

ENTWICKLUNG EINER MIKROKALORIMETRISCHEN VERSUCHSANORDNUNG FÜR STRAHLENBIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN

K. Brandenburg und J. Meißner

Forschungsinstitut Borstel, Abteilung Biophysik

Bundesrepublik Deutschland

Abstract

A microcalorimetric device - a laboratory development - being appropriate for absolute radiation dosimetry and for radiation-biophysical and -biological investigations is presented. Design and thermal properties of the device are specified. As example of application the recording of growth of bacterial cultures and the inactivation of bacterial cells exposed to ionizing radiation are discussed.

Zusammenfassung

Es wird eine mikrokalorimetrische Versuchsanordnung vorgestellt, die für absolute Strahlendosimetrie, aber auch für strahlenbiologische und -biophysikalische Untersuchungen geeignet ist. Die konstruktiven Merkmale, das thermische Verhalten und die elektronische Meß- und Registriervorrichtung werden vorgestellt.

Als Anwendungsbeispiele für die mikrokalorimetrische Meßtechnik werden das Wachstum einer Bakterienkultur (Thermogramm) sowie die Inaktivierung radioaktiver Strahlung ausgesetzter Bakterien diskutiert.

1. AUFGABEN UND AUSSAGEN DER MIKROKALORIMETRIE

Für eine Anwendung mikrokalorimetrischer Versuchstechniken zur Absolutbestimmung der Energiedosis in radioaktivitätshaltigen Substraten [1, 9- 11, 16- 17] ist Voraussetzung, daß die in diesem primär ausgelösten Anregungs- und Ionisationsprozesse ausschließlich eine Temperaturerhöhung ΔT des Materials bewirken. Handelt es sich um wäßrige Lösungen und

Suspensionen und ist die Strahlung genügend kurzreichweitig wie die der α - und der meisten β -Strahler, dann wird die gesamte Strahlungsenergie auf das Probevolumen übertragen und letztendlich in Wärmeenergie $\Delta E = cm\Delta T$ umgesetzt. Die Energidosisleistung ergibt sich dann aus

$$(1) \quad \Delta D / \Delta t = \Delta E / \Delta m \Delta t \quad \text{und}$$

$$(2) \quad \Delta D / \Delta t (\text{Gy/h}) = 5,76 \cdot 10^{-7} (\bar{c} / \text{Bq g}^{-1}) \cdot \bar{E} / \text{MeV}$$

(\bar{c} = Aktivitätskonzentration)

Mit der Messung der Energiedosis lassen sich damit Radioaktivitätsbestimmungen vollziehen oder aber die mittleren Energien \bar{E} eines Teilchenspektrums bestimmen. Auch zur Messung der Halbwertszeit läßt sich das Verfahren heranziehen gemäß

$$(3) \quad T_{1/2} = \frac{m \cdot N_1}{A_r} \ln 2 \frac{\bar{E}}{P}$$

(N_1 = Avogadro-Konstante, A_r = Relative Atommasse,
P = Wärmeleistung der Probe)

Mit der kommerziellen Verfügbarkeit von Mikrokolorimetern seit Beginn der 60er Jahre haben eine Reihe mikrobiologischer Untersuchungen die Wärmeenergiefreisetzung beim Wachstum von Bakterien- und Hefekulturen verfolgt [2,8,15]. Aus den ermittelten Thermogrammen konnten Aussagen über die zelluläre Aktivität und die Umsetzung des jeweiligen Nährsubstrates, zumeist Glucose, gewonnen werden [3-4]. Unter standardisierten Versuchsbedingungen kann die mikrokolorimetrische Untersuchungstechnik auch zur Bakteriendifferenzierung dienen [6, 14].

Mit unserer Konstruktion haben wir ein strahlendosimetrischen und mikrobiologischen Zwecken gleichermaßen geeignetes Kalorimeter angestrebt. Sie erlaubt es zudem, Dosis-Wirkungsbeziehungen an Mikroorganismen, die radioaktiver Strahlung ausgesetzt sind, direkt zu bestimmen durch den Vergleich unterschiedlicher Wärmeentwicklung der Kulturen als Maß für die Enthalpieänderung ΔH . Schließlich versuchen wir, mit der Apparatur auch Veränderungen im Resistenzverhalten der Mikroorganismen gegen Strahlung oder Antibiotika zu erfassen.

2. MIKROKALORIMETER

Bei dem von uns entwickelten Mikrokalorimeter (Abb. 1) handelt es sich um ein adiabatisch oder isoperibol zu betreibendes Füllungs-("batch") Differentialkalorimeter. Jedes der zwei Kalorimetergefäße besteht aus 3 ineinandergestellten Hochvakuum-isolierten Messingzylindern, deren innerer den Wärmeabsorber für die zu messende Wärmequelle darstellt. In den Absorber können wahlweise Frobenzeinsätze mit radioaktivitätshaltigen Lösungen oder Bakterienkulturen eingebracht werden. Diese sind mittels eines das Hochvakuum überbrückenden Schleusensystems aeroben oder anaeroben Wachstumsbedingungen aussetzbar. Die Temperaturmeßeinheit besteht aus 2 Thermistoren (NTC-Widerstände), die in einer Wheatsone'schen Brücken-

- 1: Begasung für Kulturenwachstum
 - 2: HV - Anschluß
 - 3: Cr-Ni-Heizungen
 - 4: Mantel
 - 5: Hülle
 - 6: Absorber
 - 7: Thermistoren
 - 8: Füße aus PMMA
 - 9: Elektr. Durchführungen aus Pt-Rh
- } Messing-zylinder

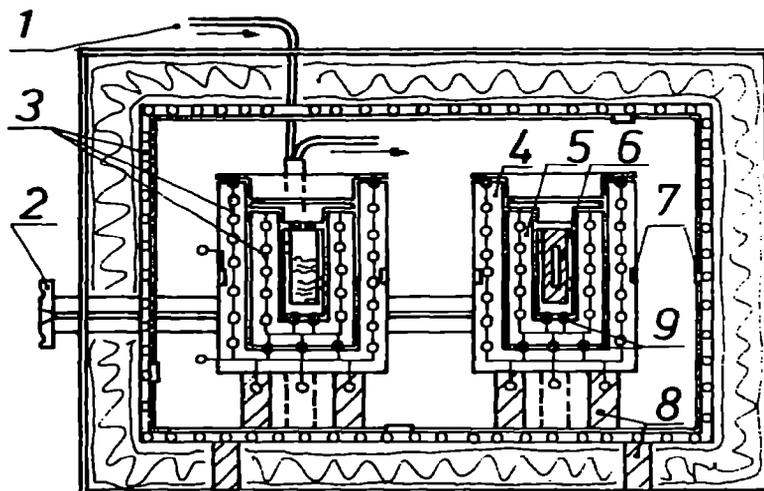


Abb. 1
Schematischer Aufbau des Mikrokalorimeters

schaltung (Abb. 2) angeordnet sind. Bei der auf diese Weise garantierten Identität beider Absorber läßt sich eine Differenzmessung zwischen beiden (Meßteil und Referenzteil) realisieren, auf die zufällige äußere Temperaturschwankungen ohne Einfluß bleiben. Die der Temperatur proportionalen Spannungssignale gelangen über eine hochohmige Eingangsstufe aus MOS-FET ($R_e > 10^{12} \Omega$) und hochwertigem Operationsverstärker (AM 316 A) auf einen Schreiber, wobei sie einzeln oder als Differenz gegeneinander

registriert werden können.

Die nachfolgende Verstärkerstufe (Abb. 2) für quasi-adiabatischen Betrieb ist so ausgelegt, daß die infolge Beheizung der die Absorber umgebenden Hüllen eintretende Temperaturerhöhung derjenigen im Absorber proportional ist.

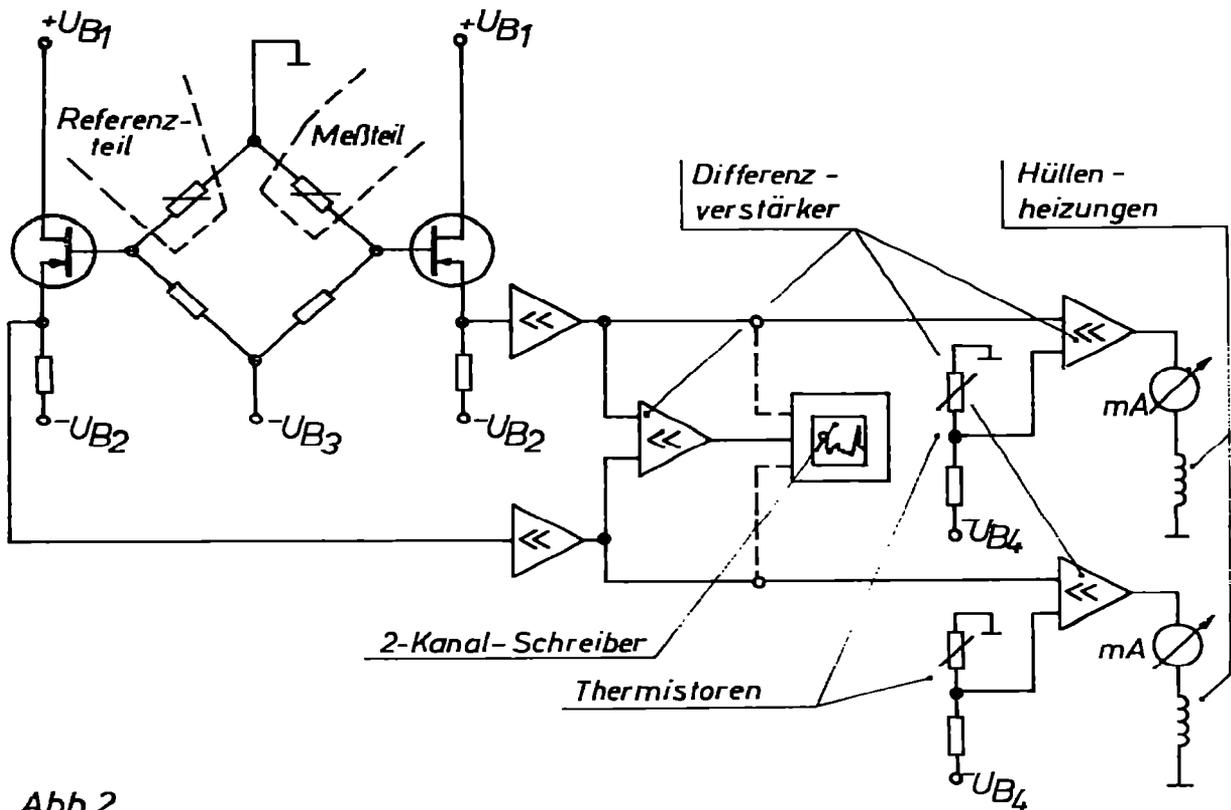


Abb. 2
Temperaturmeß - und registriervorrichtung

Die folgenden Daten charakterisieren die Eigenschaften des Gerätes: Jede Temperatur zwischen 25 und 70° C ist fest einstellbar bei einer Temperaturkonstanz von langfristig besser als $1 \cdot 10^{-4}$ K, kurzfristig $1 \cdot 10^{-5}$ K. Die Wärmekapazität der Absorber beträgt $C = 13 \cdot J \cdot K^{-1}$, die Leckrate - ausschließlich bedingt durch mechanische Aufhängung (Plexi) und elektrische Durchführungen (Pt-Rh) - ergibt sich rechnerisch zu $k = 3,40$ mW/K, in guter Übereinstimmung dazu stehen Meßergebnisse mit der elektrischen Eichheizleistung von $k = 3,27$ mW/K.

3. VERSUCHSMETHODEN

3.1. KALORIMETRISCHE ANSÄTZE ZUR ENERGIEDOSISBESTIMMUNG

Die Messung der Energiedosis erfolgt in wäßriger Lösung von Radionukliden. Wir verwendeten dazu u.a. den harten β -Strahler ^{32}P ($\bar{E} = 0,69 \text{ MeV}$) in 1 %iger Natriumphosphatlösung (Fa. Amersham Buchler). Die radioaktivitätshaltige Probe wurde im Mikrokalorimeter gegenüber radioaktivitätsfreier Lösung gemessen. Die Temperaturdifferenz wurde bei den Ansätzen bis zu 8 Stunden verfolgt.

3.2. MIKROBIOLOGISCHER VERSUCHSANSATZ ZUR STRAHLENBEEINFLUSSUNG DES KULTURWACHSTUMS

Für die bisherigen Versuche wurden Kulturansätze vom Mykobakterium smegmatis (Stamm SN 2, Bakteriensammlung des Forschungsinstitutes Borstel) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Dubos-Tween-Albumin-Lösung [12] mit 0,01 %igem NaNO_3 -Zusatz. Die Bakteriensuspension wurde folgendermaßen angesetzt: Einige mg SN 2-Bakterien wurden von einer auf Löwenstein-Jensen-Nährboden gewachsenen Vorkultur abgeerntet, gründlich gemörsert, mit Nährlösung aufgeschüttelt, abzentrifugiert zur Bestimmung des Bakterienfeuchtgewichts und nach homogener Vermischung in einer definierten Menge an Nährlösung im Mikrokalorimeter inkubiert. Die Anfangskonzentration lag zumeist bei ca. 0,05 mg Bakterienfeuchtgewicht/ml Nährlösung.

Als radioaktiver Strahler diente tritiiertes Wasser (HTO) mit einer spezifischen Aktivität von $3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq/ml}$ ($= 1000 \text{ mCi/ml}$). $10 \mu\text{l}$ (10 mCi) wurden für die Bestrahlungsversuche entnommen und der Bakteriensuspension zugegeben. Die Differenzmessung der tritiumhaltigen Kultur gegenüber einer tritiumfreien im Mikrokalorimeter liefert einen Parameter für den Einfluß der Tritium- β -Strahlung auf das Bakterienwachstum.

4. ERGEBNISSE

4.1. ENERGIEDOSIS-KALORIMETRIE

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Versuchsansätze zur Energiedosismessung für das β -strahlende Radioisotop ^{32}P .

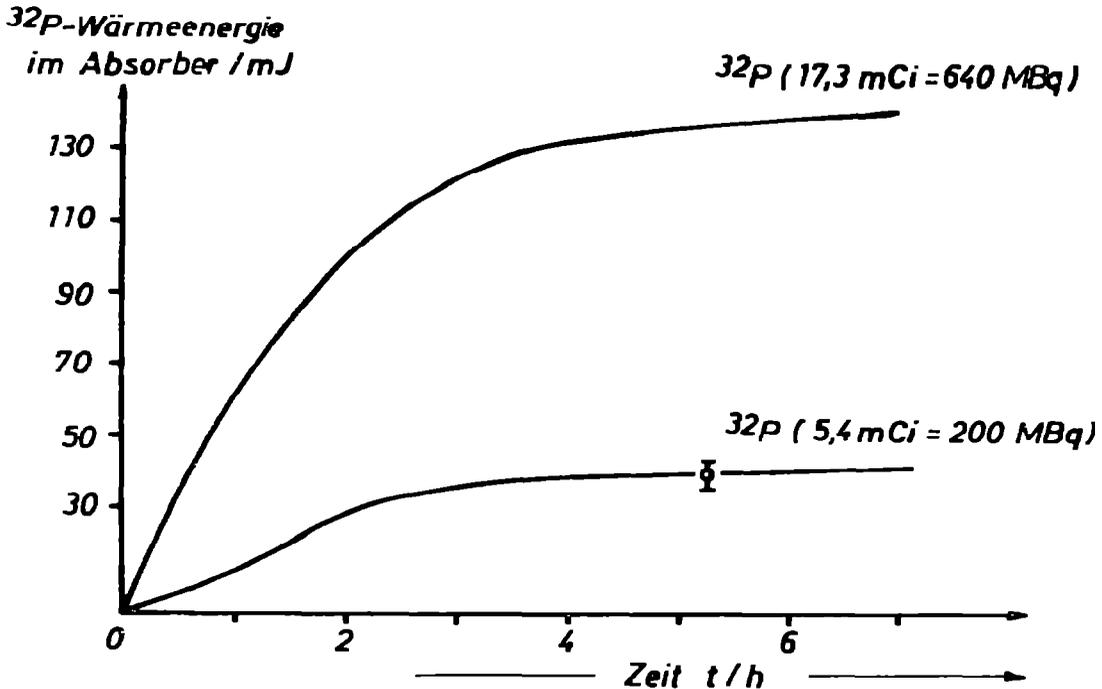


Abb. 3

Energiedosis von ^{32}P ; der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung aus 4 Versuchen wieder.

Die Kurven nähern sich nach einer charakteristischen Zeit asymptotisch Horizontalen. Für diese besteht thermisches Gleichgewicht, d.h. die Wärmeerzeugung im Probenvolumen ist gleich der Wärmeabgabe nach außen (isoperiboler Betrieb). Aus der Höhe der Geraden läßt sich bei Kenntnis der Leckrate k gemäß

$$\Delta T = P/C \cdot (1 - e^{-kt})$$

(P = Wärmeleistung, C = Wärmekapazität)

der Temperaturanstieg ΔT und damit die Energiedosis nach den Gleichungen (1) und (2) bestimmen.

Die hier dargestellten Ergebnisse (Abb. 3) sowie andere der gleichen Art haben zunächst auch unter Voraussetzung bekannter Radioaktivitätskonzentrationen und mittlerer Energien zur empirischen Eichung gedient.

4.2. THERMOGRAMME VON ANSÄTZEN

Abb. 4 zeigt Thermogramme von *M. smegmatis* mit und ohne Zusatz von Tritium.

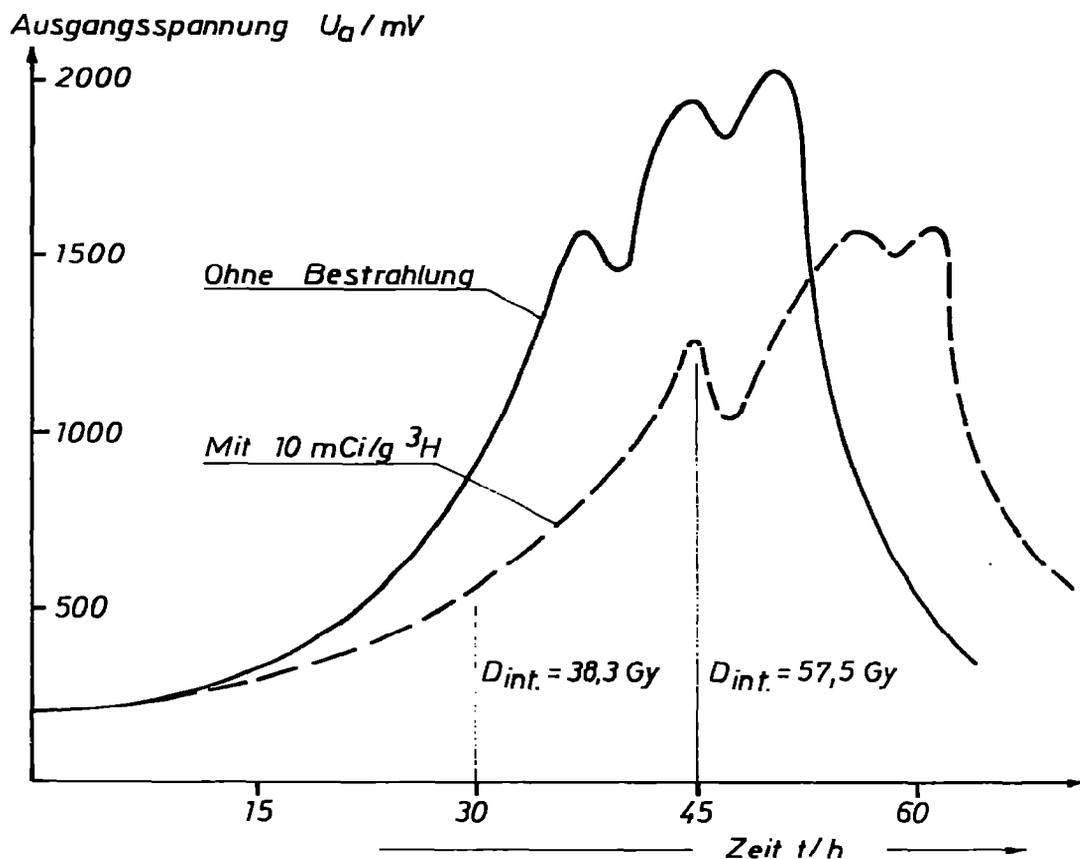


Abb. 4
Vergleich der Thermogramme von bestrahltem und unbestrahltem Mykobakterium *Smegmatis* [in Dubos-Tween - Albumin - Nährlösung].

Der in den Thermogrammen zum Ausdruck kommende Verlauf der Wärmeproduktion der bestrahlten Suspension gegenüber den unbestrahlten zeigt im wesentlichen zwei Effekte: zum einen wird eine Reduzierung des Maximums, zum anderen dessen zeitliche Verzögerung deutlich. Dies weist auf die Abnahme der Zellzahl und der Verminderung der Zellteilungsgeschwindigkeit ("division delay") als Folge der Bestrahlung hin. Inwieweit sich ein quantitativer Zusammenhang zur Zellzahl der Bakterienkultur ergibt, ist ohne weiteres [2-4,6,8,14-15] noch nicht zu entscheiden, zumal sich die Wärmeproduktion in dem Probenvolumen als Summe des Einflusses von Strahlendosis und Wachstumsdepression darstellt. Diese Vorgänge zu differenzieren, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5. METHODISCHE DISKUSSION

Die bisher erhobenen Befunde dokumentieren überzeugend, daß die mikrokalorimetrische Meßmethodik für die strahlenbiophysikalische Forschung bei relativ geringem experimentellen Aufwand von beachtlicher Bedeutung zu werden verspricht. Neben der Direktbestimmung der Energiedosis radioaktiver Strahlungen läßt sich das Wachstum von Mikroorganismenkulturen unter variierten Bestrahlungsbedingungen ohne Eingriff in das System - der mit der Gefahr einer Wachstumsmodifizierung verbunden ist - verfolgen. Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden [7] ist vermutlich der Vorteil größerer Präzision zu erreichen. In analoger Weise wie die Wachstums- hemmung durch ionisierende Strahlung läßt sich die Wirkung von Antibiotika und Chemotherapeutika [5,7,13] auf verschiedene Bakterienspezies verfolgen. Entsprechende Untersuchungen sind von uns in Angriff genommen.

Schließlich lassen sich auch Mutante gleicher Spezies, die z.B. durch die Bestrahlung von Kulturen provozierbar sind (vgl. Abb. 5), auf diese Weise in ihrem Wachstumsverhalten und in der oft damit verbundenen Resistenzinduzierung gegenüber Antibiotika untersuchen. Auch in dieser Richtung sind von uns unter Berücksichtigung der in Abb. 5 dargestellten

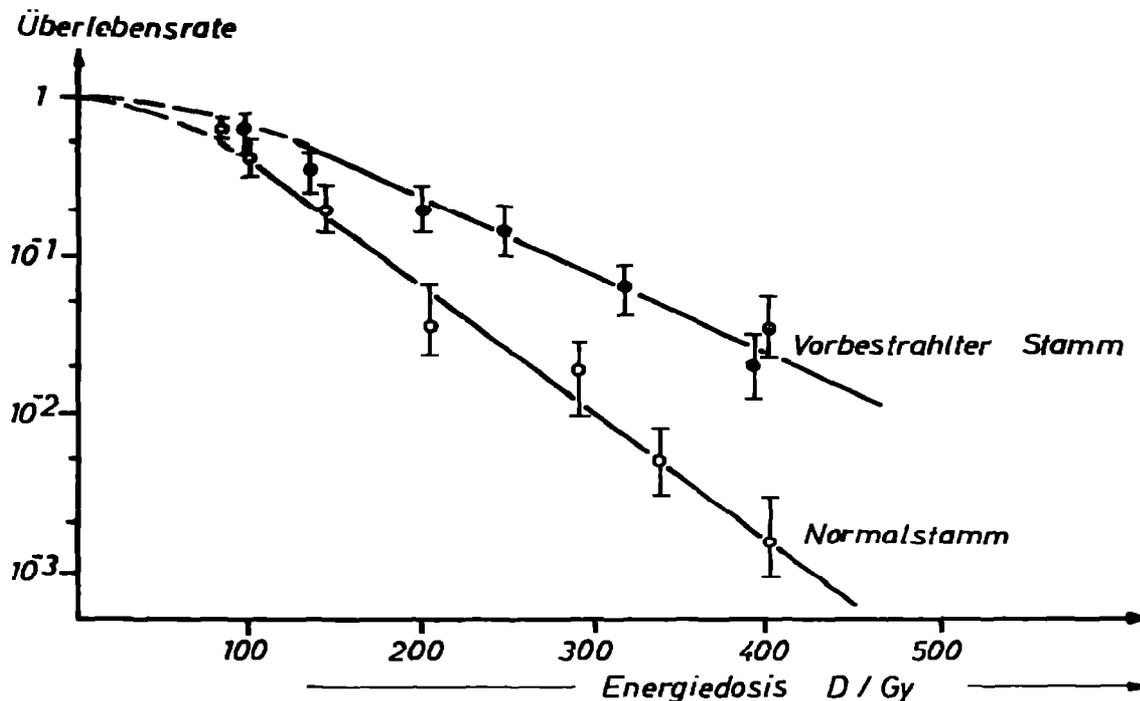


Abb.5
Vergleich der ^{192}Ir -Strahlenempfindlichkeit von normalem und vorbestrahltem [Vordosis 2544 Gy] *M. Smegmatis*.

Ergebnisse [7] und der von Meißner und Staackmann [12] mitgeteilten Befunde Versuche eingeleitet worden.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Bayly, J.G.: A Calorimetric Measurement of the Disintegration Rate of a ^{32}P -Source. Canadian Journal of Research A 28, 520-529 (1950)
- 2 Beezer, A.A., K.A. Bettelheim, R.D. Newell, J. Stevans: The Diagnosis of Bacteriuria by Flow Microcalorimetry in Science Tools 21, 13-16 (1974)

- 3 Belaich, A., J.P. Belaich: Microcalorimetric Study of the Anaerobic Growth of Escherichia Coli: Measurements of the Affinity of Whole Cells for Various Energy Substrates. *Journal of Bacteriology* 125, 19-24 (1976)
- 4 Belaich, J.P., J.S. Senez, M. Murgier: Microcalorimetric Study of Glucose Permeation in Microbial Cells. *Journal Bacteriology* 95, 1750-1757 (1968)
- 5 Binford, J.S., L.F. Binford, P. Adler: A Semiautomated Microcalorimetric Method of Antibiotic Sensitivity Testing. *American Journal of Clinical Pathology* 59, 86-94 (1973)
- 6 Boling, E.A., G.C. Blanchard, W.J. Russell: Bacterial Identification by Microcalorimetry. *Nature* 241, 472-473 (1973)
- 7 Brandenburg, K.: Untersuchungen an Mykobakterien verschiedener Spezies über den Zusammenhang von Strahlensensibilität einerseits und Vitalität, Virulenz und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung andererseits. Veröffentlichung in Vorbereitung.
- 8 Forrest, W.W.: Microcalorimetry. *Methods in Microbiology* 6 B, Edt. by J.R. Norris, D.W. Ribbons, Academic Press London and New York, S. 285-318 (1972)
- 9 Gunn, S.R.: Radiometric Calorimetry: A review. *Nuclear Instruments and Methods* 135, 251-265 (1976)
- 10 Kunze, R., H. Korn: Kalorimetrische Verfahren zur Absolutbestimmung der Energiedosis von Quantenstrahlung. *Isotopenpraxis* 9, 305-310 (1977)
- 11 Laughlin, J.S., S. Genna: *Calorimetry in Radiation Dosimetry*. 2nd Edition, Edt. by F.H. Attix, W.C. Roesch, Academic Press New York and London 1966, S. 389-441
- 12 Meißner, J. u. K. Staackmann: Dosiswirkungsbeziehungen nach Radionuklid-Inkorporation β -aktiver Radionuklide durch Mykobakterien. *Atomkernenergie* (im Druck)
- 13 Moberg, U.: Antibacterial actions of Tetracyclines studied by Microcalorimetry. *LKB Application Note* 264 (1977)

- 14 Schaarschmidt, B., I. Lamprecht: Calorimetric Characterization of Microorganisms. *Experientia* 32, 1230-1234 (1976)
- 15 Wadsö, I.: A Microcalorimeter for Biological Analysis. *Science Tools* 21, 18-21 (1974)
- 16 White, A.G.: A Calorimetric Method of Determining the Energy Output of Radioactive Materials. *Journal of Scientific Instruments* 33, 230-234 (1956)
- 17 Wojtech, L., K. Heuss: Ein gewebeäquivalentes Strahlenkalorimeter zur Messung der Energiedosis in wäßrigen Lösungen. *Biophysik* 6, 345-356 (1970)