

vitamins at 29°C⁹. The aeration rate was 0.57 l air/l/min. Methanol was added as a vapor to the aeration air. Cells were harvested at various intervals in the course of 62 h.

After centrifugation the cells were washed with 0.067 M phosphate buffer pH 5.8, with addition of 0.09 M NaCl. The pellet was resuspended in a mixture of 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde. After 2 h at 20°C, the cells were washed twice, and incubated in 1% OsO₄ for 16 h at 4°C, then washed twice and embedded in 2% agar. All the treatments mentioned above were carried out in phosphate buffer/NaCl. The cells were dehydrated in an alcohol series, stained with 1.5% uranyl acetate for 1.5 h at the 50% alcohol step, and finally embedded in Epon. Thin sections were cut with an LKB microtome, poststained with 2% uranyl acetate for 2 min, with Reynolds lead citrate for 5 min, washed, and finally examined with a Philips E.M. 201.

Results and discussion. We have confirmed the observation of Osumi et al.⁸ that the occurrence of microbodies in yeast depends on the age of the culture and on the substrate for growth. In our studies they have not been found in glucose-grown cells but, in methanol-grown cells of *Pichia pastoris*, varying numbers up to 8 were observed (Figures 1 and 2), with highest frequencies in exponentially growing cells. These microbodies are separated from each other and from the cytoplasm by a single unit membrane, and are often more or less rectangular. Osumi et al.⁸ showed these organelles to be present in various yeasts grown on hydrocarbons and in *Kloeckera* sp. grown on methanol, and van Dijken et al.¹⁰ detected microbodies in the methanol-assimilating yeasts *Hansenula polymorpha*, *Pichia pinus* and *Candida boidinii*.

Striated or crystalline areas were observed occasionally depending on the plane of section (Figures 3 and 4). Contrary to results obtained with microbodies from animal or plant cells^{1,6}, the crystalline structure was evenly distributed over the entire volume of microbodies in methanol-assimilating yeasts, and may be responsible for their rectangular shape. These observations confirm the results of van Dijken et al.¹⁰ with freeze-etched preparations of *Hansenula polymorpha* from a chemostat culture. Crystalline structures could, as reported in this paper, only be obtained by fixation of the cells with paraformaldehyde/glutaraldehyde. KMnO₄ fixation demonstrated the outlines of microbodies, but did not reveal their internal structure, as was also found by Osumi et al.⁸.

The periodicity calculated from striated areas (Figure 3) was about 125 Å, and varied between 95 and 105 Å in

crystalline regions. The nature of the enzymes present in yeast microbodies, apart from catalase which was demonstrated by cytochemical staining, is still unknown, owing to difficulties in obtaining isolated and intact preparations of these organelles. However, there is a striking correlation between the occurrence of microbodies and the catalase content of yeast cells. Methanol, as a substrate for growth, increased the catalase content of the cells 5-fold¹¹, and *n*-alkane 10 to 50-fold¹² as compared with glucose-grown cells. Therefore, one might ponder on the possibility that the crystalline nature of yeast microbodies may be provoked primarily by the high content of catalase.

In methanol-grown yeasts, this enzyme was demonstrated to degrade H₂O₂ both by catalase and by peroxidase activity with methanol as a substrate¹¹. Studies on liver peroxisomes revealed that formaldehyde and formate were also peroxidatively metabolized⁵. It is not yet clear whether these reactions play a role in yeast metabolism.

Though the significance of microbodies in yeast has still to be elucidated, both alkane- and methanol-assimilating yeasts offer opportunities for studying this intriguing phenomenon.

Zusammenfassung. In auf Methanol gewachsenen Zellen von *Pichia pastoris* wurden in «Microbodies» oder Peroxisomen nach Fixierung mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd kristalline Strukturen beobachtet.

W. HAZEU, W. H. BATENBURG-VAN DER VEGTE and P. J. NIEUWDORP¹³

Delft University of Technology,
Laboratory of Microbiology, Julianalaan 67 A,
Delft (The Netherlands), 24 March 1975.

⁹ W. HAZEU, J. C. DE BRUYN and P. BOS, Arch. Mikrobiol. 87, 185 (1972).

¹⁰ J. P. VAN DIJKEN, M. VEENHUIS, N. J. W. KREGER-VAN RIJ and W. HARDER, Arch. Microbiol. 102, 41 (1975).

¹¹ R. ROGGENKAMP, H. SAHM and F. WAGNER, FEBS Lett. 41, 283 (1974).

¹² Y. TERANISHI, A. TANAKA, M. Osumi and S. FUKUI, Agric. Biol. Chem. 38, 1213 (1974).

¹³ We gratefully acknowledge the help of L. VAN LEENGOED and T. J. J. DE SNOO in providing the methanol-grown yeast cells.

Activité antimicrobienne de *Candida hordei* DE MIRANDA et DIEM

Antimicrobial Activity of *Candida hordei* DE MIRANDA and DIEM

L'aptitude à produire des antibiotiques est rarement observée chez les levures. Au cours de nos recherches sur les microorganismes de la phyllosphère de l'Orge, nous avons néanmoins constaté que les cultures de *Candida hordei*, une levure récemment décrite par DE MIRANDA et DIEM¹, étaient capables d'inhiber la croissance de divers bactéries et champignons. Cette note rapporte les premiers résultats de nos travaux sur ce phénomène.

Matériel et méthodes. L'activité antimicrobienne de *C. hordei* est d'abord mise en évidence par la méthode classique des stries. A l'aide d'une suspension de spores de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson et de divers autres microorganismes unicellulaires (Figure 1), on

trace des stries perpendiculairement à des cultures de *C. hordei* âgées de 3, 5 et 8 jours et obtenues sur le milieu ci-dessous: glucose, 20 g; asparagine, 1,5 g; KH₂PO₄, 0,5 g; K₂HPO₄, 0,5 g; MgSO₄, 7 H₂O, 0,5 g; KCl, 0,5 g; extrait de levure, 1 g; gélose, 15 g; eau, 1 litre; pH ajusté à 6. Après 12 h d'incubation, le nombre de spores germées de *C. graminicola* est évalué directement au microscope tandis que, pour les microorganismes unicellulaires, l'inhibition de leur croissance est enregistrée après 3 jours d'incuba-

¹ L. R. DE MIRANDA et H. G. DIEM, Can. J. Bot. 52, 279 (1974).

² L'auteur remercie M. le Professeur F. MANGENOT qui a bien voulu apporter des corrections à cette note.

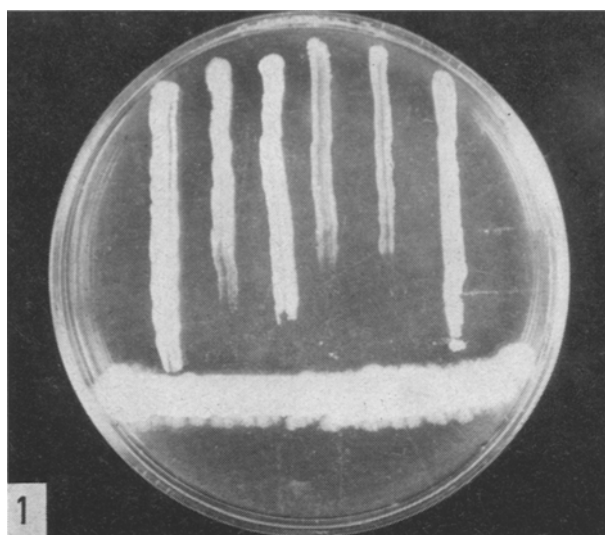


Fig. 1. Inhibition de la croissance de divers microorganismes par *Candida hordei*; de gauche à droite: *Candida muscorum*, *Tilletiopsis minor*, *Sporobolomyces roseus*, *Bacillus pumilus*, bactérie Gram positif, bactérie Gram négatif.

Effet de *Candida hordei* sur la survie de *Sporobolomyces roseus* et de *Colletotrichum graminicola*

Microorganisme	Temps d'incubation (h)			
	3	6	9	12
<i>Sp. roseus</i>	43	9	0	0
<i>C. graminicola</i>	37	12	4	0

Les résultats expriment le pourcentage de propagules survivantes.

tion. L'effet de l'antibiotique sur ces microorganismes est net mais semble être sélectif (Figure 1). *Sporobolomyces roseus* Kluyver et Van Niel montre une inhibition très marquée alors que *Candida muscorum* Di Menna est parfaitement résistant. Chez les bactéries, les germes Gram positif sont nettement plus sensibles que ceux Gram négatif. La croissance des germes sensibles s'arrêtent toujours à 20 mm environ de la strie de *C. hordei*.

Résultats et discussion. Les essais ont montré que l'activité antimicrobienne de *C. hordei* ne s'est manifestée qu'au bout de 8 jours de culture. Nous ne savons pas si ce délai est dû à la formation tardive de l'antibiotique par la levure ou à la transformation ultérieure, dans le milieu de culture, des métabolites préalablement excrétés.

Après 12 heures d'incubation, la totalité des spores de *C. graminicola* testées est incapable de germer à 10 mm de l'emplacement de la levure. A 15 mm et à 20 mm, le taux de germination de ces spores est respectivement de 67% et de 100%. A ces mêmes distances, la longueur moyenne des tubes germinatifs est respectivement de 18 μ m et de plus de 300 μ m. Une deuxième observation, effectuée 8 heures plus tard, montre qu'aucune variation n'est intervenue dans le pourcentage de germination, ce qui indique que celle-ci n'est pas retardée mais définitivement inhibée par l'antibiotique.

D'autre part, après un début de développement, les stries réalisées avec des levures roses *Sp. roseus* ou *Rhodotorula* sp. se sont ensuite décolorées progressivement en commençant, bien entendu, par l'extrémité la plus proche de la strie de *C. hordei*. Les essais de repiquage à partir des prélèvements effectués dans cette zone montrent que la disparition, chez ces levures, de la pigmentation est aussi accompagnée de la mort de leurs cellules. De même, les spores de *C. graminicola* ou les bactéries préalablement inhibées par la culture de *C. hordei* se révèlent incapables de germer ou de croître lorsqu'elles sont transférées sur un milieu nutritif neuf. Par conséquent, nous pensons que *C. hordei* produit une substance germicide.

La survie des microorganismes soumis à l'action de *C. hordei* est déterminée d'après le protocole expérimental suivant: à 5 mm de la strie de cette levure, nous déposons des carrés de cellophane préalablement stérilisés et por-

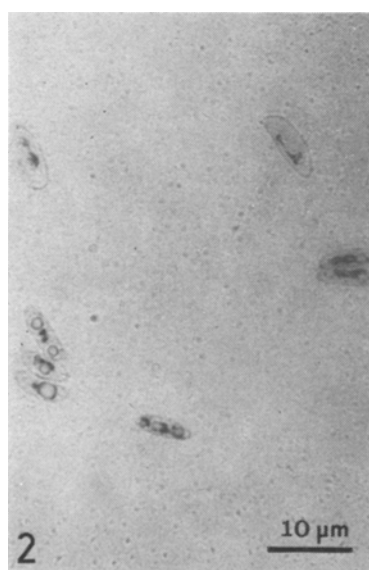


Fig. 2. Lyse des spores de *Colletotrichum graminicola* mises en présence de *Candida hordei*.

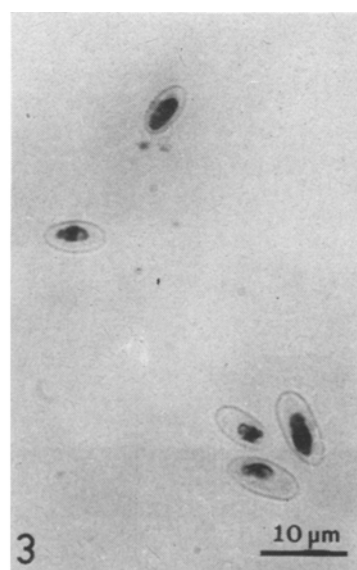


Fig. 3. Lyse des cellules de *Sporobolomyces roseus* mises en présence de *Candida hordei*.

tant soit des spores de *C. graminicola* soit des cellules de *Sp. roseus*. Les spores fongiques et les levures âgées respectivement de 7 et 3 jours sont en contact direct avec le milieu de culture de *C. hordei*. Périodiquement, les organismes testés sont retirés à l'aide de la feuille de cellophane support. Le tout est soumis au lavage par centrifugation pendant 10 min à 4000 tours/min (centrifugeuse Martin Christ, type UJ1S) dans 50 ml d'eau stérile. Les microorganismes ainsi traités sont ensuite étalés sur milieu nutritif gélosé et après 12 h d'incubation leur survie est déterminée au microscope par le pourcentage de germination des spores de *C. graminicola* ou par celui de bourgeonnement de cellules de *Sp. roseus*. L'observation des propagules restant sur le milieu de culture de *C. hordei* ne révèle aucune germination ou bourgeonnement de leur part. L'absence ultérieure sur ce même milieu de toute forme de croissance montre que ces propagules sont bien tuées.

Les résultats consignés dans le Tableau montrent que *C. graminicola* et *Sp. roseus* sont en grande partie tués après 3 h seulement de contact avec le milieu de croissance de *C. hordei*. Après 9 h d'incubation, aucune cellule n'est

plus viable. A ce moment, l'observation au microscope optique de *Sp. roseus* et de *C. graminicola* ne montre aucune différence entre une cellule saine et une cellule tuée. Mais après 48 h de traitement, on peut constater que toutes les cellules de *Sp. roseus* et les spores de *C. graminicola* sont en partie lysées avec dissolution de leur cytoplasme. Cette dissolution est déjà très nette chez la plupart d'entre elles au bout de 72 h tandis que leur parois restent intactes (Figures 2 et 3). Ces observations confirment donc que l'antibiotique formé par *C. hordei* a effectivement provoqué, chez les microorganismes testés, la mort suivie de la lyse de leurs cellules².

Summary. A new species of yeast, *Candida hordei* DE MIRANDA and DIEM, is able to produce an antibiotic which kills and lyses diverse microorganisms.

H. G. DIEM

Laboratoire de Botanique et de Microbiologie,
Centre de 2^{me} cycle, Université de Nancy,
F-54037 Nancy (France), 14 février 1975.

Cytokinin-Like Activity in Extracts from Culture Filtrates of *Pseudomonas savastanoi*

Olive knot, caused by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Sm.) Stevens, is characterized by the formation of galls on young stems, leaves and other organs of the olive. Similar outgrowths are found on a narrow range of other species including oleander¹ and privet². Gall development involves establishment of the bacteria within lysogenous cavities, followed by hypertrophy, hyperplasia and vascular differentiation of the surrounding cells³. The hypertrophy can be induced on oleander by treating it with culture filtrates from *P. savastanoi* or indole-3-acetic acid (IAA)³. The bacterium itself has been shown actively to synthesize indole-3-acetamide, IAA and its lysine conjugate⁴⁻⁶. Thus, the hypertrophied cells in the gall may result from auxin production by the bacteria. Substances which could cause hyperplasia have not been examined, but based on their well-known and characteristic stimulation of cell division, it has been suggested that cytokinins may be involved³. We report here on the production of some substance(s) having cytokinin-like activity by *P. savastanoi*.

A culture of *P. savastanoi* (NCPB 639) was grown with agitation in WOOLLEY's medium⁷ for various periods of time at 25°C. The cells were then removed by

centrifugation and filtration (Millipore, 0.45 µm). After concentrating 2-fold at 40°C under reduced pressure, the filtrate was adjusted to pH 7.8 with 1 N KOH and extracted 5 times with 1/5 volumes ethyl acetate. Excess dry Na₂SO₄ was added to the combined organic extract to remove the residual water. The extract was then filtered and evaporated to dryness at 40°C in vacuo. The residue was redissolved in ethanol, filtered and again evaporated to dryness.

In the beginning of the work, this residue was simply redissolved in a minimal volume of 0.1 N NaOH and diluted with water before use. Later on it was redissolved in ethanol and spotted on TLC plates (Merck, Silica Gel 60 F-254, 0.25 mm) which were developed with chloroform:methanol (9:1). Under UV-light (254 and 366 nm) 11 bands could be distinguished. Each was scraped off separately and its contents eluted with ethanol. This was filtered and dried in vacuo. The residue was then redissolved in 0.1 N NaOH and diluted with water.

All preparations were tested for cytokinin-like activity using the growth response of tobacco callus and retention of chlorophyll by senescing oat leaves criteria. The techniques and medium (RM 1964) of LINSMAIER and SKOOG⁸ were used for the tobacco callus assay. For each treatment 3 flasks, each containing 3 pieces of tobacco (cv. Wisconsin 307) callus, were used. The preparations were filter sterilized (Millipore, 0.45 µm) and incorporated into the medium just before it gelled. The medium contained no plant hormones initially when a crude ethyl acetate extract from a 7-day culture was tested, but later

Table I. Growth promotion of tobacco callus by ethyl acetate extracts from cultures of *P. savastanoi* of different ages

Treatment	Fresh wt. (g) ^a
3-day culture	0.91
7-day culture	1.27
10-day culture	2.39
12-day culture	2.25
complete medium ^b	2.92
– IAA	0.48
– kinetin	0.54

^a Average of 9 callus pieces. Culture filtrate equivalent to 10 l per l medium. ^b The same controls apply to the data in Table II.

¹ E. E. WILSON and A. R. MAGIE, *Phytopathology* 53, 653 (1963).

² A. BOTTALICO and G. L. ERCOLANI, *Phytopath. Medit.* 10, 132 (1971).

³ E. E. WILSON, *Phytopathology* 55, 1244 (1965).

⁴ A. R. MAGIE, E. E. WILSON and T. KOSUGE, *Science* 141, 1281 (1963).

⁵ T. KOSUGE, M. G. HESKETT and E. E. WILSON, *J. biol. Chem.* 241, 3738 (1966).

⁶ O. HUTZINGER and T. KOSUGE, *Biochemistry* 7, 601 (1968).

⁷ D. W. WOOLLEY, G. SCHAFFNER and A. C. BRAUN, *J. biol. Chem.* 215, 485 (1955).

⁸ E. M. LINSMAIER and F. SKOOG, *Physiologia plant.* 78, 100 (1965).