

## NÉCESSITÉ DU CALCIUM DANS LA CROISSANCE DE BACTÉRIES LORSQUE LA SOURCE D'AZOTE EST UNE PROTÉINE PURE

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

Un précédent travail<sup>1</sup> a montré que le calcium est nécessaire à la stabilité et à l'activité des protéinases de diverses bactéries. On pourrait penser que si on plaçait l'une de ces bactéries dans un milieu ne renfermant comme source de carbone et d'azote qu'une protéine pure, le développement de cette bactérie, dépendant nécessairement de son activité protéolytique, devrait être influencé par la présence de calcium, dont il serait ainsi possible d'étudier le rôle dans la vie de la bactérie.

En réalité, les bactéries, quel que soit leur pouvoir protéolytique, ne se développent généralement pas dans un tel milieu; les bactéries douées de pouvoir protéolytique ne peuvent croître, le plus souvent, que si à ce milieu on ajoute une source carbonée autre que la protéine; on admet alors que le départ de la croissance bactérienne est dû aux traces de substances azotées non protéiques plus ou moins présentes dans le milieu comme impuretés, ou apportées par l'inoculum. On pense en effet habituellement que les protéinases bactériennes doivent atteindre dans le milieu une certaine concentration pour déclencher l'hydrolyse de la protéine et rendre ainsi l'azote protéique assimilable par les bactéries; or, cette protéolyse exige un ensemble de conditions, en particulier la présence de calcium qui assure la stabilité et l'activité des protéinases.

Dans le présent travail, on a étudié à ce point de vue l'influence sur la croissance de *Bacterium megatherium* des métaux suivants: Ca, Sr, Ba, Mg, introduits dans des milieux de culture contenant une source de carbone différente de la source d'azote et des sources d'azote constituées soit par des protéines proprement dites, soit par des protéines plus ou moins dégradées, soit par des sels ammoniacaux.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *I. Techniques*

##### *Bactéries*

La bactérie utilisée est *Bacterium megatherium*, souche 899, provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. Cette bactérie, cultivée dans des conditions convenables, produit une protéinase particulièrement sensible à la présence de calcium<sup>1</sup>. En outre, LWOFF ET GUTMANN<sup>2</sup> se basant sur l'observation précédente, ont déjà montré la nécessité du calcium pour la croissance de ce microorganisme dans un milieu à base

de certains échantillons de "Proteose-peptone Difco". Cette bactérie, capable d'utiliser l'azote ammoniacal, peut être cultivée sur un milieu synthétique simple.

### *Milieux de culture*

Les milieux de culture utilisés renferment des constituants fixes, apportés par une solution mère dans laquelle chacun d'eux se trouve à une concentration double de celle qu'il doit avoir dans le milieu final, et des constituants variables. Dans chaque essai, on ajoute à 5 ml de la solution mère des constituants fixes, certains des constituants variables en solution concentrée, et le volume est finalement amené à 10 ml avec de l'eau.

La nature et la concentration des constituants fixes dans le milieu final, sont les suivantes: Succinate de soude,  $5 \cdot 10^{-8} M$ ; mélange de phosphate disodique et de phosphate mono-potassique à  $p_H$  7.4,  $5 \cdot 10^{-3} M$  en phosphate; sulfate de magnésium ou chlorure de magnésium,  $5 \cdot 10^{-4} M$ ; chlorure ferrique,  $2.7 \cdot 10^{-6} M$ ; tétraborate de sodium,  $2.5 \cdot 10^{-7} M$ ; chlorure cobalteux,  $8.5 \cdot 10^{-8} M$ ; tartrate de cuivre,  $4.0 \cdot 10^{-9} M$ ; molybdate de sodium,  $5.0 \cdot 10^{-8} M$ ; chlorure manganéux,  $9.0 \cdot 10^{-7} M$ ; sulfate de zinc,  $1.5 \cdot 10^{-7} M^*$ .

Le succinate de soude a été choisi comme source de carbone plutôt que le glucose afin d'éviter une chute du  $p_H$  au cours de la croissance; dans les conditions réalisées ici, le  $p_H$  tend à augmenter de quelques dixièmes d'unités, pour atteindre au maximum la valeur de 7.8 qui convient parfaitement à l'activité protéolytique du microorganisme en question.

Le sulfate de magnésium a été généralement employé comme source commune de magnésium et de soufre. Aux dilutions réalisées, on n'observe aucune précipitation due aux ions sulfates, même en présence de baryum, sauf dans le cas des milieux contenant de la sérumalbumine. Dans ce dernier cas, on remplace le sulfate de magnésium par le chlorure de magnésium, le soufre étant alors fourni par les acides aminés sulfurés de la protéine.

En plus de ces constituants fixes, les milieux contiennent comme source d'azote soit du chlorure d'ammonium  $5 \cdot 10^{-3} M$ , soit l'une des substances protéiques indiquées ci-dessous, à raison de 1 g par litre:

*Sérumalbumine à l'état natif*: il s'agit de la fraction V ("Armour") du plasma de bœuf, stérilisée en solution concentrée (20g/litre) par filtration sur bougie Chamberland.

*Sérumalbumine dénaturée*: la solution concentrée précédente est amenée à  $p_H$  8 et stérilisée par la vapeur à  $115^\circ$  pendant 20 minutes; le  $p_H$  tombe alors à 7.5, mais l'albumine dénaturée par la chaleur reste en solution.

*Gélatine*: gélatine déminéralisée isoélectrique "Rousselot".

*Gélatine ou sérumalbumine traitées par la trypsine*: A titre de comparaison, on a utilisé également les protéines précédentes après leur avoir fait subir un début de protéolyse par la trypsine; celle-ci est de la trypsine cristallisée Worthington (contenant 50% de sulfate de magnésium); on en fait agir, pendant 12 heures à  $37^\circ$ , 2 mg (trypsine pure) dans 100 ml des solutions stériles à 20 g/litre de sérumalbumine dénaturée ou de gélatine; après action de l'enzyme, les solutions sont stérilisées de nouveau à  $115^\circ$  pendant 20 minutes, pour détruire la trypsine. La concentration de cette dernière dans le milieu final (1  $\mu g$ /10 ml) est négligeable.

*Protéose-peptone "Difco"*: Il ne s'agit pas ici d'une substance définie, mais d'un ensemble contenant tous les éléments essentiels à la vie bactérienne. Parmi ces éléments<sup>4</sup>,

\* La concentration du milieu en les éléments oligodynamiques est celle de la solution préconisée par PROVASOLI, HUTNER ET SCHATZ<sup>3</sup>, diluée 200 fois.

on doit signaler le calcium et le magnésium dont la concentration est telle qu'elle augmente approximativement d'un dixième la quantité de ces éléments dans le milieu final.

*Métaux étudiés:* Le calcium, le baryum ou le strontium sont éventuellement ajoutés aux différents milieux, sous forme de chlorure. Leur concentration y est de  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

*L'eau* utilisée pour la préparation des milieux a été distillée trois fois dans un appareil spécial en Pyrex. Le  $p_H$  final du milieu stérile est 7.4.

#### *Conditions de culture*

Les cultures sont faites dans des tubes à parois parallèles permettant la lecture directe au photomètre. Chaque tube contient 10 ml de milieu, dont on a vérifié la stérilité et la stabilité chimique avant l'ensemencement, en le maintenant 12 heures à  $37^\circ$ . L'ensemencement est fait avec une culture âgée de 12 heures, obtenue à partir d'un milieu identique à celui qui doit être étudié, mais ne contenant ni calcium, ni baryum, ni strontium. On a choisi un volume d'inoculum très petit (0.05 ml), soit 1/200 du volume total de la culture, afin de n'introduire dans le milieu que la plus petite quantité possible de matières étrangères. L'incubation est faite à  $37^\circ$ , les tubes étant constamment agités dans un thermostat à eau.

#### *Mesure de la croissance bactérienne*

On suit le degré du développement de la culture par néphélométrie en mesurant la densité optique avec un électrophotomètre de Meunier, écran rouge, épaisseur de la couche liquide 20 mm. Les chiffres lus correspondent à des unités arbitraires de l'appareil. On étudie la croissance soit par détermination du taux de croissance suivant la méthode décrite par MONOD<sup>5</sup>, soit par l'évaluation de la croissance totale. Les tableaux suivants donnent la variation de  $\log_2$  de la densité optique de la culture en fonction du temps, et expriment ainsi, directement, le taux de croissance  $\mu$  pendant les premières 12 heures d'incubation. La souche étant lysogène, la densité optique peut atteindre son maximum avant 24 heures et redescendre ensuite: parmi les chiffres lus, on choisit, pour exprimer la croissance totale; la valeur maximum atteinte dans le cours des 24 heures; il convient d'ailleurs de remarquer que dans les conditions d'aération mises en jeu, le nombre des bactéries lysées ne dépasse pas quelques unités pour cent du nombre total des bactéries présentes<sup>6</sup>.

#### *Détermination du degré de protéolyse*

Lorsque la source azotée est la sérumalbumine, on a évalué la quantité de substance protéique précipitable par l'acide trichloracétique à 5 % dans le milieu après développement de la culture: les bactéries sont éliminées par centrifugation, et on ajoute au liquide ainsi clarifié son égal volume d'acide trichloracétique à 10 %. Après 1 heure d'attente, on agite fortement le milieu, puis on fait une lecture au photomètre (filtre rouge, cuve de 5 mm).

#### *Remarques sur les milieux à source azotée protéique*

Afin de comparer entre elles les différentes sources d'azote protéique, au point de vue des liaisons peptidiques qu'elles renferment, on a effectué des dosages d'azote aminé libre selon la méthode de VAN SLYKE. Les résultats sont exprimés par le Tableau I.

TABLEAU I

TENEUR EN AZOTE AMINÉ LIBRE DE DIFFÉRENTS MILIEUX A SOURCE D'AZOTE PROTÉIQUE

| Type du milieu                           | NH <sub>2</sub> aminé libre<br>mg par litre |
|--|---|
| Sérumalbumine native                     | 2.18  |
| Sérumalbumine dénaturée                  | 2.25  |
| Sérumalbumine traitée<br>par la trypsine | 2.88  |
| Gélatine                                 | 1.28  |
| Gélatine traitée<br>par la trypsine      | 2.93  |
| Protéose-peptone                         | 32.00 <sup>4</sup>                          |

## II. Résultats expérimentaux

### Sources azotées protéiques

**Sérumalbumine:** Dans les expériences avec la sérumalbumine, on a mené parallèlement 2 séries d'essais, l'une avec sérumalbumine native, l'autre avec sérumalbumine dénaturée. Dans chaque cas, on a étudié la croissance dans le milieu soit sans addition

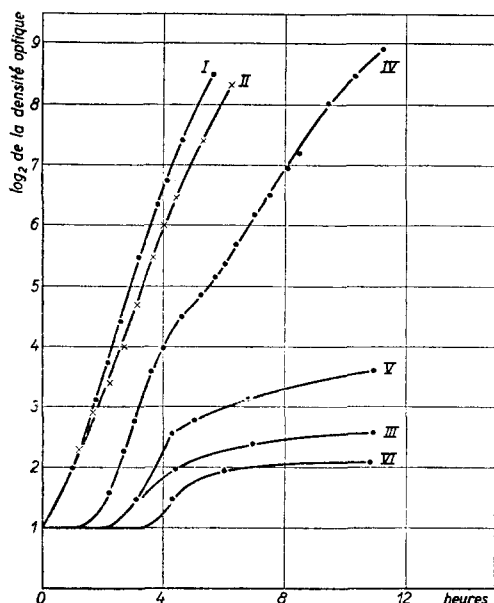


Fig. 1. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N est la sérumalbumine native

- I. Sérumalbumine traitée par la trypsine ( $\mu = 1.5$ )
- II. Sérumalbumine traitée par la trypsine + Ca
- III. Sérumalbumine seule
- IV. Sérumalbumine + Ca
- V. Sérumalbumine + Sr
- VI. Sérumalbumine + Ba

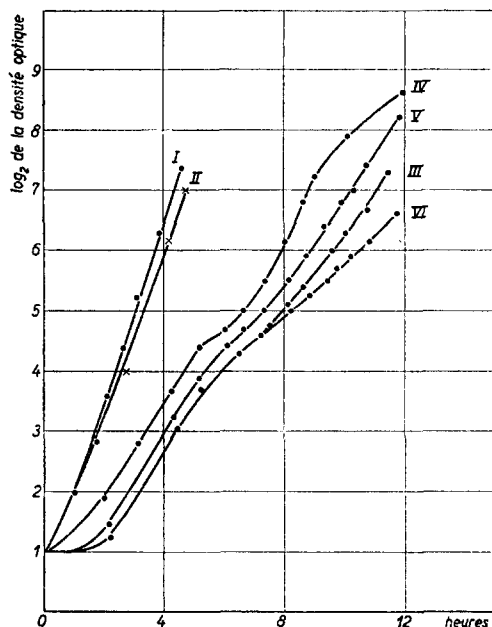


Fig. 2. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N est la sérumalbumine dénaturée

- I. Sérumalbumine traitée par la trypsine ( $\mu = 1.5$ )
- II. Sérumalbumine traitée par la trypsine + Ca
- III. Sérumalbumine seule
- IV. Sérumalbumine + Ca
- V. Sérumalbumine + Sr
- VI. Sérumalbumine + Ba

de métal, soit avec addition de calcium, baryum ou strontium. En outre, on a réalisé des essais avec un milieu contenant de la sérumalbumine préalablement traitée par la trypsine, en présence ou en absence de calcium. Les résultats obtenus sont représentés par les Figs. 1 et 2.

Dans les cas où les bactéries se trouvent en présence de sérumalbumine préalablement traitée par la trypsine, on observe une croissance très rapide, avec un taux de croissance maximum : apparemment, le calcium ne joue pas dans la croissance bactérienne de rôle autre que celui de participer à la protéolyse. Le milieu avec sérumalbumine native, additionné ou non de strontium ou de baryum, permet une très faible croissance ; additionné de calcium, il permet au contraire une croissance comparable à celle que donne la sérumalbumine traitée par la trypsine. Dans le cas de la sérumalbumine dénaturée, le milieu additionné de calcium donne des valeurs sensiblement identiques à celles données par la sérumalbumine native additionnée de calcium. Au contraire, les résultats obtenus avec les milieux à la sérumalbumine dénaturée, additionnés ou non de strontium ou de baryum, comparés aux résultats correspondants donnés par la sérumalbumine native, montrent une augmentation nette du taux de croissance. Mais la croissance obtenue à partir du milieu à la sérumalbumine native ou à la sérumalbumine dénaturée, en présence de baryum ou de strontium comme en leur absence, ne se fait pas aux dépens de la protéine présente dans le milieu. En effet, la précipitation obtenue par l'acide trichloracétique dans ces milieux après croissance et élimination des bactéries par centrifugation, est égale à celle que l'on obtient avec ces mêmes milieux stériles (Tableau II). Tandis que les cultures avec calcium, traitées de la même manière, donnent une précipitation aussi faible que celle donnée par la culture correspondante sur la sérumalbumine antérieurement traitée par la trypsine.

TABLEAU II

CROISSANCE ET PROTÉOLYSE APRÈS 24 HEURES EN PRÉSENCE DE SÉRUMALBUMINE

- SA = Sérumalbumine native  
 SAO = Sérumalbumine native nonensemencée  
 SAD = Sérumalbumine dénaturée  
 SADO = Sérumalbumine dénaturée nonensemencée  
 SADT = Sérumalbumine dénaturée traitée par la trypsine  
 SADTO = Sérumalbumine dénaturée traitée par la trypsine nonensemencée

Les chiffres sont ceux donnés directement par le photomètre.

| Milieu    | Croissance | Protéines subsistant |
|-----------|------------|----------------------|
| SAO       | —          | 124                  |
| SA        | 45         | 117                  |
| SA + Ca   | 650        | 46                   |
| SA + Sr   | 162        | 105                  |
| SA + Ba   | 38         | 111                  |
| SADO      | —          | 124                  |
| SAD       | 320        | 121                  |
| SAD + Ca  | 500        | 4                    |
| SAD + Sr  | 440        | 110                  |
| SAD + Ba  | 240        | 102                  |
| SADTO     | —          | 15                   |
| SADT      | 570        | 14                   |
| SADT + Ca | 600        | 4                    |

**Gélatine:** La Fig. 3 donne les courbes de croissance obtenues à partir de milieux renfermant la gélatine comme source d'azote. Dans certains de ces milieux, la gélatine a été traitée préalablement par la trypsine. Ces milieux ont été additionnés ou non de calcium, de baryum ou de strontium. Pour l'inoculum, on ne peut partir d'un milieu gélatine sans calcium, le premier repiquage se développant déjà trop peu; aussi a-t-on employé une culture sur sérumbalbumine dénaturée, comme dans le cas des expériences avec sérumbalbumine.

Les courbes obtenues ne montrent aucune différence sensible, en ce qui concerne le taux de croissance et la croissance globale des bactéries, entre les milieux constitués par la gélatine additionnée de calcium, la gélatine traitée par la trypsine, la gélatine traitée par la trypsine et additionnée de calcium. Dans les autres milieux: gélatine seule, gélatine additionnée de strontium ou de baryum, le taux de croissance est le même que dans le cas de la gélatine traitée par la trypsine, et ce, dans une phase initiale plus ou moins longue, après laquelle la croissance s'arrête lentement. Le baryum paraît jouer un rôle de ralentisseur, les milieux additionnés de strontium se placent dans une position intermédiaire entre ceux contenant de la gélatine seule et ceux contenant de la gélatine additionnée de calcium.

TABLEAU III

CROISSANCE APRÈS 24 HEURES EN PRÉSENCE DE GÉLATINE

G = Gélatine

GT = Gélatine traitée par la trypsine

Les chiffres sont ceux donnés directement par le photomètre.

| Milieu  | Croissance |
|---------|------------|
| G       | 22         |
| G + Ca  | 580        |
| G + Sr  | 420        |
| G + Ba  | 140        |
| GT      | 455        |
| GT + Ca | 495        |

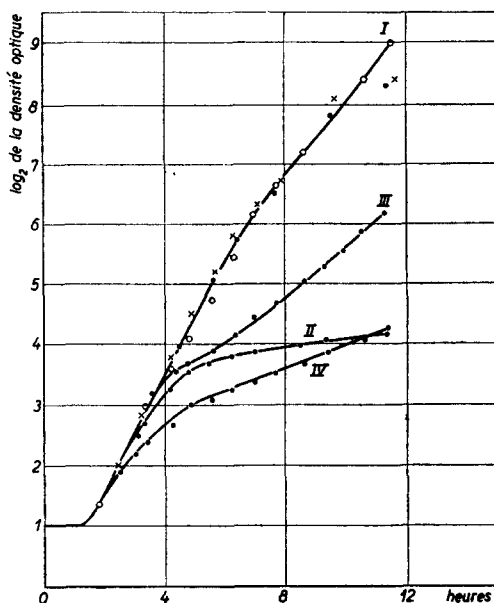


Fig. 3. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N est la gélatine

- Gélatine traitée par la trypsine ( $\mu = 1.0$ )
- I. } × Gélatine traitée par la trypsine + Ca
- o Gélatine + Ca
- II. Gélatine seule
- III. Gélatine + Sr
- IV. Gélatine + Ba

**Protéose-peptone:** Les Figs. 4 et 5 et le Tableau IV donnent les résultats obtenus avec des milieux contenant de la "protéose-peptone". Dans l'interprétation de ces résultats, on doit tenir compte du magnésium et du calcium (de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-5} M$ ) introduits dans le milieu par la substance azotée. Un essai réalisé sans addition de magnésium montre que la croissance débute alors après une période d'induction beaucoup plus longue que dans les autres essais. Dans le cas de l'addition de calcium ou de strontium, il n'y a guère de période d'induction, et on observe une augmentation du taux de croissance, tandis que dans le cas de l'addition de magnésium ou de baryum, on ne

constate aucune action sensible dans ce sens. Pour rendre plus évidente l'action du calcium et du strontium, on a fait un essai avec un milieu contenant seulement de la protéose-peptone à la concentration de 1 g par litre. Dans de telles conditions, la bactérie doit trouver sa source de carbone et d'azote, et même les éléments minéraux nécessaires, dans la protéose-peptone: un tel milieu (Fig. 5) ne permet aucune croissance en absence de calcium ou de strontium. Dans cette dernière expérience, l'inoculum était une culture sur milieu protéose-peptone complet.

TABLEAU IV

CROISSANCE APRÈS 24 HEURES EN PRÉSENCE DE PROTÉOSE-PEPTONE

PPC = Protéose-peptone avec succinate comme source de carbone

PP = Protéose-peptone seule

Les chiffres sont ceux donnés directement par le photomètre.

| Milieu                   | Croissance |
|--------------------------|------------|
| PPC                      | 455        |
| PPC + Ca                 | 455        |
| PPC + Sr                 | 380        |
| PPC + Ba                 | 315        |
| PPC (sans Mg additionné) | 420        |
| PP                       | 0          |
| PP + Ca                  | 265        |
| PP + Sr                  | 300        |

#### Source azotée minérale

Les résultats de l'expérience réalisée à partir d'un milieu contenant du chlorure d'ammonium comme source d'azote, sont exprimés par la Fig. 6 et le Tableau V. L'allure des courbes montre que l'addition des trois métaux, calcium, baryum, strontium, agit plus ou moins sur la croissance mais toujours dans le sens d'une diminu-

Fig. 5. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N et de C est la protéose-peptone

- I. } • Protéose-peptone + Ca ( $\mu = 1.75$ )  
 } × Protéose-peptone + Sr  
 II. Protéose-peptone seule

Bibliographie p. 486.

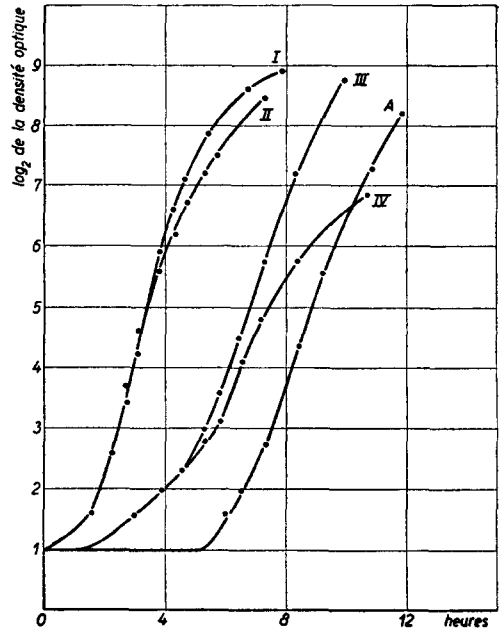
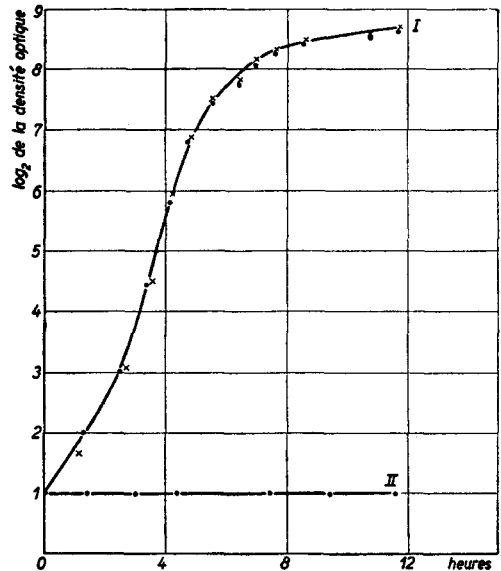


Fig. 4. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N est la protéose-peptone

- I. Protéose-peptone + Ca ( $\mu = 2.0$ )  
 II. Protéose-peptone + Sr ( $\mu = 2.0$ )  
 III. Protéose-peptone seule ( $\mu = 1.5$ )  
 IV. Protéose-peptone + Ba ( $\mu = 1.5$ )  
 A. Protéose-peptone sans Mg additionné ( $\mu = 1.5$ )



tion. Le calcium n'a guère d'effet, le baryum réduit le taux de croissance et le strontium rend à peu près nulle la croissance totale.

TABLEAU V

CROISSANCE APRÈS 24 HEURES EN PRÉSENCE DE CHLORURE D'AMMONIUM

Les chiffres sont ceux donnés directement par le photomètre.

| Milieu                             | Croissance |
|------------------------------------|------------|
| $\text{NH}_4\text{Cl}$             | 245        |
| $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Ca}$ | 171        |
| $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Ba}$ | 155        |
| $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Sr}$ | 29         |

## DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus permet de conclure que lorsque le facteur limitant de la culture est son activité protéolytique, le calcium devient un élément indispensable de sa croissance. En effet, dans les milieux contenant soit sérumalbumine native, soit

gélatine, soit aussi, bien que moins nettement, sérumalbumine dénaturée, seule l'addition de calcium permet d'obtenir des valeurs de la croissance totale et du taux de croissance qui égalent pratiquement les valeurs trouvées pour des cultures sans calcium obtenues à partir de ces mêmes protéines, mais préalablement traitées par la trypsine. La présence dans les milieux de magnésium, strontium ou de baryum à la même concentration que le calcium, et des éléments oligodynamiques aux concentrations indiquées plus haut, ne montre pas d'effet analogue. On remarque bien une croissance initiale plus ou moins importante, mais celle-ci ne dépend pas de l'activité protéolytique des bactéries; en effet, les cultures faites en l'absence de calcium donnent toujours une quantité de protéines précipitable par l'acide trichloracétique, sensiblement égale à la quantité trouvée dans les milieux stériles correspondants, tandis que dans les cultures avec calcium, les protéines précipitables disparaissent comme dans les milieux traités par la trypsine.

L'observation des cultures sur protéine dénaturée est fort intéressante. Le comportement des cultures avec calcium est pratiquement le même que dans le cas de la sérumalbumine native additionnée de calcium, mais chez les cultures sans calcium, la croissance initiale reste importante et la courbe représentative de la croissance de la culture se rapproche de la courbe obtenue à partir d'une culture avec calcium. Une telle croissance est trop importante pour être justifiée par la présence des impuretés apportées par l'inoculum; elle ne se fait pas non plus aux dépens des protéines du milieu, puisque celles-ci restent précipitables par l'acide trichloracétique. On doit donc admettre que

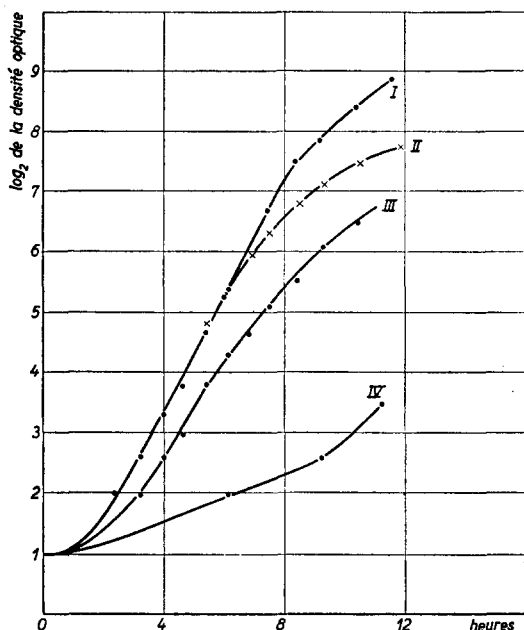


Fig. 6. Croissance de *B. megatherium* lorsque la source de N est le chlorure d'ammonium

- I. Chlorure d'ammonium seul ( $\mu = 1.0$ )
- II. Chlorure d'ammonium + Ca
- III. Chlorure d'ammonium + Ba
- IV. Chlorure d'ammonium + Sr

les bactéries trouvent dans les protéines dénaturées une source d'azote autre que celle qui nécessite une protéolyse. Cette croissance en absence de calcium est beaucoup plus importante avec la sérumalbumine dénaturée qu'avec la gélatine, ce qui peut correspondre soit à la différence dans la composition chimique de ces deux protéines, soit plutôt au fait que la gélatine a été purifiée par dialyse.

Dans l'interprétation des résultats obtenus avec la protéose-peptone, on doit non seulement penser qu'il ne s'agit pas là d'un matériel pur, mais aussi que la protéose-peptone n'est pas une protéine, mais un ensemble de substances résultant des premiers stades de la protéolyse. Une partie au moins de ce matériel doit être attaquable par les peptidases dont l'action n'est pas liée à la présence du calcium dans le milieu. On ne saurait donc s'attendre à ce qu'une addition de calcium donne des résultats aussi nets que ceux obtenus avec les protéines. Toutefois, la disparition de la période d'induction et l'augmentation du taux de croissance sont évidents. Le rôle du calcium se manifeste ici clairement, si on impose aux bactéries des conditions de culture plus rigoureuses, en éliminant le succinate de sodium; la protéose-peptone devient alors source à la fois de carbone et d'azote. Des essais préliminaires analogues effectués sur des milieux avec les protéines, avaient été négatifs, même après addition de calcium. Tandis que dans le cas de la protéose-peptone, l'addition de calcium et même de strontium, donne lieu à une croissance normale. En l'absence de ces métaux, la croissance ne s'amorce même pas malgré la présence de toutes les autres substances nécessaires, notamment du magnésium.

L'expérience réalisée avec le chlorure d'ammonium n'est pas tout à fait comparable aux expériences faites sur les autres milieux; la différence entre les milieux avec protéines et le milieu minéral dépassant le phénomène de protéolyse. Mais l'examen des courbes permet pourtant de tirer quelques conséquences du comportement des trois métaux alcalino-terreux. Le calcium ne présente ici guère d'influence activatrice ou inhibitrice: ceci semble confirmer qu'il ne joue aucun rôle en dehors de son pouvoir activateur sur la protéolyse. L'action inhibitrice du baryum se manifeste d'une manière plus ou moins évidente dans tous les milieux, tandis que le strontium, inhibiteur puissant dans ce cas, renverse ainsi le rôle qu'il a dans la protéolyse. Ainsi le strontium, dont on connaît déjà<sup>1</sup> la faible action activatrice sur les protéinases bactériennes et dont on a vu ici l'influence sur les milieux contenant des protéines, manifeste dans les milieux minéraux un effet inhibiteur.

Nous sommes heureux de remercier ici MM. A. LWOFF ET J. MONOD de l'Institut Pasteur, de l'intérêt qu'ils n'ont pas cessé de manifester pour le présent travail.

#### RÉSUMÉ

*B. megatherium* a été cultivé dans des milieux ne comportant comme source d'azote que l'une des substances suivantes: sérumalbumine native, sérumalbumine dénaturée, sérumalbumine traitée par la trypsine, gélatine, gélatine traitée par la trypsine, "protéose-peptone Difco", la source de carbone étant du succinate de sodium, et en outre, dans des milieux ne comportant comme source d'azote et de carbone, que de la protéose-peptone Difco.

A ces milieux ont été ajoutés ou non, à la concentration de  $5 \cdot 10^{-4}$  M, Ca, Sr ou Ba. Les résultats obtenus montrent que lorsque le facteur limitant le développement de la culture est l'activité protéolytique des bactéries, le calcium devient un élément indispensable de la croissance. Le strontium n'exerce alors qu'une action très faible, celle du baryum est nulle.

*Bibliographie p. 486.*

Lorsque les bactéries sont cultivées en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  comme source d'azote, le calcium ou le baryum n'ont guère d'effet sur la croissance, alors que l'action du strontium se manifeste par une inhibition très nette.

#### SUMMARY

*B. megatherium* has been grown on media containing as the only source of nitrogen one of the following substances: native, denatured, or trypsin-treated serum albumin, gelatin, trypsin-treated gelatin, "proteose-peptone Difco". The source of carbon was sodium succinate. Media were also used which contained only "proteose-peptone Difco" as source for both nitrogen and carbon. These media were used with or without the addition of Ca, Sr, or Ba at a concentration of  $5 \cdot 10^{-4} M$ .

The results show that when the factor limiting the development of the culture is the proteolytic activity of the bacteria, Ca is indispensable for growth. Under these conditions, Sr is only slightly active and Ba is inactive.

When the bacteria are grown in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as source of nitrogen, Ca and Ba have scarcely any effect on the growth, while Sr has an inhibitory effect.

#### ZUSAMMENFASSUNG

*B. megatherium* wurde auf Nährböden gezüchtet, die als einzige Stickstoffquelle eine der folgenden Substanzen enthielten: natives, denaturiertes, oder mit Trypsin vorbehandeltes Serumalbumin, Gelatine mit oder ohne Trypsin-Vorbehandlung, "Proteose-Pepton Difco".

Als Kohlenstoffquelle wurde Natriumsuccinat verwendet. Ausserdem wurden Nährböden gebraucht, die als Stickstoff- und als Kohlenstoffquelle Proteose-Pepton Difco enthielten. Diese Nährböden wurden mit und ohne Zusatz von  $5 \cdot 10^{-4} M$  Ca, Sr oder Ba geprüft.

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass da, wo die proteolytische Aktivität der Bakterien die Entwicklung der Kultur hemmt, Calcium für das Wachstum unbedingt notwendig ist. Strontium wirkt unter diesen Umständen nur schwach, Barium gar nicht. Wenn die Bakterien in Gegenwart von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Stickstoffquelle gezüchtet werden, dann haben Calcium und Barium keine Wirkung auf das Wachstum, während Strontium dasselbe hemmt.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- <sup>2</sup> A. LWOFF ET A. GUTMANN, *Ann. Institut Pasteur*, 78 (1950) 711.
- <sup>3</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER, A. SCHATZ, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 69 (1948) 279.
- <sup>4</sup> New-York State Health Dept., 54th Annual Report, (1933) 72.
- <sup>5</sup> J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann, Paris 1942.
- <sup>6</sup> A. LWOFF, L. SIMINOVITCH ET N. KJELDGAARD, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1919.

Reçu le 31 juillet 1950