

Die Röntgenschädigung von *Escherichia coli* bei 180 keV und 31 MeV

Im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen über die biologischen Wirkungen von 31-MeV-Röntgenstrahlen einerseits (Betatronanlage der radiotherapeutischen Klinik Zürich) und 180-keV-Röntgenstrahlen andererseits (Stabilivolt, 180 kV, 6 mA, 1 mm Cu) nahmen wir die Schädigungskurven von *Escherichia coli* auf.

Als Versuchsobjekt wählten wir den Stamm 1064 von *E. coli* aus dem staatlichen Seruminstitut Kopenhagen. Die Keime wurden in einem Aerosolapparat vernebelt und auf Agaroberflächen ausgesät. An Stelle von Petrischalen verwendeten wir kleine Plexiglasgefässe; von den 5 gleichzeitig besäten Schälchen dienten 2–4 als Kontrollen. Die Bestrahlung erfolgte im Innern eines Plexiglasphantoms¹; die Agaroberfläche mit den einzeln liegenden Keimen befand sich bei der Bestrahlung mit 31 MeV in einer Tiefe von 42 mm innerhalb des Phantoms, bei 180 keV in einer Tiefe von 13 mm. Zur Dosismessung verwendeten wir eine in das Phantom hineinragende Messkammer des Victoreen-Condenser-R-Meters². Die Intensität betrug bei 180 keV 72,3 r/min, bei 31 MeV durchschnittlich 82 r/min. Nach der Bestrahlung wurden die Keime 14 h lang bei 37°C bebrütet; aus den teilungsfähigen Keimen entstanden dabei makroskopisch sichtbare Kolonien. Die Schalen wurden photographiert und die Kolonienzahlen aus der photographischen Platte ermittelt. Abbildung 1 zeigt als Beispiel das photographische Protokoll des letzten Versuchs.

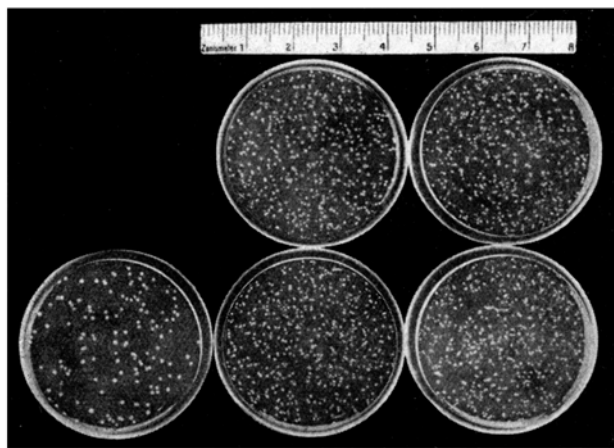


Abb. 1. Versuch vom 18. Juli 1952: Links unten eine Platte, die mit 4338 r bei 180 keV bestrahlt wurde. Die übrigen vier Platten sind Kontrollen.

Die statistische Bearbeitung der Kontrollversuche zeigt, dass eine homogene Aussaat der Keime erreicht wurde. Das Ergebnis der Bestrahlungsversuche ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt. Das vorliegende Material gestattet keine Entscheidung darüber, ob exponentielle oder asymmetrische S-förmige Schädigungskurven vorliegen. Es schien uns natürlicher und dem Stand unseres Unwissens über den Mechanismus der Strahlenwirkung angemessener, unsere Daten so zu behandeln, als ob die Schädigungskurven asymmetrische S-Kurven wären; wir haben deshalb die statistische

Auswertung mit Hilfe der Probitanalyse¹ durchgeführt. Die Versuchspunkte in den transformierten Koordinaten, die sich jetzt um Geraden gruppieren, zeigt Abbildung 3. Bei der Berechnung der Gewichte, die den einzelnen Versuchen zukommen, ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass die Zahl der bestrahlten Keime nicht bekannt ist, sondern auf Grund einiger weniger Kontrollplatten geschätzt werden muss².

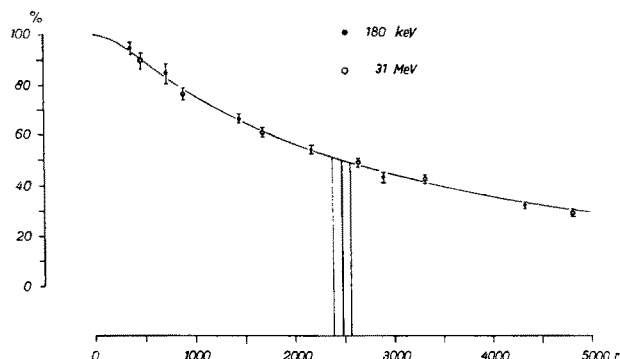


Abb. 2. Die Versuchspunkte in den untransformierten Koordinaten; die Striche geben die Streuung an. Die Kurve ist rücktransformiert aus der Geraden in Abbildung 3.

Nach einem Rechnungszyklus der Probitanalyse erhält man für die 180-keV-Punkte und für die 31-MeV-Punkte je eine Gerade; diese zwei Geraden unterscheiden sich nicht merklich voneinander. Es lässt sich abschätzen, dass ein Unterschied in den DL50 von mindestens 7% mit Sicherheit hätte festgestellt werden können. Fasst man sämtliche Punkte zusammen, so ergibt sich eine DL50 von 2475 r mit Vertrauensgrenzen («fiducial limits 95%») bei 2368 r und 2586 r.

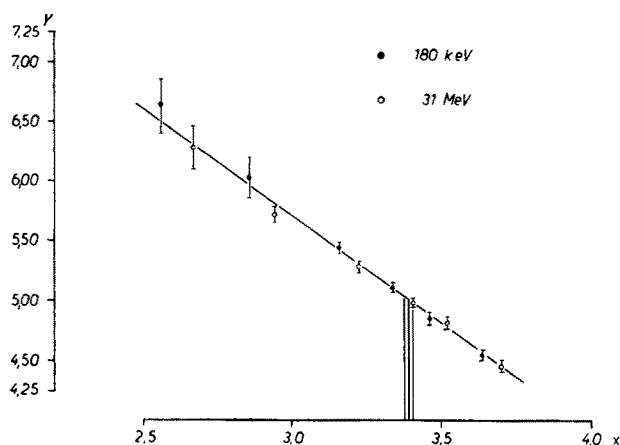


Abb. 3. Die Versuchspunkte in den transformierten Koordinaten (Probitanalyse). Die Gerade bezieht sich auf alle Versuchspunkte.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Arbeit von DIECKMANN *et al.*³, die eine grössere Wirksamkeit der 2-MeV-Elektronenstrahlung gegenüber 180-keV-Röntgenstrahlen festgestellt haben, sowie zur Arbeit von STAPLETON und ATWOOD⁴, die eine geringere Wirksam-

¹ D. J. FINNEY, *Probit Analysis*, II. Aufl. (Cambridge University Press, 1952).

² F. M. WADLEY, *Ann. Appl. Biol.* 36, 196 (1949).

³ C. DIECKMANN, W. DITTRICH, H. REICH und G. SCHUBERT, *Naturwissenschaften* 37, 140 (1950).

⁴ G. E. STAPLETON und K. C. ATWOOD, *Naturwissenschaften* 39, 330 (1952).

¹ H. FRITZ-NIGGLI, *Naturwissenschaften* 39, 485 (1952).

² G. JOYET und W. MAUDERLI, *BBC-Mitteilungen* 38, 281 (1951).

keit von 1,1-MeV-Gammastrahlen gegenüber 250-keV-Röntgenstrahlen fanden. Solche Diskrepanzen werden erst ihre Lösung finden, wenn brauchbare Normen für die Dosimetrie der energiereichen Strahlen vorliegen.

Die Arbeit erscheint ausführlich an anderer Stelle.

J. LINDENMANN

Hygiene-Institut und radiotherapeutische Klinik der Universität Zürich, den 8. Oktober 1952.

Summary

Survival curves of *Escherichia coli* irradiated with X-rays of 180 KeV and 31 MeV are identical within the experimental error. Probit analysis of the data was performed.

In vitro Development of Streptomycin Resistance in *Bacterium tularensis*

The structural and functional changes occurring in microorganisms in the process of developing resistance to chemical agents are well known, but quite unpredictable.

Streptomycin-resistant strains of *Bacterium tularensis* do not appear to have been described despite the extensive use of streptomycin as the chief therapeutic agent in the treatment of Tularemia. CHAPMAN, DOWNS, CORIELL, and KOWAL¹ tried in vain to isolate resistant strains from mice treated with subcurative doses of streptomycin; they quote, however, unpublished experiments by FOSHAY, who observed induced resistance to streptomycin in *Bacterium tularensis* *in vitro*.

This note reports on the *in vitro* production of resistance to streptomycin in *Bacterium tularensis* and on certain properties of the resistant strains.

Most of the experiments were carried out with the highly virulent (LD_{50} 10^{-10}) strain Vir. The standard suspension of bacteria from which the dilutions were made for titration in mice, contained 10^{10} organisms per milliliter. Cultures were grown on glucose-cysteine-blood agar, to which streptomycin was added in various concentrations. At the onset, the strains were susceptible to 1–2 μ g of streptomycin per milliliter of culture media. The microorganisms were cultivated in progressively graded concentrations of streptomycin. The initial development to resistance was very gradual; however, when the level of resistance of 10 μ g/ml was obtained, the strains could be transferred directly to a medium containing 40 mg/ml, the highest concentration tested. Such an abrupt rise to a very high level of resistance has been observed in other microorganisms which developed resistance to streptomycin².

The morphological and physiological changes accompanying the development of streptomycin resistance were investigated on twelve resistant strains developed in parallel from a common parent strain Vir. No microscopical changes or alterations in the main nutritional requirements could be found, the addition of cysteine and blood to the basal medium used still being necessary. Also the rate of growth on this medium did not change with the development of the resistance.

As a good correlation has been described¹ between the biological and the surface properties of the bacterium, agglutinability by N/160 NaCl of the original and of the resistant strains was determined in parallel with the virulence titrations in mice. The results are summarized in the Table.

Virulence and salt agglutinability of *Bact. tularensis* strains, resistant to streptomycin

Strains*	Salt agglutinability	Dilution required for LD_{50}
S.M.R. 1 . .	++++	10^{-2}
S.M.R. 2 . .	+++	10^{-6}
S.M.R. 3 . .	++++	10^{-2}
S.M.R. 4 . .	++++	10^{-2}
S.M.R. 5 . .	++++	10^{-1}
S.M.R. 6 . .	++++	without dilution
S.M.R. 7 . .	++++	10^{-1}
S.M.R. 8 . .	++++	completely avirulent
S.M.R. 9 . .	—	10^{-10}
S.M.R. 10 . .	++++	without dilution
S.M.R. 11 . .	+++	without dilution
S.M.R. 12 . .	++	10^{-8}

* All strains were derived from the common parent strain Vir, which was non-agglutinable and had LD_{50} 10^{-10} .

(+++ indicates 5–10% agglutinable bacteria, ++++ complete agglutination.)

Most of the resistant mutants showed a greatly decreased virulence, and a connection between these two properties appears likely. Indeed, when the parent strain was subjected to an equal number of transfers, but in the absence of streptomycin, no change in virulence occurred. The good correlation observed between salt agglutination and virulence emphasizes once more the importance of surface properties for the biological activity of bacteria. The Table shows further that in most cases the decrease in virulence and the change in suspension stability were very abrupt. This may indicate that there existed in the strains investigated two types of cells, one of very high, the other of very low virulence, without intermediate stages. In the few cases where the strains showed an intermediate degree of virulence and the salt agglutination was found to be incomplete, one may assume that these strains are actually mixtures of microorganisms of the two extreme types in varying proportions. In the light of these findings, the failure to isolate resistant strains of *Bacterium tularensis* from mice treated with sub-curative doses of streptomycin³ may be assumed to be due to the fact that the resistant avirulent mutants could not multiply in the body of the mouse, and were eliminated by the defence mechanism of the body, so that their detection became impossible.

A similar correlation between changes in virulence and the development of streptomycin resistance has been observed previously by SELIGMAN and WASSERMAN in the *Salmonella* group⁴ and by GYSON and CRYST in hemolytic *streptococci*⁴.

¹ Y. AVI-DOR and H. YANIV, Unpublished results.

² S. S. CHAPMAN, C. M. DOWNS, L. L. CORIELL, and S. F. KOWAL, J. Infect. Dis. 85, 25 (1949).

³ R. MURRAY, L. KILHAM, C. WILCOX, and M. FINLAND, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 63, 470 (1949). – A. L. OLITZKI, J. Gen. Microbiol. 6, 166 (1952).

⁴ E. SELIGMAN and M. WASSERMAN, J. Immunol. 57, 351 (1947).

⁵ H. M. GEZON and E. E. CRYST, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 68, 653 (1948).