Untersuchungen zur Beeinflussung der UV-Inaktivierung von Bakteriophagen sowie zur Deutung der auftretenden Inaktivierungskurven*

Von H. PICHL und W. UECKER

Aus dem Robert-Koch-Institut (I. Direktor: Prof. Dr. G. HENNEBERG)
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung (Leiter: Prof. Dr. H. RAETIG)
(Z. Naturforschg. 15 b, 226—231 [1960]; eingegangen am 5. März 1960)

A model is developed, explaining concave and convex forms of inactivation curves by a cooperation of two or more reactions. The dose dependence of inactivation is formulated mathematically with aid of the model and compared with the experimental values of inactivation by UV and hydrogenperoxide, showing that these values are in sufficient agreement with the theoretical function.

The results of simultaneous exposure of T3 phages to UV and visible light don't oppose the postulated theoretical function. The values rather support the proposed existence of two cooperating reactions.

Die bei der Einwirkung des UV-Lichtes auf Mikroorganismen gemachten Beobachtungen sind so zahlreich geworden, daß es schwierig wird, den Überblick zu behalten, sie sind jedoch bei weitem nicht eingehend genug, um die Wirkungsweise des UV deuten zu können. Will man versuchen, Teilgebiete der UV-Wirkung einer Klärung näher zu bringen, so erscheint es sinnvoll, Modellvorstellungen zu entwickeln. Diese Vorstellungen, die den übrigen nicht mit einbezogenen Beobachtungen nicht widersprechen dürfen, sind einer ständigen Kontrolle durch weitere Versuche zu unterziehen. Sie sind jedoch nur dann als positiv zu bewerten, wenn sich aus ihnen durch neue Gedanken zur UV-Wirkung Kontrollversuche ableiten lassen, auch wenn sich durch die Ergebnisse dieser Versuche das Modell als nicht zutreffend herausstellt.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, Inaktivierungskurven an Hand eines Reaktionsschemas zu interpretieren sowie mathematisch darzustellen und Deutungen für die Beeinflussung der UV-Inaktivierung von T3-Phagen zu geben.

Experimenteller Teil

Material und Methoden

Als Versuchsobjekte dienten T3-Phagen, die, wie von PICHL und UECKER¹ 1957 beschrieben, angezüchtet und gereinigt wurden. Die Konzentration während der Bestrahlung betrug 10^7 bis 10^8 Phagen/ml in *m*/50-Phosphatpuffer p_H 7,4. Die Zählung der aktiven Phagen erfolgte nach Adsorption an *E. coli* B auf Wasserblau-Glucose-Bouillonagar bei etwa 10^2 Plaques pro Platte. Bestrahlungsquellen waren eine Hg-Niederdrucklampe (HNS 12, Osram, vorwiegend UV-Strahlung der Wellenlänge 254 m μ) und eine Hg-Höchstdrucklampe (HBO 500, Osram). Das Licht der HBO 500 wurde mit einem 2-mm-Farbglass WG 1 (Schott & Gen.) gefiltert, um keine Strahlung mit Wellenlängen kleiner als 350 m μ wirksam werden zu lassen.

Die Phagen wurden in Quarzröhrchen von 8 mm ϕ bestrahlt. Der Abstand von der HNS (UV-Quelle) betrug 80 cm, von der HBO (Lichtquelle) 15 cm. Bei intermittierender oder gleichzeitiger UV- und Lichteinwirkung erfolgte die Bestrahlung des Quarzröhrchens von zwei Seiten entsprechend Abb. 1. Zwischen dem Röhr-

Abb. 1. Skizze der Anordnung bei intermittierender UV- und Lichteinwirkung.

chen und den Bestrahlungsquellen rotierten je ein Sektor auf einer gemeinsamen Achse, die durch einen regelbaren Motor angetrieben wurde. Die Sektoren waren so eingestellt, daß das Quarzröhrchen nur jeweils von einer Quelle Strahlung erhielt. Um die Temperatur während der Bestrahlung weitgehend konstant zu halten, wurden die Quarzröhrchen luftgekühlt. Die Kontrollröhrchen erhielten die Strahlung nur von einer Quelle. Bei Inaktivierung mit Hydrogenperoxyd wurden

* Zum Gedenken an ROBERT KOCH anlässlich des 50. Jahrestages seines Todes am 27. Mai 1960.

¹ H. PICHL u. W. UECKER, Z. Naturforschg. 12b, 770 [1957].

den in $m/50$ -Phosphatpuffer suspendierten T3-Phagen H_2O_2 in einer solchen Menge zugefügt, daß sich eine Endkonzentration von 2% ergab. Während der Inaktivierung befanden sich die Reagenzröhrchen mit den Phagensuspensionen im Wasserbad bei 37 °C. Nach den gewünschten Zeiten wurden den Röhrchen Proben entnommen und entsprechend in $m/50$ -Phosphatpuffer, der 0,1 γ/ml Katalase enthielt, verdünnt.

Ergebnisse

Inaktivierungskurven von Phagen bei verschiedenen Inaktivierungsmitteln und ihre Deutung

Neben linearen Inaktivierungskurven findet man bei Mikroorganismen häufig konkave und konvexe Kurvenformen. Da bei Bakterien lineare Inaktivierungskurven überwiegen und hier anzutreffende konkave und konvexe Kurven bei eventuellem gleichzeitigem Ablauf von Stoffwechselprozessen bzw. Teilungsvorgängen die Deutung komplex gestalten, sollen sich diese Ausführungen auf Phagen und Viren beschränken. Bei Inaktivierung von Phagen und Viren wird häufig eine mit der Dosis ansteigende bzw. abfallende Inaktivierungsrate beobachtet, doch werden bei Applikation hoher Dosen die Inaktivierungskurven exponentiell und deuten auf einen Eintreffervorgang hin. Dieses Verhalten ist weder für das Inaktivierungsmittel noch für die untersuchte Phagen- oder Virusart charakteristisch, sondern ändert sich mit beiden Parametern. Zur Deutung werden hierfür im wesentlichen folgende Annahmen herangezogen:

Für die konvexen Kurven kann in erster Näherung ein Mehrtreffervorgang verantwortlich gemacht werden, für die konkaven Kurven werden zwei verschiedene Erklärungen gegeben.

Die erste Erklärung besagt, daß in der Suspension ein Gemisch verschieden empfindlicher Teilchen vorliegt². Hierbei würden die Teilchen mit der größeren Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit sehr rasch abnehmen und die mit der geringeren den Verlauf der Kurve am Ende der Inaktivierung bestimmen. Für die Deutung der Dosiseffektcurven bei der UV-Inaktivierung von T3-Phagen würde die Annahme von zwei Gruppen verschieden empfindlicher Phagenteilchen hinreichend sein. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß für andere Inaktivierungsmittel oder andere Phagen eine größere Zahl unterschiedlich empfindlicher Gruppen angenommen werden muß. Die Mengenverhältnisse der verschieden empfindlichen Teilchen müssen dann jedoch nach der Vermehrung er-

halten bleiben, unabhängig davon, zu welcher Empfindlichkeitsgruppe das sich vermehrende Teilchen gehört. Denn bei Fortzüchtung einer stark inaktivierten Phagensuspension erhält man wieder eine Population, die sich in der Inaktivierungskurve nicht von derjenigen der Ausgangssuspension unterscheidet.

Eine weitere Deutungsmöglichkeit der konkaven Inaktivierungskurven ist durch die Annahme verschieden großer Teilchenaggregate gegeben. Hierbei würden zu Beginn der Behandlung die Einzelteilchen inaktiviert werden, während die aus mehreren Teilchen bestehenden Aggregate so lange noch als Einheit getestet werden, wie noch ein Teil des Aggregats vermehrungsfähig ist.

Die nachfolgend beschriebenen eigenen Versuche machen es recht unwahrscheinlich, daß die konkave Inaktivierungskurve durch eine Mischung verschieden empfindlicher Phagen bedingt ist. Jedes einzelne Phagenteilchen, gleich ob es von den empfindlichen

Abb. 2. Inaktivierungskurve von T3-Phagen bei nacheinander folgender Einwirkung von UV, Hitze und H_2O_2 .

oder weniger empfindlichen Teilchen der Suspension stammt, müßte danach alle auftretenden Empfindlichkeitsstufen bei der Vermehrung in einem bestimmten Verhältnis als Erscheinungsform auf die Tochterphagen übertragen. Wie die eigenen Versuche mit UV, Wärme und Hydrogenperoxyd an T3-Phagen zeigen (Abb. 2), überlagern sich die Dosiseffektcurven, wenn man die Inaktivierungsmittel nacheinander einwirken läßt, ungestört. An-

² L. A. SCHEELE, US Dep. of Health, Education, and Welfare, Publ. Health Serv., Techn. Rep. 10. 6. 1955.

dert man die Reihenfolge der einzelnen Inaktivierungsarten, so ändert sich die Form der entsprechenden Kurvenabschnitte nicht. Das einzelne Phagenteilchen müßte danach mindestens vier verschiedene Empfindlichkeitsstufen latent aufweisen und auf die Nachkommen übertragen können, wenn je zwei zur Deutung der UV- und Wärmeinaktivierung hinreichend wären und die Hydrogenperoxyd-Inaktivierung durch einen Mehrtrefferprozeß erklärt würde. Da die Annahme von je zwei unterschiedlichen Empfindlichkeitsstufen, für z. B. Wärme oder UV-Inaktivierung, nur eine Mindestforderung darstellt, und vielfach konkave Kurven nur durch die Annahme mehrerer unterschiedlich empfindlicher Populationsanteile gedeutet werden können, wird diese Hypothese kompliziert und unübersichtlich.

Zur Deutung der gekrümmten Inaktivierungskurven von Phagen können vielleicht folgende Gedanken beitragen. Wirkt auf eine einheitlich empfindliche Population ein Inaktivierungsmittel ein, so werden neben der Inaktivierung viele unspezifische Reaktionen chemischer und physiko-chemischer Art einhergehen, die unmittelbar nichts mit der Inaktivierung zu tun haben. Setzen diese Nebenreaktionen die Empfindlichkeit einer Population gegen z. B. UV-Einwirkung mit steigender Dosis an einer zunehmenden Zahl von Phagen herab, so würde sich eine konkave Inaktivierungskurve ergeben, wie sie bei T3 vorliegt. Es wird in dieser Hypothese also angenommen, daß durch die unspezifischen Neben-

wirkungen die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit von Phagen abnimmt, die bei längerer UV-Einwirkung verbliebenen überlebenden Phagen also erst unempfindlicher geworden sind. Steigern andererseits diese angenommenen Nebenreaktionen die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit, so würde sich eine konvexe Inaktivierungskurve ergeben, wie sie z. B. bei UV-Einwirkung auf T2-Phagen vorliegt.

Eine schematische Darstellung dieser Gedanken ist in Abb. 3 a gegeben.

Die mathematische Formulierung dieses Vorganges kann in folgender Weise geschehen: Die Inaktivierung, die durch die Reaktionskette R_k^1 ausgedrückt werde, soll als Reaktion erster Ordnung vorausgesetzt werden:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -k N_t \quad (1)$$

(N_t : Zahl der aktiven Teilchen nach der Bestrahlungszeit t bei konstanter Intensität, k : Proportionalitätsfaktor). Der Eingriff der zweiten Reaktionskette (R_k^2) verändert die Wahrscheinlichkeit der Inaktivierung, d. h. der Proportionalitätsfaktor k ist als eine Funktion von t anzusetzen. Da jedoch nach einer gewissen Einwirkungszeit des Inaktivierungsmittels die Inaktivierung einer Reaktion erster Ordnung folgen soll, kann für k geschrieben werden:

$$k(t) = k_1 + k_2 \psi(t) \quad (2)$$

mit den Nebenbedingungen

$$\psi(0) = 1 \quad \text{und} \quad \psi(\infty) = 0$$

oder

$$\psi(0) = 0 \quad \text{und} \quad \psi(\infty) = 1$$

und $\psi(t)$ stetig und monoton zwischen $t=0$ und $t=\infty$.

Das würde bedeuten, die neben der Inaktivierung ablaufende Reaktion (Störprozeß) ändert die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit der Organismen in den durch k_1 und $k_1 + k_2$ gegebenen Grenzen mit der Inaktivierung monoton ansteigend bzw. fallend, was den Beobachtungen entsprechen würde. Die Differentialgleichung für die Inaktivierung würde dann lauten:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -[k_1 + k_2 \psi(t)] N_t. \quad (3)$$

Durch Integration erhält man:

$$\ln N(t) = -(k_1 t + k_2 \int \psi(t) dt + C). \quad (4)$$

Nimmt man an, daß die Störreaktion R_k^2 ebenfalls eine Reaktion erster Ordnung ist, so kann man für $\psi(t)$ schreiben:

$$\psi_1(t) = e^{-\lambda t} \quad (5a)$$

Abb. 3. Schematische Darstellung im Mikroorganismus möglicher Reaktionen. a) Überlagerung zweier Reaktionsketten zur Deutung konkaver und konvexer Inaktivierungskurven. b) Eintrefferprozeß; c) Zweitrefferprozeß; R=mögliche Reaktion; 1=Reaktionsablauf; 0=Reaktionsablauf unterbrochen; ®UV=Anregung durch UV; ®=sonstige Anregung durch z. B. Wärme, Nährstoffe und anderes; [R] = Reaktion führt zum nachweisbaren Zustand des Mikroorganismus (z. B. irreversible Inaktivierung).

oder

$$\psi_2(t) = 1 - e^{-\kappa t}. \quad (5b)$$

Setzt man diese Funktion in (4) ein, so erhält man

$$\ln N(t) = -(k_1' t \pm k_2' e^{-\kappa t} + C) \quad (6)$$

oder

$$N(t) = N_0 \exp[-(k_1' t \pm k_2' e^{-\kappa t} + C')]. \quad (7)$$

Aus der Bedingung $N(0) = N_0$ kann C' zu

$$C' = -k_2' \quad (8)$$

bestimmt werden.

In Abb. 4 geben die eingetragenen Punkte die Meßwerte für die UV- (B) und H_2O_2 - (A) Inakti-

Abb. 4. Inaktivierungsverlauf von T3-Phagen bei: A. H_2O_2 Einwirkung; B. UV-Einwirkung. ● Meßpunkte der UV-Einwirkung. ○ Meßpunkte der H_2O_2 -Einwirkung. — Nach den Inaktivierungsfunktionen (7) errechnete Kurven.

vierung von T3-Phagen an. Sie stellen die Mittelwerte von etwa je 200 Versuchen dar. Die eingezeichneten Fehlerbreiten bezeichnen den mittleren quadratischen Fehler. Die ausgezogenen Kurven wurden nach der angegebenen Inaktivierungsfunktion berechnet. Die darin auftretenden Konstanten k_1 , k_2 und κ wurden auf folgende Weise bestimmt:

Für große t geht die Funktion in die Form

$$N(t) = N_0 \exp[-(k_1' t + C')] \quad (9)$$

über. Die Meßpunkte für große Inaktivierungszeiten können daher zusammengefaßt und mit Hilfe

eines Geradenausgleichs der lineare Teil der Kurve bestimmt werden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate $t=0$ ergibt $\ln k_2'$, der Anstieg $-k_1'$. Logarithmiert man die Differenzen zwischen den Ordinaten der restlichen Meßpunkte und der Geraden, so lassen sich diese Werte wieder durch eine Gerade darstellen, deren Anstieg κ ist. In Tab. 1 sind die mit Hilfe der so berechneten Konstanten sich ergebenden Inaktivierungswerte den Meßwerten gegenübergestellt. Die theoretischen Werte stimmen mit den Meßwerten hinreichend gut überein, sie befinden sich in allen Fällen innerhalb der Fehlerbreite.

Beeinflussung der UV-Inaktivierung durch sichtbares Licht

Trotz der guten Übereinstimmung der Inaktivierungsfunktion mit den gemessenen Werten ist der Wert der oben angeführten Formel so lange problematisch, wie es nicht gelingt, einen der postulierten Prozesse unabhängig von dem anderen experimentell zu beeinflussen und dadurch den Verlauf der Inaktivierungskurve zu ändern. Folgender Versuch kann in dieser Richtung gewertet werden. Gereinigte T3-Phagen lassen sich weder durch sichtbares Licht inaktivieren (vgl. unten), noch werden uv-inaktivierte, nicht an Bakterien adsorbierte Phagen durch Licht reaktiviert. Es wurde daher untersucht, ob sichtbares Licht ein geeignetes Mittel ist, um den einen der beiden postulierten Prozesse in irgendeiner Weise zu beeinflussen. Hierbei ergab sich, daß eine Bestrahlung der Phagen mit sichtbarem Licht vor oder/und nach der UV-Inaktivierung unwirksam ist, d. h. die Inaktivierungskurve wird auf diese Weise nicht verändert. Läßt man jedoch sichtbares Licht gleichzeitig mit UV-Licht auf die Phagen einwirken, so wird der Verlauf der Inaktivierungskurve dahingehend geändert, daß in dem gekrümmten Teil eine stärkere Inaktivierung bei gleicher UV-Dosis gegenüber der Kontrolle (alleinige UV-Bestrahlung) erreicht wird, während die Neigung des linearen Verlaufes unverändert ist. Wird die Lichtbehandlung jedoch erst dann begonnen, wenn der gekrümmte Teil der Inaktivierungskurve schon durchlaufen ist, so kann keine Beeinflussung der Inaktivierung mehr festgestellt werden. Die Einwirkung des Lichtes mußte jedoch nicht unbedingt gleichzeitig mit der UV-Bestrahlung erfolgen, sondern es konnte in sehr rascher Folge UV und sichtbares Licht abwechselnd auf die Phagen einwirken, ohne daß sich die Beein-

Zeit der Behandl. [Sek.]	N_t/N_0 bei UV-Inaktivierung [%]		N_t/N_0 bei H_2O_2 -Inaktivierung [%]	
	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen
15	$6,6 \cdot 10^1$	$6,7 \cdot 10^1$	$9,1 \cdot 10^1$	$8,9 \cdot 10^1$
30	$4,3 \cdot 10^1$	$4,8 \cdot 10^1$	$8,2 \cdot 10^1$	$8,0 \cdot 10^1$
60	$2,4 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^1$	$6,1 \cdot 10^1$	$6,5 \cdot 10^1$
90	—	—	$4,2 \cdot 10^1$	$4,3 \cdot 10^1$
120	$8,5 \cdot 10^0$	$9,7 \cdot 10^0$	$2,6 \cdot 10^1$	$2,9 \cdot 10^1$
180	$4,3 \cdot 10^0$	$4,5 \cdot 10^0$	$9,8 \cdot 10^0$	$9,4 \cdot 10^0$
240	$2,4 \cdot 10^0$	$2,4 \cdot 10^0$	$3,7 \cdot 10^0$	$3,0 \cdot 10^0$
300	$1,5 \cdot 10^0$	$1,3 \cdot 10^0$	—	—
360	$9,5 \cdot 10^{-1}$	$9,5 \cdot 10^{-1}$	$5,3 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-1}$
420	$6,6 \cdot 10^{-1}$	$6,5 \cdot 10^{-1}$	—	—
480	$4,7 \cdot 10^{-1}$	$4,7 \cdot 10^{-1}$	—	—
600	$2,7 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	—	—
720	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	—	—
840	$8,6 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$	—	—
960	$4,7 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-2}$	—	—

Tab. 1. Vergleich der errechneten und gemessenen Überlebensrate N_t/N_0 (%) bei UV- bzw. Hydrogenperoxyd-Inaktivierung von T3-Phagen (Ausgangskeimzahl=100%).

flussung wesentlich änderte. Die Zeit innerhalb der die Lichteinwirkung auf den Beginn der UV-Bestrahlung zur Messung eines deutlichen Effektes folgen mußte, war etwa $5 - 8 \cdot 10^{-3}$ Sekunden. Wurde diese Zeit etwa um den Faktor 5 überschritten, so war keine Beeinflussung der UV-Inaktivierung durch sichtbares Licht mehr festzustellen. In den unten dargestellten Versuchen betrug die Zeit des UV-Blitzes ca. 10^{-3} Sek., während der Lichtblitz ca. 10^{-2} Sek. dauerte.

In Abb. 5 sind die Meßpunkte der Inaktivierungskurve von T3-Phagen für UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger Lichteinwirkung dargestellt. Die Kontrolle (nur UV, intermittierend) deckt sich mit der nach (6) berechneten Inaktivierungskurve. Die sehr geringe inaktivierende Wirkung des Lichtes allein, die u. U. auf Eiweiß-Verunreinigungen der Phagensuspension zurückgeführt werden kann, ist rechnerisch berücksichtigt, indem die Meßwerte für die Inaktivierung durch Licht- und UV-Bestrahlung auf die Werte der nur mit Licht bestrahlten Kontrolle bezogen wurden. Die ausgezogene Kurve ergibt sich aus der Anwendung des Denkschemas auf den Versuch. Bei der Deutung der Beeinflussung der UV-Inaktivierung durch sichtbares Licht ließe sich für den gekrümmten Teil der Kurve, in dem eine Verstärkung gegenüber der reinen UV-Inaktivierung erfolgt, eine Erklärung sowohl durch eine verstärkte Anregung der ersten Reaktion bei gleichzeitiger Licht- plus UV-Einwirkung als auch durch alleinige Beeinflussung der zweiten Reaktionskette (Störreaktion) durch eine lichtangeregte Reaktionskette

R_k^3 geben (Abb. 3 a). Da aber im linearen Teil der Inaktivierungskurve sichtbares Licht keine Beeinflussung der Inaktivierungsrate bewirkt, kann die erste Annahme der stärkeren Anregung der ersten Reaktionskette durch UV plus Licht ausgeschlossen werden. Die Reaktionskette R_k^2 (Abb. 3 a) muß zu diesem Zeitpunkt bereits in allen Phagen abgelaufen sein, oder das Glied der Kette fehlen, an dem die Reaktionskette R_k^3 angreifen kann. Nimmt man nach diesen Überlegungen als gegeben an, daß das sichtbare Licht den Störprozeß beeinflusst und eine Dosisreduktion bewirkt, so wäre in der für die Inaktivierung geltenden Formel κ durch ein neues κ' zu ersetzen. κ' kann aus einem beliebigen Meßpunkt (am besten bei hoher Inaktivierung) der sich bei Einwirkung von UV und sichtbarem Licht ergebenden Inaktivierungskurve und der Inaktivierungsfunktion für UV allein berechnet werden. Die Inaktivierungskurve wird dann durch die Formel

$$N(t) = N_0 \exp \left[- \left(k_1' t \pm \frac{k_2'}{\kappa'} e^{-\kappa' t} + \frac{k_2'}{\kappa'} \right) \right] \quad (10)$$

dargestellt.

Die Möglichkeit, die Belichtung kurze Zeit nach der UV-Bestrahlung auf die Phagen einwirken zu lassen, ohne die Wirkung wesentlich zu ändern, bedeutet für die Reaktion R_k^2 eine Zeitkonstante in der Größenordnung von 10^{-3} Sek., wobei es offen bleiben muß, ob ein „photolabiler“ intermediärer Zustand (R_3^2) gebildet wird, der nur innerhalb von 10^{-3} Sek. beeinflusst werden kann, oder ob sich der Eingriff der Kette R_k^2 in R_k^1 innerhalb dieser Zeit nach der Anregung vollzieht.

Diskussion

Es sind in der Literatur von mehreren Autoren Vorstellungen über die UV-Inaktivierung von Mikroorganismen entwickelt worden^{3a-i, 4}.

Diese Modelle müssen sich, schon auf Grund der bisherigen unzureichenden Kenntnisse über den Ablauf des Inaktivierungsprozesses, auf Teilgebiete beschränken. Sie versuchen, die vorliegenden Befunde einzuordnen, um daraus Hinweise über die bisher ungeklärten Hauptfragen zu erhalten, z. B. ob es sich um eine direkte oder indirekte Inaktivierung handelt, und wie die verschiedenen Reaktivierungsarten zu deuten sind. Mit den Inaktivierungskurven befassen sie sich jedoch nur am Rande. Es war wohl möglich, lineare und konvexe Kurven durch Ein- bzw. Mehrtrefferprozesse zu interpretieren, doch mußten für die Deutung der konkaven Inaktivierungskurven zusätzliche Hypothesen (unterschiedliche Empfindlichkeit der Population, Aggregation der Mikroorganismen) zu Hilfe genommen werden.

Die Hypothese der unterschiedlichen Empfindlichkeit einer genetisch einheitlichen Population wird durch Versuche an T3-Phagen recht unwahrscheinlich. Es zeigte sich, daß bei Anwendung verschiedener Inaktivierungsarten (UV, Wärme, Hydrogenperoxyd) nacheinander eine ungestörte Überlagerung der Inaktivierungskurven erfolgt, gleich in welcher Reihenfolge die verschiedenen Inaktivierungsmittel einwirkten (Abb. 2). Selbst wenn man die H_2O_2 -Wirkung durch einen Mehrtrefferprozeß erklärt, würden bei Annahme je zweier unterschiedlich empfindlicher Populationen für die Wärme- bzw. UV-Wirkung schon vier unterschiedliche Empfindlichkeiten latent in einem Phagen vorhanden sein müssen und entsprechend mehr, wenn eine Einzelkurve sich nicht mehr durch zwei verschieden empfindliche Populationsanteile deuten läßt. Damit würde diese Hypothese sehr kompliziert und unübersichtlich.

Die zur Deutung nach oben konkaver Inaktivierungskurven im eigenen Reaktionsschema postulierte Überlagerung zweier durch UV angeregter Reaktionsketten ließ sich in weiteren Experimenten an

T3-Phagen stützen. Läßt man UV und sichtbares Licht gleichzeitig oder intermittierend auf T3-Phagen einwirken, so zeigt sich, daß die Inaktivierung im konkaven Abschnitt der Inaktivierungskurve zu beeinflussen ist, dagegen nicht im nachfolgenden linearen Teil (Abb. 5). Die nach diesem Reaktions-

Abb. 5. Inaktivierungskurven von T3-Phagen bei UV- und Lichteinwirkung sowie reiner UV-Einwirkung. ● Meßpunkte der UV-Einwirkung. — Ausgezogene Kurve errechnet. ○ Inaktivierung durch UV und Licht.

schema aufgestellten Funktionen zeigen sowohl für die UV-Inaktivierung bei gleichzeitiger oder intermittierender Lichteinwirkung als auch für die UV-Inaktivierung und H_2O_2 -Inaktivierung (Abb. 4) eine im Rahmen der Meßgenauigkeit hinreichende Übereinstimmung mit den Meßwerten. Die Bedeutung der in den Funktionen auftretenden Konstanten wird in einer weiteren Veröffentlichung diskutiert.

Das Reaktionsschema erlaubt weiterhin eine Darstellung der Reaktivierung nach vorhergehender Inaktivierung sowie von Ein- und Mehrtrefferprozessen (Abb. 3 b, c). Die Auffassungen der direkten und indirekten Inaktivierung lassen sich ebenfalls zwanglos diskutieren, dabei zeigt sich jedoch, daß eine Entscheidung zwischen den beiden Auffassungen — wie zu erwarten — aus den In- und Reaktivierungsphänomenen allein nicht möglich ist.

³ a) A. KELLNER, J. Bacteriol. **65**, 252 [1953]; b) R. LATARJET, L. R. CALDAS, B. MILETIC u. P. MORENNE, Brit. J. Radiol. **27**, 54 [1954]; c) A. LEMBKE, W. KAUFMANN, H. LAGONI u. H. GANTZ, Naturwissenschaften **38**, 564 [1951]; d) Kieler Milchwirtschaftl. Forsch.-Ber. **3**, 679 [1951]; e) H. B. NEWCOMBE u. H. A. WHITEHEAD, J. Bacteriol. **61**, 243 [1951]; f) A. NOVICK u. L. SZILARD, Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**,

591 [1949]; g) R. B. ROBERTS u. E. ALDOUS, J. Bacteriol. **57**, 363 [1949]; h) W. STEIN u. W. HARM, Z. Naturforsch. **8b**, 742 [1953]; i) N. W. TIMOFEEFF-RESSOVSKY u. K. G. ZIMMER, Biophysik Bd. 1. Das Trefferprinzip in der Biologie. Verlag S. Hirzel, Leipzig 1947.

⁴ D. E. LEA, Actions of radiations on living cells. MacMillan-Verlag, New York 1947.