

(Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Cornell-Universität,  
Ithaca, N. Y.)

## Zum Nachweis mitogenetischer Strahlung durch beschleunigtes Wachstum von Bakterien<sup>1</sup>.

Von

Alice Jean Ferguson und Otto Rahn.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 22. Juli 1933.)

Der Nachweis mitogenetischer Strahlung durch Bakterien ist im allgemeinen erfolgreicher gewesen als der durch Hefesprossung. Immerhin liegt eine Anzahl negativer Ergebnisse vor, deren Ursache durch die folgende Untersuchung geklärt werden sollte. Inzwischen ist durch *Wolff* und *Ras* (1932) bereits die Ursache mancher Mißerfolge erkannt worden, die in den folgenden Sätzen dieser Verfasser zusammengefaßt werden können:

„Ein positiver Effekt entsteht nur während der prälogarithmischen Phase und nicht in der logarithmischen Phase“; ferner: „Hieraus müssen wir schließen, daß unsere Strahlen nur sehr wenig in die Bouillon eindringen, und daher nur diejenigen Bakterien von den Strahlen getroffen werden können, die sich in der Oberflächenschicht befinden“.

Wir konnten beide Fehlerquellen bestätigen und erweitern. Im folgenden sollen nur Versuche mit *Bacterium coli* angeführt werden, die mit einer Agarkultur des gleichen Bakteriums bestrahlt wurden. Der Sender war in allen Versuchen genau der gleiche; nur die Detektorkultur wurde geändert, um den Einfluß wechselnder Versuchsbedingungen festzustellen.

---

<sup>1</sup> Der *Heckscher Research Foundation*, durch deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglicht wurde, sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

### Versuchsordnung.

Als fester Nährboden diente Nähragar mit 0,3 % Fleischextrakt, 0,5 % Pepton und 1,5 % Agar. Als flüssiger Nährboden für die Detektorkultur diente eine sehr verdünnte Nährbouillon mit 0,03 % Fleischextrakt und 0,05 % Pepton, die also nur ein Zehntel der Nährstoffe der normalen Nährbouillon enthielt.

Der *Sender* war stets eine Agarkultur von *Bacterium coli*. Die sterile Agaroberfläche einer *Petri*-Schale wurde mit einer ein- bis vier-tägigen Bouillonkultur überflutet, die Flüssigkeit wurde dann abgegossen, und die so beimpfte Platte 4 Stunden bei 37° gehalten. Bei allen Versuchen war diese Kultur zu Beginn genau 4 Stunden alt.

Als *Detektor* dienten Bouillonkulturen desselben Bakteriums. Die Bestrahlung erfolgte anfangs unmittelbar nach dem Übertragen der Bakterien in frische Nährlösung. Alle zum Überimpfen und zum Zählen nötigen Verdünnungen wurden mit derselben Nährlösung angelegt, die auf 37° vorgewärmt war. Dieses Vorwärmen wurde auch mit allen anderen Lösungen und Apparaten vorgenommen, um Kälteschock zu vermeiden.

Zum Versuch wurde über die offene *Petri*-Schale mit der vierstündigen Agarkultur von *Bacterium coli* ein Blechdeckel gelegt, der einen kreisrunden Ausschnitt von 45 mm Durchmesser besaß. Über diesem lagen zwei dünne Drähte, auf denen eine Quarzschale von 45 mm Durchmesser ruhte. In diese Schale wurde 1 cm der frisch beimpften Bouillon getan (Abb. 1). Das Schälchen wurde durch einen

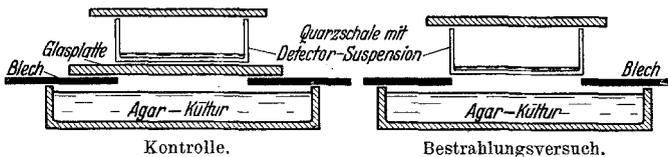


Abb. 1.

Versuchsordnung bei Bestrahlung der Bakterienkultur durch den Boden einer Quarzschale.

Glasdeckel verschlossen, um chemische Einflüsse auszuschalten; die Bestrahlung erfolgte durch den etwa 1 mm dicken Boden des Quarzschälchens. Als Kontrolle diente eine ganz ähnliche Kultur, bei der aber zur Absorption der ultravioletten Strahlung eine Glasplatte zwischen Quarzschale und Sender sich befand. Die gesamte Apparatur wurde in einer großen feuchten Kammer bei 37° gehalten.

Die Bakterien wurden mittels Agarplatten gezählt. Da zur Vermeidung tiefer Schichten nur sehr kleine Flüssigkeitsmengen verwandt wurden, erfolgte die Probenahme mit Pipetten, wie sie zur mikroskopischen Bakterienzählung in Milch benutzt werden; sie enthalten 0,01 cm.

Alle Angaben über Bakterienzahlen sind auf Zellenzahl je 1 ccm umgerechnet, um ein für allemal ein gleiches Maß zu haben, und um auch einen genauen Begriff von der Bakterienkonzentration zu geben, da diese Konzentration in Anbetracht der gegenseitigen Bestrahlung der Bakterien von Wichtigkeit ist.

#### Einfluß des Alters der Stammkultur.

In der nährstoffarmen Lösung wuchsen die Bakterien etwas langsamer als in der üblichen, zehnmals so konzentrierten Nährbouillon. Nach 24 Stunden war die Höchstzahl bei  $37^{\circ}$  noch nicht ganz erreicht; die Bakterien befanden sich noch im letzten Wachstumsstadium, und nach Überimpfung zeigten sie nur in der ersten Stunde eine Wachstumsverzögerung. In der zweiten Stunde war die Wachstumsgeschwindigkeit schon normal.

Die 2 Tage alten Kulturen haben bereits den Endpunkt der Vermehrung erreicht, und müssen als alte Kulturen bezeichnet werden. Bei ihnen dauerte es 3 bis 4 Stunden, ehe ein deutliches Wachstum einsetzte. Die 3 und 4 Tage alten Kulturen sind von den 2 Tage alten hierin wenig verschieden.

Unsere Versuche mit dauernder Bestrahlung (Tabelle I) zeigen bei den 24 Stunden alten, noch nicht ganz ausgewachsenen Kulturen keinen deutlichen mitogenetischen Effekt. Bei einigen Versuchen wird sogar bei langer Dauer der Bestrahlung eine Verzögerung deutlich sichtbar. Bei allen 2 und mehr Tage alten Kulturen ist eine Beschleunigung recht deutlich.

Einige Versuche mit kürzerer Bestrahlungsdauer ergaben, daß 30 und selbst 15 Minuten bereits zur Auslösung des mitogenetischen Effektes genügen (Tabelle II), aber nur bei alten Kulturen.

Nun ergab sich die Frage, ob es notwendig ist, die Bakterien erst auf frischen Nährboden zu übertragen, ehe sie die Strahlung ausnützen können, oder ob die günstige Wirkung auch eintritt, wenn die alten Kulturen als solche vor dem Überimpfen bestrahlt werden. Der Versuch mit einer 3 Tage alten Kultur zeigte (Tabelle III), daß dies Verfahren zulässig ist, wenn die Zellen gleich nach der Bestrahlung auf frische Nährlösung übertragen werden. Die jungen Kulturen zeigen wiederum schwankende Werte (bei diesem Verfahren ist natürlich keine dauernde Bestrahlung möglich), während die älteren Kulturen regelmäßig Wachstumsbeschleunigung zeigen. Selbst wenn die Bakterien nach der Bestrahlung noch 2 Stunden in der alten Nährlösung bleiben, ist die Wachstumsbeschleunigung noch merkbar (siehe den letzten Versuch von Tabelle IV).

Dies Verfahren hat den Vorteil, daß man in 1 ccm einer alten Kultur 10 bis 100 Millionen Zellen gleichzeitig bestrahlt, die nachher

Tabelle I.

Kulturen verschiedenen Alters, in verdünnte Nährbouillon übertragen und sofort in dünner Schicht in Quarzschälchen dauernd bestrahlt.

Alter der Kultur:	Zellenzahl je ccm			
	23,5 Std.		23,1 Std.	
	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
Zu Beginn . . . . .	8 050	8 050	7 520	7 520
Nach 1 Std. . . . .	10 960	14 130	9 500	8 266
" 2 " . . . . .	42 000	34 700	23 966	11 830
" 3 " . . . . .	—	—	81 533	26 450
" 4 " . . . . .	—	—	264 850	61 500
Alter der Kultur:	48 Std.		48 Std.	
Zu Beginn . . . . .	4 822	4 822	5 800	5 800
Nach 1 Std. . . . .	4 200	5 833	—	—
" 2 " . . . . .	4 075	6 466	5 560	5 500
" 3 " . . . . .	4 555	9 300	10 933	12 866
" 4 " . . . . .	4 650	22 350	26 500	32 800
Alter der Kultur:	72 Std.		96 Std.	
Zu Beginn . . . . .	8 375	8 375	19 160	19 160
Nach 1 Std. . . . .	5 700	6 900	12 350	14 560
" 2 " . . . . .	8 033	7 600	15 360	14 233
" 3 " . . . . .	11 366	26 300	26 500	75 700

Tabelle II.

Kulturen verschiedenen Alters, sofort nach Übertragung in frische Nährlösung kurze Zeit bestrahlt.

Alter der Kultur:	Bakterien je ccm			
	23,5 Std.		96 Std.	
	30 Min.		15 Min.	
Bestrahlungsdauer:	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
Zu Beginn . . . . .	7 520	7 520	19 160	19 160
Nach 1 Std. . . . .	9 500	14 766	12 350	17 133
" 2 " . . . . .	23 966	27 833	15 360	18 766
" 3 " . . . . .	81 533	50 557	26 500	53 850
" 4 " . . . . .	264 850	281 500	—	—

in einer großen Nährbodenmenge verteilt werden können. Man kann dann zum Zählen anstatt der 0,01 ccm-Pipetten die wesentlich genaueren 1 ccm-Pipetten benutzen. Es ergab sich dabei, daß die tatsächliche Zellenzahl im Kubikzentimeter nicht ohne Einfluß ist. Zu diesem Nachweis wurden von derselben Kultur nach Bestrahlung verschiedene Verdünnungen in Nährbouillon angelegt, und zwar 1 : 100,

Tabelle III.

Wirkung einer 30 Minuten langen Bestrahlung junger und alter Kulturen vor der Übertragung auf frische Nährböden.

Alter der Kultur:	Bakterien im ccm					
	21,2 Std.		24,5 Std.		25 Std.	
	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
Gleich nach Aussaat	12 200	10 900	7 600	7 966	1 466	1 700
Nach 1 Std. . . .	—	—	—	—	2 333	—
" 2 " . . . .	27 433	21 133	5 400	14 300	4 600	6 733
" 3 " . . . .	65 433	58 360	11 050	34 666	12 650	21 150
" 4 " . . . .	175 500	167 500	31 000	89 000	43 850	76 250
" 6 " . . . .	1355 000	1190 000	398 500	1413 500	—	—
Alter der Kultur:	71 Std.		72 Std.		94,5 Std.	
Gleich nach Aussaat	9 300	10 000	4 133	3 366	11 233	10 050
Nach 1 Std. . . .	8 500	8 200	—	—	—	—
" 2 " . . . .	10 150	12 750	7 866	9 233	22 533	27 400
" 3 " . . . .	16 000	20 800	9 900	11 700	48 700	57 960
" 4 " . . . .	55 000	69 300	19 450	27 950	110 500	180 000
" 6 " . . . .	—	—	177 000	425 500	680 000	1150 000

Tabelle IV.

3 Tage alte Kultur, nach halbstündiger Bestrahlung mit verschiedenen Nährlösungsmengen verdünnt.

	Sofort nach der Bestrahlung verdünnt						2 Std. nach Bestrahlung verdünnt	
	1 : 100		1 : 10000		1 : 1 000 000		1 : 10000	
	140 $\mu$		650 $\mu$		3000 $\mu$		—	
Durchschnittlicher Zellabstand:	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
Beginn . .	530 000	460 000	4 950	5 050	57	54	4 350	3 950
2 Std. . .	400 000	440 000	4 950	5 750	48	49	3 700	5 900
3 " . .	575 000	530 000	5 100	6 550	51	52	—	—
4 " . .	725 000	750 000	5 500	8 700	54	60	3 650	5 200
6 " . .	7 850 000	9 950 000	24 500	83 500	157	513	10 500	44 000
8 " . .	29 100 000	23 500 000	234 200	1 500 000	1 760	7 090	—	—

1 : 10000 und 1 : 100000. Das Ergebnis zeigt Tabelle IV. Die durchschnittliche Bestrahlung je Zelle war in allen Verdünnungen die gleiche, da ja alle von demselben 1 ccm der bestrahlten Stammkultur angelegt worden waren. War der Zellabstand groß (50 bis 5000 Zellen je Kubikzentimeter), so war die Strahlungswirkung groß; wenn die Zellen dagegen eng beieinander lagen (500000 Zellen je Kubikzentimeter), blieb die Wirkung aus. Es ist hierbei zu beachten, daß die normale Wachstums-

verzögerung um so länger dauert, je größer der Zellabstand ist; hierauf hat schon *Rahn* (1907) hingewiesen; s. auch *Rahn* (1933).

Es sei daran erinnert, daß *Wolff* und *Ras* ihre schönen mitogenetischen Wirkungen ebenfalls mit Bakterienkonzentrationen der Größenordnung 10000 je Kubikzentimeter erhielten.

**Einfluß der Bestrahlungsdauer.**

Die mitogenetische Literatur enthält mehrere Angaben über „Erschöpfung“ des Detektors bei zu langer Bestrahlung. Dies konnte von uns bestätigt werden. Je 1 ccm derselben 3 Tage alten Kultur wurde in verschiedenen Quarzschälchen 60, 30, 15 und 7,5 Minuten lang bestrahlt und alsdann, wie gewöhnlich, in verdünnte Nährbouillon übertragen (Tabelle V). Die einstündige Bestrahlung gab nur einen schwachen Effekt, die 7,5 Minuten lange Bestrahlung wirkte überhaupt nicht, während bei 15 und 30 Minuten die Zellenzahl das Dreifache der Kontrollen erreichte.

Tabelle V.

Einfluß verschiedener Bestrahlungsdauer auf eine dreitägige Kultur.

	Kontrolle Nr. 1	Dauer der Bestrahlung				Kontrolle Nr. 2
		60 Min.	30 Min.	15 Min.	7,5 Min.	
Beginn . . .	5 050	5 650	6 800	7 250	6 250	6 550
2 Std. . . .	5 700	5 800	7 950	7 750	5 850	7 000
3 " . . . .	—	11 000	14 350	14 400	8 300	8 500
4 " . . . .	23 750	24 250	29 000	35 350	19 150	19 550
6 " . . . .	188 000	223 000	434 000	457 000	139 000	137 000

Für unsere Versuchsbedingungen liegt also die Optimaldauer der Bestrahlung zwischen 15 und 30 Minuten; eine zu lange Exponierung ist ebenso unwirksam wie eine zu kurze. Die Dauer wird vermutlich von der Intensität der Strahlung abhängen und muß von Fall zu Fall ausprobiert werden.

**Absorption der Strahlung durch den Nährboden.**

*Wolff* und *Ras* (1932) haben bereits spektrographisch die Absorption der kurzwelligen ultravioletten Strahlung durch Nährbouillon nachgewiesen. Demnach müßte der mitogenetische Effekt auf Kulturen in normaler Nährlösung viel geringer sein als in verdünnter Bouillon. Zwei an verschiedenen Tagen angesetzte Versuche, bei denen der einzige Unterschied in der Konzentration der Nährlösung bestand, bestätigten diese Annahme (Tabelle VI). Es handelt sich bei diesen Versuchen um dauernde Bestrahlung nach der Überimpfung auf frischen

Nährboden. In der normalen Bouillon war das Wachstum besser als in der verdünnten, aber bestrahlte und unbestrahlte Kulturen wuchsen gleich schnell. In der verdünnten Nährlösung löste dagegen die Bestrahlung derselben Bakterien einen deutlichen mitogenetischen Effekt aus.

Tabelle VI.

Vergleich der Bestrahlungswirkung in normaler und 1:10 verdünnter Bouillon.

Versuch Nr.		Bestrahlung			
		in normaler Bouillon		in verdünnter Bouillon	
		Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
1	Zu Beginn . . .	8 470	8 470	8 375	8 375
	1 Std. später . .	4 800	7 100	5 700	6 900
	2 " " . . .	10 250	14 700	8 033	7 600
	3 " " . . .	74 330	78 000	11 366	26 300
2	Zu Beginn . . .	4 775	4 775	4 822	4 822
	1 Std. später . .	6 500	4 933	4 200	5 833
	2 " " . . .	12 333	10 266	4 075	6 466
	3 " " . . .	70 766	67 700	4 550	9 300
	4 " " . . .	—	—	4 650	22 350

Es könnte nun angenommen werden, daß das Fehlen des Effektes in der konzentrierteren Nährlösung nicht in der Absorption der Strahlung, sondern im größeren Nährwert zu suchen sei. In der Literatur findet man Andeutungen, daß bei optimalem Wachstum die Bestrahlung wirkungslos bleibt. In unserem Falle konnte dies nun nachgeprüft werden, indem die Bestrahlung *vor* der Übertragung in die normale bzw. verdünnte Bouillon vorgenommen wird. Die Versuchsanordnung ist dann folgende: Man läßt zwei Kulturen altern, eine in normaler, die andere in verdünnter Bouillon. Von jeder Kultur werden je 2 ccm getrennt 30 Minuten lang bestrahlt, dann wird von jeder Kultur 1 ccm in normale, 1 ccm in verdünnte Nährbouillon übertragen.

Das Ergebnis ist in Tabelle VII wiedergegeben. Die Bestrahlung der Bakterien in normaler Bouillon hat weder bei guter noch bei schlechter Ernährung eine Wachstumsbeschleunigung hervorgerufen. Bei Bestrahlung in verdünnter Bouillon ist dagegen das Wachstum sowohl bei guter als bei schlechter Ernährung beschleunigt worden. In der verdünnten Bouillon ist allerdings die Zunahme diesmal innerhalb der Fehlergrenzen, doch kommt es ja bei diesem Versuch gerade auf das Wachstum in der normalen Bouillon an.

Die Versuche mit mitogenetischer Strahlung sind öfters von Kritikern abgelehnt worden mit der Begründung, daß es sich wahr-

Tabelle VII.

Wirkung der Bestrahlung in normaler Nährbouillon und in 1:10 verdünnter Bouillon (1 ccm einer 72stündigen Kultur wurde 30 Minuten bestrahlt, alsdann in normaler und auch in verdünnter Bouillon ausgesät, und die Zellenzahl stündlich gezählt).

Detektor- kultur		Nach Bestrahlung kultiviert			
		in normaler Bouillon		in verdünnter Bouillon	
		Kontrolle	bestrahlt	Kontrolle	bestrahlt
In normaler Bouillon gewachsen und bestrahlt	Gleich nach der Aussaat	4 000	3 650	7 050	6 050
	1 Std. später . . . . .	4 000	4 800	4 300	5 650
	2 " " . . . . .	10 500	9 350	6 800	5 000
	3 " " . . . . .	47 300	42 750	9 150	7 350
In verdünnt. Bouillon gewachsen und bestrahlt	4 " " . . . . .	274 000	250 000	25 800	24 700
	Gleich nach der Aussaat	8 800	8 000	9 300	10 000
	1 Std. später . . . . .	10 760	10 200	8 500	8 200
	2 " " . . . . .	15 250	20 400	10 150	12 750
	3 " " . . . . .	62 400	60 145	16 000	20 800
	4 " " . . . . .	293 000	394 500	55 000	69 000

scheinlich um chemische Einwirkung der von dem „Sender“ verdampfenden Stoffe handelt. Um diesen Einwand von vornherein zu begegnen, wurden auch Versuche mit *Erlenmeyer*-Kolben aus Quarz angesetzt. Jeder Kolben erhielt 1 ccm der alten Kultur, wurde dann mit einem Gummistopfen fest verschlossen und  $\frac{1}{2}$  Stunde bestrahlt. Darauf folgte die übliche Übertragung auf frische Bouillon und stündliche Zählung der Zellen. Das Ergebnis war durchaus in Übereinstimmung mit dem obigen. Eine chemische Erklärung der Wachstumsbeschleunigung ist also ausgeschlossen.

#### Zusammenfassung.

Diese Untersuchung betrifft hauptsächlich das Verfahren zum Nachweis mitogenetischer Strahlung durch Bakterien. Die Quelle der Strahlung war stets eine vierstündige Oberflächenkultur von *Bacterium coli* auf Nähragar bei 37°. Als Detektor diente eine Kultur desselben Bakteriums in Nährbouillon.

Wenn eine eintägige Kultur dieses Bakteriums im Quarzgefäß bestrahlt wurde, vermehrte sie sich gewöhnlich gerade so schnell wie die Kontrollkultur. Zwei- bis fünftägige Kulturen dagegen wuchsen nach Bestrahlung wesentlich schneller als die Kontrollen. Es machte keinen Unterschied, ob die alten Bakterienzellen noch in der alten Nährlösung oder erst nach Übertragung in frische Nährlösung bestrahlt wurden.

Die Nährlösung, in der die Bestrahlung stattfand, war stets stark verdünnt (1 Teil Normalbouillon + 9 Teile Wasser). Normale Bouillon

absorbiert die mitogenetische Strahlung so stark, daß kein deutlicher Effekt eintritt.

Die besten Wirkungen wurden mit 100 bis 10000 Zellen je 1 ccm erzielt.

Zu lange Bestrahlung (1 Stunde) und zu kurze Bestrahlung (7,5 Minuten) verursachen keine Wachstumsbeschleunigung.

Bei Benutzung von Bakterien als Detektoren der mitogenetischen Strahlung ist vor allem zu beachten:

1. daß nur alte Zellen, deren Vermehrung bereits aufgehört hat, auf diese Strahlung reagieren;
2. daß die Strahlung durch den Nährboden stark absorbiert wird;
3. daß bei zu großer Zellkonzentration die Wirkung ausbleibt;
4. daß die Bestrahlungsdauer weder zu lang noch zu kurz sein darf;
5. daß es sich empfiehlt, sich nicht auf eine einzige Zählung zu verlassen, sondern die ganze Wachstumskurve der ersten 6 Stunden aufzunehmen.

#### Literatur.

- M. Baron*, *Planta* **10**, 28, 1930. — *Otto Rahn*, *Zentralbl. f. Bakt. II. Abt.*, **16**, 418, 1907. — *Derselbe*, *Quarterly Review of Biology* **8**, 77, 1933. — *L. K. Wolff* u. *G. Ras*, *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, **123**, 257, 1932.
-