

Effect of Butyl Alcohol in *Datura innoxia* Mill

Seeds of *Datura innoxia* Mill. are reported to contain 0.1–0.9% tropane alkaloids¹ (mainly hyoscyamine and hyoscyne). The latter accounts for 40–50% of the total alkaloids. These seeds from wild sources at Jammu contain 0.12–0.22% total alkaloids. SINGH and KAUL², by treating these seeds with various concentrations of ethyl alcohol, induced tetraploidy and increase in alkaloid content of seeds. The present experiment was conducted to see the effect of butyl alcohol on these seeds.

Material and method. Mature seeds with 0.18% total alkaloids were collected from a single clone. Seeds in 100 g lots were separately soaked in varying concentrations of normal butyl alcohol for 1 h at room temperature. This treatment, in one set, was proceeded by exposure to 45°C for 30 min, while, in the other set it was followed by washing with tap water and exposure to a similar temperature shock. Seeds soaked in tap water for 1 h at room temperature served as control. Seeds of all the sets were separately sown in the field soon after treatment; they germinated in 20–25 days with 80–85% germination. 200 plants of each set were raised under identical conditions. 10 plants from each treatment were marked at random, their capsules collected separately at approximately the same stage of maturity, seeds oven-dried at

45°C and analyzed for alkaloids as per I.P.C. method³. Each sample was analyzed twice and average value taken. In case of doubts, analysis was repeated. Hyoscyne content was determined approximately by thin-layer chromatography. Seeds treated with 12% *n*-butyl alcohol could not be given conditions identical to other sets and were ignored. The experiments were repeated the following year (1968) on a changed site which happened to be very poor in humus and nitrogen content.

Results and discussion. The results are given in the Table. The data show that (1) *n*-butyl alcohol treatment appears to enhance production of seeds and their alkaloid content in the next generation, (2) temperature shock after the alcoholic treatment has given better results, and (3) treating seeds with 9% *n*-butyl alcohol followed by temperature shock has given best results. Certain pronounced morphological changes were also noticed in plants thus raised. The lower alkaloid content in experiments in the year 1968 may be ascribed to the nitrogen-deficient soil on which plants were raised, since nitrogen affects the formation of alkaloids in *D. innoxia*⁴. The above changes are probably due to certain modifications introduced in chromosomes and the same are under investigation.

Treatment	Year 1967			Year 1968		
	Average wt. of seeds per plant (g)	Total alkaloid content (%)	Approx. hyoscyne content (%)	Average wt. of seeds per plant (g)	Total alkaloid content (%)	Approx. hyoscyne content (%)
Control	250	0.18	45	250	0.17	45
6% <i>n</i> -butyl alcohol followed by temperature shock	350	0.36	55	350	0.35	55
Temperature shock followed by 6% <i>n</i> -butyl alcohol treatment	300	0.29	55	300	0.27	55
9% <i>n</i> -butyl alcohol followed by temperature shock	350	0.56	70	350	0.42	70
Temperature shock followed by 9% <i>n</i> -butyl alcohol treatment	300	0.32	60	300	0.34	60
12% <i>n</i> -butyl alcohol followed by temperature shock	—	—	—	350	0.40	60
Temperature shock followed by 12% <i>n</i> -butyl alcohol treatment	—	—	—	300	0.27	50

¹ I. I. GERASIMENKO, N. I. LIBIZOV, B. S. NIKOLSKAYA and F. A. SATSIPEROV, *Durman indiasckii* (Medgiz, Moscow 1953), p. 28.

² P. SINGH and B. L. KAUL, *Ind. J. exp. Biol.* 5, 128 (1967).

³ B. MUKERJI, *The Indian Pharmaceutical Codex* (C.S.I.R., New Delhi, 1, 90, 1953).

⁴ A. S. SINHA and K. C. VERMA, *Ind. J. Pharm.* 38, 3 (1966).

⁵ The author is grateful to Dr. K. GANAPATHI, Director, and Dr. C. K. ATAL, Scientist of this Laboratory, for their interest in the work. SHRI HET SINGH, Dr. K. L. DHAR and Miss SUBASH KUMARI helped by analyzing the seeds which is duly acknowledged.

Zusammenfassung. Die Behandlung der Samen von *Datura innoxia* Mill. mit *n*-Butylalkohol und Temperaturschock ergibt in der nächsten Generation Pflanzen, deren Samen einen höheren Alkaloidgehalt aufweisen. Das Hauptalkaloid ist Scopolamin (Hyoscin) mit einem Anteil von 50–70% am Gesamtalkaloidgehalt.

PRATAP SINGH⁵

Regional Research Laboratory,
Canal Road, Jammu (India), 21 August 1969.

La multiplication in vitro des streptocoques du groupe A. Le phénomène d'éclipse

Certaines souches de streptocoques du groupe A ne se multiplient, en milieu artificiel, que si le nombre de bactéries ensemencées est suffisamment important. Nous étudions dans ce travail la multiplication in vitro d'une souche très virulente pour la souris et ses variations en fonction de l'importance de l'ensemencement.

Matériel et méthodes. La souche 18 t 24 BM (groupe A, type 24) est extrêmement virulente puisqu'une seule chaînette, injectée par voie intra-péritonéale, suffit à tuer la souris. Pour conserver cette souche, dans cet état de virulence, une culture est faite chaque semaine à partir du sang du cœur d'une souris infectée par voie intra-

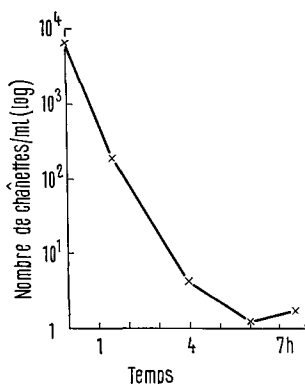
péritonéale. La culture en phase exponentielle est répartie en échantillons de 2 ml et conservée à -70°C (Culture BM -70°C). Les cultures et numérations sont faites en milieu Liebig¹ ou dans ce même milieu gélosé additionné de 5% de sang de cheval.

Cinq tubes de milieu Liebig sont ensemencés à partir d'une ampoule congelée de façon à contenir au temps 0 environ 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 chainettes par ml. Une numération des bactéries contenues dans chaque tube est faite immédiatement. Les tubes sont alors incubés pendant 6 h à 37°C .

Resultats. Le Tableau I montre la variation du nombre de streptocoques contenus dans chaque tube entre le temps 0 et la 6ème h d'incubation. Il permet de constater que ce nombre n'augmente que s'il était, au temps 0, supérieur à 10^3 par ml. Dans le cas contraire le nombre de streptocoques capables de donner naissance à une colonie diminue fortement. Cette diminution n'est pas brutale mais progressive comme le montre la Figure.

Tableau I. Croissance de la souche 18 t 24 BM (-70°C). Expérience portant sur 6 h

Tube N°	Nombre de chainettes/ml	
	Temps 0	Après 6 h d'incubation à 37°C
I	$4,7 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^6$
II	$4,7 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^1$
III	$4,7 \cdot 10^3$	3,0
IV	$4,7 \cdot 10^2$	<1
V	$4,7 \cdot 10^1$	<1



Le phénomène d'éclipse: souche 18 t 24 BM -70°C .

Tableau II. Croissance de la souche 18 t 24 BM (-70°C). Durée d'incubation comprise entre 15 et 21 h

Tube N°	Nombre de chainettes/ml au temps 0	Nombre de chainettes après incubation à 37°C		
		15 h	17 h 30	21 h
I	$5,3 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^7$ *	—	—
II	$5,3 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	—
III	$5,3 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^4$	—	$2,9 \cdot 10^6$
IV	$5,3 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^3$	—	$2,4 \cdot 10^5$
V	$5,3 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^2$	—	$3 \cdot 10^4$

* La culture n'est plus en phase exponentielle.

Le Tableau II montre les résultats d'une expérience faite dans des conditions identiques mais au cours de laquelle les numérations sont faites à l'heure 0 et à partir de la 15ème heure. Les résultats montrent que si l'ensemencement est faible l'accroissement moyen du nombre de bactéries est plus faible entre l'heure 0 et l'heure 15 qu'entre la quinzième et la 21ème heure.

Les expériences rapportées ci-dessus montrent que si l'on dilue suffisamment dans du milieu Liebig les cultures BM -70°C , la majorité des bactéries qu'elles contiennent deviennent incapables de se multiplier et meurent au cours des 6 premières d'incubation. Si l'on dilue ces cultures, non plus dans du milieu Liebig mais dans ce même milieu additionné de surnageant stérilisé par filtration d'une culture BM -70°C on n'observe plus le phénomène d'éclipse rapporté dans les expériences précédentes (Tableau III).

Il semble donc que la majorité des bactéries contenues dans les cultures BM -70°C ne peuvent survivre et se multiplier dans le milieu Liebig que si celui-ci est additionné d'une quantité suffisante de facteur(s) contenu(s) dans ces mêmes cultures BM -70°C . Celles ci contiennent environ 0,2 à 0,5% de sang de souris. Le Tableau IV montre que l'adjonction au milieu Liebig de 0,01% de sang ou de serum de souris permet la croissance immédiate de bactéries BM -70°C sans phase d'éclipse, quelque soit l'importance de l'ensemencement.

Les bactéries recueillies après la phase d'éclipse au cours des expériences précédentes sont capables de se multiplier en milieu Liebig sans phase d'éclipse même si le nombre de bactéries ensemencées est très faible.

En conclusion, la phase d'éclipse peut être décomposée en 2 périodes. Pendant la première, la majorité des

Tableau III. Croissance de la souche 18 t 24 BM (-70°C) en l'absence et en présence de 10% surnageant stérile de la même souche

Milieu de Culture	Nombre de chainettes/ml au temps 0	Nombre de chainettes/ml après 6 h à 37°C
Liebig	$2 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^2$
Liebig + surnageant stérile	$2 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^5$

Tableau IV. Croissance de la souche 18 t 24 BM (-70°C) en milieu Liebig et dans ce même milieu additionné de sang ou de serum de souris normale

	Nombre de bactéries au temps 0 (par ml)	Nombre de bactéries après 6 h à 37°C
Milieu Liebig	$1,9 \cdot 10^3$	<1
Milieu Liebig + 0,01% de serum de souris	$1,9 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^6$
Milieu Liebig + 0,01% de sang de souris	$1,9 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^6$

¹ R. WAHL et P. MEYER, Ann. Inst. Pasteur. 92, 43 (1957).

² P. CAYEUX et J. PANIJEL, Ann. Inst. Pasteur. 108, 623 (1965).

bactéries, exigeantes en facteurs nutritifs contenus dans le sang ou le sérum, cessent de se multiplier et meurent. Seuls un petit nombre de streptocoques moins exigeants survivent. Leur multiplication est responsable de l'augmentation de la population à laquelle on assiste durant la seconde période.

Des expériences identiques ont été faites avec d'autres souches de streptocoques du groupe A. Le phénomène d'éclipse n'a été observé qu'avec deux autres souches extrêmement virulentes pour la souris (dose létale voisine de 1 chaînette). Nous n'avons jamais observé ce phénomène avec des souches de moindre virulence.

Summary. The streptococci belonging to some strains of group A, when cultivated in small number in an artificial medium, start to multiply only after a hidden period of several hours during which most of them die. This phenomenon is observed only with bacteria obtained from a culture made directly from the heart blood of mice infected with virulent group A streptococci.

PH. CAYEUX

*Centre National de référence des Streptocoques,
Institut Pasteur,
Paris 15^e (France), 2 avril 1969.*

Fine Structure of Chromatic Granules in *Trichomonas vaginalis* Donné

Cytoplasmic structures previously called chromatic granules^{1,2}, and recently in papers on electron microscopy named according to their position in a cell as paracostal and paraaxostylar bodies, may be found in many flagellates. In my study on the fine structure of *Trichomonas vaginalis*, chromatic granules were encountered frequently. When some modifications in the preparation of the cells for electron microscopy were introduced, these granules showed morphological features so far not described in the literature. Ultrastructure of chromatic granules in *T. vaginalis*, as observed after application of a variety of procedures, will be reported in the present paper.

Materials and methods. The strain of *T. vaginalis* Donné isolated from human vaginal excretion was cultivated axenically, according to methods of JOHNSON et

al.³ and FILADORO and ORSI⁴. Two main procedures were used: (1) Centrifuged cells prefixed in phosphate buffered 6% glutaraldehyde (pH 7.2, 0.1M), postfixed in 2% phosphate buffered OsO₄ (pH 7.2) were embedded in Epon. (2) Preserved cellular monolayers⁵ prefixed in 5% s-collidin buffered glutaraldehyde (pH 7.2, 0.1M), postfixed in 4% unbuffered OsO₄ (pH 6.0) were embedded in Epon. Sections of cells fixed with both methods were

¹ C. F. T. MATTERN, B. M. HONIGBERG and W. A. DANIEL, J. Protozool. 14, 320 (1968).

² D. H. WENRICH, J. Morphol. 36, 119 (1921).

³ G. JOHNSON, U. M. TRUSSEL and F. JAHN, Science 120, 126 (1945).

⁴ F. FILADORO and N. ORSI, Antibiotics chemotherapy 8, 561 (1958).

⁵ F. FILADORO, Rivista di Biol. 62, 167 (1969).

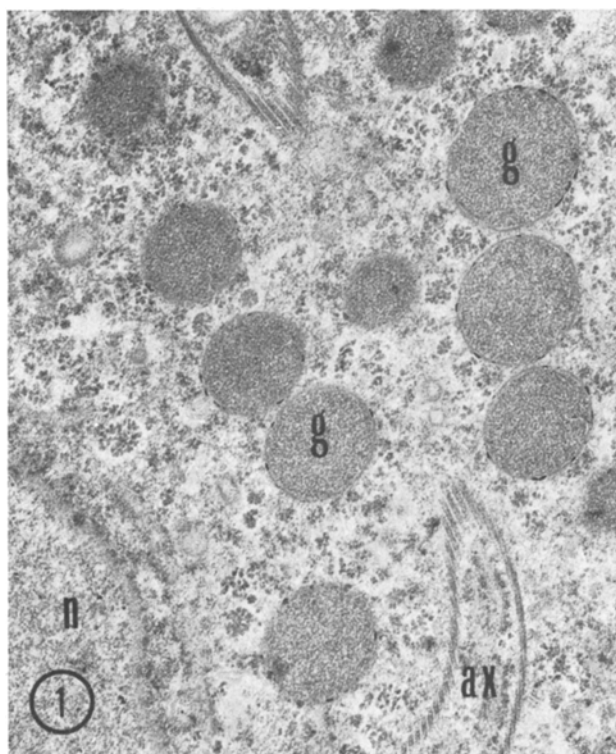


Fig. 1. Chromatic granules (g) in *T. vaginalis* disposed along and around the axostyle (ax). The nucleus is marked (n). The cell was prepared with method 2. $\times 24,000$.

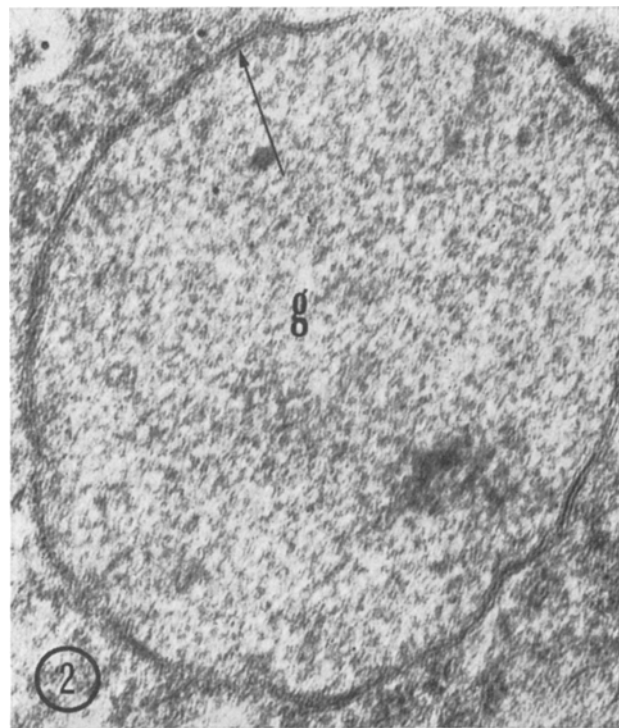


Fig. 2. A chromatic granule (g) of *T. vaginalis* fixed with method 1. No inclusions are seen on the periphery of the granule. An arrow indicates a part of the envelope where a single membrane of the trilaminar type is visible. $\times 98,000$.