

tersuchungen auch als Kortikalschicht bezeichnet wird<sup>3</sup>. Während die ZRE elektronenmikroskopisch eine geschlossene Schicht darstellt, die die Eihülle nach aussen hin abschliesst, ist die ZRI inhomogen und aus Säulen in der Form eines Fischgrätenmusters aufgebaut. Die zwischen diesen Säulen verlaufenden Porenkanäle durchdringen die ZRI völlig in annähernd geradlinigem Verlauf. Während der Eireifung dienen sie mit Hilfe von Mikrovilli, in die Protoplasma-Ausläufer der Follikelzellen einwachsen, der Ernährung der Oocyte. Ob die in den Kanälen deutlich sichtbaren kugeligen Gebilde (Figur c) als Follikelmaterial oder als Reststücke solcher Mikrovilli gedeutet werden können, muss hier offen bleiben. Wir konnten sie zwar nur in den Frühstadien feststellen, doch sprechen alle Anzeichen dafür, dass sich sowohl die Mikrovilli als auch die Follikelzellen zur Ovulation völlig aus den Kanälen zurückziehen<sup>4</sup>.

Die Dickenverhältnisse der drei untersuchten Schichten gehen aus der Abbildung deutlich hervor und weisen die ZRI mit etwa 50 µm als besonders mächtig aus, während die ZRE mit 0,2 µm etwa 2–3 mal dünner ist als die aufgelagerte Schleimschicht.

Die beiden äusseren Schichten (Schleimschicht und ZRE) sind beide annähernd homogen, aber dennoch deutlich voneinander abgegrenzt, da die ZRE viel dichter ist (Figur b). Während die Schleimschicht das Ei gleichmässig einhüllt, bildet die ZRE zum Zeitpunkt der Ovulation sog. Verschlusspfropfen aus, die die Kanäle der ZRI wie mit einem Korken verschliessen. Die Aufgabe der Schleimschicht scheint eine reine Schutzfunktion zu sein, indem sie sich im lebenden Zustand überaus resistent gegenüber Bakterien und Pilzen erweist und erst wenige Tage vor dem Schlüpfen Auflöserscheinungen zeigt. Da sie mechanisch die am wenigsten widerstandsfähige Schicht der Eihülle darstellt, ist ihre Resistenz besonders auffallend. Für die Möglichkeit einer dauernden Regeneration aus dem Ei heraus konnten wir keine Hinweise finden; dagegen spräche aber auch die Herkunft der Schleimhaut, bei der es sich um eine tertiäre Eihülle handelt<sup>4</sup>. Bei dem Material der Zona radiata handelt es sich wahrscheinlich um keratinartige Proteine<sup>5</sup>. Versuche, die Schwefelbrücken durch «sulfhydryl compounds» zu sprengen, führten bei Schalen von unbefruchteten Eiern zu einer Quellung um 35–65%, entsprechend der Anwendung von Thioglycolsäure (0,1 M) bzw. Cystein (0,1 M).

Innerhalb der ersten 2 bis 3 Tage nach der Eiablage lassen sich in der Festigkeit der Hülle mehrere Phasen unterscheiden, die durch eine verschieden hohe Belastbarkeit

hervortreten<sup>6</sup>. In der Hülle zeigen sich zu dieser Zeit aber keine sichtbaren strukturellen Veränderungen, die einen Hinweis geben könnten, weshalb die Erklärung wahrscheinlich eher aus der chemischen Zusammensetzung der einzelnen am Bau beteiligten Stoffe ersichtlich sein wird. Betrachten wir die Eihülle von der Zeit des Augenpunktstadiums an, so zeigen sich erst kurz vor dem Schlüpfen (2–3 Tage) Veränderungen, die aber nur die Schleimschicht betreffen, die jetzt allmählich zerfällt, während strukturelle Auflöserscheinungen in der eigentlichen Eihülle (Zona radiata) über den gesamten Zeitraum nicht zu beobachten sind. Eine Auflösung der Eihülle erfolgt erst unmittelbar vor dem sich anschliessenden Schlüpfen von der ZRI her und lässt sich im Bereich des Kopfes zuerst feststellen. Die Ausschüttung des Sekretes ist also ein kurzfristiger Vorgang, dessen Mechanismus – nervöse oder humorale Steuerung – noch nicht geklärt ist<sup>7</sup>. Die sich anschliessende Verdauung der Hülle erfolgt über ein Eindringen des Sekretes in die Kanäle der ZRI und bewirkt ein völliges Kollabieren der gesamten Schicht, die entweder völlig gleichmässig aufgelöst wird oder teilweise zurückbleibt, wenn der Fisch durch bereits gebildete Löcher die Resthülle verlässt.

**Summary.** The investigation of the egg shell of *Salmo trutta fario* L. reveals several layers, which are chemically and physically different. During development of the egg, the chorion does not show notable changes in structure. Immediately at hatching the dissolution of the egg takes place as a result of the glands being on the head of the embryo.

H. E. HAGENMAIER und R. WILHELM<sup>8,9</sup>

Zoologisches Institut der Universität Münster,  
Hindenburgplatz 55, D-44 Münster (Deutschland),  
8. November 1971.

<sup>3</sup> E. A. ARNDT, Z. Zellforsch. 52, 315 (1960).

<sup>4</sup> H. FLÜGEL, Z. Zellforsch. 83, 82 (1967).

<sup>5</sup> E. G. YOUNG and W. R. INMAN, J. biol. Chem. 124, 189 (1938).

<sup>6</sup> A. I. ZOTIN, J. Embryol. exp. Morph. 6, 546 (1958).

<sup>7</sup> G. M. IGNATEVA, Dokl. Biol. Sci. Sect. (engl. Transl.) 128, 774 (1959).

<sup>8</sup> Fräulein BARBARA BLUM danken wir für ihre technische Hilfe.

<sup>9</sup> Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für finanzielle Unterstützung gedankt.

## Antiviral Properties of Humic Acids

SCHULTZ<sup>1</sup> successfully used peat mull to prevent transmission of foot and mouth disease in pigs and it was assumed that the antiviral activity was due to the humic acids which probably caused denaturation of viral protein. The chemical structure of the humic acids is unknown, although in several laboratories many degradation products such as phenolic acids, carbohydrates and amino acids have been isolated<sup>2</sup>. In order to study the antiviral properties of humic acids we prepared ammonium humate from peat water by a method previously described<sup>3</sup> and tested this against Coxsackie virus A9 (Griggs-Baylor, obtained from Dr. SYRŮČEK, Prague, ČSSR) in cell culture. The cells, Fogh and Lund (FL) cells, were maintained with Eagle's minimum essential medium (MEM) mixed to equal parts with Hanks salt solution containing 0.5% Lac-

talbumin hydrolysate Difco (Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA) and 0.01% Bacto yeast extract Difco. To this medium was added 10% heat inactivated calf serum, 100 µg/ml Streptomycin (VEB Jenapharm, Jena, DDR) and 100 IU/ml Penicillin G, Jenapharm. The cultures were incubated at 35 °C and reached a cell density of 10<sup>6</sup> cells/ml by day 3. At this stage the medium was replaced by maintenance medium containing 3% calf serum and the cultures treated with ammonium humate

<sup>1</sup> H. SCHULTZ, Dt. tierärztl. Wschr. 69, 613 (1962).

<sup>2</sup> W. WILDENHAIN, Freiburger Forschungsh. A 447, 7 (1969).

<sup>3</sup> R. KLÖCKING and D. MÜCKE, Z. Chem. 9, 453 (1969).

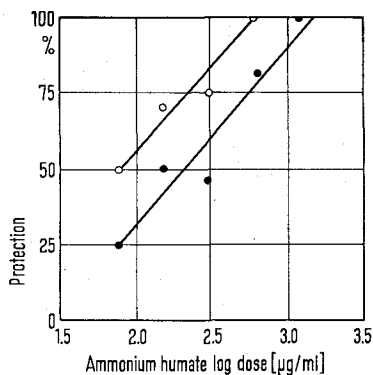


Fig. 1. Inhibition of viral-induced cytopathic effect by ammonium humate. ○—○, at the 3rd day after infection with Coxsackie virus A9. ●—●, at the 6th day after infection with Coxsackie virus A9.

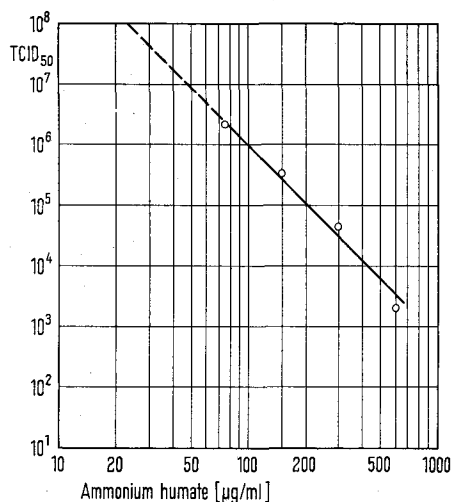


Fig. 2. The effect of ammonium humate on the multiplication of Coxsackie virus A9. TCID<sub>50</sub> after treatment (72 h) with different quantities of ammonium humate. TCID<sub>50</sub> of control cultures without humate is 10<sup>8</sup>.

(37.5–1200 µg/ml), ammonium sulphate (at concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> equimolar to those of ammonium humate), infected with Coxsackie virus A9 (Griggs-Baylor; inoculum to give final concentration/culture log<sub>10</sub> 4.0 TCID<sub>50</sub>/ml), or simultaneously infected by virus and treated with ammonium humate or ammonium sulphate. The cultures were incubated at 35°C for 3 or 6 days and the results were recorded either by estimating the percent reduction of virus-induced cytopathic effect (TAMM et al.<sup>4</sup>) or by measuring the yield of virus/ml culture.

Ammonium humate alone was not cytotoxic but possessed marked antiviral activity. At 3 days 224 µg/ml resulted in 75% inhibition of viral-induced cytopathic effects, but in order to achieve the same level of inhibition at 6 days 562 µg/ml were required; the dose-response relationship was linear (Figure 1). With regard to the effect on yield of virus there was again a linear relationship between dose and response (Figure 2). At 100 µg/ml ammonium humate the yield of virus was about 100-fold less than in untreated infected control cultures. Equivalent concentrations of ammonium sulphate had no effect on viral inhibition, nor were they cytotoxic, thus ruling out that the inhibitory factor was associated with NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions. The active chemical constituent of ammonium humate has not been characterized and our observations do little to elucidate the observations of SCHULTZ<sup>1</sup>, which presumably resulted from the direct action of the humic acids on a certain step of virus multiplication system.

**Zusammenfassung.** Es wird ein antiviraler Effekt von Ammoniumhumat gegenüber Coxsackievirus A9 in FL-Zellkulturen nachgewiesen. Die antivirale Wirkung ist auf den Humatanteil des Moleküls zurückzuführen.

R. KLÖCKING and M. SPRÖSSIG

*Institut für Medizinische Mikrobiologie der  
Medizinischen Akademie Erfurt,  
Nordhäuser Strasse 74, DDR-50 Erfurt, DDR  
19 May 1971.*

<sup>4</sup> I. TAMM, H. J. EGGERS, R. BABLANIAN, A. F. WAGNER and K. FOLKERS, *Nature*, Lond. 223, 765 (1969).

## The Use of Mitochondrial Mutants of Yeast in the Screening for New Antimetabolites

For the detection of new antimetabolites produced by microorganisms, synthetic nutrient media containing mineral nitrogen are used, and as tests are employed bacteria capable of growing in a simple synthetic environment, such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and some others<sup>1,2</sup>. In the rich nutrient media, antimetabolites synthesized by microorganisms cannot be detected at all, since their action is neutralized by the metabolites present in the medium. It is clear that cells of malignant tumors, multiplying in vitro in the rich nutrient media, cannot be used in screening of antimetabolites.

It would be of great interest to use eukaryotic cells for screening of antimetabolites produced by microorganisms. Such cells possess typical nuclei and mitochondrial systems. The latter are particularly important, since tumor mitochondria exhibit reduced activities and deficiencies compared to mitochondria from normal cells<sup>3</sup>. We therefore used for this purpose cultures of 2 species of yeast,

*Candida utilis* strain 766, and *Torulopsis globosa* strain 697, which grow well on synthetic nutrient media containing mineral nitrogen. In both species we induced mitochondrial mutants with small colonies, impaired respiration and enhanced glycolysis, which are capable of growing on synthetic nutrient media. As is known, such mutants show gross alteration of their mitochondrial DNA<sup>4</sup>.

The induction of mitochondrial mutants with small colonies in the yeast *Candida utilis* and *Torulopsis globosa*

<sup>1</sup> L. J. HANKA, *Proc. 5th Intern. Congr. Chemoth.* Vienna (1967), p. 351.

<sup>2</sup> T. P. KOROBKOVA, L. P. TEREKHOVA and T. S. MAKSIMOVA, *Antibiotiki* 15, 936 (1970).

<sup>3</sup> L. A. SORDAHL and A. SCHWARTZ, in *Methods in Cancer Research* (Academic Press, New York 1971), vol. 6, p. 159.

<sup>4</sup> D. H. WILLIAMSON, in *Control of Organelle Development* (Cambridge University Press 1970), p. 247.