

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in vain to isolate resistant strains from mice treated with subcurative doses of streptomycin; they quote, however, unpublished experiments by FOSHAY, who observed induced resistance to streptomycin in *Bacterium tularensis* *in vitro*.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 streptococci⁴.

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

⁴ H. M. GEZON and E. E. CRYST, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 68, 653 (1948).

¹ S. S. CHAPMAN, C. M. DOWNS, L. L. CORIELL, and S. F. KOWAL, J. Infect. Dis. 85, 25 (1949).

² 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).

The constancy of the streptomycin resistance in the mutant strain S.M.R.I. was investigated by transferring it to media without streptomycin. Even after 150 transfers, the resistance remained unaltered. Passages through mice were then made to determine the changes of virulence and resistance *in vivo*. After two direct passages from mouse to mouse, using liver and spleen for infection, the strain S.M.R.I. failed to induce the disease and no bacteria could be recovered from the mice. Also with a second technique (isolation and culturing of the strain after each passage, and inoculation of the bacteria from the cultures into mice), no changes either in the resistance or the virulence of the strain could be detected after six passages.

Inoculation of sublethal doses, 0.5 ml of the dilution 10^{-3} , of the S.M.R.I. strain into mice and their subsequent challenge with the virulent strain showed that this quantity of the resistant strain immunized the mice against one million LD_{50} .

Streptomycin resistant and non-resistant strains were tested for their susceptibility to aureomycin and chloramphenicol, the two other most effective antibiotics for *Bacterium tularensis*. No cross-resistance was found in these experiments.

The results presented in this paper show that the acquisition of streptomycin resistance by *Bacterium tularensis* is not accompanied by alterations in nutritional requirements and immunogenic properties, but seems to be connected with a loss of virulence.

H. YANIV, Y. AVI-DOR, and A. L. OLITZKI

Israeli Institute for Biological Research and Department of Bacteriology, Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, September 15, 1952,

Zusammenfassung

Von 12 streptomyzinfesten *B. tularensis*-Stämmen wurden 11 in einer 1/160 normalen NaCl-Lösung agglutiniert und waren von niedrigerer Virulenz als die durch dieselbe NaCl-Lösung nicht agglutinable, hochvirulente Ausgangskultur. Einer dieser streptomyzinfesten, nicht virulenten Stämme war fähig, weisse Mäuse gegen eine Million 50%iger tödlicher Dosen des Ausgangsstammes zu immunisieren.

Die enzymatische Synthese des Glutamins im *Lupinus albus*

Das Vorkommen und die Rolle des Glutamins und Asparagins in Pflanzen bildete seit der Entdeckung dieser Verbindungen den Gegenstand zahlreicher Untersuchungen¹. Die enzymatische Synthese des Glutamins aus Glutaminsäure und Ammoniak wurde aber erst in den letzten Jahren beinahe gleichzeitig von LEUTHARDT und BUYARD² in Meerschweinchen- und Rattenleberhomogenaten und von SPECK³ in Taubenleberhomogenaten nachgewiesen. Sie bewiesen, dass Adenosintriphosphat (ATP) die Energie zur Synthese liefert und dass Magnesiumionen zur Reaktion nötig sind. Ähnliche Ergebnisse erhielten ELLIOTT⁴ und ELLIOTT und GALE⁵

mit Gehirnextrakten bzw. *Staphylococcus aureus*. ELLIOTT berichtet auch kurz darüber, dass im *Lupinus albus* ein Enzym vorkommt¹, welches aus Glutaminsäure und Ammoniak in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen Glutamin synthetisiert.

Wir haben versucht, das im *Lupinus albus* nachgewiesene glutaminsynthetisierende Enzym zu isolieren, um seinen Wirkungsmechanismus aufzuklären.

Als Untersuchungsmaterial benützten wir 5–6 Tage lang (bei gewöhnlichem Laboratoriumlicht) keimende *Lupinus-albus*-Samen. Die Samen wurden am 5. bis 6. Tage des Keimens im mechanischen Mörser verrieben und abgepresst. Der Pressaft wurde 24 h lang bei 0°C gegen 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,6, dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen von 0,2 M Azetatpuffer, pH 5,2, versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Flüssigkeit wurde bei 0°C mit 0,2 M Essigsäure auf pH 4,2 eingestellt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, dann mit 0,2 M Natriumhydrogencarbonat aufgelöst. Die gewonnene Lösung wurde 24 h lang gegen 0,15-M-Natriumchlorid-, 0,005-M-Natriumhydrogencarbonat- und 0,001-M-Kobaltchlorid-Mischung dialysiert, dann wurde das pH mit 0,2 g Essigsäure auf 5,2 gebracht und der gewonnene Niederschlag abzentrifugiert und wieder in 0,2-M-Natriumhydrogencarbonat gelöst. Auf diese Weise reicher ten wir das Enzym ungefähr 20fach an.

Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Enzymversuche geschah folgenderweise: die komplette Reaktionsmischung enthielt 0,08 M Succinatpuffer, pH 6,5, 0,005 M Kobaltchlorid, 0,05 M neutralisiertes Hydroxylaminhydrochlorid, 0,05 M Natriumglutamat und 0,006 M ATP. Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 4 ml, Inkubation: 60 min bei 30°C.

In den Experimenten, wo die Amidsynthese geprüft wurde, wurde statt Hydroxylamin Ammoniumchlorid verwendet (150 µg NH_3 -N). Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit Trichloressigsäure abgestellt. Die Bestimmung der Hydroxamsäure wurde nach LIPMANN und TUTTLE² durchgeführt. Die Glutaminbestimmung wurde mit *Clostridium Welchii* SR 12 Stamm nach KREBS³ durchgeführt.

Tabelle I

Inkubation	Hydroxamsäurebildung in µM	Abgespaltes anorganisches Phosphat in µM
Komplettes System	8,0	8,6
Ohne Glutaminsäure	0,0	0,6
Ohne ATP	0,0	0,0
Ohne Kobaltionen	1,0	1,6
Ohne Hydroxylamin	0,0	0,7

Wie Tabelle I zeigt, wird parallel mit der Hydroxamsäuresynthese aus dem ATP anorganisches Phosphat abgespalten. Das gereinigte Enzym zeigt in Abwesenheit von Kobaltionen fast keine Aktivität. Auf ähnliche Weise aktivieren auch Magnesium und Manganionen. Das Enzym ist streng spezifisch für die 1(+) Konfiguration der Glutaminsäure, es wirkt auf d(–) Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht ein. Die Abbildung zeigt die Ionenaktivierung des Enzyms.

¹ H. E. STREET, Adv. Enzymol. 9, 391 (1949).

² F. LEUTHARDT und E. BUYARD, Helv. med. Acta 14, 247 (1947).

³ J. F. SPECK, J. biol. Chem. 168, 403 (1947).

⁴ W. H. ELLIOTT, Nature 161, 128 (1948).

⁵ W. H. ELLIOTT und E. F. GALE, Nature 161, 129 (1948).

¹ W. H. ELLIOTT, Biochem. J. 49, 106 (1951).

² F. LIPMANN und L. C. TUTTLE, J. biol. Chem. 159, 21 (1945).

³ H. A. KREBS, Biochem. J. 43, 51 (1948).