

heme are to be separated, heme can be extracted from the ethyl acetate-glacial acetic acid (3:1) phase by 15% HCl. The protoporphyrin-free heme can be crystallized from this solution in the manner described above after neutralization and shaking into an ethyl acetate-glacial acetic acid (3:1) phase.

In conclusion, the procedure described above is suitable for the isolation of the final product of both heme and protoporphyrin synthesis<sup>5</sup>.

### Membrana testacea: A Support for Organ Cultures

Organ-culture method is a powerful tool for biological investigations and so it has been extensively used in several fields (e.g. embryology, genetics, cancer research)<sup>1</sup>. The usefulness of this methodology is largely dependent upon many factors such as composition of nutritional media, nature of supports. As concerns the support, the vitelline membrane (VM) is the most frequently employed one, since it favors adhesivity, flattening and nutrition of the explants<sup>2</sup>. On the other hand, its preparation is difficult and time consuming. The research for supports is therefore advisable.

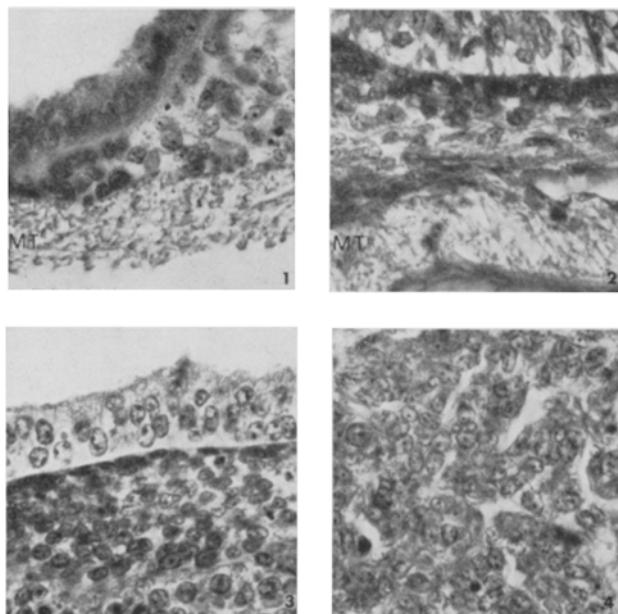


Fig. 1. 6-day lung rudiment after 5 days of incubation. Note the adhesivity of the mesenchyme over the membrana testacea (MT).  $\times 1,500$ .  
Fig. 2. 7-day stomach rudiment after 4 days in culture.  $\times 1,500$ .

Fig. 3. 6-day intestine rudiment after 4 days of incubation.  $\times 1,500$ .  
Fig. 4. 6-day liver rudiment maintained in culture for 5 days. Note the well preserved structure of epithelial cords.  $\times 1,500$ .

**Zusammenfassung.** Neues Verfahren für Häm-Isolierung durch Aceton-Fällung: Lösung in Aethylacetat-Eisessig und Auskristallisieren mit Wasserzugabe.

A. EGYED

*Department of Cell Metabolism,  
National Institute of Haematology and Blood  
Transfusion,  
Daróczi ut. 24, Budapest XI (Hungary),  
23 May 1972.*

We have observed that the membrana testacea (MT), a proteinaceous framework placed inside the egg-shell<sup>3</sup>, provides a natural support as well and easier to handle than the VM.

MT is removed under sterile conditions from unincubated eggs, rinsed in Tyrode's, cut in small pieces and then placed upon the solid media. Nutrient medium consisted of: 6 drops gelose 1% in Gey fluid, 3 drops chick embryo extract (Difco; 50% in Tyrode's), 3 drops chicken serum (Difco), and Tyrode's containing penicillin 1 drop<sup>4</sup>. Lung, liver stomach, intestine, heart, skin, kidney, limb bud rudiments removed from 6–7-day-old chick embryos have been examined both upon MT and VM. Cultures were incubated at 37 °C; fixed in Bouin fluid; serial sections were cut at 8 + 10  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin-eosin.

The different anlagen undergo a fairly good morphogenesis and differentiation over the MT (Figures 1–4). As shown in Figures 1 and 2, adhesivity to the MT is very good. Morphology of those parts which directly rest upon this support is much better when compared with the VM. One can therefore conclude than nutrition of explants is possible through the MT and occurs at a very good rate<sup>5</sup>.

**Riassunto.** È stato dimostrato che la membrana testacea costituisce un substrato idoneo e di agevole preparazione per culture organotipiche.

M. A. BODO and P. CARINCI

*Istituto di Istologia ed Embriologia generale,  
Via del Giochetto, I-06100 Perugia (Italy),  
2 May 1972.*

<sup>1</sup> E. N. WILLMER, *Cells and Tissues in Culture*, 2nd edn. ((Ed. E. N. WILLMER, Academic Press, New York 1965), vol. 4, p. 1).

<sup>2</sup> E. WOLFF, *Devel. Biol.* 3, 767 (1961).

<sup>3</sup> A. ROMANOFF and A. I. ROMANOFF, *The Avian Egg*, 2nd edn. (John Wiley and Sons, New York 1963).

<sup>4</sup> P. CARINCI and L. SIMONELLI, *Z. Anat. EntwGesch.* 135, 108 (1971).

<sup>5</sup> These studies were supported by Italian CNR grants No. 69.02110 and No. 70.01069.04.

### Zur Bestimmung der Katalaseaktivität in Bodenproben

Die Bestimmung der Aktivität mikrobiell gebildeter Enzyme im Boden ist ein häufig angewendtes Verfahren zur Charakterisierung der biologischen Aktivität des Bodens<sup>1,2</sup>. Es muss jedoch festgestellt werden, dass für viele interessierende Enzyme keine geeigneten Methoden beschrieben sind, die ihre Aktivitätsbestimmung im Boden ermöglichen.

Die Katalase, ein weit verbreitetes Enzym, das die Spaltung von Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff katalysiert, kann zwar recht gut über die spektralphotometrische und titrimetrische Bestimmung des Substratverbrauches untersucht werden<sup>3</sup>, doch sind beide Methoden nicht anwendbar, wenn die Aktivität des Enzyms in Bodenproben gemessen werden soll, da in diesem

Fall die Bodenfärbung in der Reaktionslösung stört. Es bleibt die Bestimmung des sich bildenden Sauerstoffes. Dieses ist einmal möglich im sogenannten «Katalaser», in dem der Sauerstoff volumetrisch gemessen wird<sup>3,4</sup>, oder aber mittels einer Sauerstoffelektrode.

Beide Methoden wurden zunächst auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht, indem die Sauerstoffsbildung in Ab-

hängigkeit von der vorgelegten Enzymmenge bestimmt wurde. Zur volumetrischen Messung wurde dabei zu 30 ml Versuchslösung, die das Enzym in Tris-Puffer (pH 7,2) enthielt, 1 ml einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Der entweichende Sauerstoff wird nun 1 min in einer graduierten Säule aufgefangen. Figur 1 zeigt, dass die Forderung nach linearer Abhängigkeit des gebildeten Sauerstoffes von der Enzymmenge in dem Bereich bis 2,0 mg Katalase (Merck – Darmstadt, Nr.: 5183) pro Ansatz gegeben ist.

Empfindlicher ist die Messung des Sauerstoffes mit einer Sauerstoffelektrode (wrtw-oxI 39). In diesem Fall wird nach der Zugabe des Wasserstoffperoxyds zu den 30 ml Versuchslösung die Zeit ermittelt, die benötigt wird, um 5, 10 oder 15 mg O<sub>2</sub> zu bilden. Die optimale Versuchsdauer liegt hier zwischen 10 und 20 sek. In Figur 1 sind die Ergebnisse auf ml O<sub>2</sub> pro min umgerechnet worden. Es zeigt sich, dass auch für diese Methode die lineare Abhängigkeit zwischen produziertem Sauerstoff und Enzymmenge gilt. In diesem Fall ist jedoch die Empfindlichkeit im Vergleich zum Katalaser um das 10fache erhöht.

Somit ergänzen sich beide Methoden praktisch ideal. Wird die Sauerstoffkonzentration aufgrund hoher Katalaseaktivität so hoch, dass der gebildete Sauerstoff aus der Versuchslösung entweicht, ist anstelle der Messung mit der Elektrode die Bestimmung mit Hilfe des Katalasers möglich.

Figur 2 zeigt eine Zeit-Umsatz-Kurve, gewonnen mit Versuchslösungen, die anstelle des Enzympräparates 2 g bzw. 3 g frischen Boden enthielten. Gemessen wurde die Aktivität des in der Bodenprobe enthaltenen Enzyms anhand der volumetrischen Sauerstoffbestimmung. Der Kurvenverlauf zeigt eine fortschreitende Reaktionsverzögerung, wie es für eine Reaktion erster Ordnung typisch ist. Für die Bestimmung der Katalaseaktivität in Bodenproben ist die Methode der volumetrischen Messung des entweichenden Sauerstoffes der Bestimmung mittels Sauerstoffelektrode vorzuziehen, da der apparative Aufwand erheblich geringer ist und trotzdem gut reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen sind. Bei nur geringen Katalaseaktivitäten reicht jedoch die Empfindlichkeit dieser Methode nicht aus, so dass der Einsatz der Sauerstoffelektrode notwendig wird. So ist zum Beispiel der Anteil der Katalaseaktivität einer Bodenprobe, der nicht an Bodenkolloide adsorbiert ist, nur mit der empfindlichen Methode zu messen, da er nur 0,5–1% der in der Bodensuspension gefundenen Aktivität ausmacht.

*Summary.* Two methods for the determination of catalase activity in soil samples are described.

CH. KUNZE

Botanisches Institut II der Universität,  
Senckenbergstrasse 17–21, D-63 Giessen (BR Deutschland),  
15. Mai 1972.

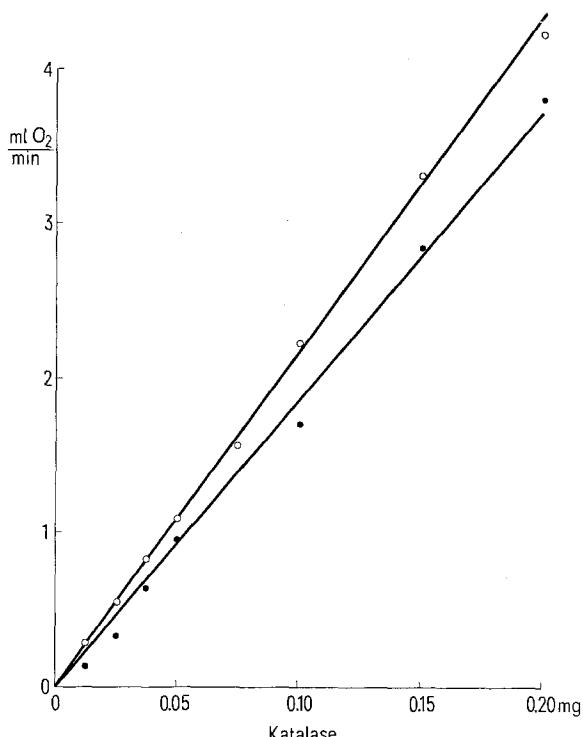


Fig. 1. Abhängigkeit der Sauerstoffsbildung von der Menge zugegebener Katalase. ●—●, gemessen mit der Sauerstoffelektrode; ○—○, gemessen im Katalaser (ml O<sub>2</sub>/min × 10-mg Katalase × 10).

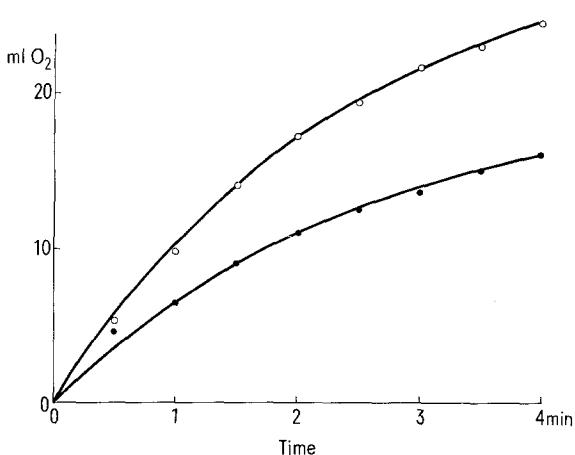


Fig. 2. Zeit-Umsatz-Kurven katalasehaltiger Bodenproben. ●—●, 2 g Boden; ○—○, 3 g Boden.

<sup>1</sup> E. HOFMANN, Umschau 53, 181 (1953).

<sup>2</sup> C. KUNZE, Zentbl. Bakt. Parasitkd. II. 125, 385 (1971).

<sup>3</sup> H. LÜCK, in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Ed. H. U. BERGMEYER; Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse 1962), p. 885.

<sup>4</sup> T. BECK, Z. PflErnähr. Bodenk. 130, 68 (1971).