

generally applicable to other supposed inducers. This work was supported by a grant from the Illinois Division of the American Cancer Society.

SUSUMU NAGAI and HIDEKO NAGAI

Department of Biology, Institute of Polytechnics, Osaka City University, Kita-Ku, Minami-ogi-machi, Osaka (Japan), April 8, 1958.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer Nährlösung, in der 2prozentiges Glycerin den Zucker ersetzte, wurde ein neues und vereinfachendes Verfahren gefunden, die durch Acriflavin bedingte Induktion der Atmungsunfähigkeit von Hefe zu prüfen. Während die normalen, das heisst atmungsfähigen Zellen sich in dieser Nährlösung vermehren, tun dies die atmungsunfähigen Zellen nie. Eine bemerkenswerte Zunahme der atmungsunfähigen Zellen wurde bei normalen Hefekulturen in Glycerin-Nährlösung nach Zusatz von verschiedenen Konzentrationen von Acriflavin trotz der nachteiligen Bedingungen beobachtet.

Produktion von Acetylmethylkarbinol durch Aktinomyzeten

Aus unserer früheren Arbeit<sup>1</sup> geht hervor, dass der Aktinomyzet *Streptomyces erythreus* während der Submerskultivierung eine geringe Menge von Acetylmethylkarbinol produziert, die durch den Zusatz von Arsenit wesentlich gesteigert wird. Die Erhöhung der Acetylmethylkarbinolproduktion führt dabei zu einer intensiven

Störung der Biosynthese des Erythromyzins. Um festzustellen, ob die Fähigkeit, das Acetylmethylkarbinol zu bilden, unter den Aktinomyzeten allgemein verbreitet ist, studierten wir seine Produktion in An- und Abwesenheit von Arsenit bei den Aktinomyzeten *Streptomyces noursei*, *S. griseus*, *S. antibioticus*, *S. rimosus*, *S. aureofaciens*, *S. coelicolor* und *S. olivaceus*.

Die Bestimmung des Acetylmethylkarbinols, der Brenztraubensäure und der Fähigkeit der Fermentationsflüssigkeit, Bisulfit zu binden (ausgedrückt in mg von Acetaldehyd), wurde ebenso wie in den vorhergehenden Arbeiten durchgeführt<sup>2</sup>.

Die Tabelle zeigt, dass das Acetylmethylkarbinol, unter den von uns angewandten Bedingungen, in Abwesenheit von Natriumarsenit nur von den Aktinomyzeten *S. erythreus*, *S. antibioticus*, *S. aureofaciens* und *S. olivaceus* produziert wird. Bei *Streptomyces aureofaciens* war die Acetylmethylkarbinolkonzentration kleiner als 50 µg/ml, bei *S. erythreus*, *S. antibioticus* und *S. olivaceus* wurde das Acetylmethylkarbinol je nach dem Stamme in Konzentrationen von 150 bis 360 µg/ml synthetisiert. Die Anhäufung grösserer Mengen von Pyruvat und «Acetaldehyd» wurde dabei nur bei *S. erythreus* festgestellt.

In Anwesenheit von Arsenit wurde die Produktion von Acetylmethylkarbinol und die Anhäufung von Pyruvat und «Acetaldehyd» durch *S. erythreus*, *S. antibioticus*, *S. aureofaciens* und *S. olivaceus* wesentlich erhöht. Bei den Aktinomyzeten *S. noursei*, *S. griseus*, *S. rimosus* und *S. coelicolor* erhöhte der Zusatz von Arsenit die Anhäufung von Pyruvat und «Acetaldehyd» mehrfach und induzierte die Biosynthese von Acetylmethylkarbinol.

Zur maximalen Anhäufung von Pyruvat und «Acetaldehyd» kam es bei allen untersuchten Aktinomyzeten vor der maximalen Produktion von Acetylmethylkarbinol, und bei der Erhöhung der Acetylmethylkarbinolsynthese

<sup>1</sup> V. MUSÍLEK und V. ŠEVČÍK, Naturwissenschaften 45, 215 (1958).

<sup>2</sup> V. MUSÍLEK und V. ŠEVČÍK, Naturwissenschaften 45, 215 (1958); 45, 86 (1958); Čs. mikrobiologie 3, 205 (1958).

Produktion von Acetylmethylkarbinol durch verschiedene Aktinomyzeten

Typen der benutzten Nährmedien:  
A: Glukose, Maisextrakt, CaCO<sub>3</sub>.      B: Glukose, Sojamehl, Maisextrakt, CaCO<sub>3</sub>.      C: Glukose, Laktose, Maisextrakt, CaCO<sub>3</sub>.  
D: Sacharose, Melasse, Maisextrakt, CaCO<sub>3</sub>.      E: Glukose, Stärke, Maisextrakt, CaCO<sub>3</sub>.  
Kultivierung auf einer reziproken Schüttelmaschine bei 28° C.

Stamm	Typ des Nährmediums	Zusatz	Maximale Konzentration von		
			Acetylmethylkarbinol µg/ml	Brenztraubensäure mg/ml	«Acetaldehyd» mg/ml*
<i>Streptomyces erythreus</i> . . . . .	A	—	150	2,8	0,05
		Arsenit 4·10 <sup>-4</sup> M	2300	5,9	1,69
<i>Streptomyces noursei</i> . . . . .	B	—	—	0,35	0,1
		Arsenit 2·10 <sup>-5</sup> M	210	0,95	0,92
<i>Streptomyces griseus</i> . . . . .	A	—	—	0,08	0,09
		Arsenit 5·10 <sup>-4</sup> M	90	0,45	0,33
<i>Streptomyces antibioticus</i> . . . . .	C	—	175	0,05	0,07
		Arsenit 1·10 <sup>-3</sup> M	500	0,08	0,37
<i>Streptomyces aureofaciens</i> . . . . .	D	—	40	0,09	Spuren
		Arsenit 1·10 <sup>-5</sup> M	400	1,55	1,03
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,03%	350	0,07	Spuren
<i>Streptomyces rimosus</i> . . . . .	E	—	—	0,18	Spuren
		Arsenit 7,5·10 <sup>-4</sup> M	50	0,60	0,33
<i>Streptomyces coelicolor</i> . . . . .	C	—	—	0,03	0,18
		Arsenit 5·10 <sup>-4</sup> M	100	0,3	0,29
<i>Streptomyces olivaceus</i> . . . . .	E	—	360	0,36	0,15
		Arsenit 1·10 <sup>-3</sup> M	1800	2,0	0,95

\* Die Fähigkeit der Fermentationsflüssigkeit, Bisulfit zu binden, ist in mg von Acetaldehyd ausgedrückt.

sank die Konzentration von Pyruvat und «Acetaldehyd». Man kann daraus folgern, dass das Acetylmethylkarbinol bei diesen Aktinomyzeten aus Pyruvat und Acetaldehyd synthetisiert wird, ähnlich wie wir bei *S. erythreus* (auch aus freiem Acetaldehyd allein) *in vitro* festgestellt haben<sup>1</sup>.

Im Falle von *S. rimosus* und *S. coelicolor* liess sich die Acetylmethylkarbinolbiosynthese ausser durch den Zusatz von Arsenit auch durch die Wegnahme von Ca-Karbonat aus dem Fermentationsmedium induzieren. Die dadurch beeinflusste Herabsetzung des pH-Wertes wurde von einer Erhöhung der Acetylmethylkarbinolproduktion begleitet. Eine ähnliche wesentliche Erhöhung der Acetylmethylkarbinolsynthese, jedoch ohne Sinken des pH-Wertes, wurde im Falle von *S. aureofaciens* durch einen Zusatz von 0,03 bis 0,3% sekundären Kaliumphosphates zum Kulturmedium erreicht (Tabelle). Dieses Resultat bietet eine biochemische Erklärung für den schon früher bekannten<sup>3</sup> negativen Einfluss von Phosphat auf die Biosynthese von Chlortetracyclin.

Unsere Resultate zeigen, dass die Fähigkeit, das Acetylmethylkarbinol zu produzieren, bei den Aktinomyzeten offensichtlich beträchtlich verbreitet ist. Die Acetylmethylkarbinolbiosynthese lässt sich dabei durch entsprechende Kulturbedingungen induzieren oder mehrfach erhöhen. Aus diesen Befunden ergibt sich vielleicht die Möglichkeit, dass, ähnlich wie bei den Bakterien, auch bei den Aktinomyzeten ihre Fähigkeit zur Acetylmethylkarbinolbildung zur systematischen Kennzeichnung benutzt werden könnte. Die Erhöhung der Acetylmethylkarbinolbiosynthese durch Arsenit ist sehr wahrscheinlich die Folge der Störung der oxydativen Dekarboxylierung von Pyruvat zu Acetat, die durch eine adaptive Intensivierung der anoxydativen Umwandlung von Pyruvat unter anderem auch zu Acetylmethylkarbinol ersetzt wird.

V. MUSÍLEK, V. ŠEVČÍK, M. MUSÍLKOVÁ\*,  
J. ROKOS und P. PROCHÁZKA

Biologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, und Forschungsinstitut für Antibiotika\*, Roztoky bei Prag (Tschechoslowakei), 16. Mai 1958.

#### Summary

The production of acetylmethylcarbinol by various strains of actinomycetes was established. The biosynthesis of acetylmethylcarbinol depends largely on the composition of the fermentation medium and on the presence of arsenite, which regulates the metabolism of pyruvic acid. In the case of *Streptomyces aureofaciens* the stimulating effect of phosphate on the production of acetylmethylcarbinol gives a partial explanation of the well-known negative effect of phosphate on the biosynthesis of chlortetracycline.

<sup>3</sup> G. BIFFI, G. BORETTI, A. DI MARCO und P. PENNELLA, Appl. Microbiol. 2, 288 (1954).

### A Study of the Temperature Dependence of Radiation Sensitivity of Dry Spores of *Bacillus Megaterium* Between 5° K and 309° K<sup>1</sup>

The temperature dependence of effects of X-rays on biological systems has been the subject of several recent

investigations<sup>2</sup>; however, none of these studies included temperatures below 77° K. In view of the theoretical importance of the temperature dependence relationship, the temperature range was extended in this study to 5° K to provide a complete description of it. A brief report has appeared previously<sup>3</sup>.

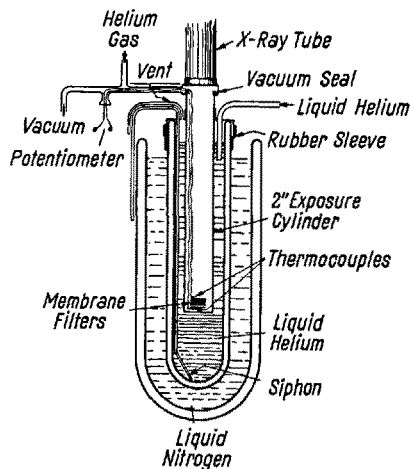


Fig. 1.—Diagram of the apparatus for controlling temperature during irradiation.

Spores from two nonlysogenic strains of *Bacillus megaterium* (No. 337, Welshimer and ATCC No. 8245) were mounted in known concentrations on membrane filters and dried *in vacuo* according to the method of POWERS *et al.*<sup>4</sup>. The X-ray source was a Machlett OEG 60 tube, with a tungsten target and a beryllium window, operated at 50 kvp and 45 ma without added filtration (HVL 0.070 mm Al). The irradiation chamber was a gas tight stainless steel cylinder, 5 cm by 41 cm, attached directly to the X-ray tube (Fig. 1). The membranes carrying the spores on their surfaces were irradiated in stacks of five at a target distance of 45 cm at a dose rate of 2800 r/min (measured in air with a windowless ionization chamber) to the first filter (2400 r/min to the fifth filter). Anaerobic conditions were achieved in the exposure chamber by evacuating to 1 mm Hg pressure and flushing with purified helium twice before sealing the chamber at one atmosphere of He at 25°C. The temperature of the spores was fixed by immersing the exposure chamber in appropriate liquid and slush baths. The double Dewar apparatus illustrated in Figure 1 was designed to meet the requirements of liquid helium, but was applicable to the other baths. The temperature of the membrane filters was monitored during all irradiations with two thermocouples in contact with the spore-bearing filters. The temperatures at which experimental points were obtained were observed to be as follows: 309° K (water bath); 299° K (water bath); 274° K (ice water); 253° K (NaCl-saturated ice water slush); 196° K (dry ice-acetone); 152° K (95% ethanol slush); 79° K (liquid nitrogen); 64° K (nitrogen slush); 21° K (liquid hydrogen); 6° K (liquid helium); and 5° K (liquid helium).

<sup>2</sup> B. RAJEWSKY, Brit. J. Radiol. 25, 550 (1952). – W. R. ADAMS and E. POLLARD, Arch. Biochem. Biophys. 36, 311 (1952). – C. S. BACHOFER, C. F. EHRET, S. MAYER, and E. L. POWERS, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 39, 744 (1953). – T. HOUTERMANS, Z. Naturf. 9b, 600 (1954); 11b, 636 (1956).

<sup>3</sup> R. B. WEBB, C. F. EHRET, and E. L. POWERS, Radiation Res. 1, 459 (1957).

<sup>4</sup> E. L. POWERS, C. F. EHRET, and A. BANNON, Appl. Microbiol. 5, 61 (1957).

<sup>1</sup> This work was performed under the auspices of the U. S. Atomic Energy Commission. – The assistance and advice of Dr. DARRELL W. OSBORNE, Chemistry Division, Argonne National Laboratory, and his colleagues in producing and handling liquid He and liquid H are gratefully acknowledged.