

DIE STICKSTOFFASSIMILATION DER BACILLUS SUBTILIS

von

Dr. I. FEDORCSÁK und Dr. I. TURTÓCZKY

Institut für Abstammungs- und Vererbungslehre der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 5. November 1962

Laut früherer Feststellungen von W i a m e (9) können gewisse *B. subtilis*-Stämme (+) NH_3 als einzige Stickstoffquelle gebrauchen. Diese ihre Fähigkeit können sie verlieren (-). In diesem Fall kann die Bakterie nur bei Vorhandensein von Aminosäuren, in erster Reihe von Glutaminsäure wachsen.

Die Verwandlung eines (+) in ein (-) bringt den vollständigen Verlust der Fähigkeit, den Stickstoff von NH_3 zu verwerten, mit sich.

Es schien für wahrscheinlich, dass im (+) die Assimilation des NH_3 Stickstoffes durch das Enzym der Glutaminsäuredehydrogenase geschieht. Die Glutaminsäuredehydrogenase kann durch einen spontan entstehenden Mutationsmechanismus ausfallen und so entsteht der zu seiner Vermehrung Aminosäure, Glutaminsäure erfordernde (-) Stamm.

W i a m e und P i é r a r d (10) isolierten im Jahre 1955 aus zur Assimilation von NH_3 unfähigen negativen *B. subtilis*-Zellen ein reversibel funktionierendes, bis dahin unbekanntes Enzym. Das Alanindehydrogenase genannte neue Enzym katalysiert mit einem bei Glutaminsäuredehydrogenase bekannten Reaktionsmechanismus bei Vorhandensein von reduziertem DPN, aus Ammoniak und Brenztraubensäure eine Alaninsynthese (7). Das Alanindehydrogenase-Enzym wurde in zur Ammoniakassimilation unfähigen Zellen nachgewiesen. Nach der Ansicht von W i a m e und P i é r a r d ist zur Ammoniakassimilation Glutaminsäuredehydrogenase erforderlich.

Neuerdings untersuchten B r a u n s t e i n und seine Mitarbeiter (2, 3) den Alanindehydrogenase-Gehalt verschiedener *B. subtilis*-Stämme wilden Typs und anderer Bakterien. Sie haben gefunden, dass bei diesen Mikroorganismen das Vorhandensein von Alanindehydrogenase eine normal-biochemische Erscheinung ist.

Ihrer Ansicht (8) nach geschieht die NH_3 -Assimilation der *B. subtilis* im allgemeinen auf dem Wege der Alanindehydrogenase. Da Alanindehydrogenase so wohl bei Positivstämmen, wie auch bei Negativen nachzuweisen ist, wird vorausgesetzt, dass der Verlust der Assimilationsfähigkeit des Ammoniaks nicht die Folge des Ausfalls der Alanindehydrogenase, sondern die des Ausfalls der aus Alanin und α -Ketoglutarinsäure Glutaminsäure synthetisierenden Transaminase ist.

Nach den Autoren können wir also die NH_3 -assimilationsunfähige *B. subtilis* als einen biochemischen Mutanten betrachten, in dem ein Zwischenglied der im Aminosäurenstoffwechsel zentralwichtigen Glutaminsäuresynthese ausgefallen ist.

Versuchsmaterial und Methoden

Die Versuche führten wir an aus unserer Stämmesammlung entnommenen, mit C46(-) bezeichneten *B. subtilis*-Stämmen durch.

Für unsere Versuchszüchtungen verwendeten wir eine synthetische Nährflüssigkeit:

KH_2PO_4	13,0	Millimol/Liter
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,5	,,
NaCl	8,5	,,
Na_2SO_4	2,3	,,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	,,
Fe^{III} -Zitrat	24,5	μM /Liter

pH = 6,8 – 6,9

Als Kohlenquelle wurde 0,1 mol/Liter Glycerin verwendet. Als N-Quelle wogen wir je nach Versuchsbedingungen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,8 Millimol/Liter, oder L(+)-Glutaminsäure-K Salz 13,6 Millimol/Liter der Lösung bei. Im Falle von gleichzeitiger Verwendung von organischer und anorganischer N-Quelle sind in der Nährflüssigkeit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und die oben angeführten Quantitäten von Glutamat gleichzeitig enthalten.

Die Sterilisation wurde im Autoklav bei 120°C Temperatur in 30–40 Minuten durchgeführt. Zur Vermeidung der Ausscheidung wurden das MgSO_4 und das Fe^{III} -Zitrat in anderen Gefäßen in 20–30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und nach Autoklavheizung und Abkühlung der Grundflüssigkeit beigemischt.

Bei der Herstellung durchlüfteter Kulturen wogen wir 1 Liter Nährflüssigkeit in das Züchtungsgefäß, die mit Hilfe eines Kompressors mit durch Wattetürme sterilgesiebter Luft aeriert wurde.

Bei Bereitung der durch CO_2 + Luftgemisch aerierten Züchtungen wird der zur Durchlüftung verwendeten Luft 30 Vol% CO_2 beigemischt.

Bei Bereitung von geschüttelten Kulturen wird die gewünschte Nährflüssigkeitsmenge in einem, mit Wattepfropf versehenen Erlenmeyer-Kolben gewogen, und die Gefäße werden auf einen Schüttelapparat aufgeschnallt.

Die Temperatur der aerierten, wie auch der geschüttelten Kulturen war 37°C. Die Messung der Vermehrung geschieht auf photometrischer Grundlage mittels eines Pulfrich-Photometers.

Zur Impfung einer aerierten Nährlösung gebrauchten wir 5 ml Bakterien-suspension im Werte von 1,0 Ext. Zur Impfung geschüttelter Kulturen verwendeten wir je 5 ml Nährflüssigkeit eine Bakteriensuspension im Werte von 0,05 ml 1,0 Ext.

Die Phagentitrierungsversuche führten wir nach der von Horváth und Alföldi (4) mitgeteilten Methode durch.

Die Isolierung des Hemmungsfaktors wurde durch Kohlenadsorption durchgeführt: zu 200 ml sterilem Filtrat 8 g Adsorbens „Carbo activatus Richter“ beigemischt, liessen wir die Suspension eine halbe Stunde lang auf +4°C stehen, dann wurde sie durch ein Büchner-Sieb gesiebt. Die Kohle wurde dann mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen, und nachher zwecks Eluierung in 100 ml 40%igem Etanol suspendiert. Nach Filtrierung der Suspension liess man das Filtrat in Vakuum bei 37°C auf 11–14 ml eindampfen.

Zur Gewinnung von für Messungen der Enzymaktivität geeigneten zellfreien Extrakten wurde die Vermehrung der Kulturen in der Logarithmenphase abgestellt, die Zellen wurden mit destilliertem Wasser durchgewaschen, und mit Lysozim gelöst. Zur Bestimmung der Alanindehydrogenase wählten wir eine photometrische Methode (3, 10, 11). Unsere Messungen wurden mittels Spektrophotometers bei $340\text{ m}\mu$ durchgeführt.

Die Bestimmung ging bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ in folgender Zusammenstellung vor sich:

- 3,0 ml 0,1 M Na-Pyrophosphat-Puffer, $\text{pH} = 8,5$
- + 0,2 ml 0,1 M L (+) Alanin
- + 0,2 – 1,0 ml Enzym (Zellfreies Bakterienextrakt)
- + 2,0 – 1,2 ml destilliertes Wasser

Die Photometrierung erfolgt bei $340\text{ m}\mu$: das Ext. ist unter 0,1 und verändert sich auch nach 5 Minuten nicht. Da bringen wir die Reaktion durch 0,6 DPN-Lösung ($2\text{ }\mu\text{M DPN}$)/ml in Gang und verfolgen ihren Zeitablauf mittels Photometrierung.

Die Alaninsynthese untersuchten wir unter ähnlichen Umständen. Statt Alanin wogen wir 0,1 ml Brenztraubensäure von 0,1 M und 0,1 ml $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ von 0,1 M ein und nach Zugabe des Extraktes ergänzten wir das Volumen mit destilliertem Wasser auf 5,4 ml. Die Reaktion wurde durch Beifügung von 0,6 ml DPNH ($1\text{ }\mu\text{M DPHN}$)/ml in Gang gebracht.

Versuchsergebnisse

Unsere Versuche führten wir an mit C46 (–) bezeichneten *B. subtilis*-Stämmen durch, die sich durchwegs als Ammoniak-negativ erwiesen haben. Von der dem Nährboden beigefügten Stickstoffquelle bedingt, erhielten wir die Vermehrungskurven nach Abb. 1.

Ist die alleinige Stickstoffquelle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entsteht keine Vermehrung, also ist der Stamm Ammoniak-negativ (1). Ist die alleinige Stickstoffquelle Glutaminsäure, beginnt eine Vermehrung, doch autolisiert sie um die 18-te Stunde (2). Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Glutaminsäure und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entsteht eine beträchtliche Vermehrung (3). Im Gegensatz zur Kurve No. 2 kann eine beträchtliche Vermehrung bei alleinigem Vorhandensein von Glutaminsäure festgestellt werden, wenn der zur Durchlüftung verwendeten Luft 30 Vol% CO_2 beigefügt wird (4).

Wir legen den Versuch folgenderweise aus: Die Vermehrung in einer Glutaminsäure enthaltenden Flüssigkeit wird durch einen Autolysis Faktor gehemmt. Bei Vorhandensein von Ammoniak oder Kohlendioxyd kommt die Lysis nicht zustande. Danach wird die Autolysis durch Ammoniak und Kohlendioxyd gehemmt.

Die NH_4 -Ion-konzentration der Nährflüssigkeit verändert sich während der Züchtung nicht. Die Synthese des bakteriellen Eiweisses geschieht ausschliesslich auf Rechnung der Glutaminsäure N. In Betracht des Wirkungsmechanismus von CO_2 scheint es wahrscheinlich zu sein, dass es sich hierbei nicht um eine Veränderung der pH-Werte handelt, sondern um die Wirkung des Ion HCO_3 .

Dementsprechend bekommen wir, wenn wir statt Durchströmung mit CO_2 der Nährflüssigkeit NaHCO_3 beifügen, im wesentlichen dasselbe Resultat.

Im Zusammenhang mit der Lysis hemenden Wirkung des CO_2 möchten wir bemerken, dass wir an Kulturen, die statt Luftdurchströmung durch Schütteln aeriert wurden, eine Lysis niemals wahrgenommen habe. Das ist damit zu erklären, dass in den geschüttelten Kulturen die Kohlensäurekonzentration

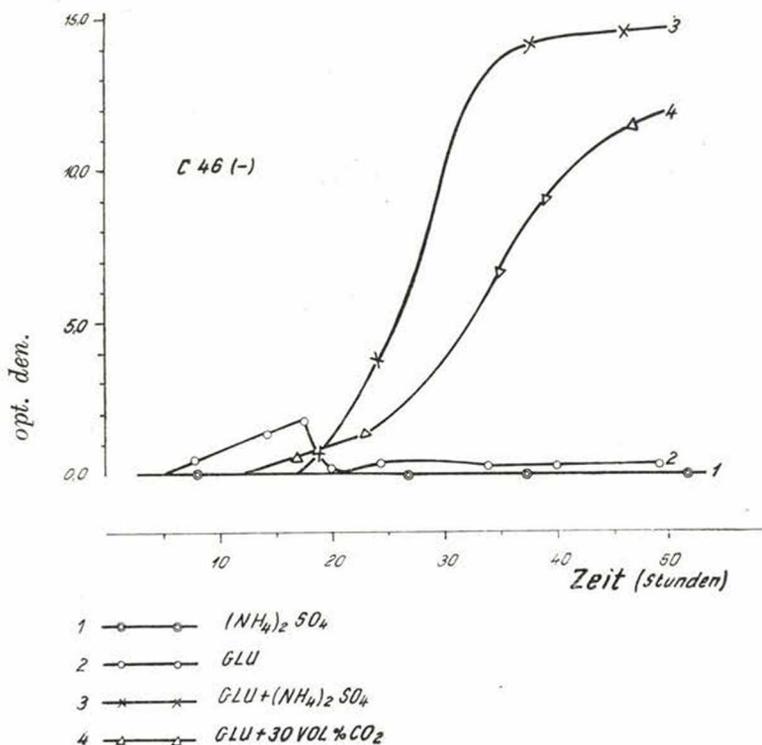


Abb. 1. Vermehrung der *B. subtilis* C46 (-) bei verschiedenen N-Quellen

immer grösser ist, als in den mit Durchströmung aerierten Kulturen. Im letzteren Fall verjagt die durchströmende Luft aus der Nährflüssigkeit das von den Bakterien erzeugte CO_2 .

Bei der Untersuchung der Umstände der Glutaminsäure enthaltenden Nährflüssigkeit entstandenen Autolysis dachten wir an Phage-Wirkung. Wir haben angenommen, dass wir es mit einem Lysogenstamm zu tun haben, der sich bei guter Durchlüftung spontan induziert.

Bei Verwendung verschiedener Indikatoren-Stämme haben wir in bakterienfreien Filtraten autolyserter Kulturen Phagetitrier-Analysen durchgeführt. Die Versuche ergaben durchgängig negative Resultate: im Filtrat konnte keine infizierungsfähige Phage gefunden werden.

Wir haben beobachtet, dass die Autolysis durch die Mg^{++} -Ionkonzentration der Nährflüssigkeit stark beeinflusst wird. Die Mg^{++} -Ionkonzentration

der zur Züchtung verwendeten Nährflüssigkeit ist unter üblichen Umständen gewöhnlich 1,0 Millimol/Liter. Bei einer solchen Mg-Konzentration bekommen wir die dem schon vorgeführten Bilde entsprechenden Kurven. Ist die Mg-Konzentration 10mal kleiner, d. h. 0,1 Millimol/Liter, gestalten sich die Züchtungskurven nach Abb. 2.

Es kann beobachtet werden, dass die Herabsetzung der Mg-konzentration – in Glutaminsäure enthaltender Nährflüssigkeit – den Ausfall der Autolysis aber auch gleichzeitig die Hemmung der Zellenvermehrung bewirkt.

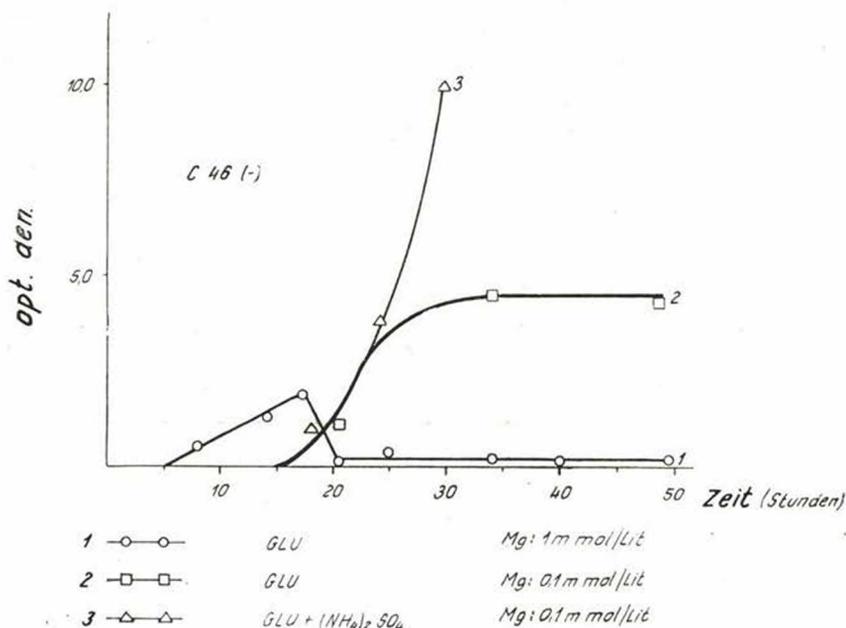


Abb. 2. Vermehrung der *B. subtilis* C46 (-) bei verschiedenen Mg⁺⁺ Konzentration

In der 30-ten Stunde hört bei 4,5 optischer Dichte die Zellteilung auf, und in den folgenden 20 Stunden ist keine weitere Vermehrung wahrzunehmen. Die herabgesetzte Mg-Konzentration ist kein limitierender Faktor, denn wenn bei gleicher Mg- und Glutaminsäure-Konzentration der Nährflüssigkeit (NH₄)₂SO₄ beigegeben wird, erhält man normale Vermehrungskurven.

Aus diesen Daten folgerten wir, dass bei Verringerung der Mg-Konzentration sich im Laufe der Züchtung irgendein Hemmstoff synthetisiert, der die weitere Zellteilung verhindert. Wir haben die im Wachstum gehemmte Kultur filtriert, um ein bakterienfreies Filtrat zu erhalten und versuchten seine Wachstum hemmende Wirkung nachzuweisen.

Die Versuche wurden in geschüttelten Kulturen durchgeführt (Tab. I.). Unter solchen Umständen ergibt sich beim Stamm C46 eine optische Dichte von 2,0–3,0 als maximale Vermehrung. Es kann beobachtet werden, dass sich bei wachsendem Quantum des Filtrats die Hemmung steigert. Der Versuch No. 2 weist auf eine termolabile Eigenschaft des Hemmstoffes, auf eine im Laufe der Autoklavenheizung auftretende Inaktivierung hin.

Die Vermehrung hemmende Wirkung des Filtrats

No	GLU+ (NH ₄) ₂ SO ₄ Nährboden ml	Dest. Wass. ml	Filtrat ml	Autoklav 30 min. 120 °C	Filtrat ml	B. subtilis C 46 (-) Suspension 0,05 ml	Opt. den. nach 24 Stdn.
1	3,0	2,0	-	+	-	+	2,28
1	3,0	2,0	-	+	-	+	2,40
2	3,0	-	2,0	+	-	+	1,60
2	3,0	-	2,0	+	-	+	1,54
3	3,0	1,5	-	+	0,5	+	2,80
3	3,0	1,5	-	+	0,5	+	2,36
4	3,0	1,0	-	+	1,0	+	2,50
4	3,0	1,0	-	+	1,0	+	2,40
5	3,0	-	-	+	2,0	+	0,27
5	3,0	-	-	+	2,0	+	0,28
6	2,0	-	-	+	3,0	+	0,00
6	2,0	-	-	+	3,0	+	0,00

Durch Adsorption an „Carbo-activatus Richter“ stellten wir aus dem Filtrat auch eine etwas klarere und konzentriertere Lösung her. Unsere bisherigen Versuche machen einen polypeptiden Aufbau des Hemmstoffes wahrscheinlich. Die Hemmwirkung ist eine bakteriostatische und kann mit Eiweiss, z. B. Gelatine antagonisiert werden (Tab. II.).

Tabelle II.

Neutralisierung eines konzentrierten Hemmstoffes durch Gelatine

No	GLU+ (NH ₄) ₂ SO ₄ Nährboden ml	Dest. Wass. ml	Gelatine µg	Autoklav 30 min. 120 °C	Filtrat (konzentriert) ml	B. subtilis C 46 (-) Suspension 0,05 ml	Opt. den. nach 24 Stdn.
1	3,0	2,0	-	+	-	+	2,20
2	3,0	2,0	100	+	-	+	2,60
3	3,0	2,0	200	+	-	+	3,10
4	3,0	1,7	-	+	0,3	+	0,00
5	3,0	1,7	100	+	0,3	+	1,20
6	3,0	1,7	200	+	0,3	+	2,80

Es ist sichtbar, dass die Hemmwirkung der konzentrierten Lösung von 0,3 ml durch 200 µg Gelatine vollständig aufhört.

Aus unsere in Versuche lässt sich darauf schliessen, dass in den C46(-) Zellen ein die Autolysis auslösender Faktor, vielleicht eine defektive Prophage vorhanden ist. Dieser Faktor ist bei Vorhandensein von Ammoniak oder Kohlendioxyd stabil; er induziert sich nicht. In einer nur Glutaminsäure enthaltenen Lösung erfolgt eine Induktion. Das eine Resultat der Induktion wäre der Beginn einer neuen Synthese: die Synthese eines dem Baktericin ähnlichen Hemmstoffes. Das andere Resultat wäre ein für die Zellen letaler Ausgang der Autolysis.

Das im Verlaufe der Autolysis in die Lösung übergehende Bakterien-Eiweiss macht das Nachweisen des Hemmstoffes unmöglich. Bei verminderter Mg-Konzentration kann die Autolysis nicht eintreten. Infolgedessen wird der Hemmstoff nachweisbar, die Zellen bleiben am Leben und so ergibt sich eine Möglichkeit zur Untersuchung der in den Zellen eventuell vorsich gehenden Veränderungen.

Aus dieser letzteren Möglichkeit ausgehend haben wir Versuche durchgeführt, und gefunden, dass unter den Zellen der bei geringen Mg-Konzentration

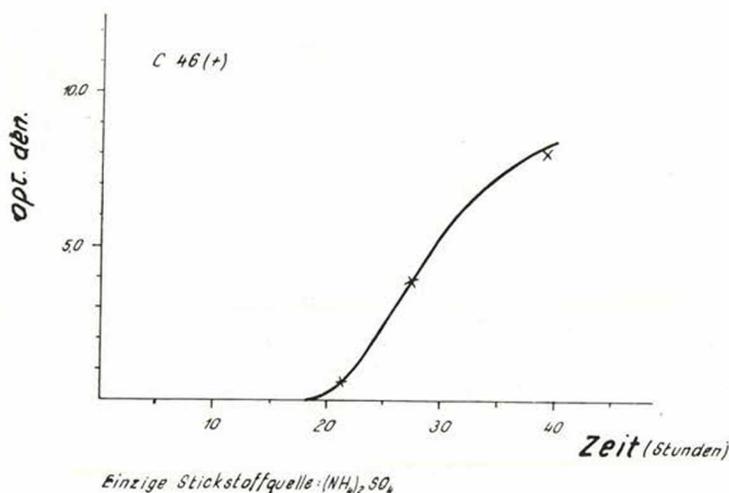


Abb. 3. Vermehrung der *B. subtilis* C46 (+) bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ N-Quelle

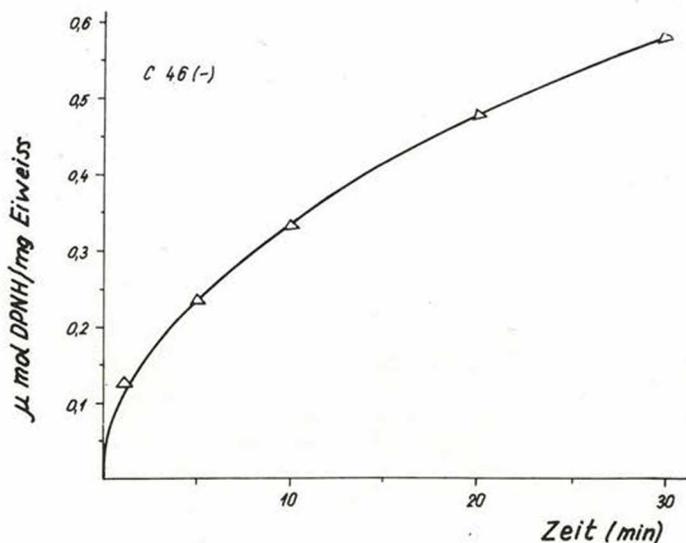


Abb. 4. Die ALA-Dehydrogenase aktivität der Extraktes der *B. subtilis* C46 (-) in der Richtung der Pyruvate und Ammoniakbildung

Ordinate: das entstandene $\mu\text{M DPNH/mg Eiweiss}$; Abszisse: Zeit in Min.

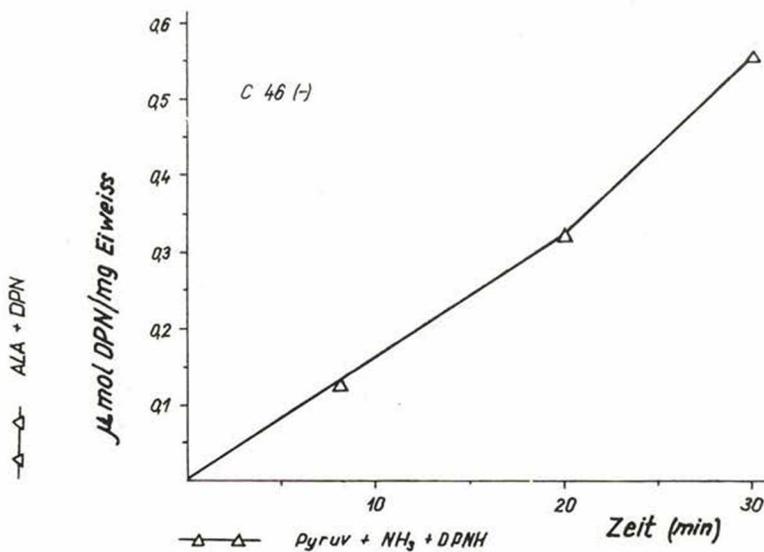


Abb. 5. Die aktivität des ALA-Dehydrogenase enthaltenden Extraktes der *B. subtilis* C46 (-) in der Richtung der ALA-Synthese
 Auf der Ordinate ist die aus der Verringerung der Extinktion (DPNH→DPN) errechnete DPN-Menge (μ M DPN/mg Eiweiss) angegeben

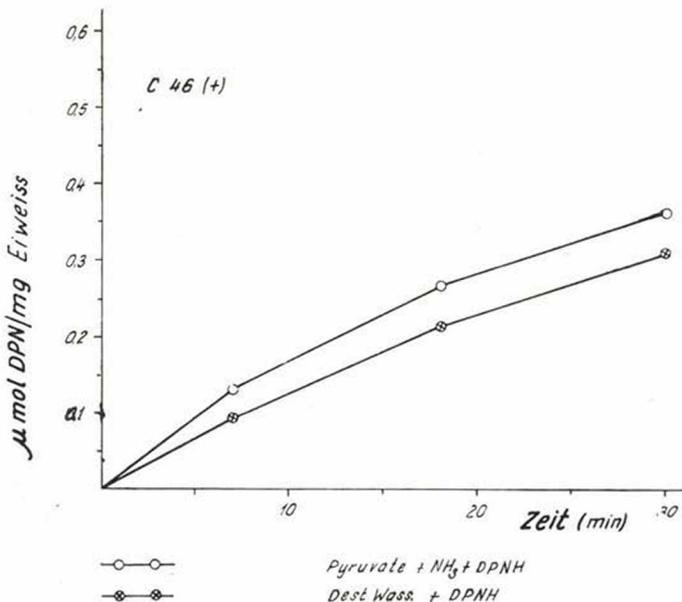


Abb. 6. Die Geschwindigkeit der durch *B. subtilis* C46 (+) Extrakt katalysierten DPNH Oxydation
 Auf der Ordinate ist die aus der Verringerung der Extinktion (DPNH→DPN) errechnete DPN-Menge (μ M DPN/mg Eiweiss) angegeben

gezüchteten, im Wachstum zum Stillstand gebrachten *C46* (-) Kulturen zur Ammoniakassimilation fähige (+) zellen zu finden sind. Durch Isolierung solcher Zellen erhielten wir den *C46 Positivstamm* (+).

Auf der Abbildung 3. ist die Vermehrungskurve des Stammes *C46* (+) zu sehen, auf einem als einzige N-Quelle Ammoniumsulfat enthaltenden Nährboden.

Im zellfreien Lysat der *C46* (-) Zellen konnten wir sehr aktive Alanin-, dehydrogenase nachweisen (Abb. 4 und 5.). Es kann beobachtet werden, dass das Präparat bei Vorhandensein von Alanin und DPN die Brenztraubensäure und Ammoniakbildung praktisch mit derselben Geschwindigkeit katalysiert, wie im entgegengesetzten Fall die Alaninsynthese bei Vorhandensein von Brenztraubensäure, Ammoniak und DPNH.

Im Extrakt der *C46* (+) Zellen kann man bei Vorhandensein von Alanin und DPN keine DPN Reduktion nachweisen. Gegenüber dem Extrakt der Negativzellen besteht der auffallende Unterschied darin, dass ohne jedes andere Substrat, das DPNH durch das Extrakt der Positivzellen, mit grosser Geschwindigkeit oxidiert wird. Die Geschwindigkeit der Oxydation steigert sich, wenn man mit DPNH gleichzeitig auch Brenztraubensäure und Ammoniak beigibt (Abb. 6.).

In Bezug auf die Identifikation der im Extrakt der Positivzellen vorhandenen, die Oxydation des DPNH herbeiführenden Faktoren verfügen wir derzeit noch über keine Versuchsdaten. Es ist auch anzunehmen, dass dieser in den Negativzellen gehemmte, in den Positivzellen intensiv funktionierende Prozess eine bedeutende Rolle in der Ammoniakassimilation der Zelle haben kann.

Diskussion

Unsere Untersuchungen befassten sich mit der N-Assimilation der *B. subtilis* *C46* (-) und der *C46* (+) Stämme. Die *B. subtilis* *C46* (-) vermehrt sich nicht auf einer Nährflüssigkeit, die als alleinige N-Quelle Ammonium-Salz enthält. In einer Glutaminsäure enthaltenden Nährflüssigkeit kommt die Vermehrung in Gang. Unter solchen Umständen tritt eine Autolysis in der 18-ten Stunde ein und hemmt die weitere Vermehrung.

Im Filtrat des aufgelösten Negativstammes liess sich keine infizierungs-fähige Phage nachweisen. Trotzdem ist es möglich, dass die Lysis die Folge einer Phagewirkung und das Negativepräge dagegen die Wirkung einer durch Phage-Infizierung entstandenen Repression ist. E. M. Lederberg und J. Lederberg (6), Appleyard (1) sowie Jakob und Wollmann (5) isolierten aus dem Lysogen-Stamm von *Escherichia coli* (*K12λ*) verschiedene defektive Lysogen-Stämme (*K12 λd*), die den defektiven Mutant der erblichen Prophage enthielten. Infolge der Mutation ist die Prophage nicht mehr fähig sich in eine infektiöse Phage zu verwandeln.

Es ist zu vermuten, dass bei *B. subtilis* (-) Stamm aus dem das NH_3 assimilierenden wilden Typ, infolge einer Phage-Infektion entstanden ist. Die spontan entstandene defektive Mutation wirkte als Selektionsfaktor und endlich verwandelte sich der Stamm in eine defektive lysogenen „Reinkultur“. Das zum Bakterien-Chromosom fixierte Phage-Genom wirkt als Repressor auf den in der NH_3 -Assimilation eine wichtige Rolle spielenden enzymatischen Prozess, z. B. auf die Transaminase. Bei Glutaminsäure enthaltenden aerierten

Зüchtungen induziert sich die defektive Prophage. Das ist für die defektive Phage unbedingt letal, doch gleichzeitig auch, durch die mit der Induktion verbundene Lysis, für die Bakterie.

Der bei niedriger Mg-Konzentration nachweisbare Hemmungsfaktor ist vermutlich mit der durch die defektive Prophage gelenkte Synthese zu identifizieren. Die geringe Mg-Konzentration blockiert in erster Reihe die Lysis, und erst dadurch wird die im Filtrat erfolgende Detektierung des Hemmungsfaktors möglich. Wahrscheinlich erfolgt die Produktion des Hemmungsfaktors auch bei normaler Mg-Konzentration, doch können wir dies infolge des durch die Lysis freigewordenen Eiweisses nicht nachweisen.

Unserer Meinung nach ist die *B. subtilis* C46 (+) ein Mutant des (-) Stammes, der keine defektive Prophage enthält.

Der in unseren Versuchen gebrauchte (-) Stamm ist mit dem (*Am*⁻) Stamm von W i a m e (9) nicht identisch, und dementsprechend stimmen auch unsere Resultate nicht vollständig mit den Beobachtungen B r a u n - s t e i n s überein (3, 8).

Zusammenfassung

Wir haben die N-Assimilation der *B. subtilis* Ammoniak (-) Stämme und der daraus isolierten Ammoniak (+) Stämme untersucht.

Unserer Meinung nach kann die sich bei der N-Assimilation der *B. subtilis* zeigende Veränderung ein Resultat verschiedener genetischer Aktionen sein.

1. Es kann sich um Mutation handeln, wenn die Positivzelle durch den Ausfall eines zur Ammoniakassimilation unbedingt erforderlichen Enzyms glutaminsäurebedürftig (-) wird.

2. Es kann ein Repressionsvorgang sein, in dessen Herbeiführung verschiedene Wirkungen (z. B. Phagen) eine Rolle spielen können. In diesem Falle kann sich die Negativzelle induzieren und wird dementsprechend wieder zur Ammoniakassimilation fähig, also zur Positivzelle.

РЕЗЮМЕ

Нами была исследована ассимиляция азота (аммиачно-негативным) штаммом *B. subtilis* C46. Штамм не в состоянии ассимилировать NH₃, и он размножается только в присутствии глутаминовой кислоты. В безклеточном лизате клеток C46 (-) нами была обнаружена весьма активная аланиндегидрогеназа. В аэрированной глутаминовокислой культуре происходит закономерно лизис. Если в питательном растворе рядом с глутаминовой кислотой присутствует даже и сульфат аммония или же гидрокарбонат натрия, или же к применимому для аэрации воздуху прибавляется двуокись углерода, то лизис не состоится. В безбактерийном фильтрате автолизированной культуры мы не смогли обнаружить инфекцеспособных фагов. На автолиз в большой мере влияет концентрация ионов Mg⁺⁺ питательного раствора. С уменьшением концентрации Mg в глутаминовокислотном питательном растворе не происходит растворение, но в то же время синтезируется известное тормозящее вещество, препятствующее дальнейшему размножению клеток. Тормозящее влияние является бактериостатическим эффектом, и оно может быть антагонизировано при помощи желатина.

В числе произведенных при небольшой концентрации Mg и в своем росте остановленных клеток C46 (-) можно обнаружить даже и (+) клетки, способные к ассимиляции аммиака в количестве около 0,01%. Прибавляя к экстракте (+) клеток DPNH, последнее окисляется с большой скоростью. Таким образом, доказывание аланиндегидрогеназы, основывающее на измерении восстановленного DPN, не может быть успешным. В связи

с идентификацией факторов, вызывающих окисление DPNH, пока не имеются никаких экспериментальных данных в нашем распоряжении. По нашему мнению, в случае *B. subtilis*'а, изменение в ассимиляции азота является следствием регрессивного процесса, вызванного мутацией или же различными эписомами (напр. дефективными профагами).

LITERATUR

1. Appleyard, R. K. 1954: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**. 440–452.
2. Hong, M. M., Shen, S. C., Braunstein, A. E. 1959: Raszprosztralenie L-alanindehidrogenazü i L-gljutamatdehidrogenazü u mikroorganizmov, prinadlezsaschih k rodu *Bacillus*. *Biohimija* **24**. 929–937.
3. Hong, M. M., Shen, S. C., Braunstein, A. E. 1959: Distribution of L-alanine dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase in *Bacilli*. *Biochim. Biophys. Acta* **36**. 288–289.
4. Horváth, S., Alföldi, L. 1954: A new and sensitive method of phage titration on plastic trays. *Acta Microbiol. Hung.* **1**. 495–510.
5. Jacob, F., Wollman, E. L. 1956: Recherches sur les bacteries lysogènes defectives. I. Déterminisme génétique de la morphogenése chez un bactériophage tempéré. *Ann. Inst. Pasteur* **90**. 282–302.
6. Lederberg, E. M., Lederberg, J. 1953: Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*. *Genetics* **38**. 51–64.
7. Piérard, A., Wiame, J. M. 1960: Propriétés de la L(+)-alanine-déshydrogénase. *Biochim. Biophys. Acta* **37**. 490–502.
8. Shen, S. C., Hong, M. M., Braunstein, A. E. 1959: The main path of nitrogen assimilation in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **36**. 290–291.
9. Wiame, J. M., Storck, R. 1953: Métabolisme de l'acide glutamique chez *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **10**. 268–279.
10. Wiame, J. M., Piérard, A. 1955: Occurrence of an L(+)-Alanine-Dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *Nature* **176**. 1073–1075.
11. Wosilait, W. D., Nason, A. 1954: Pyridine nucleotide-quinone reductase. I. Purification and properties of the enzyme from pea seeds. *J. Biol. Chem.* **206**. 255–270.