

6. A. V. ORTALI e D. STEVE BOCCIARELLI — Inattivazione di batteri con raggi ultravioletti. Il fattore tempo.

Riassunto. — Sul ceppo *Escherichia coli* K 12 è stato studiato l'effetto di inattivazione dei batteri per azione dei raggi ultravioletti, per stabilire se esso dipende dal tempo durante il quale la radiazione ha agito sui batteri, a parità di dose. È stato stabilito che, quando l'irradiazione avviene durante periodi di tempo brevi, cioè dell'ordine del minuto, esiste una dipendenza dell'effetto di inattivazione dal tempo. Ciò dimostra che tale effetto è, per lo meno in parte, dovuto non a mutazioni geniche, ma ad alterazioni dei processi chimici che interessano il metabolismo cellulare.

Résumé. — On a étudié l'effet d'inactivation des bactéries par l'action des rayons ultraviolets sur la souche *Escherichia coli* K 12 pour établir s'il dépend du temps pendant lequel les bactéries subissent l'action de la radiation, à doses égales. On a pu constater que, lorsque la durée de l'irradiation est brève, c'est-à-dire de l'ordre de la minute, il existe une relation entre l'effet d'inactivation et le temps. Cela démontre que cet effet, tout ou moins en partie, est dû, non pas à des mutations de gènes, mais à des altérations de phénomènes chimiques qui intéressent le métabolisme cellulaire.

Summary. — The inactivating effect of ultra-violet rays on bacteria has been studied on the *Escherichia coli* K 12 strain to establish whether this depends on the time during which the bacteria has been exposed to the radiation in equal doses. It has been found that, when the irradiation occurs during brief periods of time, within the range of a minute, a relation exists between the effect of inactivation and the time. This shows that the effect is, at least in part, due, not to a mutation of genes, but to an alteration in the chemical processes which affects the cellular metabolism.

Zusammenfassung. — Auf einem Stamm von *Escherichia coli* K 12 ist die die Bakterienvirulenz herabsetzende Wirkung von ultravioletten Strahlen beobachtet worden, um festzustellen, ob diese bei gleicher Dosisierung von der Zeit abhängt, während der die Strahlung auf die Bakterien einwirkt. Es ist festgestellt worden, dass eine Abhängigkeit der Virulenzminderung von der Zeit dann besteht, wenn die Bestrahlung während kurzer Zeiträume, d. h. von Minutendauer, erfolgt. Das beweist,

dass die besagte Wirkung, wenigstens zum Teil, nicht auf Genmutationen zurückzuführen ist, sondern auf Veränderungen der chemischen Abläufe, die den Zellmetabolismus angehen.

1. - INTRODUZIONE.

E' noto come l'irradiazione con raggi X, ultravioletti e corpuscolari possa ostacolare la riproduzione di cellule viventi, e come gli stessi agenti fisici siano in grado di produrre mutazioni geniche sopra esseri viventi sia unicellulari che pluricellulari. Sui risultati di numerose esperienze compiute da TIMOFEEFF RESSOWSKY e coll. intorno al decennio 1930-1940 sugli effetti dell'irraggiamento con raggi X di *Drosophila melanogaster* è basata la teoria dell'urto nelle reazioni biologiche elementari, secondo la quale l'azione delle radiazioni, sia elettromagnetiche che corpuscolari, cui sono dovute le mutazioni, deve considerarsi limitata a una ristretta regione delle cellule colpite (ambito d'urto) che può identificarsi col gene o con determinati gruppi di geni: le cellule colpite dalla radiazione entro l'ambito d'urto, subiscono la mutazione o morte, intesa questa come mutazione letale; quelle colpite al di fuori dell'ambito d'urto restano intatte. La teoria è basata sull'osservazione, da moltissimi sperimentatori ripetuta, che il numero di mutazioni ottenute mediante l'irradiazione è funzione esponenziale della dose somministrata (1, 2).

A base della validità della teoria è evidentemente l'asserzione che dosi uguali di radiazioni, somministrate in tempi diversi, producano gli stessi effetti biologici per quanto riguarda le mutazioni. Nel caso delle mutazioni in *Drosophila*, indotte da raggi X, l'indipendenza dal fattore tempo è stata controllata con risultati soddisfacenti (3, 4, 5); nel caso di inattivazione di batteri dovuta a radiazione tale controllo è

(1) BUZZATTI-TRAVERSO A., CAVALLI L.: Teoria dell'urto ed unità biologiche elementari - Longanesi, Milano, 1948.

(2) LEA D. E.: Action of radiations on living cells - Cambridge Univ. Press 1945.

(3) PETERSON E.: Time intensity factor in X ray irradiation - Brit. J. Rad., 1948, 21, 414-419.

(4) LEA D. E., HAINES R. B., BRETSCHER E.: Bactericidal action of X rays neutrons and radioactive radiations - J. Hyg. Camb., 1941, 41, 1.

(5) LEA D. E., KENNETH M. SMITH: The inactivation of plant viruses by radiation - Parasitology, 1940, 32, 405.

stato alcune volte tentato ma con risultati non definitivi (6, 7, 8, 9, 10) e contraddittori.

D'altra parte, mentre le esperienze su *Drosophila* sono state fatte, per la massima parte, mettendo in evidenza, col metodo CIB, mutazioni letali legate al sesso, le esperienze su batteri riguardano invece per lo più l'effetto letale sulla popolazione, permettendo solo di valutare il numero di batteri resi incapaci di produrre colonie dopo essere stati irradiati. Evidentemente non è rigoroso, in questo caso, parlare di mutazioni letali, anche se come risulta dalla letteratura esistente sull'argomento, molti AA hanno ottenuto curve di inattivazione di batteri a tipo esponenziale, analoghe quindi a quelle che danno le mutazioni letali in *Drosophila* in funzione della dose (1, 2).

La radiazione ultravioletta, mentre è stata solo raramente usata come agente mutagene nelle esperienze su *Drosophila*, ha avuto invece largo impiego in quelle di inattivazione di batteri. Data la possibilità che almeno una parte dell'azione della radiazione ultravioletta sui batteri sia dovuta ad effetti fotochimici che interessino la vita e lo sviluppo del batterio indipendentemente da eventuali mutazioni geniche, e dati anche i risultati discordanti ottenuti dai diversi autori nello studio delle curve di inattivazione di batteri mediante radiazione ultravioletta, abbiamo ritenuto opportuno eseguire un controllo del fattore tempo su batteri irradiati con questo mezzo.

2. - CONDIZIONI SPERIMENTALI.

a) La sorgente di luce ultravioletta era costituita da una lampada a mercurio in quarzo, a bassa pressione, della potenza di circa 5 Kw, munita di un riflettore emisferico metallico che convogliava la luce della lampada in un fascio poco divergente: la distribuzione di intensità di questo fascio è però poco uniforme in prossimità della lampada. Per ovviare a questo inconveniente, che rendeva naturalmente difficile la valutazione della dose somministrata nell'area occupata dalla sospensione

(6) REUTSCHLER H., NAGY R., MOUROMSEFF G.: Bactericidal effect of ultraviolet light - J. Bact., 1941, 41, 745.

(7) GATES F. L.: A study of the bactericidal action of ultra violet light - II. The effect of various environmental factors and conditions - J. Gen. Physiology, 1929, 13, 249-260.

(8) KELNER A.: Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation - J. Bact., 1949, 58, 511-522.

(9) LEA D. E., HAINES R. B.: Bactericidal action of ultraviolet light - J. Hyg. Camb., 1940, 40, 162.

(10) MARCHAL J. G.: Etude de l'action des rayons ultra-violet sur les Bactéries - Travaux Lab. Microb. Nancy, 1947, XV, 60-77.

dei batteri da irradiare, abbiamo per la prima parte di queste esperienze (1° e 2° gruppo) diaframmato la sorgente, in modo da eliminare i raggi riflessi lateralmente, oppure eliminato il riflettore; nelle seguenti (3° e 4° gruppo) abbiamo usato tutto il fascio di luce, ma controllando accuratamente l'uniformità del campo in modo da utilizzare solo la regione del fascio in cui l'intensità si manteneva costante. Il recipiente, cilindrico, che conteneva la sospensione di germi da sottoporre all'irradiazione copriva del resto una superficie di soli 7,5 cm²; la distanza minima alla quale abbiamo irradiato è circa 50 cm.

Non abbiamo usato luce monocromatica per non perdere intensità, desiderando che le esposizioni fossero brevi per evitare possibili alterazioni dei preparati nelle esposizioni di maggiore durata. D'altra parte abbiamo riscontrato che la presenza di radiazioni dello spettro visibile non produceva alcun processo di inattivazione (controllo n. 5) nè alcuna sensibile riattivazione dei germi nel breve tempo durante il quale si facevano le irradiazioni (controllo n. 6).

b) Le misure dell'intensità luminosa venivano fatte a mezzo di pile termoelettriche Kipp e Zonen, la cui sensibilità è, secondo i dati della Casa, $1,25 \times 10^{-8}$ V per 1 erg/sec. cm², in accordo con le tarature da noi fatte a mezzo di un dispositivo potenziometrico.

Il primo e il secondo gruppo di misure sono stati fatti irradiando i batteri con circa 41.000 erg/cm² per min.; i seguenti con circa 50.000 erg/cm² per min.

Nelle misure d'intensità veniva sempre detratto l'effetto di zero sulla pila dovuto alle radiazioni termiche, il quale era tuttavia sensibile solo alle distanze minori dalla lampada. Misurando l'intensità totale del fascio luminoso, e non della sola regione ultravioletta, si ammette naturalmente che lungo tutto il fascio luminoso le due grandezze siano tra di loro proporzionali: poichè, soprattutto a causa della presenza del riflettore metallico ciò poteva anche non essere vero, abbiamo controllato che i rapporti di intensità della sola regione ultravioletta dello spettro, isolata a mezzo di un filtro liquido, alle varie distanze, fossero uguali ai medesimi rapporti misurati per il fascio completo.

c) Le esposizioni venivano fatte a distanze diverse dalla lampada, determinate in modo che le rispettive intensità stessero fra loro in rapporti semplici; e poichè la dose complessiva D somministrata è legata all'intensità i e alla durata dell'esposizione dalla relazione:

$$D = it$$

i tempi di esposizione stavano anch'essi in rapporti semplici.

Ogni serie di esposizioni, comprendente cioè tutte le esposizioni per tutte le durate prestabilite, veniva sempre eseguita nel tempo minimo possibile, non interrompendosi mai la serie di esposizioni se non quando questa era completa.

Appena irradiata, la sospensione veniva portata in altra stanza dove si faceva l'inseminamento su piastra.

d) Preparazione dell'emulsione: il ceppo *Escherichia coli* K 12 coltivato su Nutrient Agar Difco distribuito in tubi a becco di clarino, dopo 24 h di incubazione venne emulsionato in soluzione fisiologica e lavato più volte centrifugando e riemulsionando sempre in soluzione fisiologica. Tale emulsione, indicata nei protocolli come « vecchia », venne lasciata stabilizzare in ghiacciaia a 4° per circa un mese e dopo tale periodo usata per le prove. L'emulsione « vecchia », per quanto avesse l'inconveniente di non essere molto sensibile alla radiazione e di diminuire ancora di sensibilità col passare del tempo, offriva il vantaggio di avere il titolo ben noto e caratteristiche costanti. L'emulsione fresca veniva, invece, usata appena raccolta, dopo una valutazione nefelometrica grossolana del numero di germi presenti. Tale emulsione non veniva lavata ma soltanto diluita fino al titolo usato per l'irradiazione. La diluizione usata tanto per l'emulsione « vecchia » che per la fresca era quella che, dopo irradiazione, poteva venir seminata su piastra direttamente in modo da evitare ulteriori diluizioni. L'emulsione, portata alla temperatura del ghiaccio fondente, veniva irradiata sempre a temperatura costante e conservata, sino al momento del piastramento a temperatura costante e al buio. Il piastramento veniva eseguito sotto luce verde, per evitare la riattivazione.

e) Piastramento. Tranne qualche conta del numero di germi capaci di dare colonia, fatta col metodo dell'agar-stripes ⁽¹¹⁾, tutte le colonie sono state fatte su piastra con tre strati di agar. Le piastre venivano preparate con un sottile strato di agar sterile ben gelificato. Su tale strato si versava 1/2 cm³ della emulsione irradiata o del controllo, e si emulsionava accuratamente con altro agar sciolto e portato a 50°. Si lasciava gelificare e poi si versava sopra un terzo strato di agar sterile a 50°.

Dopo completa gelificazione si ponevano le piastre in termostato e si leggeva dopo 48 h di incubazione.

Oltre al ceppo *Escherichia coli* K 12 abbiamo usato altri ceppi in quanto il K 12 è portatore di batteriofago il che avrebbe potuto far in-

(11) STIRLING A., STEVENS M., LAWLEY D.: Colony counts on stripes of agar in tubes J. Gen. Microb., 1950, 4, 339-344.

interpretare i risultati ottenuti in maniera ben differente. Per questo motivo abbiamo usato anche i due ceppi *Escherichia coli* 1290 e *Escherichia coli* 1294, entrambi derivanti dal precedente ma non lisogeni, secondo le tecniche usuali di dimostrazione di lisogenesi con un limitato numero di marcatori.

f) Distribuzione casuale delle esposizioni. Per quanto l'intensità della lampada venisse controllata spesso durante l'irradiazione, allo scopo di evitare le conseguenze di un'eventuale diminuzione o aumento dell'intensità durante le prove e allo scopo di annullare l'effetto di adsorbimento dei germi alle pareti del recipiente (controllo n. 2), abbiamo distribuito casualmente i campioni di ogni singola serie secondo le tabelle di distribuzione casuale di FISHER e YATES ⁽¹²⁾. Pertanto le serie di esposizioni che ripetevano la medesima esperienza venivano eseguite una dopo l'altra, ma i singoli tempi di irraggiamento che erano stabiliti per ogni serie venivano, invece, distribuiti casualmente e la semina su piastra veniva fatta, serie per serie, immediatamente dopo l'irradiazione. In tal maniera veniva eliminato qualunque possibile errore sistematico dovuto a variazioni di condizioni sperimentali nel tempo durante il quale venivano fatte le esposizioni.

3. - RISULTATI SPERIMENTALI.

Le esperienze fatte per stabilire se l'effetto di inattivazione della radiazione u. v. su *E. coli* è costante al variare dell'esposizione si dividono in quattro gruppi che differiscono per alcune condizioni sperimentali.

Un primo gruppo di esperienze è stato eseguito usando batteri prelevati da una coltura avente 2 mesi di età all'incirca (emulsione vecchia v. 2-d). La sospensione irradiata conteneva circa 1000 germi/cm³. La quantità prelevata per l'irradiazione era di 6 cm³; questa veniva esposta entro una vaschetta cilindrica scoperta avente una base di 40 cm. di diametro: lo spessore della sospensione sul fondo del recipiente era perciò circa 15 mm. Un agitatore ad aria provvedeva che la sospensione venisse continuamente rimossa per evitare che una parte dei batteri aderisse alla parete. Veniva tuttavia usato sempre il medesimo recipiente per l'esposizione, in modo da diminuire quanto possibile l'eventuale perdita di germi dovuta all'adesione alle pareti, compensandola col numero di germi che veniva a distaccarsi nell'esposizione succes-

(12) FISHER R. A.; YATES F.: Statistical tables - Olivier & Boyd, Londra 1949.



siva. Data la distribuzione rigorosamente casuale (v. 2-f) delle varie esposizioni, l'errore dovuto a questo effetto di adesione alle pareti non poteva influire sui risultati dell'esperienza: abbiamo eseguito, a questo proposito, il controllo n. 2.

La dose complessiva somministrata era 41.000 erg/cm² min. La sorgente era diaframmata. I tempi di esposizione erano 20^a, 30^a, 1^m, 2^m, 4^m. La serie completa di esposizioni e successive conte venne eseguita 13 volte, complessivamente in sei giorni.

La sospensione irradiata veniva seminata in dieci tubi. Per ogni esposizione quindi si facevano 10 conte e veniva presa la media di queste come dato dell'esperienza. I dati delle 15 serie così ottenuti non erano però direttamente confrontabili, in quanto differivano per un fattore di proporzionalità dovuto per la massima parte alla difficoltà di titolare ogni volta con precisione la sospensione di partenza. Abbiamo determinato questo fattore di proporzionalità a mezzo delle linee di regressione tracciate per tre punti fissi di ogni serie.

TABELLA I

Durata della irradiazione	20 ^a	30 ^a	1 ^m	2 ^m	4 ^m
<i>n. colonie</i>	98.3	51.6	86.5	25.6	32.8
	138.5	87.0	71.6	49.1	41.0
	110.3	120.7	63.2	46.3	43.1
	105.8	72.5	63.5	63.4	56.2
	96.0	75.0	72.8	82.7	41.1
	95.3	90.7	71.5	63.2	48.0
	84.8	99.9	57.7	47.9	67.1
	112.6	67.5	65.2	59.6	57.5
	95.8	62.6	61.5	65.4	63.1
	68.2	77.5	70.0	66.5	64.0
	90.0	70.5	61.0	64.5	61.5
	82.0	71.0	—	65.5	65.0
	71.8	70.8	70.2	65.0	67.2
	72.0	73.0	65.5	65.5	67.3
medie	93 ± 5	78 ± 4.6	68 ± 2.5	59 ± 3.5	55 ± 3.2

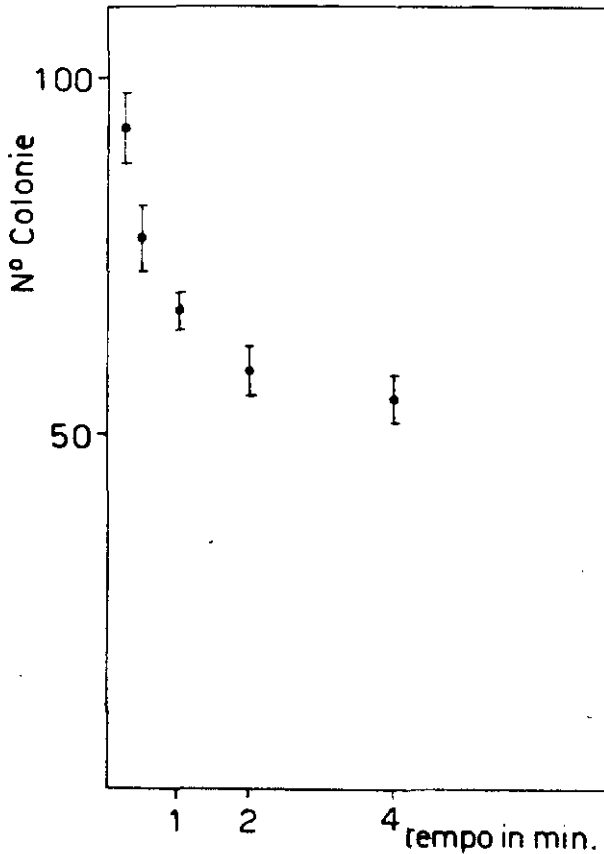


FIG. 1.

I gruppo esperienze. - Emulsione germi di 2-3 mesi di età, conservata in ghiacciaia. Irradiati ~ 1000 germi/cm². Dose 41.000 erg/cm² min. - Sopravvivenza germi 90-30%.

I risultati complessivi delle 15 misure sono riassunti nella Tab. I e nel grafico della fig. 1. In ordinate sono posti i numeri di colonie contate, in media, per ciascun tempo di irradiazione, e in ascissa i tempi corrispondenti. Gli errori sono valutati dagli scarti dei valori ottenuti in ciascuna serie dalla media, secondo la formula: (errore standard)

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n (n - 1)}}$$

Dal grafico si rileva in modo molto evidente una dipendenza del numero di germi inattivati dalla radiazione dal tempo durante il quale tale radiazione è stata somministrata: più precisamente la medesima dose si dimostra meno efficace se somministrata in tempi brevi anzichè in tempi relativamente lunghi.

Le semine dei germi per il conteggio delle colonie venivano fatte sempre in tubi. La sopravvivenza dei germi dopo l'irradiazione era dal 90 al 30% circa.

Il secondo gruppo di esperienze differisce dal primo solo in quanto la emulsione irradiata conteneva un numero assai basso di germi/cm² e precisamente da 50 a 300 germi/cm². Essa veniva prelevata dalla stessa emulsione che era servita per le esperienze precedenti, e che aveva ormai 4 mesi di età.

I risultati ottenuti sono riassunti (in percentuale del numero di colonie contate da batteri irradiati in 30^s) nella Tab. II e riportati nel grafico della fig. 2. Ciascun dato della Tab. II risulta dalla media di una

TABELLA II

20 ^s	30 ^s	1 ^m	2 ^m	4 ^m	8 ^m
94.8	100.0	97.5	98.7	100.0	
95.9	100.0	95.4	89.0	73.6	
120.0	100.0	128.8	86.2	116.0	
76.1	100.0	88.4	79.8	91.0	
95.4	100.0	75.6	86.2	93.2	96.4
109.8	100.0	104.1	103.5	103.1	88.5
98.7	100.0	83.9	107.8	84.2	89.6
115.8	100.0	105.0	103.4	103.4	98.2
101.5	100.0	93.6	98.6	96.0	98.6
—	100.0	—	101.5	—	101.0
—	100.0	—	92.0	—	89.8
—	100.0	—	101.0	—	92.2
101 ± 5	100 ± 4		95 ± 3	96 ± 4	94 ± 3

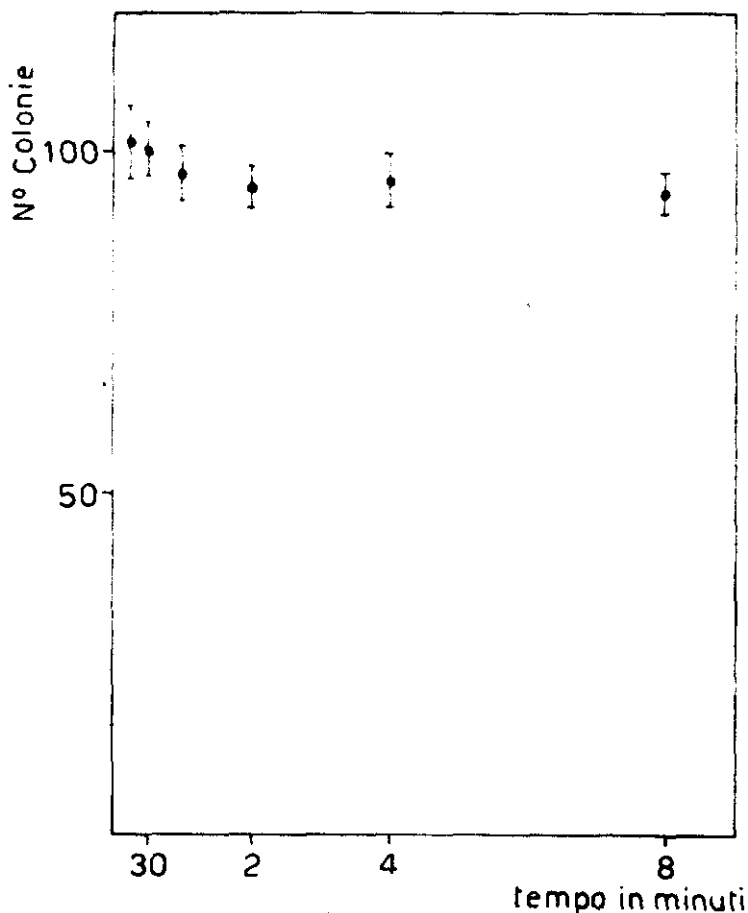


FIG. 2.

II gruppo esperienze. - Emulsione germi di 4 mesi di età, conservata in ghiacciaia. Irradiati \sim 50-300 germi/cm³. Dose 41.000 erg/cm² cin. - Sopravvivenza germi 95-80%.

diecina di valori ottenuti dalle singole conte. Dal grafico si vede chiaramente che, in queste condizioni, l'efficacia della radiazione ultravioletta dipende in ben scarsa misura dal tempo durante il quale la dose è stata somministrata.

Le colture sono state fatte tutte in tubi salvo che per l'ultima serie per la quale sono state usate le piastre. La sopravvivenza dei germi all'irradiazione era dal 95 all'80% circa.

Il terzo gruppo di esperienze è stato fatto con la sorgente non diaframmata, allo scopo di potersi valere della massima intensità del fascio ottenibile. La dose somministrata in queste condizioni era 50.000

TABELLA III

a) irradiati 20.000 germi/cm³

Durata dell'irradiazione	30 ^s	4 ^m	16 ^m
n. colonie	100,0	58,0	67,0
"	100,0	62,0	46,0
"	100,0	54,0	37,0
"	100,0	67,0	60,0
media	100 ± 4	60 ± 3	52 ± 6,5

b) irradiati 20.000 germi/cm³

Durata dell'irradiazione	30 ^s	4 ^m	16 ^m
n. colonie	100	42,0	31,0
"	100	68,0	74,0
"	100	46,0	38,0
"	100	72,0	65,0
media	100 ± 4,3	57 ± 6,5	52 ± 9

c) irradiati 200 germi/cm³

Durata dell'irradiazione	30 ^s	4 ^m	16 ^m
n. colonie	100	80	92
"	100	90	76
"	100	53	70
media	100 ± 4,3	74 ± 10	79 ± 7

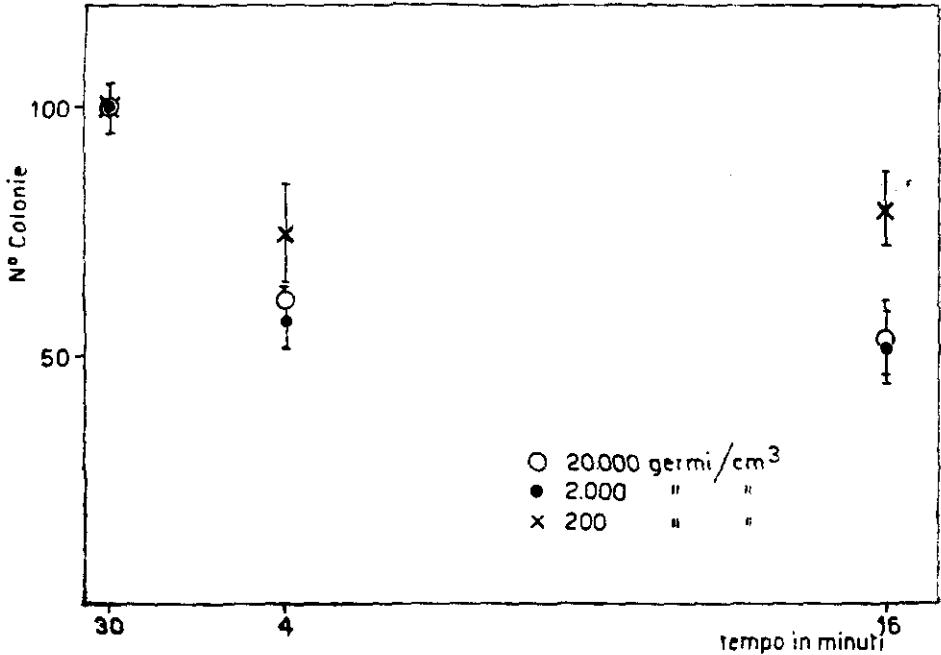


FIG. 3.

III gruppo esperienze. - Emulsione di 5 mesi di età, conservata in ghiacciaia. Irradiati 20.000, 2.000, 200 germi/cm³. Dose 50.000 erg/cm².

erg/cm² min. L'emulsione dei germi era ormai vecchissima (circa 5 mesi di età). I tempi di irradiazione sono stati ridotti a tre, e prolungato a 16 min. quello della esposizione di maggiore durata. L'emulsione di germi irradiata conteneva 20, 2.000, 20.000 germi/cm³. Come si vede dalla Tab. III, che riassume i dati sperimentali, e dal grafico corrispondente (fig. 3), una dipendenza dell'efficacia della radiazione dal tempo si può ritenere provata solo per le emulsioni più ricche di germi, in concordanza con quanto ottenuto precedentemente. Gli errori sono assai forti, ma non abbiamo ritenuto opportuno seguirne l'esperienza in queste condizioni giudicando preferibile lavorare con emulsioni di germi di 24 h, che sono notoriamente più sensibili agli effetti delle radiazioni.

Con emulsioni di 24 h e utilizzando sempre la massima intensità dalla lampada usata, abbiamo ottenuto i risultati riportati nella Tab. IV e nel grafico fig. 4. In queste condizioni la variazione dell'effetto di inattivazione dei germi in funzione del tempo di irradiazione appare molto

TABELLA IV

Durata dell'irradiazione	30 ^s	4 ^m	8 ^m
n. colonie	100	79	—
"	100	70	—
"	100	77	28
"	100	55	14
"	100	41	25
"	100	19	8
"	100	41	14
"	100	48	22
"	100	46	13
"	100	40	39
media	100 ± 2	51.6 ± 6	16.3 ± 4

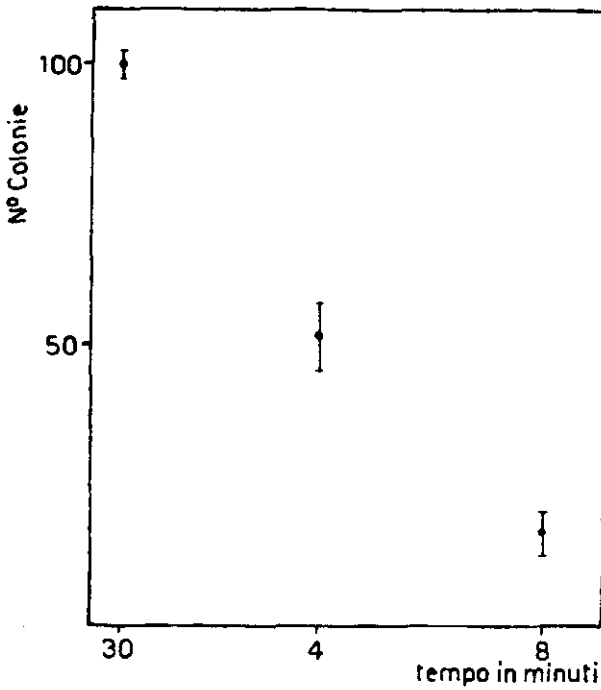


FIG. 4.

IV gruppo esperienze. - Emulsione di 24 ore di età. Irradiati 400.000 germi/cm³.
Dose 50.000 erg/cm² min. - Sopravvivenza germi dell'ordine dell'1/100.

evidente. L'emulsione usata conteneva $4 \cdot 10^7$ germi/cm³. Le colture sono state fatte su piastre. La sopravvivenza dei germi dopo irradiazione era dell'ordine di 1/100, assai bassa, come doveva aspettarsi, a confronto di quella riscontrata nei casi precedenti.

4. - CONTROLLI.

Allo scopo di non incorrere in errori sistematici, e di abbassare quanto possibile gli errori accidentali, abbiamo eseguito numerose prove e controlli; riportiamo alcuni di questi, necessari alla valutazione dei risultati di cui sopra.

1) *Errore sulla diluizione.* — Sono state fatte tre diluizioni indipendenti della stessa emulsione di germi e confrontati tra loro i numeri di colonie sviluppate dalle relative colture. I risultati sono riportati nella Tab. V.

TABELLA V

Diluizioni	1:5000	1:1000	1:10,000
n. colonie	106 ± 2	26 ± 1	11.5 ± 1.5
"	100 ± 4	20.7 ± 1	12.0 ± 1
"	104 ± 2	23.5 ± 1	10.3 ± 1

2) *Perdita di germi per aderenza alle pareti.* — Un possibile effetto di diminuzione del numero di germi con l'aumentare la durata dell'irradiazione potrebbe aversi a causa del fatto che nelle irradiazioni di più lunga durata i germi risiedono nel recipiente più a lungo che non nelle esposizioni brevi e quindi hanno maggiore probabilità di restare aderenti alle pareti anche se, come in tutte le nostre esperienze, la sospensione venga agitata di continuo. L'esperienza mostra infatti (Tabella VI-a) che lasciando l'emulsione per tempi diversi in recipienti uguali si ha una perdita di germi proporzionale al tempo di permanenza. Se invece i germi permangono tempi diversi nello stesso reci-

TABELLA VI

Durata dell'irradiazione	30 ^s	4 ^m	16 ^m
n. colonie (a)	239 ± 6	204 ± 6	157 ± 5
n. colonie (b)	43.7 ± 3	61.6 ± 1.5	60.2 ± 3

(a) cambiando recipiente ad ogni irradiazione

(b) usando sempre lo stesso recipiente.

piante, questa perdita scompare (Tab. VI-b), probabilmente perchè il numero di germi che si distacca dalla parete per l'agitazione del liquido compensa il numero di germi che vi aderisce.

3) *Assorbimento dei raggi ultravioletti nella sospensione dei germi.*

— Per garantirci che effetti di assorbimento o diffusione di raggi ultravioletti nella sospensione di germi non potessero alterare i risultati delle esperienze, abbiamo eseguito due tipi di controlli: il primo, di carattere fisico, è consistito nel fotografare lo spettro emesso dalla nostra

TABELLA VII

Durata dell'irradiazione 30^s

Volume in cm ³	2	4	8	16
n. colonie	76.5 ± 7	102.5 ± 8	96 ± 6	101 ± 7

Durata dell'irradiazione 4^m

Volume in cm ³	5	10	20	40
n. colonie	597 ± 40	627 ± 40	634 ± 63	11.1 ± 0.6
"	8.5 ± 1.2	7.3 ± 1.0	7.8 ± 0.7	

lampada a mercurio con e senza la sospensione di germi posta davanti alla fenditura dello spettrometro in vaschetta di quarzo, e di confrontare le relative fotometrie: si è così dimostrato che spessori di 1, 2, 5 centimetri di sospensione di germi nella densità massima da noi usata per l'irradiazione, non produce assorbimento apprezzabile neppure nelle righe dell'ultravioletto estremo (fino a 2230 Å). Il secondo controllo, di carattere biologico, è stato fatto irradiando nelle stesse condizioni e per lo stesso tempo volumi diversi della sospensione in recipienti identici, in modo che si disponessero secondo vari spessori. Come si vede dai dati della Tab. VII, neppure con sospensioni di 20 cm³ si può sospettare assorbimento apprezzabile.

Se si tiene conto che in quasi tutte le nostre esperienze abbiamo irradiato 6 cm³ di sospensione i quali, negli stessi recipienti usati per le prove di cui sopra, costituivano uno strato di emulsione di spessore inferiore a 1 cm, è chiaro che nessun effetto di assorbimento della radiazione può in alcun modo avere influito sui risultati di queste esperienze.

4) *Distribuzione statistica degli errori di osservazione.* — Per avere una valutazione della attendibilità dei dati sperimentali, abbiamo, per tutte le serie di misure, controllato che la distribuzione dei valori osservati (numero di colonie per piastra per ogni serie di 10 piastre seminate dopo ogni irradiazione) corrispondesse alla distribuzione statistica richiesta dalla serie di Poisson, verificando che per ogni successione di dati ottenuti dalle 10 piastre la varianza risultasse circa uguale alla media. Abbiamo tuttavia utilizzato anche le serie che presentavano una varianza tre o quattro volte la media, data la difficoltà di ottenere distribuzioni migliori e dato il fatto che l'errore di misura era valutato attraverso gli scarti della media ottenuta per ciascuna serie dalle medie complessive.

Abbiamo escluso le serie di piastre che presentavano meno di 10 colonie per piastra avendo riscontrato, mediante la distribuzione di Poisson, che con le medie basse (inferiori a 4 colonie per piastra) il numero di piastre con poche colonie era superiore in maniera significativa al numero previsto. Pertanto abbiamo preso come margine di sicurezza la media 10.

5) *Selettività dell'effetto per l'ultravioletto estremo.* — Vari Autori (7, 13) hanno mostrato che l'effetto letale dovuto ai raggi ultravioletto

(13) HOLLAENDER A.: Effects of long ultraviolet and short visible radiation (3500 to 4000 Å) on *Escherichia coli* - J. Bact. 1943, 46, 531-542.

letti è praticamente prodotto solo dalle radiazioni di lunghezza d'onda inferiori a 3000 Å. Per garantirci che possibili effetti spuri dovuti alle modalità dell'esperienza (p. es. alla permanenza della sospensione di batteri in una atmosfera ricca di ozono, oppure all'esposizione dei batteri alla radiazione termica emessa anch'essa, e inevitabilmente, dalla sorgente luminosa) potessero influire sui risultati ottenuti, abbiamo provato ad irradiare la sospensione di batteri (fresca) nelle solite con-

TABELLA VIII

Non irradiati	Irradiati ^m
97 ± 4.5	92 ± 2.5
	87 ± 2
	98 ± 4.5

dizioni, filtrando però la luce attraverso una lastra di vetro che sapevamo, dai dati spettroscopici, capace di assorbire tutto l'ultravioletto estremo fino a 2925 Å. I dati della Tabella VIII così ottenuti non mostrano apprezzabile effetto di inattivazione in queste condizioni: se si tiene conto che, quando si irradia con tutta la luce della lampada, l'effetto di inattivazione è tale che la percentuale di batteri che è capace, dopo l'irradiazione, di dare ancora colonie, è solo dell'1/100, si possono considerare questi dati sufficienti a dimostrare che gli effetti di inattivazione, in base ai quali sono stati ottenuti i dati finora esposti, sono esclusivamente dovuti all'azione di radiazioni di lunghezza d'onda inferiore a 2925 Å.

6) *Controllo della capacità di riattivazione della lampada usata.* — Sapendo che la lampada usata dava, oltre all'u. v., un'intensità non trascurabile di luce dello spettro visibile, alla quale notoriamente è dovuto un effetto di riattivazione di batteri inattivati con luce u. v., abbiamo voluto anche controllare se la lampada desse riattivazione della popolazione batterica durante l'irradiazione stessa. Una popolazione batterica già inattivata con una dose unica, venne esposta alla lampada ai tempi usati altrimenti per l'inattivazione. Le varie emulsioni erano protette dall'u. v. più spinto mediante la lastra di vetro di cui al controllo precedente. Come mostra la Tab. IX, durante le irradiazioni non

poteva aversi alcun effetto di riattivazione da parte della lampada usata come sorgente di raggi u. v. La popolazione irradiata poteva viceversa essere riattivata dalla luce emessa da una lampada a filamento da 500 W

TABELLA IX

Riattivazione dovuta alla lampada usata come sorgente di raggi u.v.

Tempo di riattivazione	0	30 ^s	1 ^m	2 ^m	4 ^m	8 ^m	16 ^m	32 ^m
n. colonie	29 ± 5		12 ± 1	21 ± 4	15 ± 2	29 ± 6	17 ± 1	
"				73 ± 5	78 ± 4	64.5 ± 3	63 ± 3	
"		84 ± 6	73 ± 8	90 ± 5				68 ± 5

Durata dell'esposizione per inattivazione = 8 min.

TABELLA X

Riattivazione in relazione all'effetto tempo

Tempo di esposizione alla lampada e raggi u. v.	N. colonie dopo inattivazione	N. colonie dopo riattivazione
30 ^s	268 ± 9	672 ± 8
4 ^m	189 ± 9	470 ± 12

con un'ora di esposizione, tenendo l'emulsione in ghiaccio fondente. I dati relativi a questa prova sono riportati nella Tab. X. Da questa sembra doversi ritenere che emulsioni inattivate con una uguale dose ma a tempi differenti, conservano, una volta riattivate, le differenze che abbiamo visto per l'inattivazione in funzione del fattore tempo.

CONCLUSIONE.

Se una stessa dose di raggi ultravioletti è diversamente efficace nel produrre l'inattivazione di batteri quando venga somministrata in intervalli di tempo di lunghezza diversa, ciò significa che, anche se i raggi ultravioletti, come è stato affermato da diversi AA., sono capaci di pro-

durre mutazioni letali, agendo direttamente sul gene, non è tuttavia solo a questo fenomeno che si deve ascrivere l'effetto di inattivazione sui batteri. La dipendenza di questo effetto dal tempo durante il quale avviene l'irradiazione prova infatti che l'inattivazione è prodotta anche mediante processi che non dipendono da azione diretta delle radiazioni sul patrimonio genico della cellula.

Questa conclusione, del resto, non è in disaccordo con le nostre cognizioni sui processi che possono essere provocati da queste radiazioni in elementi biologici. Infatti tali elementi, dal punto di vista fisico-chimico devono essere considerati come un insieme di molecole, buona parte delle quali composte di un numero molto grande di atomi, soggette a continue trasformazioni a causa di molte reazioni chimiche che avvengono tra di loro. Non si conosce nè la natura di queste reazioni nè il loro numero: si può dire soltanto che la presenza di alcuni elementi o di certe condizioni ambientali è necessaria allo svolgersi dei processi chimici essenziali alla vita della cellula. Si ritiene poi che la massima parte di questi processi si svolga in presenza d'acqua, dato che questo elemento costituisce circa l'80% della massa cellulare.

L'arrivo di fotoni di qualche volt di energia nella compagine molecolare che costituisce la cellula non può avere altra azione che quella di rompere dei legami chimici e favorire la creazione di altri, alterando così localmente l'andamento di reazioni chimiche che si andrebbero altrimenti naturalmente svolgendo. Si capisce che quanto più numerosi sono i fotoni che arrivano sulla cellula, tanto più numerosi saranno i radicali che si liberano e tanto più varie le nuove reazioni che avranno probabilità di compiersi. Noi sappiamo che nella cellula vi sono determinate sostanze come gli enzimi, gli acidi nucleici, le lipoproteine, i polisaccaridi ecc., la cui presenza è essenziale per la vita della cellula stessa; non sappiamo però quali reazioni chimiche interessino questi composti o portino alla loro produzione: non possiamo quindi fare alcuna ipotesi neppure sulla possibile azione della radiazione ultravioletta come agente perturbatore di tali reazioni.

Molti sperimentatori (da ¹⁴ a ²⁷) hanno provato che, a mezzo delle

(14) FRICKE H.: The chemical properties of X ray activated molecules with special reference to the water molecule - Cold Spring Harbor Symp. 1935, *III*, 55.

(15) ALLEN A. O.: Chemical effects of ionizing radiation on simple inorganic compounds and aqueous solutions - Oak Ridge Tennessee U.S. A.E.C., MDDC 263, 1946.

(16) ALLSOPP C. B.: Radiation chemistry in relation to radiobiology - Brit. J. Rad., 1951, *XXIV*, 413.

(17) BONET-MAURY P.: Hydrogen peroxide formation in water exposed to ionizing radiations, Brit. J. Rad., 1951, *XXVI*, 422.

(18) WEISS J.: I^o: Radiochemistry of aqueous solutions - Nature, 1944, *153*, 748.

(19) STEIN G., WEISS J.: Chemical effects of ionizing radiations - Nature, 1943, *161*, 650.

radiazioni ionizzanti e ultraviolette, si possono rompere anelli di composti organici, inattivare enzimi e decomporre l'acqua con formazione di radicali liberi che possono agire come forti ossidanti o riducenti; dato il grande numero di molecole d'acqua presenti nella cellula e la probabilità che la massima parte delle reazioni chimiche si svolgano in presenza di acqua, è da ritenere che l'azione delle radiazioni sull'acqua sia tra le più importanti di quelle che si possono produrre nella compagine cellulare.

La decomposizione dell'acqua per azione dei raggi ultravioletti può aversi malgrado che l' H_2O non presenti praticamente assorbimento in questa regione dello spettro: le uniche due righe di assorbimento per $\lambda = 1760 \text{ \AA}$ e $\lambda = 1360 \text{ \AA}$ sono deboli e appartengono all'ultravioletto più spinto. Il forte assorbimento che si ha tuttavia tra 1800 e 2000 \AA è dovuto alla presenza degli ioni $OH^{(18)}$ e a questo si deve la formazione di altri radicali liberi. Per quanto riguarda le alterazioni che possono subire molecole di vario tipo in soluzioni acquose, le ricerche fotochimiche non hanno dato alcun risultato definitivo. E' infatti estremamente difficile stabilire, anche per molecole assai semplici, quali legami chimici abbiano maggior probabilità di essere rotti e quali reazioni si possano avere tra i radicali liberi così formati e quelli esistenti per decomposizione dell'acqua ^(28, 29, 30). E' inoltre da ritenere che nella scissione di legami chimici dovuta alle radiazioni si producano, per la susseguente formazione di nuovi composti, anche radicali che reagiscono utilmente per il prolungarsi della vita della cellula ⁽²¹⁾ e

(20) ALLEN A. O.: Effects of radiation on materials - Oak Ridge Ten., MDDC 962, 1947.

(21) DALE W. M.: Effect of X rays on aqueous solutions of biologically active compounds - Brit. Jour. Rad., 1943, XVI, 171-172.

(22) DALE W. M.: Some aspects of the biochemical effects of ionizing radiation - Brit. J. Rad., 1951, XXVI, 433.

(23) READ J.: Physical aspects of the biological action of ionizing radiations B. J. Appl. Physics, 1951, 2, 337.

(24) DUNN C., CAMPBELL W., FARM H., HUTCHINS A.: Biological and photochemical effects of high energy electrostatically produced Roentgen rays and cathod rays - J. Appl. Phys., 1948, 19, 605.

(25) FORSSBERG A.: Mechanism of the action of X rays on enzymes in water solution - Nature, 1947, 159, 308-309.

(26) RAPPORT D., CANZANELLI A.: The photochemical action of ultraviolet light on the absorption spectra of nucleic acid and related substances - Science, 1950, 112, 469-471.

(27) SCHOLES G., WEISS J.: Chemical action of ionizing radiations on nucleic acids in aqueous systems - Nature, 1950, 166, 640.

(28) FORBES G. S.: Absorption spectra and photo-chemistry, with special reference to water solutions - Cold Spring Harbor Symp., 1935, III, 1.

(29) ALLEN A. O.: Radiation chemistry of aqueous solutions - Oak Ridge Tennessee U.S. A.E.C., MDDC, 1947.

(30) DANTON F. S.: A review of the evidence for the production of free radicals in water consequent on the absorption of ionizing radiations - Brit. J. of Rad., 1951, XXIV, 428.

che l'effetto di inattivazione non sia che il risultato della somma di molti effetti, utili e nocivi, tra i quali prevalgono questi ultimi. Il noto fenomeno del recovering ^(31, 32, 8, 33) conforta questa ipotesi.

Unica ipotesi che si può fare in base alle conoscenze che si hanno finora sull'argomento, in relazione al risultato da noi ottenuto, cioè la dipendenza dell'effetto di inattivazione dei batteri dall'intensità della radiazione agente, è che le radiazioni ultraviolette provochino nell'ambito cellulare delle reazioni fotochimiche del tipo a catena: caratteristica di queste reazioni è, infatti ⁽³⁴⁾: che il rendimento quantico varia con l'intensità della luce, e normalmente decresce al crescere dell'intensità, il che corrisponde a quanto si deduce dal grafico della fig. 4 per l'inattivazione di *E. coli*; che inoltre il rendimento quantico varia con la concentrazione delle sostanze reagenti, il che è compatibile col fatto da noi osservato che, se il numero di elementi irradiato è assai basso ($< 1000/\text{cm}^3$), l'effetto di inattivazione si abbassa sensibilmente; che infine la presenza di impurità influisce notevolmente sulla lunghezza della catena; è noto infatti, nel caso di batteri, che tracce di determinate sostanze (composti contenenti gruppi sulfidrilici, alcoli e glicoli, idrosolfito di sodio, prodotti intermediari del metabolismo e prodotti metabolici) ⁽³⁵⁾ agiscono quali agenti protettivi nei riguardi dell'azione delle radiazioni sui batteri. Il fatto che colture giovani siano più sensibili delle vecchie può rientrare in questo ultimo ordine di fenomeni, in relazione alla presenza, nelle vecchie colture, di un numero rilevante di batteri morti i quali evidentemente costituiscono una distribuzione di materia organica, nella sospensione di batteri irradiati, nella quale è probabile abbiano sede reazioni in competizione con quelle che si producono nei batteri viventi per attivazione di molecole da parte di raggi ultravioletti.

L'ipotesi che radicali liberi, come si ottengono per azione delle radiazioni, possano dar luogo a reazioni a catena, è stata avanzata recentemente anche da W. M. DALE ⁽³⁶⁾ a conclusione di considerazioni sui

⁽³¹⁾ DULBECCO R.: *Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage by visible light* - Nature, 1949, 163, 949-950.

⁽³²⁾ KELNER A.: *Effect of visible light on the recover of Streptomyces griseus conidia, from ultraviolet irradiation injury* - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1949, 35, 73-79.

⁽³³⁾ THOMPSON T., MEFFERD R., WYSS O.: *The protection of bacteria by piruvate against radiation effects* - J. Baet., 1951, 62, 39-44.

⁽³⁴⁾ NOYES W. A. JR.: *The kinetics of photochemical reactions from the standpoint of chains* - Cold Spring Harbor Symp., 1935, III, 32.

⁽³⁵⁾ HOLLAENDER A., STAPLETON G. E., BURNETT W. T.: *The modification of X ray sensitivity by chemicals* - Isotopes in Biochemistry, Ciba Foundation Conference, Churchill Ltd. London, 1951, 96-113.

⁽³⁶⁾ DALE W. M.: *The indirect action of ionizing radiations on aqueous solutions and its dependence on the chemical structure of the substrate*. J. Cell. Comp. Phys. Suppl., 1952, 39, 39.

risultati quantitativi da lui ottenuti in due ordini di fenomeni originati dall'azione di raggi X su soluzioni, e precisamente: l'azione protettiva di determinate sostanze nel processo di inattivazione di enzimi o parte di enzimi e la deaminazione della glicina. Un esempio di una reazione a catena iniziata dai radicali OH e H era già stato dato da F. S. DANTON ⁽³⁷⁾ nel caso della polimerizzazione dell'acrilonitrile e del metilacrilonitrile.

Il fatto che gli AA. che hanno prima di noi tentato di mettere in rilievo una dipendenza dell'effetto di inattivazione dal tempo di irradiazione non abbiano trovato il risultato da noi ottenuto, può facilmente ascriversi al modo col quale sono state fatte le esperienze: noi infatti abbiamo non solo determinato rapporti di numero di sopravvivenenti quando trattati rigorosamente nelle stesse condizioni, ma anche usato tempi di irraggiamento particolarmente brevi. Allungando i tempi di esposizione, le nostre stesse esperienze dimostrano (fig. 4) che l'effetto va scomparendo.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di fisica e di microbiologia.

(37) DANTON F. S.: v. Dale W. M. (11).