department of Physiology, Dartmouth Medical
School, Hanover (New Hampshire 03755, USA),
10 September 1967.

⁴ R. B. HILL, Fedn Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol. 22, 461 (1963).

⁵ A. I. CSAPO, Physiol. Rev. Suppl. 5, 7 (1962).

⁶ A. V. HILL, Proc. R. Soc. B. 141, 104 (1953).

⁷ B. C. ABBOTT and J. LOWY, J. Physiol. 141, 398 (1958).

⁸ J. LOWY and B. M. MILLMAN, Phil. Trans R. Soc. B. 246, 105 (1963).

⁹ J. LOWY and B. M. MILLMAN, J. Physiol. 160, 353 (1962).

¹⁰ B. M. MILLMAN, J. Physiol. 173, 238 (1964).

¹¹ J. C. HERRICK, Am. Nat. 40, 707 (1906).