

It must be remembered indeed that RUNNSTRÖM *et al.*<sup>1</sup> have shown that the so-called "cortical granules" appear in the cortical layer only after maturation has been completed. WICKLUND<sup>2</sup> has failed to find any granules of alkaline phosphatase in the cytoplasm of sea-urchin oocytes. In mature unfertilized eggs granules appear which are located in the cortical layer. It is not certain whether these granules can be identified with the "cortical granules". On the other hand I have found that in sections of oocytes, ashed according to POLICARD, ashes are uniformly distributed throughout the whole cytoplasm, whereas in mature eggs they are clearly more accumulated in the cortical layer. It is evident that the accumulation of bivalent cations in the cortical layer may increase the mutual attraction among molecules, thus narrowing the intermolecular spaces.

The changes which the cortical layer of sea-urchin oocytes undergoes during maturation are, so to speak, the reverse of those observed at fertilization. RUNNSTRÖM indeed observed long ago<sup>3</sup> a colour change of the cortical layer at fertilization (observations with dark-field illumination) from orange-yellow to silver-white, i.e. the reverse of the one that takes place during maturation. In sea-urchin eggs of the Gulf of Naples, MONROY<sup>4</sup> and MONROY and MONTALENTI<sup>5</sup> observed that the cortical birefringence disappears at fertilization. That was explained as a result of a disarrangement in the submicroscopic structure of the lipo-protein cortical complex. The loss of bivalent cations which occurs at fertilization (ÖRSTRÖM and ÖRSTRÖM<sup>6</sup>, MONROY ODDO<sup>7</sup>) may play a role in this process.

The cortical birefringence seems to be, therefore, the expression of a submicroscopic structure which is bound to the ripeness, i.e. to the fertilizability of the egg.

It is interesting to note that all these cortical phenomena occurring during maturation and fertilization in sea-urchin eggs from Naples, do not occur in the eggs of the Swedish west coast, as described by RUNNSTRÖM *et al.*<sup>8</sup> and as the present author was able to confirm during a stay at the Zoological Station Kristineberg, Sweden. The significance of these differences would be worth investigating.

The author wishes to express his indebtedness to Prof. J. RUNNSTRÖM for suggestions and advice. A. MONROY

The Zoological Station of Naples, May 27, 1948.

### Zusammenfassung

Die Kortikalschicht der Seeigeloozyten ist isotrop. Eine kortikale positive Doppelbrechung wird erst während der Reifung sichtbar. Am Anfang ist sie ganz schwach; der normale Zustand ist nach der zweiten Reifungsteilung erreicht. Die kortikale Doppelbrechung erscheint aber auch in den Oozyten durch Plasmolyse.

<sup>1</sup> J. RUNNSTRÖM and L. MONNÉ, Ark. Zool. 36, A, n:o 18 (1945).  
– J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ, and E. WICKLUND, J. coll. Sci. 1, 421 (1946).

<sup>2</sup> E. WICKLUND, Nature 161, 556 (1948).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, Acta Zool. 4, 285 (1923).

<sup>4</sup> A. MONROY, Exper. 1, 335 (1945).

<sup>5</sup> A. MONROY and G. MONTALENTI, Nature 158, 939 (1946); Biol. Bull. 92, 151 (1947).

<sup>6</sup> A. ÖRSTRÖM and M. ÖRSTRÖM, Prot. 36, 475 (1941).

<sup>7</sup> A. MONROY ODDO, Exper. 2, 371 (1946).

<sup>8</sup> J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ, and L. BROMAN, Ark. Zool. 35 A, n:o 3 (1943).

## Fettsäuren aus dehydratisiertem Rizinusöl mit sog. Vitamin-F-Wirkung

Bei der Verseifung von dehydratisiertem Rizinusöl ergeben sich Gemische von Fettsäuren, welche zur Hauptsache aus 9,11- und 9,12-Linolsäure bestehen. Mengemäßig überwiegt die Säure mit konjugierten Doppelbindungen. Möglicherweise sind auch noch strukturisomere Linolsäuren mit anderer Lage der Doppelbindungen in dem aus der Dehydratisierung erhaltenen Fettsäuregemisch enthalten, in welchem naturgemäß auch die übrigen im Rizinusöl enthaltenen Fettsäuren, wie Stearinsäure, Ölsäure, usw. vertreten sind. Über die geometrischen Isomerieverhältnisse dieser Linolsäuren ist nichts Näheres bekannt.

Die aus dem dehydratisierten Rizinusöl gewonnenen Fettsäuren bzw. die Linolsäuren, zeigten im Tierversuch, durchgeführt vom Schweizerischen Vitamininstitut in Basel, sog. Vitamin-F-Wirkung.

Das geprüfte Präparat stammte aus dehydratisiertem Rizinusöl Marke «Dienol» (konz. Schwefelsäure als Dehydratisierungskatalysator) und besaß folgende Daten:

Kp. 0,2 187–188,5°C.

$n_{D}^{20} = 1,4739$

Säurezahl:

ber. 201,5

gef. 200,0

Jodzahl:

ber. 280,3

gef. 155,0

Molekulargewicht:

ber. 280,3

gef. 285,0

aktive Wasserstoffatome:

ber. 0,36%

gef. 0,36%

CH-Bestimmung:  $C_{18}H_{32}O_2$

ber. C: 77,07%

H: 11,51%

gef. C: 76,41% H: 11,89%

UV-Spektrum: Hauptbande bei 2300 Å;  $\log \epsilon = 4,20$

Nebenbande bei 2700 Å;  $\log \epsilon = 2,25$

Die Bestimmung der Mikrohydrierzahl ergab keine Aufnahme von Wasserstoff. Möglicherweise wird die katalytische Hydrierung durch Spuren von Schwefel verhindert, welche während der Dehydratisierung durch Reduktion des Schwefelsäurekatalysators entstanden sind.

Die Prüfung auf sog. Vitamin-F-Wirkung ergab folgende Werte:

perorale Applikation: 1 g entspricht 358 mg Linolsäure;  
perkutane Applikation: 1 g entspricht 270 mg Linolsäure.

A. C. MUHR

Wissenschaftliches Laboratorium der Öl- und Chemie-Werk-AG., Hausen bei Brugg, den 2. Juni 1948.

### Summary

The fatty acids from dehydrated castor oil, mainly consisting of 9,11- and 9,12-linoleic acid, show in biological tests vitamin effects similar to those of the so-called essential fatty acids.

## Dosage de la streptomycine par la méthode des dilutions appliquée à *Klebsiella pneumoniae* N° 41 en milieu synthétique de Monod

### Observation préliminaire

*Souche et technique.* *Klebsiella pneumoniae* N° 41, provenant de la N.C.T.C.<sup>1</sup>, conservée sur gélose, souche hautement qualifiée pour le dosage de la streptomycine<sup>2</sup>. Technique des dilutions classique: on ajoute au milieu des

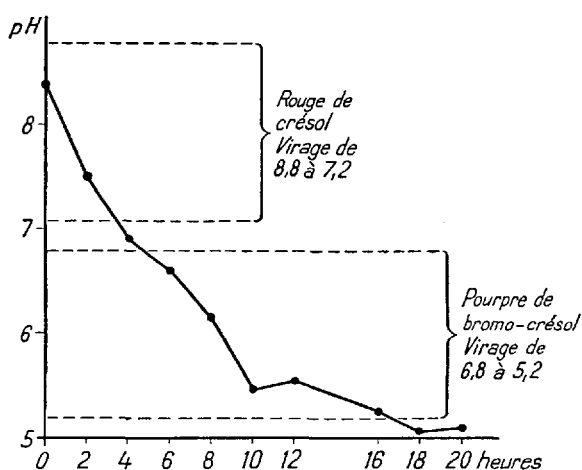
<sup>1</sup> N.C.T.C. National Collection of Type Cultures. Londres.

<sup>2</sup> E. ALTURE-WERBER et L. LOEWE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 63, 277 (1946).

quantités décroissantes de streptomycine, et on note le taux inhibiteur limite d'après le numéro d'ordre du tube précédant immédiatement le premier tube où vire un indicateur coloré, virage traduisant l'acidification du milieu par la fermentation d'un sucre.

**Milieu d'entretien et de dosage.** Milieu S de MONOD<sup>1</sup>. On utilise la saccharose parce que non réducteur<sup>2,4</sup>. On ajuste le  $p_H$  de 9 à 9,5 parce que l'acidité a pour effet d'augmenter le taux inhibiteur limite (voir plus loin, et <sup>3</sup>). On n'a pas étudié l'action antagoniste du tampon phosphatique<sup>4</sup>.

**Entretien de la souche.** Effectué sur le milieu susdit, à raison d'un large réensemencement toutes les 24 h environ, à partir d'un implantat initial important. Plusieurs passages sont nécessaires, tant pour éliminer l'implantat initial (et ainsi opérer en milieu synthétique défini), que pour adapter la souche à la nouvelle ambiance.



**Observation.** Dans ces conditions, et à raison de 2 cm<sup>3</sup> de milieu neuf pour 0,5 cm<sup>3</sup> de saccharose à 20% et 0,5 cm<sup>3</sup> d'une culture de pneumobacille de 12 à 24 h du 30<sup>e</sup> au 32<sup>e</sup> passage sur S, les taux inhibiteurs limites sont de 0,1  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> à  $p_H$  8,5, de 0,15  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> à  $p_H$  7,9, de 0,3  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> à  $p_H$  6,8, taux calculés en microgrammes de base pure à partir du complexe cristallisé CaCl<sub>2</sub> de MERCK<sup>6</sup>.

Avec un indicateur coloré adéquat, à  $p_H$  de virage proche du  $p_H$  initial du mélange (rouge de crésol<sup>7</sup> pour un  $p_H$  de 8,8 au départ), on effectue les mesures en 2 h (voir figure).

En résumé, on exalte le pouvoir fermentatif de la souche *Klebsiella pneumoniae* N° 41 par le repiquage quotidien sur milieu synthétique S de MONOD, ce qui permet ensuite des dosages très rapides par la méthode des indicateurs colorés de  $p_H$ . Des recherches ultérieures montreront si cette méthode est applicable au dosage de la streptomycine dans les humeurs.

V. BONIFAS et Y. CHESNI

Institut d'hygiène, Genève, le 8 juillet 1948.

<sup>1</sup> J. MONOD, Recherches sur la croissance des cultures bactériennes (Hermann, Paris 1942).

<sup>2</sup> G. SYKES et M. LUMB, Nature 158, 271 (1946).

<sup>3</sup> S. A. WAKSMAN, Les Antibiotiques (Masson, Paris 1947).

<sup>4</sup> S. A. WAKSMAN, E. BUGIE et A. SCHATZ, Proc. Staff. Mayoclin., 19, 537 (1944). – G. WERNER, communication orale.

<sup>5</sup>  $p_H$  initial du mélange, mesuré au potentiomètre de Beckman.

<sup>6</sup> Streptomycine déposée dans les tubes au moyen de la seringue micrométrique Agla, à partir d'une solution à 100  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> dans de l'eau distillée alcaline.

<sup>7</sup> Solution à 1/5000, à raison de 4 gouttes par tube.

## Zusammenfassung

*Klebsiella pneumoniae* Nr. 41 wird in einem leicht alkalischen, synthetischen Medium mit Zusatz von Saccharose und einem Indikator (z. B. Kresolrot) wachsen gelassen. Durch Spaltung des Zuckers wird die Reaktion nach der sauren Seite verschoben. Das bei einer bestimmten Streptomycin-Konzentration eben noch stattfindende Wachstum der *Klebsiella* kann nach etwa 2 Stunden am Umschlag des Indikators erkannt werden.

## Nouvelle méthode de mesure de la concentration du radio-brome dans le matériel biologique

La méthode de mesure de l'activité des organes due au Br\*, dérivée de celle utilisée par P. SUE<sup>1</sup> pour l'I\*, s'étant révélée dans quelques cas peu fidèle, nous avons essayé d'y remédier en procédant de façon entièrement différente. En principe, il s'agit de dissoudre le matériel biologique (tissus, organes, organismes) dans un solvant approprié, puis de précipiter dans cette dissolution le Br\* sous forme de BrAg.

Le corps chimique dont on veut suivre le métabolisme et dans lequel le Br\* est engagé en tant qu'indicateur commande en partie le choix du dissolvant. De même aussi y a-t-il intérêt à ne pas choisir d'emblée les acides forts susceptibles de déplacer Br\* sous forme de Br<sup>2+</sup> volatile.

Nous avons travaillé avec le triphényléthylène bromé (TE Br), hormone œstrogène de synthèse (BERGER et coll.<sup>2</sup>). En lieu et place du Br<sub>35</sub><sup>81</sup> stable, nous avons utilisé le Br<sub>35</sub><sup>82</sup> (34 H) obtenu par irradiation neutronique du bromure d'éthyle au cyclotron du Collège de France. Le Br\* se combine très facilement au triphényléthylène (réaction d'addition) et la liaison Br-triphényléthylène est très forte. Après de nombreux essais de rupture de cette liaison avec diverses substances, le choix définitif s'est porté sur une solution dans l'alcool à 90° de KOH (5 N) agissant à l'ébullition. Dans ces conditions, l'expérience a montré que, pour une durée d'ébullition de 1 h, les organes étaient entièrement dissout et la saponification du TE Br complète. Pour éviter l'évaporation de l'alcool on procède sous réfrigérateur à reflux.

Les différentes opérations de cette méthode se déroulent de la façon suivante:

1° Prélever les organes qui sont immédiatement lavés dans de l'eau et le chloroforme pour éliminer le sang ou les liquides organiques qui y adhèrent.

2° Peser les organes.

3° Introduire les organes dans des ballons contenant 10 cm<sup>3</sup> de la solution alcoolique de KOH (5 N) et 2 cm<sup>3</sup> de solution d'entraîneur (solution de NaBr 10 g dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée). (L'adjonction d'entraîneur permet d'obtenir une masse déterminée de précipité facile à manipuler ultérieurement, ce qui ne serait pas le cas sans cela).

4° Fixer les ballons sous le réfrigérant à reflux et chauffer à l'ébullition pendant 1 h. au moins.

5° Interrompre le chauffage et laisser refroidir.

6° Ajouter à chaque ballon 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, puis quelques gouttes de tournesol.

7° Neutraliser rapidement la solution alcaline jusqu'à virage du tournesol par NO<sub>3</sub>H (solution de NO<sub>3</sub>H conc. diluée de moitié).

8° Et ajouter immédiatement alors 5 cm<sup>3</sup> au moins de NO<sub>3</sub>H en excès. On peut aussi ajouter en une fois 10 cm<sup>3</sup> de la solution NO<sub>3</sub>H diluée de moitié. (L'expérience a montré que l'excès de NO<sub>3</sub>H ainsi ajouté favorisait la précipitation de AgBr d'une part, empêchait la précipitation simultanée des protéines en solution d'autre part.)

<sup>1</sup> P. SUE, J. Chim. Phys. 38, 123, 148 (1941).

<sup>2</sup> P. et R. DAUDEL, M. BERGER, NG PH. BUU-HOI et A. LACASAGNE, Exper. 2, 70 (1946).