

Table IV. Sensitivity of heat-shocked wheat roots to high concentrations of sodium chloride

Heat shock	Living roots (%) NaCl added (%)				
	0.5	0.9	1.0	1.2	1.4
No	100	100	100	100	60
Yes	100	100	65	5	0

After the heat shock (or in the control series: no shock) the roots were placed for 5 min in the nutrient solution with NaCl added. Before and after the treatment with heat shock and NaCl the plants were incubated at 25°C.

These observations may indicate that the influence of kinetin on the sensitivity of cells to heat shock depends on how long the kinetin treatment has lasted and on the intensity of the metabolism of the cell. This may explain the observations reported here, that kinetin under certain conditions protects against and under others sensitizes to a supraoptimal environmental temperature.

Zusammenfassung. Die Hitzesensibilisierung von Weizenwurzelmeristemen kann durch Kältebehandlung oder Kinetinzugaben zumindest teilweise rückgängig gemacht werden.

I. SKOGQVIST and N. FRIES

Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, S-75121 Uppsala (Sweden), 31 March 1970.

The Effects of Nicotinamide on Heat Resistance of Spores of *Bacillus cereus* T

Heat resistance is one of the most important characteristics of the bacterial endospore. Since the discovery of dipicolinic acid (DPA) in the bacterial endospores¹, evidence has been steadily accumulated to implicate DPA in the heat resistance of the bacterial endospores. The protection of some enzymes and proteins by DPA against heat denaturation²⁻⁴ has also been demonstrated. Indirect evidence has also been adduced through the production of DPA deficient spores sensitive to heat by using imbalanced media⁵, specific inhibitors⁶ and DPA less mutants⁷. In the latter two cases the effects could be reversed by exogenous DPA.

Recently UPRETI et al.⁸ have shown that picolinamide specifically inhibits DPA synthesis leading to the production of DPA deficient heat sensitive spores. The effect of picolinamide cannot be reversed by zinc. DPA was shown to activate the soluble reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) oxidase of spores by electron accepting mechanism⁹ and also to protect it against heat inactivation². It was thought that picolinamide may be interfering with the role of DPA as an electron acceptor in the spore. Therefore a study of the effects of nicotinamide was undertaken.

Materials and methods. *Bacillus cereus* strain T was used throughout these investigations. The active culture technique was used and the organism was allowed to grow and sporulate in a glucose yeast extract-salts medium (G medium). Total viable counts (TVC) were made by plating suitable dilutions on nutrient agar. Octyl alcohol kills vegetative cells and germinated spores of

this organism. Octyl alcohol stable counts (OSC) were made by using octyl alcohol saturated water for dilution in making plate counts. Heat stable counts (HSC) were made by plating suitable dilutions, after first heating the suspension at 80°C for 30 min. The OSC gives the total number of spores while the HSC gives the number of heat resistant spores in the culture.

Results and discussion. The effects of nicotinamide and nicotinic acid on heat stability are given in Table I. The effects of exogenous DPA on nicotinamide induced heat sensitivity are given in Table II. The results show that whereas nicotinic acid has no effect, nicotinamide

Table II. Effect of DPA on the production of heat sensitive spores of *Bacillus cereus* T in the presence of nicotinamide

Addition to G medium	After 30 h incubation		
	OSC (ml)	HSC (ml)	HSC (%)
None (Control)	2.1×10^8	2.2×10^8	100
Nicotinamide (2 mg/ml)	1.9×10^8	5.0×10^5	0.26
DPA (0.5 mg/ml)	2.0×10^8	2.2×10^8	100
Nicotinamide (2 mg/ml) + DPA (0.5 mg/ml)	2.0×10^8	5.5×10^5	0.27

Table I. Effect of nicotinamide and nicotinic acid on heat stability of spores of *Bacillus cereus* T

Additions to G medium	After 30 h incubation ^a			
	TVC (ml)	OSC (ml)	HSC (ml)	HSC (%)
None (Control)	2.0×10^8	2.1×10^8	2.1×10^8	100
Nicotinamide (2 mg/ml)	2.1×10^8	2.2×10^8	6.0×10^5	0.27
Nicotinic acid (2 mg/ml)	1.0×10^8	1.0×10^8	1.0×10^8	100

^a Incubated on a rotary shaker at 30°C ($\pm 1^\circ$ C).

¹ J. F. POWELL, *Biochem. J.* **54**, 210 (1953).

² H. HALVORSON and C. HOWITT, *Spores II* (Burgess Publishing Co., Minneapolis 1961), p. 149.

³ Y. HACHISUKA, *J. Biochem.* **61**, 659 (1967).

⁴ Y. MISHIRO and M. OCHI, *Nature* **211**, 1190 (1966).

⁵ B. D. CHURCH and H. HALVORSON, *Nature* **183**, 124 (1959).

⁶ K. G. GOLLAKOTA and H. O. HALVORSON, *J. Bact.* **85**, 1386 (1963).

⁷ J. WISE, A. SWANSON and H. O. HALVORSON, *J. Bact.* **94**, 2075 (1967).

⁸ G. C. UPRETI, R. P. SINGH, J. VERMA, P. L. BHATIA and K. G. GOLLAKOTA, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **35**, 611 (1969).

⁹ R. H. DOI and H. HALVORSON, *J. Bact.* **81**, 642 (1961).

¹⁰ H. O. HALVORSON, *J. appl. Bact.* **20**, 305 (1957).

specifically inhibits the synthesis of DPA and the development of heat resistance. However, exogenous DPA cannot reverse the nicotinamide induced heat sensitivity. Further, spores produced in the presence of nicotinamide contained as much as 40% of the normal DPA as determined by the method of JANSSEN et al.¹¹. It has been shown that if the DPA content of the spore is above 1.2%, viability is independent of the DPA content, and that, as the level of DPA is reduced below 1.2%, the proportion of non-viable spore-like bodies increased.

In the literature there has been no reference so far to the role of DPA as an electron acceptor in the heat resistance of bacterial endospores. The results obtained in our laboratory with picolinamide and nicotinamide suggest that in the heat resistance of bacterial endospores, the role of DPA as an electron acceptor may be important^{12, 14}.

Zusammenfassung. Nicotinamide hemmt die Synthese von Dipicolinsäure (DPA) und die Entwicklung der Hitzeresistenz von *Bacillus cereus* T Sporen. Nicotinsäure hat keinen Effekt. Zugabe von DPA kann die Hitzsensitivität, die durch Nicotinamide induziert wurde, nicht rückgängig machen.

11 F. W. JANSSEN, A. J. LUND and L. E. ANDERSON, *Science* 127, 26 (1958).

12 This research has been financed in part by a grant made by the United States Department of Agriculture under No. P.L.480. Sincere thanks are also due to Dr. K. V. B. R. TILAK, for the help rendered during the preparation of the manuscript.

13 Request for reprints are to be addressed to the Librarian, U.P. Agricultural University, Pantnagar (Naini Tal, U.P., India).
14 Journal Series Publication No. 244 Experiment Station, U.P. Agricultural University, Pantnagar, India.
15 Present address: Deptt. of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

16 F. CHEVALLIER, M. BRIÈRE, F. SERREL et M. CORNU, *J. Physiol.*, Paris 54, 701 (1962).

17 J. M. KINNEY, A. P. MORGAN, F. S. DOMINIQUE et K. J. GILDNER, *Metabolism* 13, 205 (1964).

18 M. BAGGIOLINI, *Experientia* 12, 731 (1965).

19 B. M. TOLBERT, M. KIRK et F. UPHAM, *Rev. scient. Instrum.* 30, 116 (1959).

20 G. V. LEROY, G. T. OKITA, E. C. TOCUS et D. CHARLESTON, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 7, 273 (1960).

PRO EXPERIMENTIS

Techniques simultanées de mesures: CO₂(C¹⁴O₂) élimination urinaire et activité motrice chez la souris dans l'expérimentation métabolique des amphétamines

La dégradation métabolique des médicaments marqués au C¹⁴ aboutit, dans de très nombreux cas, à la formation de C¹⁴O₂, éliminé par voie expiratoire. La vitesse et le taux de cette dégradation dépendent de la structure moléculaire du produit et de la position du marquage. Quoique cette voie d'élimination a un caractère secondaire, sa mesure quantitative est nécessaire à l'établissement de tout bilan.

La mesure du CO₂ expiratoire permet d'établir l'activité spécifique du C¹⁴O₂, ainsi que l'influence du médicament et de la dose administrée sur le métabolisme basal. Des dispositifs permettant d'effectuer ces mesures ont déjà été décrits dans la littérature¹⁻⁴. Ils utilisent notamment pour la mesure de la radioactivité des compteurs G.M. ou des chambres d'ionisation. Ces dernières, d'une grande sensibilité instantanée, présentent un certain nombre d'inconvénients, notamment la nécessité d'un calibrage et une importante dérive.

Dans nos études, le caractère quantitatif de la mesure de la radioactivité du C¹⁴O₂ prime celle de la sensibilité instantanée. Cette mesure s'effectue par scintillation liquide après absorption du CO₂ par l'éthanolamine⁵; elle est quantitative et d'une grande sensibilité. Le CO₂ expiratoire est mesuré par infrarouge.

La cage métabolique permet de collecter séparément l'élimination urinaire et fécale; elle est munie, entre autre, d'un dispositif de mesure de l'activité motrice de l'animal d'expérience. L'ensemble de l'appareil comporte les éléments suivants (Figure): Une cage métabolique de Roth, permettant l'alimentation de l'animal en nourriture et en eau. Les urines et les fèces peuvent être collectées séparément. La cage est alimentée en air par une pompe à membrane, assurant un débit de 0,5 l/min dans le cas de la souris, et de 1 l/min pour le rat. Le débit est mesuré par un débitmètre électronique (Hastings Mass Flowmeter), et cette information est enregistrée. La régulation

du débit s'effectue par un dispositif électronique utilisant l'information du débitmètre pour asservir la pompe à membrane. La température de l'air circulant peut être réglée à partir de la température ambiante jusqu'à 45°C par un dispositif électrique asservi au thermomètre de mesure. Deux rotomètres BROOKS SHO-150 en amont et en aval de la cage métabolique permettent d'évaluer une éventuelle chute de débit. La surpression à l'intérieur de la cage métabolique est d'environ 5 mm Hg. Après son passage dans la cage métabolique, l'air est desséché sur Cl₂Ca contenu dans un cylindre de 5×40 cm Ø, incliné à 45°C. La mesure du CO₂ s'effectue par un appareil URAS-Medical (Hartmann et Braun AG, Frankfurt/Main, Allemagne). Détermination par infrarouge, mesure de 0,1 à 1% en volume de CO₂ et enregistrement. La calibration s'effectue par un mélange gazeux 0,5% CO₂, 99,5N. La mesure de la radioactivité du C¹⁴O₂ s'effectue par scintillation liquide après absorption quantitative du CO₂ par une solution d'éthanolamine/méthanol⁶. La mesure de l'oxygène absolu de 21 à 60% en volume et différentiel (21 à 18% en volume) s'effectue par un appareil «Doppeloxytest» (Hartmann et Braun AG, Frankfurt/Main, Allemagne). La mesure de la radioactivité du C¹⁴O₂ s'effectue par scintillation liquide après

1 B. M. TOLBERT, M. KIRK et F. UPHAM, *Rev. scient. Instrum.* 30, 116 (1959).

2 G. V. LEROY, G. T. OKITA, E. C. TOCUS et D. CHARLESTON, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 7, 273 (1960).

3 F. CHEVALLIER, M. BRIÈRE, F. SERREL et M. CORNU, *J. Physiol.*, Paris 54, 701 (1962).

4 J. M. KINNEY, A. P. MORGAN, F. S. DOMINIQUE et K. J. GILDNER, *Metabolism* 13, 205 (1964).

5 M. BAGGIOLINI, *Experientia* 12, 731 (1965).