Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 13 (1956)

Heft: 3

Artikel: Untersuchungen über die Abhängigkeit der Entwicklung der Reduviide "Triatoma infestans" Klug von ihrem Darmsymbionten

Autor: Halff, Lily-Anne

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-310608

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 13.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Schweizerisches Tropeninstitut Basel.

Untersuchungen über die Abhängigkeit der Entwicklung der Reduviide *Triatoma infestans* Klug von ihrem Darmsymbionten.

Von Lily-Anne Halff.

Inhalt.

Einleitung 225
I. Material und Technik 228
II. Lokalisierung und Zyklus der Symbionten bei *Triatoma infestans* Klug 231
III. Morphologisch-systematische Beurteilung des Symbionten . . . 233
IV. Entwicklung symbiontenfreier Wanzen 234
V. Mikrobiologische Auswertung des Kultursymbionten 238
VI. Versuche mit künstlicher Verfütterung von Folsäure 243
VII. Verfütterung von Aminopterin 246
Literatur 248
Résumé. Summary 251

Einleitung.

Bevor die Verhältnisse bei den Reduviiden eingehender geschildert werden, sei hier zur Einleitung auf die Symbiose einiger blutsaugender Arthropoden eingegangen. Diese Tiere interessierten die Forscher früher nur, sofern sie als Krankheitsüberträger in Frage kamen, und so wurde ihre Symbiose entweder ganz übersehen, mißverstanden oder fehlgedeutet. Robert Koch hat z. B. schon Symbionten gesehen, die in einem bestimmten Abschnitt des Mitteldarmes der Tse-Tse-Fliege lokalisiert sind, doch untersuchte er diese Mikroorganismen nicht näher. Solche Beispiele ließen sich hier noch manche aufführen, doch änderte sich die Situation schon 1910 durch die Arbeiten von Roubaud, der die Symbiose der Glossinen beschrieb. Von da an wurde diese Erscheinung hauptsächlich morphologisch untersucht, und erst in jüngerer Zeit versucht man durch mikrochemische Untersuchungsmethoden etwas über die physiologischen Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Symbiont zu erfahren.

Sehen wir uns nun auf Grund von Buchner's Schilderung (1954) einige Beispiele näher an. Zuerst soll die Rede sein von der Symbiose der *Argasiden* und *Ixodiden*. Bei diesen Zecken finden sich die Symbionten immer nur in den Zellen der Malpighi'schen Gefäße und in den Ovarien. Die Mikroorganismen werden vom Weibchen schon bei der Eibildung an die Nachkommen weitergegeben. Bei der Kopflaus, *Pediculus capitis,* hingegen sehen wir beim Adulttier eine sogenannte Magenscheibe. Dieses weißlich-gelbe Gebilde ist ein Mycetom, das aus 10—16 Fächern besteht, in denen die wurstförmigen Symbionten liegen. Diese Organe wölben das Darmepithel, mit dem sie nur leicht verbunden sind, nach innen vor. Eine direkte Verbindung mit dem Darmlumen besteht also nicht. Die Übertragung der Symbionten auf die Nachkommen erfolgt im Ovarium. Die Symbionten wandern aus dem Mycetom des reifen Weibchens in die sogenannten Ovarialampullen aus und gelangen auf diesem Wege in die Eier.

Schließlich sei noch die Symbiose der Glossinen genannt, die verschiedene

Trypanosomiasen übertragen können. Der Mitteldarm der Imago zerfällt in drei deutlich zu unterscheidende Zonen. Im ersten Abschnitt fällt ein scharf abgegrenzter Bereich auf, in dem sich die Symbionten intrazellulär finden. Die Zellen, die sich in dieser Gegend befinden, sind außerordentlich vergrößert, ja beim hungernden Tier wölben sie sich sogar ins Darmlumen vor und sind mit Stäbchen prall gefüllt. Bei einer Blutmahlzeit werden die stäbchenförmigen Mikroorganismen möglicherweise durch die peritrophe Membran hindurch in das Lumen des Darmes abgegeben und beteiligen sich eventuell an der Verdauung des Blutes. Bei den Glossinen vollzieht sich das Embryonal- und Larvenleben bis zur Verpuppung im mütterlichen Körper. Während dieser Zeit wird die Larve mit dem Sekret der sogenannten Milchdrüse ernährt. ROUBAUD stellte nun fest, daß das Ei zwar noch symbiontenfrei, die Larve jedoch schon symbiontenhaltig sei. Daraus schloß er, daß die Symbionten durch das milchige Sekret übertragen werden. In zwei der eingehender geschilderten Fälle wurden die Symbionten durch spezielle Einrichtungen via Ei an die nächste Generation weitergegeben, im letzten durch das milchige Sekret, mit dem die intrauterine Larve gefüttert wird.

Diesen Beispielen gegenüber weist die Symbiose der Reduviiden gewisse Eigenheiten auf. Wieder waren es Mediziner, die sich für die Raubwanzen vor allem interessierten, da dieselben den Erreger der Chagas-Krankheit, das *Schizotrypanum cruzi*, übertragen. So gewahrte der brasilianische Arzt DIAS (1933, 1934) als erster die Symbionten bei *Triatoma*. Ein Entomologe, WIGGLESWORTH (1936), untersuchte die Symbionten von *Rhodnius prolixus* und fand im Lumen und in den Zellen des vorderen Abschnittes des Mitteldarmes dieser Reduviide grampositive Bakterien, die er später in Übereinstimmung mit ERIKSON (1935) als *Actinomyces (Nocardia) rhodnii* klassifizierte. Damals glaubte er, daß die Symbionten im Ovar auf die Eier übertragen werden. Zu dieser Auffassung kam er, weil er bei frischgeschlüpften Wanzen die Symbionten nur intrazellulär feststellte. Erst ca. 10 Tage nach der ersten Häutung vermehrten sich die Mikroorganismen und wurden dann auch frei im Darmlumen gefunden. Aus Eierbrei konnten die Symbionten nie gezüchtet werden, jedoch ließen sie sich leicht aus älteren Larven isolieren. Deshalb glaubte der Autor auch, daß lediglich die intrazelluläre Form in den Embryonen gefunden werde, die sich auf künstlichem Nährboden nicht züchten ließe. Außerdem sah WIGGLESWORTH auch in anderen Reduviiden ähnliche Mikroorganismen, doch untersuchte er diese nicht.

Er verfütterte sodann Rhodnius-Symbionten an Lucilia-Larven und stellte fest, daß diese Diät ähnlich wirkte wie eine Fütterung mit Hefeextrakt. Daraus schloß er, daß der Symbiont ein Vitamin des B-Komplexes produzieren müsse.

DIAS (1937) fand bei *Triatoma megista* intra- und extrazelluläre Symbionten und stellte ohne nähere Stoffwechseluntersuchungen fest, daß diese Mikroorganismen für die normale Entwicklung des Wirtes unentbehrlich seien.

BRECHER und WIGGLESWORTH (1944) isolierten aus dem Proventrikel von *Rhodnius prolixus* wiederum *Actinomyces rhodnii*, und zwar auf Glukoseagar Sie revidierten ferner ihre Ansicht über den Übertragungsmodus des Symbionten insofern, als sie an keine intraovarielle Übertragung mehr glaubten, sondern die Infektion durch den symbiontenhaltigen Kot postulierten. Demnach ist also kein spezieller Mechanismus zur Symbiontenübertragung vorhanden, sondern die Mikroorganismen werden durch den Kot, mit dem die Wanzeneier normalerweise beschmiert sind, auf die Nachkommen übertragen. Die Embryonen sind also, entgegen der früheren Ansicht, nie symbiontenhaltig, hingegen können die Symbionten durch Abstreichen von mit Kot beschmierten Eiern auf Glukoseagar gezüchtet werden. Verglichen mit den eingangs beschriebenen

Verhältnissen bei Zecken, Pediculus und Glossinen, finden wir bei den Reduviiden eine lockere Form der Symbiose.

Nachdem solchermaßen der Übertragungsmodus geklärt war, wurde es möglich, symbiontenfreie Wanzen zu züchten. Hierzu brauchten lediglich die Eier mittels einer Gentianaviolettlösung oberflächlich desinfiziert und die aus so behandelten Eiern schlüpfenden Larven weiterhin unter sterilen Bedingungen aufgezogen zu werden. So ließ sich die Bedeutung des Symbionten für den Organismus ermitteln. Die Larven von *Rhodnius prolixus* entwickelten sich bis zum IV. Larvenstadium normal, konnten sich aber nur selten zur Nymphe oder zum Adulttier häuten. Die Vermehrungsfähigkeit der Adulttiere soll vermindert sein. Wurden diese Imagines sekundär mit Symbionten infiziert, so regulierte sich die Vermehrung. BRECHER und WIGGLESWORTH untersuchten ferner noch die Rolle, die der Symbiont bei der Verdauung des Blutes im Magen der Wanze spielt. Auf Grund ihrer Versuchsergebnisse glaubten sie, daß *Actinomyces rhodnii* an der Haemolyse nicht beteiligt sei, sondern lediglich ein Wuchshormon produziere, durch das die Normalentwicklung der Wanze gewährleistet würde.

Als Ergänzung zu DIAS, der *Triatoma megista* untersucht hatte, fand WEURMANN (1947) in *Triatoma infestans* kleine, bipolar färbbare Bakterien, die auf Glukoseagar grauweiße, glänzende Kolonien bildeten. Es handelt sich hier um ein echtes Bakterium mit spezifischen Agglutinationsreaktionen. WEURMANN glaubte, daß außer der Übertragung des Mikroorganismus durch den Kot auch eine intrauterine Infektion durch die Mikropyle des Eies möglich wäre, doch hielt die Autorin diese Art der Übertragung für wenig wahrscheinlich. WIGGLESWORTH revidierte (1952) anhand von weiteren Untersuchungen seine frühere Ansicht in bezug auf die intrazelluläre Lage der Symbionten von *Rhodnius prolixus*. Nach dieser neuen Auffassung finden sich die Symbionten lediglich im Lumen oder zwischen den Zellen des Proventrikels.

Wie wir sehen, unterscheidet sich die Symbiose der Reduviiden wesentlich von der anderer blutsaugender Arthropoden. Hier werden weder spezielle Organe zur Beherbergung der Symbionten ausgebildet noch solche, die eine Übertragung auf das Ei ermöglichen würden.

Bisher wurden nur nähere Stoffwechseluntersuchungen bei der Reduviide *Rhodnius prolixus* ausgeführt. Die Verhältnisse bei *Triatoma infestans,* einer ebenfalls lediglich von Säugerblut sich nährenden Raubwanze, abzuklären, ist die Aufgabe vorliegender Arbeit. In den bisherigen Publikationen GEIGY, HALFF und KOCHER (1953, 1954) wurden einige der Hauptergebnisse zusammengestellt, die hier nun näher beschrieben werden sollen.

Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik (Hygienische Anstalt, Basel) für seine wissenschaftliche Stellungnahme, Herrn Dr. V. Kocher (Mikrobiologisches Laboratorium, Basel) für seine Mitarbeit und die Erlaubnis zur Benützung seines Laboratoriums und seiner Methoden, der Firma Hoffmann-La Roche für die Überlassung von Substanzen, Herrn Dr. K. A. Bisset (Department of Bacteriology, Birmingham, England) für die Begutachtung des Symbiontenstammes, Herrn Dr. R. E. Ryckman (Loma-Linda, California, U.S.A.) für die Sendung von *Triatoma infestans* und Frau M. Siebenmann-Stehelin für die Ausführung der Zeichnungen zu danken.

Vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung meines verehrten Lehrers, Herrn Prof. Dr. R. Geigy, am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel ausgeführt. Sie geht im wesentlichen auch auf gemeinsame Diskussionen mit Herrn Prof. Dr. P. Buchner (Porto d'Ischia, Italien) zurück. Beiden Herren danke ich für die Anregungen und das Interesse, das sie dieser Arbeit stets entgegengebracht haben, besonders herzlich.

I. Material und Technik.

Die Untersuchungen, die hier beschrieben werden sollen, wurden mit *Triatoma infestans* Klug ausgeführt. Diese blutsaugenden Raubwanzen stammen aus Südamerika, wo sie in den Hütten der Eingeborenen leben und als Überträger der Chagas-Krankheit, einer südamerikanischen Trypanosomiase, eine wichtige Rolle spielen. Unser Stamm wurde aus Caracas eingeführt und schon längere Zeit am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel gehalten; ferner wurden noch einige Beobachtungen an einem Wanzenstamm aus Loma-Linda gemacht. Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. R. E. Ryckman zur Verfügung gestellt (School of Tropical and Preventive Medicine, Loma-Linda, California).

Die zu Vergleichszwecken verwendeten *Rhodnius prolixus* stammen ebenfalls aus Südamerika und wurden auch schon länger unter den gleichen Bedingungen wie *Triatoma infestans* am Tropeninstitut gezüchtet.

Zucht- und Fütterungstechnik:

Die Raubwanzen wurden in einem Klimaraum bei einer Temperatur von 26° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% gehalten. Die Luftfeuchtigkeit wurde absichtlich so niedrig gehalten, um ein Schimmeln der Zuchten zu vermeiden, und weil die Wanzen ganz allgemein trockene Haltung bevorzugen.

Triatoma infestans ist ein Insekt, das nach dem Schlüpfen aus dem Ei vier Larven- und ein Nymphenstadium durchläuft, um sich endlich zur Imago zu häuten. Zu dieser hemimetabolen Entwicklung, die direkt verläuft, braucht das Tier durchschnittlich sechs Monate. Um die Bedingungen möglichst konstant zu halten, wurden alle Wanzen während der Versuchsdauer dreimal wöchentlich auf Meerschweinchen gefüttert. Nach unseren Erfahrungen müssen die Triatomen ungefähr eine halbe Stunde lang am Meerschweinchen belassen werden, um eine genügend große Blutmenge aufnehmen zu können. *Rhodnius prolixus* nimmt pro Larvenstadium nur eine Blutmahlzeit zu sich, *Triatoma infestans* hingegen mehrere von recht unterschiedlicher Größe. So saugt z. B. eine Larve des dritten Stadiums 13—30 mg Blut, eine solche des vierten Stadiums ca. 60 mg pro Mahlzeit.

Die Fütterungtechnik ist folgende:

Gewöhnlich werden 20—30 Tiere zusammen in Bechergläser von 50—100 ccm Inhalt verbracht, die mit einem gefalteten Stück Filterpapier versehen und mit Gaze verschlossen werden. So lassen sich die Tiere leicht sauber halten. Man ermöglicht den Wanzen den Blutsaugakt, indem man den Gazeabschluß der Zuchtbehälter einem Kleinsäuger anlegt. Meist geben die Tiere unmittelbar nach der Fütterung feuchten Kot ab, und deshalb werden die Gläser am besten dann gereinigt und Filterpapier und Gaze erneuert. Für die Aufzucht symbiontenfreier Wanzen wurde folgendes, von WIGGLESWORTH für Rhodnius ausgearbeitetes Verfahren angewendet: Die Eier von *Triatoma infestans* werden fünf Minuten lang in eine gesättigte wäßrige Gentianaviolettlösung gebracht und in Alkohol (70%) und sterilisiertem destilliertem Wasser bis zur totalen Entfärbung ausgewaschen. Hierauf werden die Eier in sterile Zuchtgläser gegeben und in ein mit Lysollösung (50%) symbiontenfrei gemachtes Aquarium verbracht. Gläser, Filterpapier, Gaze und zur Fütterung dieser Tiere verwendete Instrumente werden im Autoklaven bei 1,5 Atm. während einer halben Stunde sterilisiert. Das zur Fütterung gebrauchte Meerschweinchen wird mit einer gesättigten wäßrigen Gentianaviolettlösung desinfiziert, um eine Infektion mit Symbionten zu verhüten. Alle tot aufgefundenen sterilen Wanzen wurden entweder histologisch aufgearbeitet oder deren Proventrikel nach der üblichen

Methode auf Kulturmedien ausgestrichen. In keinem Fall konnten Symbionten nachgewiesen werden.

In allen ausgeführten Versuchen wurden jeweils Larven aus Eiern gleichen Alters zu einer Gruppe zusammengefaßt, um die Ausgangsbedingungen möglichst konstant zu gestalten und mit möglichst gleichwertigem Wanzenmaterial zu arbeiten.

Künstliche Ernährung:

Um den Vitaminbedarf von Triatoma genau zu bestimmen, ist es nötig, ihr eine Nährlösung zu verfüttern, deren Gehalt an Vitamin bekannt ist. Uns interessierte hauptsächlich der Vitamin-B-Komplex, da diese Vitamine als Insektenentwicklungshormone schon längere Zeit bekannt sind (REICHSTEIN u. a. 1940—1946).

Es ist nicht schwer, Triatomen künstlich zu füttern, da sie durch rein thermische Reize zum Saugen angeregt werden können. In Anlehnung an den von NICOLLE und LWOFF (1942—1947) erfundenen Apparat, den wir weiter modifizierten, ließen wir unsere Versuchstiere durch eine dünne Gummimembran hindurchstechen und saugen (s. Abb. 5, vgl. auch GEIGY und KRAUS 1952). Der Apparat wurde möglichst einfach gestaltet, um seine Reinigung zu erleichtern, vor allem aber, um die Sterilisation im Autoklaven zu ermöglichen. Es wurden daher nur Glasteile verwendet, da Metall leicht rostet und zu oft ersetzt werden müßte.

Um die zur Fütterung gebrauchte Lösung, in unserem Falle Meerschweinchenserum, auf einer Temperatur von 40° C zu halten, stellte man sie auf ein Wasserbad von 50° C. Die Triatomen werden vor und nach der Fütterung gewogen. Die aufgenommene Vitaminmenge konnte auf diese Weise ziemlich genau bestimmt werden. Durchschnittlich wurden die Wanzen zwanzig Minuten auf der Gummimembran belassen. Nach dieser Zeit hatten sich die meisten vollgesaugt. Die Fütterungsdauer kann bei künstlicher Ernährung herabgesetzt werden, weil der Saugrüssel nach Durchstechen der Membran sofort in die Nährflüssigkeit eintaucht und nicht erst die Haut des Futterspenders nach Kapillaren absuchen muß (Abb. 1).

Histologische Aufarbeitung:

Von den sezierten Wanzen wurde lediglich der Darmtrakt histologisch weiterverarbeitet. Nach der Sektion wurden Proventrikel und ein Stück Mitteldarm kurz in eine Natriumzitratlösung (2%) getaucht, nach CARNOY fixiert und über Butylalkohol in Paraffin eingebettet. Das Schwenken in Natriumzitrat erfolgt, um aus dem Proventrikel möglichst viel Blut vor der Weiterverarbeitung zu entfernen. Butylalkohol eignet sich für dieses Objekt besonders gut, weil sich unter seiner Einwirkung Blut nicht so stark verhärtet wie bei anderen Entwässerungsmitteln. Die Schnittdicke betrug durchschnittlich etwa 5 μ, gefärbt wurde mit Haematoxylin HEIDENHAIN oder nach GIEMSA-Originalmethode für Schnittpräparate. Es wurden auch Ausstriche von Proventrikeln hergestellt, die mit Methylalkohol fixiert und nach GRAM oder GIEMSA gefärbt wurden.

Züchtung des Symbionten in Kultur:

Wie schon in der Einleitung erwähnt, finden sich die Symbionten immer im vorderen Abschnitt des Mitteldarmes, im sogenannten Proventrikel. Die zum Anlegen von Symbiontenkulturen verwendeten Wanzen wurden mit Äther oder Chloroform abgetötet, zur Desinfektion der Körperoberfläche in eine Lysollösung (50%) verbracht und anschließend mit sterilem destilliertem Wasser gründlich gespült. Das Tier wurde hierauf möglichst rasch eröffnet, der

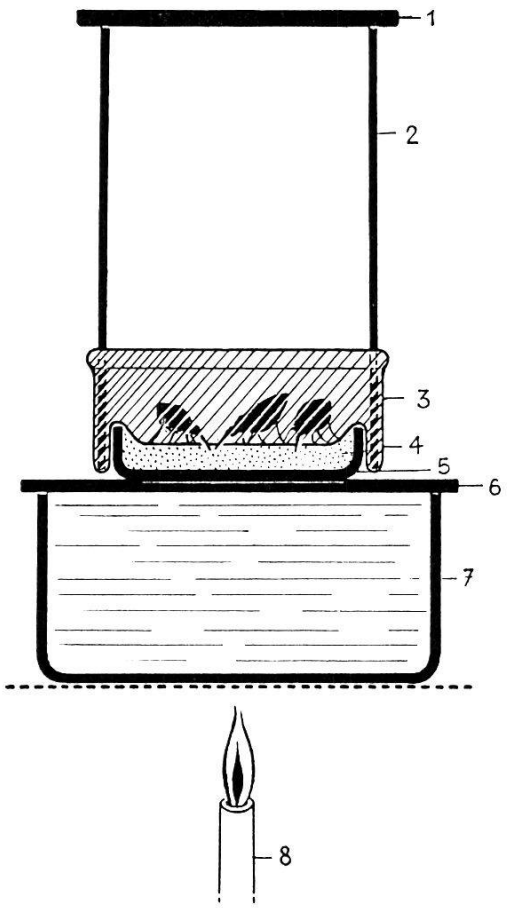


Abb. 1. Apparat für die künstliche Fütterung der Triatomen.

1 = Abschließender Glasdeckel.
2 = Glaszylinder.
3 = Gummimembran.
4 = Nährflüssigkeit.
5 = Glasgefäß zur Aufnahme der Nährflüssigkeit.
6 = Glasdeckel.
7 = Wasserbad.
8 = Gasflamme zur Erwärmung des Wasserbades.

Proventrikel herauspräpariert und auf eine Öse verbracht, die dann auf dem Nährboden abgestrichen wurde. Hierzu wurden folgende Nährböden verwendet:

Bacto-Beef-Extract (Difco)	3 g	NaCl	8 g
Bacto-Peptone (Difco)	5 g	Glukose Sandoz	20 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g	aq. dest.	1000 g
	pH 6,8—7,0		

Zu speziellen Untersuchungen wurde diesem Nährmedium steriles Menschenblut zugegeben, und zwar 2 ccm Blut auf 8 ccm Nähragar. Auch flüssiger Nährboden wurde zum Teil verwendet, der gleich hergestellt wurde wie der feste, jedoch ohne Zusatz von Agar. Die Zugabe von Glukose ist in allen Fällen erforderlich, da sich der Symbiont ohne diese nicht entwickeln kann.

Um zu prüfen, ob Gentianaviolett- und Lysollösungen in den zur Sterilisation verwendeten Konzentrationen den Symbionten tatsächlich beseitigen können, gaben wir zu unseren gewöhnlichen Nährböden je 1 ccm Desinfektionsflüssigkeit zu. Nie zeigte sich auf solchen Medien nach Beimpfung mit Symbiontenkulturen Wachstum.

Die frisch angesetzten Kulturen wurden alle 12 Stunden kontrolliert. Meist zeigte sich nach 48 Stunden Wachstum von weißlichen, glänzenden Kolonien. Erfolgte innert 96 Stunden kein Wachstum, so bezeichneten wir den Befund als negativ. Von den positiven Kulturen wurden Ausstriche angefertigt, die mit Methylalkohol fixiert und nach GRAM oder GIEMSA gefärbt wurden (s. Abb. 8, S. 249).

II. Lokalisierung und Zyklus der Symbionten bei Triatoma infestans Klug.

Bevor auf den Zyklus des Symbionten von *Triatoma infestans* eingegangen wird, soll hier die Dauer, die eine normale Triatoma durchschnittlich zu ihrer hemimetabolen Entwicklung braucht, festgelegt werden. Bis *Triatoma infestans* sich zur geflügelten Imago häutet, durchläuft sie vier Larven- und ein Nymphenstadium.

Nach Ablage des Eies vergehen 20 Tage bis zum Schlüpfen der I. Larve. Wird diese sogleich und regelmäßig gefüttert, so häutet sie sich schon nach 12 Tagen zu einer Larve des 2. Stadiums. Nach weiteren 14—16 Tagen schlüpft diese und bleibt dann ungefähr 25 Tage lang eine Larve des 3. Stadiums, um sich dann in die IV. Larve zu verwandeln. 21 Tage darauf schlüpft die Nymphe, die sich erst nach 60 Tagen zur geflügelten Imago häutet. Im ganzen benötigt das Tier nach Ablage des Eies zu seiner Entwicklung also ca. 5½ Monate.

Nun fanden wir, in Übereinstimmung mit WIGGLESWORTH (bei *Rhodnius prolixus*), nie Symbionten in Eiausstrichen oder in aus

Abb. 2. Embryo, aus dem Ei präpariert; schematisiert. 1 = Embryo, total. a = Darm. 2 = Ausschnitt aus dem Darm, ohne Symbionten.

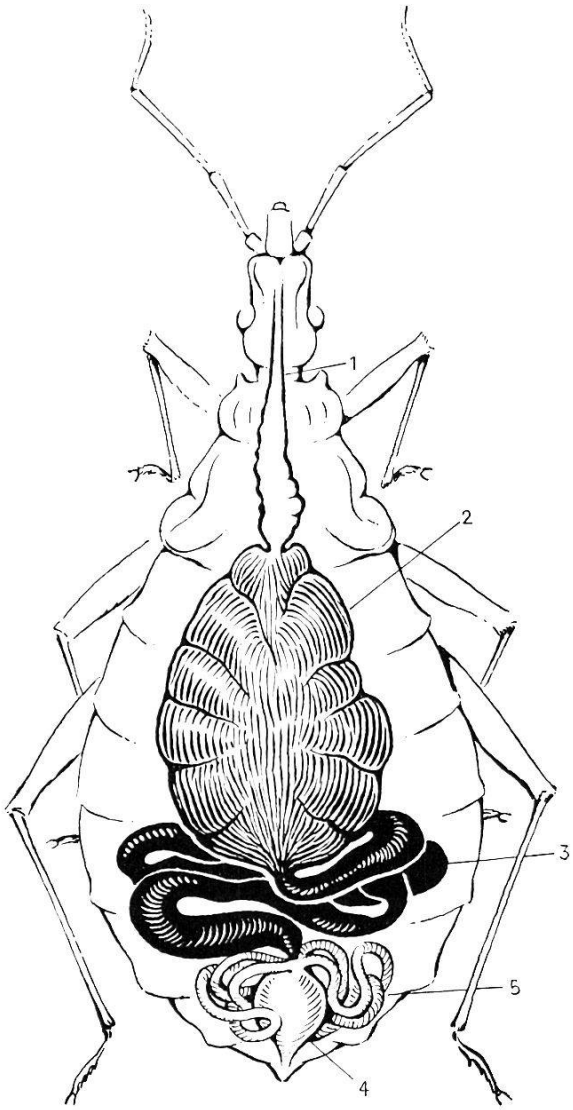


Abb. 3a.

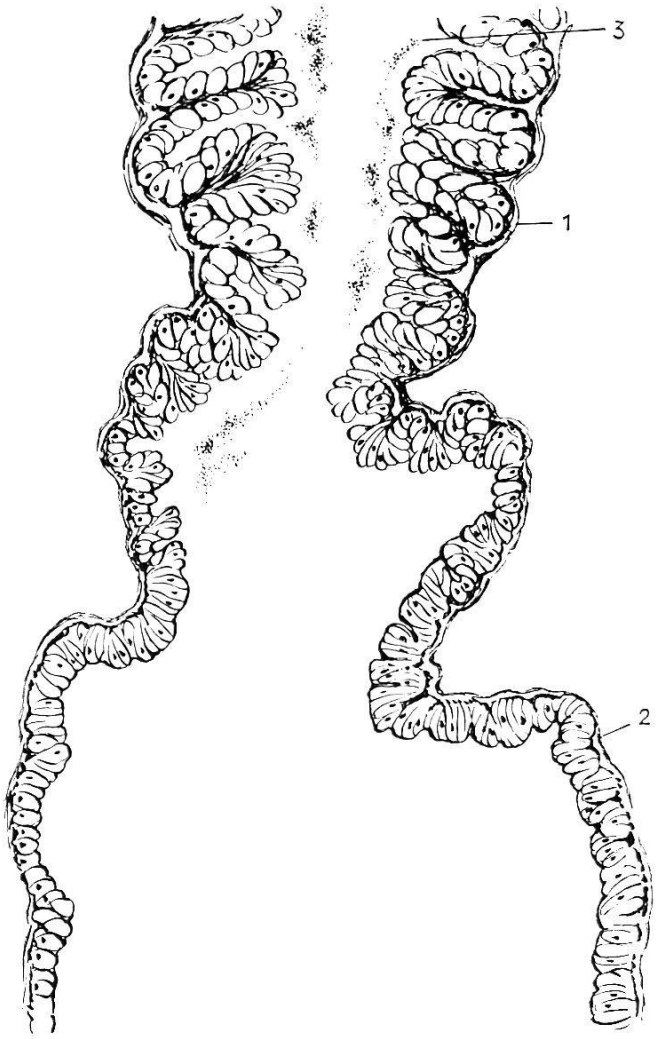


Abb. 3b.

Abb. 3a. Larve, II. Stadium, Verlauf des Darmes, schematisch. 1 = Vorderdarm. 2 = Vorderer Abschnitt des Mitteldarms. 3 = Hinterer Abschnitt des Mitteldarms. 4 = Rectum. 5 = Malpighische Gefäße.

Abb. 3b. Übergang zwischen Vorderdarm und vorderem Abschnitt des Mitteldarms. *Triatoma infestans*, Larve. 1 = Vorderdarm. 2 = Vorderer Abschnitt des Mitteldarms. 3 = Symbionten.

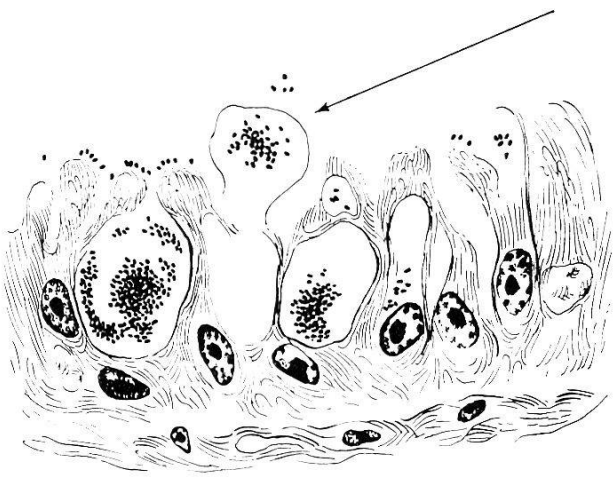


Abb. 4.

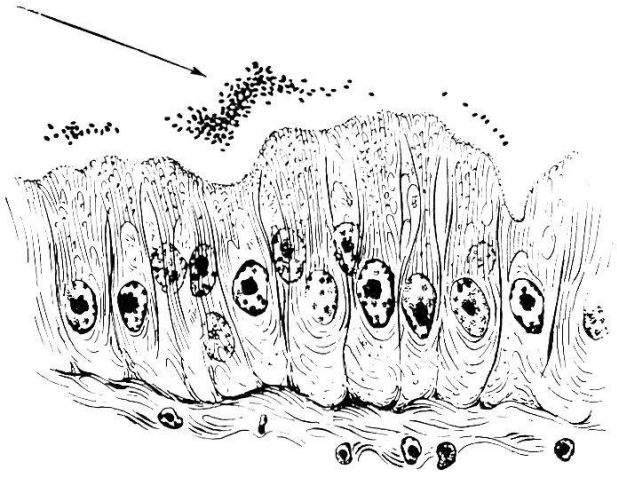


Abb. 5.

Abb. 4. Ausschnitt aus einem Längsschnitt durch den Vorderdarm einer *Triatoma infestans* Klug. (Zucht: Schweiz. Tropeninstitut.)

Abb. 5. Ausschnitt aus einem Längsschnitt durch den Vorderdarm einer *Triatoma infestans* Klug (Zucht: Loma-Linda.)

den Eiern präparierten Embryonen von *Triatoma infestans*. Erst nach der ersten Blutmahlzeit ließen sich die Mikroorganismen im Lumen des vorderen Abschnittes des Mitteldarmes von Triatoma-Larven des 1. Stadiums nachweisen. Von da an fanden sich an dieser Stelle stets Symbionten; ferner wurden sie auch regelmäßig im Kot ausgeschieden.

Nie wurde im reifen Weibchen ein Hilfsapparat gefunden, der die Infektion mit Symbionten im Ovar oder Uterus gewährleisten würde. Damit scheint auch hier eine transovarielle oder uterine Übertragung des in Frage kommenden Mikroorganismus ausgeschlossen. Die Eier von *Triatoma infestans* werden aber bei der Ablage stets mit symbiontenhaltigem Kot beschmiert. Beim Schlüpfen oder später muß also die Larve die für sie lebenswichtigen Symbionten aus diesem Kot aufnehmen.

Die Symbionten fanden sich bei den Triatomen, die wir am Schweizerischen Tropeninstitut schon längere Zeit hielten, immer nur extrazellulär im Lumen des Mitteldarmes, bei einem Stamm aus Kalifornien, den wir noch zusätzlich auf die Lage der Symbionten untersuchten, ebenda, jedoch auch intrazellulär in Vakuolen des Darmepithels (s. Abb. 2—5).

III. Morphologisch-systematische Beurteilung des Symbionten.

Wie im vorhergehenden Kapitel erwähnt, war es sehr leicht, den Symbionten auf einem einfachen Nährboden zu züchten. Gaben wir diesem Nährboden steriles Menschenblut im Verhältnis 4 : 1 zu, so trat schon nach 10—12 Stunden eine α-Haemolyse ein. Wir glaubten deshalb, daß der Symbiont bei der Aufarbeitung des Blutes im Magen der Triatoma eine Rolle spielen könnte, doch wurde diese Annahme auf Grund späterer Untersuchungen nicht bestätigt. Die Triatomen verdauen, auch wenn sie in ihrem Mitteldarm Kokken enthalten, nur einen Teil des aufgenommenen Blutes. Unmittelbar nach jeder Nahrungsaufnahme wird Kot abgegeben, der eine ziemlich große Menge leicht angedauter Blutkörperchen enthält. Diese Verhältnisse sind auch bei symbiontenfreien Wanzen nicht verändert. Es wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen über diesen Punkt ausgeführt.

Zur morphologischen Beurteilung des Symbionten sei folgendes gesagt:

In den Kulturpräparaten konnten Bakterien einzeln oder in Diploformen gesehen werden. Die Bakterien waren grampositiv, sie zeigten ferner eine bipolare Färbbarkeit; eine Kapsel konnte nicht festgestellt werden.

Im folgenden seien einige Stoffwechselreaktionen aufgezählt:

Thermoresistenz bei 60° C	weniger als 30 min
Wachstum in 6,5% NaCl enthaltender Bouillon	+++
Wachstum in alkalischer Bouillon (pH 9,6)	0
Wachstum auf Zitratnährböden (Simmons)	0
Gallelöslichkeit	0
Aesculinfermentation	+++
Glukose- und Mannitfermentation	+++
Arabinose-, Xylose-, Saccharose- u. Inositfermentation	0

Die vorstehenden Stoffwechseluntersuchungen wurden von Herrn Prof. Dr. J. TOMCSIK, Hygienische Anstalt, Basel, ausgeführt. Ihm möchten wir auch hier nochmals für seine wertvollen Angaben danken. Er kam zum Schluß, daß auf Grund der Stoffwechselreaktionen die Zugehörigkeit der Mikroorganismen zur Staphylokokkengruppe ausgeschlossen sei, daß jedoch eine gewisse Ähnlichkeit mit Enterokokken bestehe. Wie wir aus diesem Befund ersehen, ist es außerordentlich schwierig, den Symbionten in das bestehende System einzuordnen.

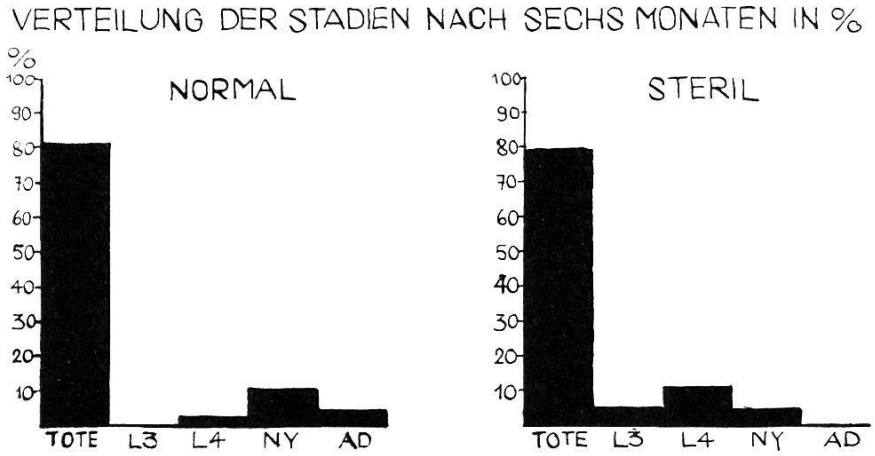
Später sandten wir verschiedene der von uns isolierten Symbiontenstämme zur Begutachtung an Herrn Dr. K. A. BISSET, Dept. of Bacteriology, University of Birmingham, England, dem wir für seine Beobachtungen zu Dank verpflichtet sind. Nachdem er sterile *Rhodnius prolixus* mit unserem Symbionten infiziert hatte, stellte er fest, daß ungefähr 24—48 Stunden nach der Infektion die sporenartigen, kokkoiden Zellen aussprossen und septierte Filamente bildeten. Deshalb klassifizierte er sie als *Nocardia,* welche meist in Kokkenform auftritt. Der Organismus ist der *Nocardia (Actinomyces) rhodnii* auch in seinen cytologischen Eigenschaften sehr ähnlich.

IV. Entwicklung symbiontenfreier Wanzen.

a) *Nach Sterilisation der Eier.*

Wie oben gesagt, wurde zur Sterilisation der Eier eine wäßrige Gentianaviolettlösung gebraucht, weil die sonst zum Desinfizieren benützte Lysollösung (50%) die Eier offenbar schädigt und die Schlüpfrate stark herabsetzt. Bei den mit Gentianaviolett sterilisierten Eiern konnte nie eine erhöhte Sterblichkeit beobachtet werden. Die Schlüpfrate betrug bei den unbehandelten Kontrolltieren 78,79%, bei den sterilisierten 76,23%.

Zur Untersuchung der Wechselbeziehung zwischen Kokken und Wanze ist es nötig, eine große Anzahl steriler Triatomen mit einer ebenfalls großen Kontrollgruppe normaler Tiere zu vergleichen. Wir beobachteten insgesamt 543 mit Kokken normal infizierte und 1483 kokkenfreie *Triatoma infestans.* Es wurden jeweils gleichzeitig abgelegte Eier in einer Versuchsgruppe zusammen-



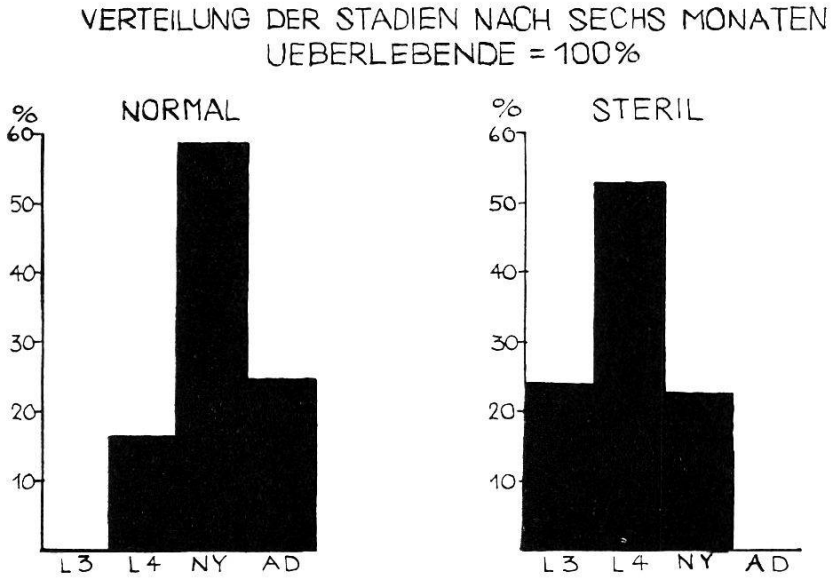


Abb. 6 und *7.*

gefaßt. Dadurch entstanden 8 Gruppen normaler und 8 Gruppen steriler Raubwanzen. Jede Gruppe wurde sechs Monate lang beobachtet und das Wachstum von der ersten Fütterung an kontrolliert.

Da wir mit einer sehr großen Anzahl von Versuchstieren arbeiteten und für alle Tiere die gleichen Bedingungen (Licht, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Futter) schafften, glauben wir, das Ergebnis als gesichert betrachten zu können.

Die anschließenden Tabellen sollen die Versuche erläutern.

(Vgl. auch Abb. 6 und 7.)

Die Mortalität der Wanzen ist erfahrungsgemäß immer sehr hoch. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist sie bei den symbiontenfreien Tieren zum mindesten nicht erhöht. Hingegen scheint die Entwicklung der sterilen Triatomen gegenüber den symbiontenhaltigen beträchtlich verzögert. In diesem Zusammenhang fällt besonders auf, daß wir bei den normalen Tieren keine Larven des

TABELLE 1.

Verteilung der Stadien nach sechs Monaten.

Serie	Zahl der Versuchstiere	gestorben	L 3	L 4	Ny	Ad
Normal						
I	26	10	—	6	10	—
II	52	44	—	—	1	7
III	59	50	—	—	—	9
IV	86	70	—	2	12	2
V	79	63	—	3	13	—
VI	84	73	—	1	6	4
VII	78	66	—	2	9	1
VIII	79	66	—	3	8	2
Total	543	442	—	17	59	25
Steril						
I	10	7	2	1	—	—
II	65	58	2	2	3	—
III	60	56	2	2	—	—
IV	139	119	1	7	12	—
V	217	162	22	16	17	1
VI	384	305	16	42	20	—
VII	306	226	21	49	10	—
VIII	302	242	8	45	7	—
Total	1483	1175	74	164	69	1

3. Stadiums mehr antreffen, während 24% der überlebenden sterilen die Häutung zum 4. Stadium noch nicht durchgemacht haben. Die größte Zahl der normalen Wanzen finden wir im Nymphenstadium (58,5%), von symbiontenfreien dagegen im 4. Larvenstadium (53,3%). Ein namhafter Teil der Kontrolltiere konnte sich zu Imagines häuten (24,7%), bei den sterilen Tieren nur eines (0,3%).

Diese Ergebnisse stimmen mit den von WIGGLESWORTH bei *Rhodnius prolixus* erhaltenen Befunden gut überein. WIGGLESWORTH fand nämlich, daß es sterilen Larven schwerer fällt, das 4. Larvenstadium zu überwinden, als den entsprechenden Normaltieren.

b) *Nach Verfütterung von Antibiotica.*

Nachdem die künstliche Fütterung von *Triatoma infestans* keinerlei Schwierigkeiten bereitete, war es naheliegend, durch Ver-

TABELLE 2.

Verteilung der Stadien nach sechs Monaten in %.

	normal	steril
Zahl der Versuchstiere	100	100
gestorben	81,4	79,2
Larven 3. Stadium (L3)	—	4,99
Larven 4. Stadium (L4)	3,13	11
Nymphen (Ny)	10,9	4,65
Adulte (Ad)	4,61	0,07

TABELLE 3.

Verteilung der Stadien nach sechs Monaten (Überlebende = 100%).

	normal	steril
Larven 3. Stadium	—	24
Larven 4. Stadium	16,4	53,3
Nymphen	58,5	22,4
Adulte	24,7	0,3

Vgl. auch Abb. 6 und 7.

fütterung von Antibiotica eine Beseitigung der Darmsymbionten bei Wanzen verschiedener Stadien zu erreichen.

In Vorversuchen wurde die Wirksamkeit verschiedener Antibiotica (Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin) in vitro ausgetestet.

Der Symbiont wurde in 9 ccm Nährbouillon 24 Stunden bei 26° C kultiviert. Darauf wurde das Antibioticum (5 mg bzw. 1 mg/ccm Nährlösung) zugesetzt und weitere 24 Stunden bebrütet. Hierauf wurde versucht, von diesen Kulturen auf neue zu überimpfen. Von den geprüften Substanzen erwies sich lediglich das Terramycin als wirksam, und zwar schon in einer Konzentration von 1 mg/ccm Nährlösung.

Das Terramycin-Hydrochlorid wurde in Meerschweinchenserum gelöst und mit SOERENSEN-Puffer für pH 7 neutralisisiert, da die sonst stark saure Lösung von den Wanzen nicht aufgenommen wurde. Die Nährflüssigkeit enthielt 10 mg Terramycin/ccm Meerschweinchenserum. Wir gingen bei der Wahl dieser Konzentration von der Überlegung aus, daß die Lösung im Darm der Wanze mit bereits früher aufgenommener Nahrung vermischt und daher verdünnt wird.

Es wurden 20 Larven des 4. Stadiums und 20 Nymphen zur Fütterung bestimmt, von denen sich nach 45 Min. nur je sechs mit

der Terramycinlösung vollgesaugt hatten. Diese Tiere wurden nun sorgfältig weiterbeobachtet und in der Folge alle seziert. Terramycin übte in der verwendeten Konzentration keinen schädigenden Einfluß auf den Stoffwechsel der Triatoma aus. Die 12 Tiere (6 Larven 4 und 6 Nymphen) wurden unmittelbar nach der Fütterung, 3, 8, 12, 15, und 19 Tage nach der Terramycin-Meerschweinchenserum-Mahlzeit seziert und ihre Därme mikroskopisch untersucht. Nach dem 12. Tag wurden in den Proventrikeln keine Symbionten mehr gefunden. Zur Kontrolle wurden auch normale Triatomen seziert, welche durchwegs die üblichen Kokken enthielten.

Die Terramycinmethode eignet sich somit vorzüglich zur Reinigung der Triatomendärme von Mikroorganismen. Ihr großer Vorteil gegenüber der von WIGGLESWORTH entwickelten und von uns zu allen anderen Versuchen verwendeten Methode besteht darin, daß mit ihrer Hilfe Raubwanzen eines beliebigen Stadiums in kurzer Zeit symbiontenfrei gemacht werden können. Bei diesem Verfahren wird jedoch die Körperoberfläche der Wanze nicht sterilisiert, so daß eine Reinfektion leicht möglich ist. Diesem Mangel könnte aber leicht mit einer äußerlichen Desinfektion (z. B. mit Gentianaviolett oder mit Terramycin) abgeholfen werden. Mit diesem Verfahren könnte man andererseits vielleicht zeigen, daß die Symbionten nur in einem bestimmten Zeitabschnitt für die Entwicklung der Wanze unentbehrlich sind.

Sterile Wanzen können auch mit Symbionten reinfiziert werden. Zu diesem Zweck verfütterten wir eine Aufschwemmung des Kultursymbionten an sterile Wanzen, deren histologisch untersuchte Proventrikel einige Tage nach dieser Mahlzeit Symbiontenbefall zeigten. Damit könnte man die bei Symbiontenverlust auftretende Entwicklungshemmung wieder aufheben und eine normale Metamorphose bewirken.

V. *Mikrobiologische Auswertung des Kultursymbionten.*

Wie schon gesagt, ist schon länger bekannt, daß Vitamine des B-Komplexes bei der Entwicklung von Insekten eine entscheidende Rolle spielen können (BRUNNER, GROB, REICHSTEIN und ROSENTHAL 1942—1946, WIGGLESWORTH 1950). Wir untersuchten die Fähigkeit des Symbionten, Vitamine des B-Komplexes sowie Aminosäuren in einer halbsynthetischen Nährlösung zu synthetisieren. Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß nur ein Vitamin, das vom Symbionten in größerer Menge produziert wird, für den Wirtsstoffwechsel von Bedeutung sein kann.

Kulturversuche.

Um die beste halbsynthetische Nährlösung herauszufinden, war es nötig, einige der gebräuchlichsten Medien zu testen. Im Verlaufe dieser Vorversuche stellte sich außerdem heraus, daß man zur Beimpfung am besten zwei bis drei Tage alte Kulturen von Symbionten verwendet. Als günstigstes Medium erwies sich folgende Lösung:

$(NH_4)_2SO_4$	3 g	DL-Asparaginsäure	400 mg
Na-Acetat	6 g	Glycocoll	100 mg
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,2 g	L-Cystin	100 mg
NaCl	0,01 g	L-Glutaminsäure	1000 mg
$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,01 g	L-Histidin	100 mg
$MnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,01 g	L-Hydroxyprolin	100 mg
KH_2PO_4	1 g	DL-Isoleucin	100 mg
K_2HPO_4	1 g	L-Leucin	100 mg
Glukose	60 g	L-Lysin	100 mg
Adenin	0,01 g	DL-Methionin	100 mg
Guanin	0,01 g	DL-Norleucin	100 mg
Xanthin	0,01 g	DL-Norvalin	100 mg
Uracil	0,01 g	DL-Phenylalanin	100 mg
p-Aminobenzoesäure	300 γ	L-Prolin	50 mg
Biotin	25 γ	DL-Serin	200 mg
Pantothensäure	500 γ	DL-Threonin	200 mg
Nikotinsäureamid	500 γ	L-Tryptophan	100 mg
Pyridoxin	300 γ	L-Tyrosin	50 mg
Lactoflavin	500 γ	DL-Valin	200 mg
Aneurin	100 γ	Inosit	2500 γ
Folsäure	15 γ	B_{12}	100 γ
Pyridoxamin	250 γ	Salzsaures Caseinhydrolysat	
Cholinchlorid	2500 γ	10 ccm, 10% (dreimal bei	
DL-Alanin	200 mg	verschiedenem pH mit Kohle	
L-Arginin	100 mg	behandelt)	

ad 1000 ccm aq. dest.

pH mit NaOH auf 8.0 einstellen, nach dem Sterilisieren sinkt das pH auf 7,3—7,5.

Erst nach mehreren Passagen zeigte sich auf diesem Nährboden ein rasches und dichtes Wachstum.

Qualitative Vitamin-Bestimmungen:

Vorerst wurde das Vitaminbedürfnis des Symbionten nur qualitativ untersucht; zu diesem Zweck wurden die Vitamine des B-Komplexes sowie Cholinchlorid und Strepogenin aus der Nährlösung weggelassen. In gleichzeitigen Kontrollkulturen waren alle Vitamine anwesend. Geimpft wurde mit einer dreimal in Kochsalz gewaschenen Bakteriensuspension. Nach ein bis zwei Tagen Be-

brütung bei 37° C konnte das Wachstum turbidimetrisch gemessen werden. Dabei zeigte sich, daß folgende Vitamine vom Symbionten

essentiell benötigt werden:	folgende dagegen nicht benötigt werden:
Lactoflavin	Folsäure
Nicotinsäure	Aneurin
Pantothensäure	p-Aminobenzoesäure
Biotin	Inosit
Pyridoxin	Cholinchlorid
	B_{12}
	Strepogenin

TABELLE 4.

Drei zu verschiedener Zeit isolierte Symbiontenstämme zeigten die gleichen Resultate. Als Stoffwechselprodukte, die der Symbiont der Triatoma zur Verfügung stellen kann, kommen die vom Mikroorganismus selbst benötigten nicht in Frage.

Qualitative Vitamin-Bestimmungen:

Als weiterer Schritt sollte eine quantitative Untersuchung uns nun über die Menge der synthetisierten Vitamine Aufschluß geben. Als Insektenwuchsstoffe kommen hauptsächlich Aneurin, Folsäure, B_{12} und Strepogenin in Frage. Vorerst wurden die Mengenbestimmungen ebenfalls in der oben beschriebenen halbsynthetischen Nährlösung ausgeführt, da sie in dieser am leichtesten durchführbar sind. Dabei ist jedoch anzunehmen, daß im natürlichen Milieu des blutgefüllten Wanzendarmes die Verhältnisse etwas anders liegen können.

Nach mehreren Passagen und Angewöhnung im neuen Nährmilieu wurde der Symbiont in Abwesenheit des zu untersuchenden Vitamins bei 37° C gezüchtet. Es wurde jeweils mit einer zweimal gewaschenen Mikroorganismensuspension geimpft. Nach Abschluß der Entwicklung (3—6 Tage) wurden die Kokken durch Aufkochen abgetötet und der Vitamingehalt der Kulturlösung nach dem Zentrifugieren geprüft. Es wurde eine Verdünnungsreihe dieser Lösung hergestellt und mit einem Testorganismus gleichzeitig mit einer Testserie, die bekannte Vitaminmengen enthielt, beimpft.

Anschließend seien die verwendeten Testorganismen und Testsubstanzen tabellarisch zusammengefaßt.

Die quantitative Untersuchung ergab, daß als einziges der synthetisierten Vitamine vom Symbionten Folsäure im Überschuß produziert wurde.

Die Überproduktion kann ungefähr 70mal den Vitaminbedarf eines für Folsäure heterotrophen Testorganismus decken. Wir ver-

suchten nun, die Synthesefähigkeit des Symbionten durch Zugabe von Menschenblut, d. h. durch eine möglichst genaue Anpassung an die natürlichen Bedingungen im Wanzendarm, zu steigern.

TABELLE 5.

Nachzuweisendes Vitamin	Testsubstanz	Testorganismus
Folsäure	reine Folsäure «Lederle»	*Streptococcus faecalis*
Aneurin	Aneurin «Roche»	*Phycomyces Blakesleanus*
B_{12}	B_{12} krist.	*Lactobacillus Leichmanni*
Strepogenin	Strepogeninpräparat aus Pankreatin	*Lactobacillus helveticus*

Für die folgenden Untersuchungen wurde steriles Menschenblut (Blutspendezentrum, Bürgerspital Basel), das entweder durch Defibrinieren oder durch Zusatz von Natriumcitrat (0,7%) flüssig gehalten wurde, verwendet. Das Blut wurde der früher beschriebenen Nährlösung in einer Konzentration von 20% steril zugegeben und die mit Symbionten beimpften Kulturen 4—6 Tage bei 36° C bebrütet. Schon nach 36—48 Stunden zeigte sich bei den geimpften Kulturen eine deutliche Verfärbung, und die über den abgesetzten Erythrocyten stehende Flüssigkeit war getrübt. Später verfärbten sich die Kulturen unter Einfluß der Haemolyse dunkelbraun. Die Grenze zwischen den Erythrocyten und der überstehenden Flüssigkeit verschwand ganz. Bei den ungeimpften Kontrollen blieb die überstehende Flüssigkeit klar, die Erythrocyten verfärbten sich nicht, und die Grenze war scharf.

Die zur quantitativen Bestimmung der synthetisierten Vitaminmenge geeignetste Methode mußte für das neue Milieu herausgefunden werden. Einerseits untersuchten wir die Flüssigkeit direkt, andererseits wurden die Kulturen erst 10 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt und die überstehende Flüssigkeit zur Bestimmung des Vitamingehaltes weiter verwendet.

Beispielsweise fanden wir bei einer Folsäurebestimmung in dieser Nährlösung (mit 20% defibriniertem Blut):

TABELLE 6.
Folsäuregehalt pro ccm Nährlösung.

	ungeimpft	geimpft
Nährlösung	< 1 mγ	20 mγ
Nährlösung nach Erhitzen und Zentrifugation	< 1 mγ	16 mγ

Die Unterschiede der Resultate sind so gering, daß wir uns für die zweite Arbeitsweise entschlossen, da mit ihrer Hilfe beim

Sterilisieren der Prüfserien auftretende, störende Trübungen wegfallen.

Da der Symbiont das Blut offensichtlich bis zu einem gewissen Grade abbaut, mußte auch darauf geachtet werden, daß durch diesen Aufschluß eine Synthese nicht lediglich vorgetäuscht würde. Zu diesem Zweck wurden später sowohl die mit Symbionten beimpften als auch die Kontrollkulturen mit Papain bzw. Trypsin nach den hierfür üblichen Methoden abgebaut. Nachher wurde 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt (Eiweißfällung), zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ihren Vitamingehalt geprüft. Die höchsten Resultate wurden für die Auswertung der Versuchsergebnisse als maßgebend erachtet.

Ganz allgemein stellte sich bei diesen Versuchen heraus, daß von allen noch speziell untersuchten Vitaminen (Folsäure, Aneurin, B_{12} und Strepogenin) lediglich Folsäure in namhaftem Überschuß produziert wird.

TABELLE 7.

Resultate der Untersuchungen über die Folsäuresynthese.
(Folsäure in mγ pro ccm.)

	defibriniertes Blut	Citrat-Blut
Nährlösung (Kontrolle)	1	1
Nährlösung mit Trypsin abgebaut	1	1
Nährlösung mit Papain abgebaut	1	1
Nährlösung mit Symbiont	6	16
Nährlösung mit Symbiont mit Trypsin abgebaut	10	40
Nährlösung mit Symbiont mit Papain abgebaut	37	50

Dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß unsere Blutmuster nur wenig Folsäure enthielten, so daß diese kleine Menge vernachlässigt werden kann. Die höchsten Folsäurewerte erhielt man nach Abbau mit Papain, auch wurde bei Zusatz von Citratblut mehr Folsäure synthetisiert als mit defibriniertem Blut.

Da der Eigenbedarf des Symbionten an Folsäure durch ungefähr 0,1 mγ/ccm gedeckt wird (= Bedarf eines für Folsäure heterotrophen Mikroorganismus), übersteigt die Produktion diese Menge ca. 500mal. Im reinen Blutmilieu des Reduviidendarmes dürfte die Folsäure in noch größeren Mengen synthetisiert werden.

Dem normal mit Symbionten infizierten Wirtstier wird demnach hauptsächlich Folsäure zur Verfügung gestellt, die dem künstlich symbiontenfrei gemachten Tier fehlen muß. Im folgenden Kapitel sollen die von uns ausgeführten Versuche mit Verfüt-

terung einer Folsäure-Meerschweinchenserum-Diät an normale und sterile Wanzen geschildert werden.

VI. Versuche mit künstlicher Verfütterung von Folsäure.

Nach den vorstehenden in vitro Versuchen begannen wir mit der Verfütterung von Folsäure an normale und sterile Wanzen. Wir verfütterten steriles Meerschweinchenserum, das, den mikrobiologischen Untersuchungen zufolge, selbst keine Folsäure enthält, und fügten ihm 1 γ Folsäure/ccm zu. Die Folsäuredosis hielten wir absichtlich so hoch, um sicher zu sein, daß die Triatomen eine genügend große Menge des Vitamins aufnehmen können. Zur Kontrolle fütterten wir aus sterilen Eiern aufgezogene und normale Triatomen mit unvitaminisiertem, sterilem Meerschweinchenserum. Die Tiere wurden alle vierzehn Tage gefüttert, vor und nach der Fütterung gewogen und sieben Monate lang beobachtet. Zur Erläuterung der Versuchsergebnisse seien hier die folgenden Tabellen eingefügt.

TABELLE 8.

Fütterung mit	Zustand	Anzahl	geschlüpft in %	Durchschnittsgewicht in mg. Versuchsbeginn Vor Fütterung	Versuchsbeginn Nach Fütterung	nach 7 Monaten Vor Fütterung	nach 7 Monaten Nach Fütterung
Larvenstadium 3.							
Serum	normal	10	50	11,6	24	18,5	48,5
	steril	10	30	10,1	13,5	20,6	48,7
Serum mit Folsäure	normal	10	20	9,5	17,3	14,3	37
	steril	10	—	9,3	16,2	11,3	40,5
Larvenstadium 4.							
Serum	normal	15	20	21,3	39,6	57	114,8
	steril	8	37	40	59,7	70	88
Serum mit Folsäure	normal	15	13,2	24,2	28,1	40,6	88,6
	steril	8	12	31,6	36,1	47	47
Nymphenstadium.							
Serum	normal	15	6,7	83,3	118	113	234
	steril	18	16,7	102,4	160,4	112,3	312,3
Serum mit Folsäure	normal	15	6,7	74,1	80,5	86	150,4
	steril	16	12,5	93,2	99,2	62	101,4

In der anschließenden Tabelle ist die Gewichtszunahme der einzelnen Gruppen zur Veranschaulichung der Ergebnisse noch gesondert zusammengefaßt.

TABELLE 9.

Gewichtszunahme nach sieben Monaten.

Stadium und Zustand	Gewichtszunahme nach sieben Monaten in mg.	
	Vor Fütterung	Nach Fütterung
Fütterung mit sterilem Meerschweinchenserum		
Larvenstadium 3, normal	6,9	24,5
Larvenstadium 3, steril	10,5	35,2
Larvenstadium 4, normal	35,7	93,5
Larvenstadium 4, steril	30	28,3
Nymphen, normal	29,7	116
Nymphen, steril	9,9	151,9
Fütterung mit Meerschweinchenserum + 1 γ Folsäure/ccm		
Larvenstadium 3, normal	4,8	19,7
Larvenstadium 3, steril	2	24,3
Larvenstadium 4, normal	16,4	60,5
Larvenstadium 4, steril	15,4	10,9
Nymphen, normal	11,9	69,9
Nymphen, steril	11,2	2,2

Wie diesen Tabellen zu entnehmen ist, hemmt die Folsäure in der von uns verwendeten Konzentration nicht nur das Wachstum, sondern auch die Gewichtszunahme. Dies läßt sich nur damit erklären, daß ein Vitamin oder Hormon in zu hoher Dosis eine hemmende Wirkung ausübt. Die Wanzen des 4. Larvenstadiums werden durch das Fehlen der Symbionten besonders in ihrer Entwicklung gehemmt. So haben die normalen Larven 4 nach sieben Monaten vor der letzten Fütterung immerhin 35,7 mg, nach der Fütterung 93,5 mg gegenüber ihrem Anfangsgewicht vor bzw. nach der ersten Fütterung zugenommen. Die sterilen Larven nahmen nur 30 bzw. 28,3 mg zu.

Ganz allgemein haben die sterilen Larven weniger zugenommen als die normal mit Symbionten infizierten. Eine Ausnahme bildet lediglich das 3. Larvenstadium, das mit sterilem Meerschweinchenserum gefüttert wurde. Dies ist insofern nicht überraschend, als uns schon früher bekannt war, daß die Larven 3 weniger empfindlich auf den Symbiontenverlust reagieren als die späteren Stadien. Am stärksten werden Nymphen, und zwar mit

und ohne Symbionten gleicherweise, durch die Zugabe von Folsäure in Überdosen in ihrem normalen Wachstum gestört.

Wir versuchten nun, durch andere Dosierungen die wachstumsfördernde Wirkung der Folsäure nachzuweisen. Zu diesen Versuchen standen uns lediglich Larven des 3. Stadiums zur Verfügung. Die anschließende Tabelle faßt die Ergebnisse dieser Versuche zusammen.

TABELLE 10.

Larvenstadium 3 nach sechsmonatiger Fütterung mit Folsäure.

Fütterung mit	Zustand	Anzahl	geschlüpft in %	Durchschnittsgewicht in mg. Versuchsbeginn Vor Fütterung	Versuchsbeginn Nach Fütterung	nach 6 Monaten Vor Fütterung	nach 6 Monaten Nach Fütterung
Serum	normal	15	46,5	10	16	24	60
	steril	9	44,5	7,6	24,4	24	47
Serum + 0,01 γ Folsäure	steril	10	60	6,9	17,5	21	57,4
Serum + 0,01 γ Folsäure	steril	9	44,5	8,1	18,5	24	70,6

TABELLE 11.

Gewichtszunahme der Larven 3 nach sechs Monaten.

Fütterung mit	Zustand	Gewichtszunahme nach 6 Monaten Vor Fütterung	nach Fütterung
Serum	normal	14	44
	steril	16,4	22,6
Serum + 0,01 γ Folsäure	steril	14,1	39,9
Serum + 0,01 γ Folsäure	steril	15,9	52,1

Bei einer Diät von 0,01 γ Folsäure/ccm Serum schlüpfen auffallend viele sterile Larven (60%). Durch die Verfütterung von 0,1 γ Folsäure/ccm wurde das Schlüpfen nicht stimuliert, doch war die Gewichtszunahme sehr hoch (52,1 mg). Die normalen, nur mit Serum gefütterten Larven nahmen nur 44 mg, die entsprechenden sterilen Tiere am wenigsten, nämlich nur 22,6 mg zu. Die mit 0,01 γ Folsäure genährten sterilen Wanzen nahmen 39,9 mg zu. Die wachstumsfördernde Wirkung der Folsäure zeigte sich bei diesen letzten Versuchen klar. Damit scheint der Beweis erbracht zu sein, daß tatsächlich Folsäure das entscheidende, vom Symbionten dem Wirt zur Verfügung gestellte Stoffwechselprodukt

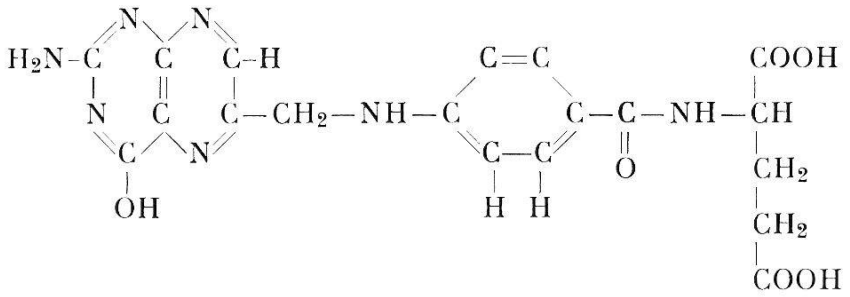
ist. Ohne dieses scheint eine völlig normale Entwicklung nicht möglich zu sein.

Wir vermuten, daß die Ergebnisse klarer wären, wenn statt der einseitigen Meerschweinchenserum-Diät abwechslungsweise künstlich und auf dem Kleinsäuger gefüttert würde. Der Nachteil einer solchen Versuchsanordnung liegt darin, daß die aufgenommenen Vitaminmengen nicht genau nachgeprüft werden können. Hingegen könnte man nach dem von DE MEILLON und anderen (1947) ausgearbeiteten Verfahren versuchen, ein Meerschweinchen so zu ernähren, daß man den Folsäuregehalt seines Blutes genau kennt, und auf ihm dann Triatomen füttern.

VII. Verfütterung von Aminopterin.

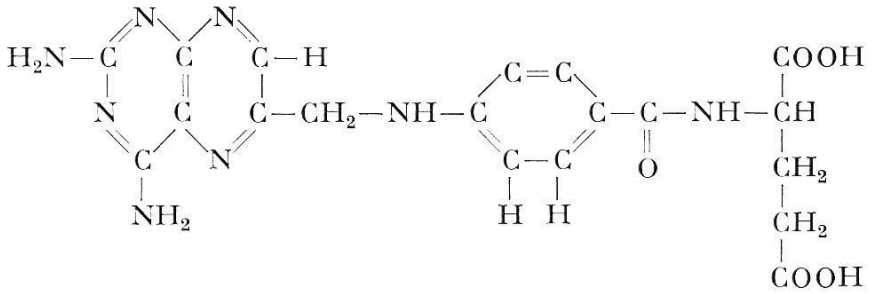
Wie uns aus der Literatur (PIPER 1953, WAISMANN 1952, FRANKLIN 1948) bekannt war, übt Aminopterin auf Folsäure eine Hemmwirkung aus. Wird Aminopterin im Überschuß verfüttert, so wird das Aminopterin-Molekül statt des Folsäure-Moleküls eingebaut, und der Folsäurestoffwechsel ist in seinem Ablauf gestört.

Folsäure:



Das Aminopterin (9,10-Dimethylaminopterin) wurde uns von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt.

Aminopterin:



Mit der Verfütterung von Aminopterin (der Einfachheit halber wird in der Folge das 9,10-Dimethylaminopterin von uns als Aminopterin bezeichnet) muß man sehr vorsichtig sein, da diese

Substanz auf viele Organismen toxische Nebenwirkungen ausübt. Sie wird dieser Wirkung wegen hauptsächlich in den Vereinigten Staaten in der Krebsforschung näher untersucht.

Wir verfütterten verschiedene Dosen Aminopterin an normale Triatomen des 3. bzw. 4. Larvenstadiums, und zwar 0,1 γ, 1 γ und 10 γ Aminopterin/ccm Meerschweinchenserum.

Die Versuchsergebnisse finden sich hier tabellarisch zusammengefaßt.

Bei allen Tieren, die mit Aminopterin gefüttert wurden, konnte eine Verminderung der Schlüpffähigkeit festgestellt werden. Be-

Wirkung des Aminopterins nach fünf Monaten Fütterung.

Fütterung mit	Anzahl	geschlüpft in %	Durchschnittsgewicht in mg. Versuchsbeginn Vor Fütterung	Versuchsbeginn Nach Fütterung	nach 5 Monaten Vor Fütterung	nach 5 Monaten Nach Fütterung
Larvenstadium 3.						
Serum	15	46,6	10	16	24	58
Serum + 0,1 γ Aminopterin	15	40	9,5	16,9	26	45
Serum + 1 γ Aminopterin	15	20	11,7	14,7	18,6	37,7
Serum + 10 γ Aminopterin	15	40	10,2	21,1	17,1	36,1
Larvenstadium 4.						
Serum	8	40	23,6	26	51	133
Serum + 0,1 γ Aminopterin	8	12,5	25,9	32	52	92
Serum + 1 γ Aminopterin	8	12,5	27	33,8	38,5	84
Serum + 10 γ Aminopterin	8	12,5	24,5	44,1	45,1	84

Gewichtszunahme nach fünfmonatiger Fütterung mit Aminopterin.

Fütterung mit	Stadium	Gewichtszunahme in mg. Vor Fütterung	Nach 5 Monaten
Serum	Larven 3	14	42
Serum + 0,1 γ Aminopterin	Larven 3	18,5	28,1
Serum + 1 γ Aminopterin	Larven 3	6,9	23
Serum + 10 γ Aminopterin	Larven 3	7,1	15
Serum	Larven 4	27,4	107
Serum + 0,1 γ Aminopterin	Larven 4	26,1	60
Serum + 1 γ Aminopterin	Larven 4	11,5	50,2
Serum + 10 γ Aminopterin	Larven 4	20,6	39,9

sonders stark von der Folsäure-Hemmung betroffen werden die Larven des 4. Stadiums. Bei keiner der verfütterten Aminopterin-Dosen erreichten die Triatomen auch nur annähernd die gleichen Häutungszahlen wie die bei der üblichen Meerschweinchenserum-Diät gehaltenen Tiere. Aminopterin scheint schon in der kleinsten von uns angewandten Konzentration (0,1 γ Aminopterin/ccm Meerschweinchenserum) wirksam zu sein, doch wirkt sich eine Dosis von 1 γ am ungünstigsten aus. Das Aminopterin war in keiner Dosierung tödlich, sondern es hemmte lediglich die Entwicklung. Zu den beiden letzten Tabellen ist zu bemerken, daß bei steigender Aminopteringabe die Gewichtszunahme kleiner wird. Die Wanze ist auch nicht mehr fähig, die gleichen Nahrungsmengen aufzunehmen wie ohne Aminopterin. Ganz allgemein scheinen die Larven des 4. Stadiums von der Folsäure-Hemmwirkung besonders stark betroffen zu sein. Dies stimmt mit den früher von uns beschriebenen Versuchsergebnissen gut überein.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen zeigen erneut die Unentbehrlichkeit der Folsäure im Stoffwechsel von *Triatoma infestans*.

Nachwort.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erschien noch eine Publikation von A. J. P. GOODCHILD, der ebenfalls zum Schluß kommt, daß die in Triatomen gefundenen Mikroorganismen wesentlich verschieden sind von denen, die in *Rhodnius prolixus* vorkommen. Der diphtheroide Organismus soll dem *Corynebacterium hofmannii* sehr ähnlich sein.

Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von BEWIG und SCHWARTZ, die in *Triatoma infestans* Klug zwei Mikroorganismen gefunden haben, und zwar einen mit *Actinomyces rhodnii* identischen und einen Begleitcoccus. Vielleicht haben die beiden Autoren ihre Stämme von *Rhodnius prolixus* und *Triatoma infestans* so nebeneinander gehalten, daß eine Mischinfektion möglich war, sonst ließe sich diese kaum erklären, denn sie steht im Gegensatz zu allen bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet. Unsere bisherigen Ergebnisse über die Vitaminsynthese des von uns isolierten Symbionten wurden ferner von den vorgenannten Autoren angezweifelt, da in unseren Vorpublikationen keine Einzelheiten darüber zu finden waren; in der vorliegenden Arbeit finden sich nun alle nötigen Angaben.

Literatur.

BEWIG, F. & SCHWARTZ. (1956). Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. VII. Über die Physiologie der Symbiose bei einigen blutsaugenden Insekten. — Arch. f. Mikrobiologie *24,* 174-208.

BLEWETT, M. & FRAENKEL, G. (1942). Biotin, B_1, Riboflavin, Nicotinic Acid, B_6 and Pantothenic Acid as Growth Factors for Insects. — Nature, *150,* 177.

BRECHER, G. & WIGGLESWORTH, V. B. (1944). The Transmission of *Actinomyces rhodnii* ERIKSON in *Rhodnius prolixus* . . . — Parasitology, *35,* 220-224.

BUCHNER, P. (1939). Symbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. — Berlin: Sammlung Göschen *1128.*

— (1951). Historische Probleme der Endosymbiose bei Insekten. Amsterdam.

Abb. 8. Kultursymbionten.

BUCHNER, P. (1953). Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. — Basel/Stuttgart.

CARAYON, J. (1952). Les mécanismes de transmission héréditaire des endosymbiontes chez les insectes. — Tijdschr. Entomol., *95*, 114-142.

DE MEILLON, B., THORP, J. M. & HARDY, F. (1947). The Relationship between Ectoparasite and Host. 1: The Development of *Cimex lectularius* and *Ornithodorus moubata* on Riboflavin Deficient Rats. — South Afr. J. Med. Sci., *12*, 111-116.

DIAS, E. (1937). Sobre a presença de symbiontes em hemipteros hematophagos. — Mem. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro, *32*, 165-167.

FAIRBROTHER, R. W. (1950). A Textbook of Bacteriology. — London: Heinemann.

FRANKLIN, A. L., STOKSTAD, E. L. R. & JUKES, T. H. (1948). Observations on the Effect of 4-amino-pteroyl-glutamic acid on Mice. — Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., *67*, 398-400.

GEIGY, R., HALFF, L. A. & KOCHER, V. (1953). Untersuchungen über die physiologischen Beziehungen zwischen einem Überträger der Chagaskrankheit *Triatoma infestans* und dessen Darmsymbionten. — Schweiz. Med. Wschr., *83*, 928-937.

— (1954). L'acide folique comme élément important dans la symbiose intestinale de *Triatoma infestans*. — Acta Tropica, *11*, 163-166.

GEIGY, R. & KRAUS, C. (1952). Rüssel und Stechakt von *Rhodnius prolixus*. — Acta Tropica, *9*, 272-276.

GOODCHILD, A. J. P. (1955). The bacteria associated with *Triatoma infestans* and some other species of Reduviidae. — Parasitology *45*, 441-448.

GROB, C. A. & BRUNNER, TH. (1946). Der Vitaminbedarf des amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum* DUVAL. — Experientia, *2*, Fasc. 11.

HASE, A. (1932). Beobachtungen an venezolanischen Triatoma-Arten sowie zur allgemeinen Kenntnis der Familie der Triatomidae. — Zschr. Parasitenk., *4*, 585-652.

KOCH, A., OFFHAUS, K., SCHWARZ, I. & BANDIER, J. (1951). Symbioseforschung und Medizin. Ein Beitrag zur Klärung des Wirkungsmechanismus des Vitamin B-Komplexes, nebst einer kritischen Betrachtung zum «Vitamin T-Problem». — Naturwissenschaften, *38*, 339-345.

KOCH, A. (1951). Biologische und medizinische Probleme der Stoffwechselphysiologie symbiontischer Mikroorganismen. — Münch. Med. Wschr., *93*, No. 13.

— (1952). Über die Physiologie intrazellulärer Symbionten. — Zbl. Bakteriol., *158*, 363-366.

— (1933). Über das Verhalten symbiontenfreier Sitodrepa-Larven. — Biol. Zbl. *53*.

LWOFF, M. & NICOLLE, P. (1944). Alimentation artificielle de *Triatoma infestans* à l'aide de sérum vitaminé. — C. R. Soc. Biol., *138*, 205-206.

— (1945). Nécessité de l'hématine pour la nutrition de *Triatoma infestans* KLUG. — C. R. Soc. Biol., *139*, 879-881.

MUSGRAVE, A. J. & MILLER, J. J. (1951). A Note on some Preliminary Observations on the Effect of the Antibiotic Terramycin on Insect Symbiotic Micro-Organisms. — Canad. Ent., *83*, 343-345.

NICOLLE, P. & LWOFF, M. (1944). L'acide pantothénique dans la nutrition de l'hémiptère hématophage *Triatoma infestans* KLUG. — C. R. Soc. Biol., *138*, 341.

— (1947). A propos de l'action protérogène de l'amide nicotinique sur l'exuvation de *Triatoma infestans* KLUG. — C. R. Acad. Sc., *225*, 147.

— (1942). Recherches sur la Nutrition des Réduvidés hématophages. I. Développement des stades larvaires de *Triatoma infestans* KLUG dans les conditions habituelles d'élevage. — Bull. Soc. Path. exot., *35*, 219-232.

— (1943). II. Besoins alimentaires des adultes de *Triatoma infestans* KLUG dans les conditions habituelles d'élevage. Fécondité des femelles. — Bull. Soc. Path. exot., *36*, 110-124.

— (1943). III. Alimentation artificielle de *Triatoma infestans* KLUG au moyen de sang défibriné, hémolysé. — Bull. Soc. Path. exot., *36*, 154-167.

— (1944). IV. Alimentation de *Triatoma infestans* KLUG à l'aide de sérum de cheval. Action du glucose. — Bull. Soc. Path. exot., *37*, 38-51.

— (1946). V. Alimentation de *Triatoma infestans* KLUG à l'aide de sérum vitaminé. Importance de l'acide pantothénique. — Bull. Soc. Path. exot., *39*, 206-221.

— (1947). VI. Nécessité de l'hématine pour *Triatoma infestans* KLUG. — Bull. Soc. Path. exot., *40*, 467-479.

OLESON, J. J., HUTCHINGS, B. L. & SUBBAROW, Y. (1948). Studies on the Inhibitory Nature of 4-Aminopteroylglutamic-Acid. — J. Biol. Chem., *175*, 359.

ØRSKOV, J. (1923). Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. — Diss. Kopenhagen.

PIPER, D. L. (1953). Folic Acid as an Essential Nutritient. — Calco Technical Bulletin 733, New Jersey.

REGNA, P. (1952). Chemistry of Terramycin. — Bull. Org. Mond. Santé, *6*, 123-129.

ROSENKRANZ, W. (1940). Symbiose der Pentatomiden. — Zschr. Morph. & Ökol. der Tiere, *36*.

ROSENTHAL, H. & REICHSTEIN, T. (1942). Vitamin Requirement of the American Flour beetle *Tribolium confusum* DUVAL. — Nature, *150*, 546.

— (1945). Der Vitaminbedarf des amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum* DUVAL. — Zschr. Vitaminforschung, *15*, 341-367.

ROSENTHAL, H. & GROB, C. A. (1946). Über den Vitaminbedarf des amerikanischen Reismehlkäfers *Tribolium confusum* DUVAL. — Zschr. Vitaminforschung, *17*, 27-35.

SCHNEIDER, G. (1940). Beiträge zur Kenntnis der symbiontischen Einrichtungen der Heteropteren. — Zschr. Morph. & Ökol. der Tiere, *36*.

SCHWARTZ, W. & BEWIG, F. (1954). Untersuchung der Symbiose der Triatomiden *Rhodnius prolixus* STÅL und *Triatoma infestans* KLUG. — Naturwissenschaften, *41*, 435.

SKIPPER, H. J., MITCHELL, J. H. & BENNETT, L. L. (1950). Inhibition of Nucleic Acid Synthesis by Folic Acid Antagonists. — Cancer Research, *10*, 510.

WAISMAN, H. H., CRAVIOTO-MUNOZ, J., GREEN, M. & RICHMOND, J. B. (1952). Citrovorum Factor and Aureomycin in Experimental Folic-Acid Deficiencies. — A. M. A. Am. J. Dis. Child.

WEITZ, B. & BUXTON, P. A. (1953). The Rate of Digestion of Blood Meals of Various Haematophagous Arthropods as Determined by the Precipitin Test. — Bull. Ent. Res., *44*, 445-450.

WEURMAN, C. (1947). Investigations Concerning the Symbiosis of Bacteria in *Triatoma infestans* KLUG. — Acta Leidensia, *18*, 307-319.

WEYER, F. (1951). Über die in vitro Wirkung von Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin auf Rickettsien nach Versuchen in der Kleiderlaus. — Zschr. Tropenmed., *3*, 215-230.

WIGGLESWORTH, V. B. (1936). Symbiotic Bacteria in a Blood-Sucking Insect *Rhodnius prolixus*. — Parasitology, *28*, 284-289.

— (1943). The Fate of Haemoglobin in *Rhodnius prolixus* and other Blood-Sucking Arthropods. — Proc. Roy. Soc. Series B *131*, 313-339.

— (1950). The Principles of Insect Physiology. — London: Methuen.

— (1952). Symbiosis in Blood-Sucking Insects. — Tijdschr. Entomol. *95*, 63-68.

Résumé.

L'existence d'un microorganisme dans la partie apicale de l'intestin moyen de la punaise *Triatoma infestans* Klug est déjà connue depuis assez longtemps. On connaît également sa forme, mais jusqu'à présent on n'a pas encore fait de recherches concernant son assimilation et son influence sur le développement normal de la punaise.

Les recherches que nous avons entreprises ont été faites avec une souche de *Triatoma infestans* élevée depuis plusieurs années à l'Institut Tropical Suisse. Les punaises ont été tenues à une température de 26° C. et dans une humidité relative de 65 %. Elles ont été nourries régulièrement sur des cobayes ou au moyen de sérum de cobaye stérile avec addition de vitamines.

Les souches de symbiotes que nous avons utilisées pour la détermination de leur métabolisme ont été isolées de l'intestin moyen de Triatomes adultes et ont été cultivées sur de l'agar nutritif additionné de glucose. Les souches hémolysaient le médium additionné de sang humain après 10 à 12 heures. Il était difficile de classifier le microorganisme. Jusqu'à présent, la classification du symbiote de *Triatoma infestans* Klug n'est pas encore définitivement achevée. Il s'agit sûrement d'une *Nocardia*, mais il n'est pas certain qu'elle doive être systématiquement séparée de la *Nocardia (Actinomyces) rhodnii*.

Pour éclairer l'influence du symbiote sur son hôte, nous avons élevé et observé pendant six mois un grand nombre de punaises stériles et un groupe normal dans les mêmes conditions (nutrition, humidité, température). Le développement des punaises stériles était considérablement retardé et seul 0,3 % des insectes ont atteint l'état adulte. Il leur était avant tout difficile de surmonter le quatrième stade larvaire. Peut-être ce phénomène est-il en rapport avec la formation de l'appareil sexuel. Ces résultats confirment ceux obtenus par WIGGLESWORTH. La raison de ce phénomène est probablement le manque de vitamines qui retarde la croissance et empêche le développement normal de la punaise.

Dans ce rapport, la grande mortalité des punaises de laboratoire est très

frappante. Mais il est bien possible que, dans le milieu naturel également, seule une petite partie des Triatomes sortie des œufs atteigne l'état adulte et puisse se reproduire.

Ensuite, nous avons essayé d'obtenir des punaises stériles au moyen d'antibiotiques. Nous avons d'abord testé différents de ces antibiotiques sur des milieux nutritifs contenant le symbiote. Des substances suivantes : auréomycine, chloromycétine et terramycine, seule la terramycine s'est révélée efficace. Puis, nous avons dissout cet antibiotique dans du sérum de cobaye et en avons nourri des Triatomes de différents stades. Douze jours après, nous n'avons plus trouvé de symbiotes dans l'intestin moyen, ni sur culture, ni dans l'examen histologique.

Cette méthode peut donc être utilisée pour la stérilisation de punaises de n'importe quel stade, mais on ne doit pas oublier qu'il faut également désinfecter la surface du corps de la punaise pour garantir une stérilité durable.

L'examen microbiologique du symbiote nous a démontré que, parmi toutes les vitamines du complexe B, seul l'acide folique est produit en quantité excessive aussi bien dans un milieu semi-synthétique que dans un même milieu, additionné de sang.

Nous avons ensuite nourri artificiellement d'acide folique des punaises stériles ainsi qu'un groupe d'insectes de contrôle normaux, afin de voir si l'on pouvait ainsi supprimer les signes de carence survenus par l'absence du symbiote. La concentration utilisée (1 γ d'acide folique/cc. de sérum de cobaye) était trop élevée et ralentissait la croissance des punaises stériles aussi bien que celle des punaises de contrôle. L'augmentation de poids des insectes stériles était, exception faite des larves du troisième stade, inférieure à celle des insectes de contrôle.

En travaillant avec des concentrations inférieures (0,01 γ et 0,1 γ d'acide folique/cc. de sérum de cobaye) l'influence de l'acide folique sur la croissance était frappante.

En outre, nous avons encore nourri artificiellement des punaises normales avec de l'aminoptérine, antagoniste de l'acide folique. Pour ces expériences nous avions des larves de *Triatoma infestans* du troisième et quatrième stade larvaire à notre disposition. Nous avons pu démontrer que par ce régime (0,1 γ, 1 γ et 10 γ d'aminoptérine/cc. de sérum de cobaye), l'action de l'acide folique est supprimée. Le nombre des mues était considérablement réduit. L'effet sur les larves du quatrième stade était particulièrement frappant. Dans aucun des dosages l'aminoptérine n'avait une action mortelle.

L'acide folique s'est donc révélé indispensable pour *Triatoma infestans* Klug et semble être l'élément responsable des phénomènes de carence dus à l'absence du symbiote.

Summary.

The presence of a microorganism in the anterior part of the midgut of the bug *Triatoma infestans* Klug has been known for some time. The morphology of this symbiont was known too, but its physiology and influence upon the normal development of the bug had not yet been established.

The following experiments were carried out with a strain of *Triatoma infestans* which was maintained at the Swiss Tropical Institute for several years. The animals were kept at a temperature of 26°C and a relative humidity of 65%. They were regularly fed on guinea-pigs or on sterile guinea-pig serum, to which several vitamins had been added.

The symbionts used for physiological investigations were isolated on glucose-agar out of the midgut of adult Triatoma. Already after 10-12 hours all the strains hemolysed nutrient media, to which human blood was added. The

isolated strains could not easily be identified. The systematic position of the symbiont of *Triatoma infestans* Klug is not yet clear. There is no doubt that the microorganism is a Nocardia, but it is not sure if it has to be separated systematically from *Nocardia (Actinomyces) rhodnii.*

To investigate the relationship between symbiont and bug a great number of symbiont-free animals were observed for six months under the same conditions (i.e. food, temperature, relative humidity) as a control group of normal bugs. The development of the sterile bugs seemed considerably delayed and only 0.3% of all the insects reached the adult stage. This phenomenon could be connected with the formation of the sexual apparatus. The results above described agree very well with the findings of WIGGLESWORTH. Here we seem to have to deal with vitamin deficiencies which delay the growth and make a normal development of the bug impossible.

The high mortality of the bugs held in our laboratory is very striking. Nevertheless it is easy to believe that only a small part of the primarily hatched Triatoma reach the adult stage even in their natural surroundings and are then able to propagate.

Furthermore a new way of obtaining symbiont-free bugs was tried out. For this purpose several antibiotics were first tested in vitro on symbiont cultures. Of all the tested substances (i.e. aureomycin, chloromycetin, terramycin) only the terramycin had an action upon the culture-symbiont. This antibiotic was then dissolved in guinea-pig serum and artificially fed to Triatoma of various stages. 12 days after feeding no symbionts could be found in the midgut either histologically or on culture. This method can very well be used to obtain sterile bugs of any stage, but in order to avoid a reinfection the body surface should be disinfected as well.

The microbiological examination of the symbiont in vitro showed that in a half-synthetic nutrient medium as well as in a blood nutrient medium of all the vitamins of the B-complex folic acid only was produced in considerable excess.

In the following experiments folic acid was fed artificially to sterile and normal bugs in order to find out, whether by this vitamin diet the deficiencies produced by the absence of the symbiont could be compensated or not. The concentration which was first used (1 γ folic acid/c.c. guinea-pig serum) was too high and inhibited the growth both of sterile and normal bugs. The increase in weight of the sterile bugs, with the exception of the 3rd stage larvae, was smaller than that of the control insects.

With a lower concentration (0.01 γ and 0.1 γ folic acid/c.c. guinea-pig serum) the growth-increasing action of the folic acid could clearly be demonstrated. Furthermore experiments with normal bugs of the 3rd and 4th larval stage artificially fed on aminopterin (a folic-acid antagonist) were carried out. By feeding various amounts of aminopterin (0.1 γ, 1 γ, and 10 γ aminopterin/c.c. guinea-pig serum) the growth promoting action of the folic acid could be inhibited. The hatching rate of the insects was remarkably lowered. The 4th stage larvae were most strongly affected. In none of the used doses was aminopterin fatal to the bugs.

The above mentioned experiments show clearly that folic acid is indispensable for the normal development of *Triatoma infestans* Klug. Folic acid seems to be responsible for the deficiencies caused by the absence of the symbionts.