

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna. Lublin.  
Kierownik: prof. dr Józef Parnas.

Leon JABŁOŃSKI

### Charakterystyka *Brucellafaga*

### Характеристика бруцеллезного бактериофага

### A Characteristics of *Brucellaphage*

Poszukiwania fagów pałeczek *Brucella* prowadziło szereg autorów: Sanderson (21), Gwatkin (9), Liu (13) i Smith (23). Autorom tym nie udało się fagów wyosobnić. Badaczom ukraińskim: Siergience, Schultzowi i Natowiczowi (22), w 1940 r., udało się wyosobnić jednego faga z hodowli muzealnej szczepu *Brucella bovis*. Fag działał litycznie na badane szczepy *Brucella*. Badania te przerwała wojna. Picket i Nelson (19) w 1950 roku wyodrębnili faga z hodowli pałeczek *Brucella*. Fag ten miał małą aktywność lityczną, a w kolejnych pasażach nie namnażał się i zanikał: Drożewkina (6), w r. 1951, otrzymała trwałe, dające się namnażać fagi. Wyosabniano je ze szczepów muzealnych i ze świeżych hodowli pałeczek *Brucella* oraz z narządów wewnętrznych poronionych płodów bydłowych. Faga wyosobniono z płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi ludzi chorych na brucelozę. Wszystkie szczepy fagów otrzymanych przez Drożewkinę (7) działały litycznie na prawie wszystkie szczepy pałeczek *Brucella bovis*, *suis* i *melitensis*. Mamacaszwili (17) wyosobnił fagi, które wykazywały właściwości podobne do fagów Drożewkinęj. Natomiast Popchadze i Abaszidze (20) stwierdzili, że wyosobniony przez nich fag, nazwany „Tbilisi”, działa swoiście tylko na odmianę *Brucella bovis*. Zaprzeczają temu badania Drożewkinęj (7) i Parnasa (18, 19), którzy stwierdzili, że fag ten działa także na szczepy *Brucella suis* i *melitensis*. W Polsce w latach 1955—1961 fagi *Brucella* otrzymał Parnas ze współpr. (17, 18, 19). Wyosobniono około 50 fagów ze starych hodowli muzealnych i z nowo izolowanych szczepów *Brucella*. Fagi te działają litycznie na rodzaj *Brucella*, natomiast za ich pomocą nie udało się w 100 % określać gatunków *Brucella*. Posługując się metodą Drożewkinęj (6) i Parnasa (18), Łazuka i Renoux (14) oraz van Drimmelen (5) otrzymali kilkadziesiąt fagów *Brucella*. Charakterystykę fagów przed nami przeprowadzili: Drożewkina (6), Mamacaszwili (15), Parnas (18) i Ostrowskaja (16) a równocześnie z nami Brinley-Morgan ze wsp. (2) oraz McDuff, Jones Lois M. i Wil-

son (8). Charakterystyki badanych fagów nie były pełne, nie obejmowały wszystkich właściwości opisanych przez Adamsa (1). Jedni autorzy charakteryzowali właściwości biologiczne faga, inni właściwości fizykochemiczne i serologiczne.

Celem niżej przedstawionej pracy jest podanie wyników badań nad charakterystyką jednego szczepu faga — 371/XXIX. Ze względów technicznych nie wykonano badań nad morfologią cząsteczki faga.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto faga nr 371/XXIX, wyosobnionego z hodowli muzealnej szczepu *Brucella bovis* przez Parnasa (18, 19). Jako szczepu wskaźnikowego używano szczepu *Brucella bovis* nr 12, pochodzącego z kolekcji szczepów Inst. Med. Pracy i Hig. Wsi w Lublinie.

Szczep wskaźnikowy w fazie „S” namnażano i przechowywano na 2,5 % agarze Brauna otrzymanego wg opisu Parnasa (19). Fagi namnażano na szczepie wysianym do bulionu wątrobowego otrzymanego wg metody Huddlesona (11). Do bulionu wprowadzono jon  $\text{Ca}^{++}$  potrzebny przy adsorbcji i penetracji faga (4). Skład podłoża płynnego przedstawiał się następująco: Do 1000 ml jałowego bulionu wątrobowego o pH 7,2 dodawano w temperaturze pokojowej 11 ml 1 % chlorku wapnia p.a. uprzednio wyjałowionego przez filtr Seitza. Rozlewano do odpowiednich naczyń i wstawiano do ciepłarki na 10—16 godzin celem sprawdzenia jałowości. Skład podłoża stałego przedstawiał się następująco: Do 1000 ml bulionu wątrobowego, bez dodatku Ca, dodawano 15 g agaru, rozpuszczano w parze bieżącej, po oziębieniu do 50° dodawano 11 ml jałowego 1 % chlorku wapnia, ustalano pH na 7,2, rozlewano na płytki. Probówki (kolby) ze szczepem i fagiem inkubowano przez 18 godz., a następnie przenoszono do lodówki na 20 godz. Fagi sączone przez świecę Berkefelda typ „N”. Miano faga ustalano metodą dwuwarstwową wg opisu Adamsa (1), lub wg metody d’Herelle’a (10).

Fag konserwowano przez 10 miesięcy trzema metodami: 1) w lodówce, 2) w zamrażarce w —25°C, 3) w glicerolu: do 2 ml przesączonej i wymianowanej zawiesiny faga dodawano 1 ml jałowego glicerolu (p.a.) i pozostawiono w temperaturze pokojowej.

Wpływ ciepłoty na aktywność faga badano następująco: Do probówek zawierających 4,5 ml bulionu dodawano 0,5 ml faga o mianie 10<sup>6</sup> i poddawano działaniu odpowiedniej temperatury w ultratermostacie przez 60 minut. Następnie zawiesinę faga odpowiednio rozcieńczano, wysiewano według metody dwuwarstwowej i obliczano ilość lysinek.

Wpływ oddziaływania środowiska na żywotność faga badano następująco: W probówkach zawierających po 9,9 ml bulionu wątrobowego ustalano pH od 3,2 do 9,8 za pomocą 1 N NaOH i 1 N HCl w pH-metrze produkcji polskiej marki „Piezo”. Do kolejnych probówek dodawano po 0,1 ml faga o mianie 10<sup>6</sup> i wstawiano do ciepłarki na 24 godz. Następnie odpowiednio rozcieńczano zawiesinę faga i wysiewano metodą dwuwarstwową na 4 płytki. Po 36 godz. inkubacji obliczano ilość lysinek.

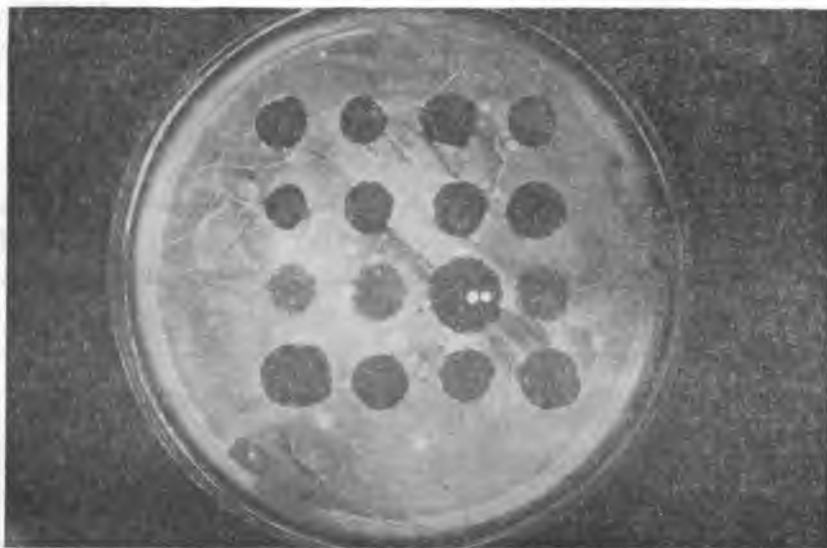
Wpływ chloroformu na żywotność faga badano następująco: Do 1,8 ml wy-miarczowanego faga dodawano 0,2 ml chloroformu i w temperaturze pokojowej wstrząsano przez 1, 3, 5 i 10 minut. Po tym czasie pobierano 0,1 ml faga, roz-

cieńczano i wysiewano metodą dwuwarstwową. Po 36 godz. inkubacji obliczano ilość łyseinek.

Surowicę antyfagową otrzymano wg opisu Adamsa (1), używając faga o mianie  $5,1 \times 10^8$ .

Test neutralizacji faga surowicą, szybkość adsorpcji faga (fag  $5,1 \times 10^5$ , zawiesina bakterii  $8,2 \times 10^8$ ), oraz czas generacji (latent period), wydajność fagów z jednej komórki (burst size) i okres wyzwalania się faga (rise period), (fag  $5,1 \times 10^6$ , zawiesina bakterii  $5,3 \times 10^8$ ), wykonano według opisów Adamsa (1). Łysinki liczone po 36 godz. inkubacji.

Kontrolę swoistości działania faga na rodzaj *Brucella* przeprowadzono w sposób następujący: 0,2 ml 24 godz. bulionowej hodowli każdego szczepu (spis poniżej) wylewano na płytki agarowe z dodatkiem Ca i suszono w cieplarni przez 30 min. Następnie na każdy szczep nakraplano fag o mianie  $5,1 \times 10^8$ . Płytki oglądano po 24 godz. inkubacji. Użyto szczepy następujących gatunków bakterii: *Pasteurella pseudotuberculosis* 4 szczepy, *Staphylococcus aureus* i *albus* po 5 szczepów, *Escherichia coli* i *Aerobacter aerogenes* po 5 szczepów. Laseczka saprofityczna gatunkowo nieokreślona 1 szczep, oraz pałeczka saprofityczna gatunkowo nieokreślona 1 szczep. Jako szczepu wskaźnikowego używano szczepu *Br. bovis*, nr 12.



Ryc. 1.

Zmienność morfologii łyseinek spostrzegano i badano wysiewając fagi metodą dwuwarstwową. Używano fagi rozcieńczone  $10^{-7}$  do  $10^{-10}$ , tj. rozcieńczenia, w których na jednej płytce spostrzegano 10 do 50 łyseinek. Selekcję mutantów faga przeprowadzono w sposób następujący: Wybraną łyseinkę wycinano z agaru nożem stomatologicznym i przenoszono do próbówki z zawiesiną szczepu wskaźnikowego. Po namnożeniu i wymianowaniu wycinano wybraną łyseinkę i namnażano. W ten sposób przeprowadzono pięciokrotną selekcję.

Do badań nad litycznym działaniem faga i jego mutantów użyto 291 szczepów pałeczek *Brucella*, które otrzymano z Muzeum Szczepów *Brucella* Inst. Med. Pracy

i Hig. Wsi w Lublinie. Każdy szczep posiadał metrykę, na podstawie której zaliczono go do odpowiedniego gatunku. Badano 143 szczepy *Br. bovis typica*, 30 szczepów *Br. bovis atypica*, 60 szczepów *Br. suis typica*, 20 szczepów *Br. suis atypica*, 20 szczepów *Br. melitensis typica*, 7 szczepów *Br. melitensis atypica*, oraz 11 szczepów *Brucella „british” melitensis* (pochodzące od krów — mleko). Każdy szczep wysiewano na agar Brauna i po 36 godz. inkubacji zawieszano w bulionie wątrobowym tak, by zawiesina była lekko mętna. Zawiesinę wylewano na płytki z agarem wątrobowym, suszono w cieplarni przez 20 min. i nakraplano zawiesinę fagów (ryc. 1). Miano faga „dzikiego” i mutantów wynosiło  $10^{-3}$  w 1 ml, tj. około 50 cząstek faga w 1 kropli.

#### WYNIKI BADAŃ

Wpływ różnych warunków konserwacji na utrzymywanie się miana faga przedstawia tab. 1.

Tabela 1

| Fag | Miano początkowe | Lodówka | Zamrażarka | Glicerol | Kontrola w temp. pok. |
|-----|------------------|---------|------------|----------|-----------------------|
| 371 | 100%             | 45%     | 70%        | 20%      | 0%                    |

Wpływ ciepłoty na aktywność faga przedstawia tab. 2.

Tabela 2

| Temp. w °C     | 30  | 37  | 40   | 50   | 55   | 60   | 70 |
|----------------|-----|-----|------|------|------|------|----|
| % żywych fagów | 100 | 100 | 99,9 | 98,7 | 80,0 | 64,2 | 0  |

Wpływ chloroformu na aktywność faga przedstawia tab. 3.

Tabela 3

| Czas działania chloroformu w min. | 0   | 1    | 3   | 5   | 10 |
|-----------------------------------|-----|------|-----|-----|----|
| % żywych fagów                    | 100 | 53,2 | 3,6 | 0,7 | 0  |

Wpływ oddziaływania środowiska (pH) na żywotność faga przedstawia tab. 4.

Tabela 4

| pH             | 3,2 | 4,0 | 4,8 | 5,2 | 6,0 | 6,3 | 7,0 | 7,2 | 8,0 | 8,8 | 9,8 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| % żywych fagów | 0   | 41  | 72  | 77  | 98  | 100 | 100 | 100 | 99  | 77  | 42  |

Wyniki badania stałej neutralizacji surowicy antyfagowej przedstawia tab. 5.

Tabela 5

| Czas<br>w min. | % faga żywego<br>w surowicy rozcieńczonej |       |
|----------------|-------------------------------------------|-------|
|                | 1/50                                      | 1/100 |
| 5              | 5,2                                       | 10,6  |
| 10             | 4,3                                       | 6,0   |
| 15             | 1,7                                       | 1,2   |
| 20             | 0,2                                       | 0,04  |

Dane z tabeli 5 podstawiono do wzoru  $K = 2,3 D/t \times \log p^0/p$ , gdzie  $p^0$  = fag badany w 0 (zero) czasie, czyli miano użytego faga.  $p$  = fag badany po  $t$  minutach, czyli ilość lysinek po określonym czasie działania surowicy.  $D$  = ostatnie (końcowe) rozcieńczenie surowicy antyfagowej. Wzór ten można stosować dla danych zawartych w granicach 90 do 99 % neutralizowanych fagów.

$$K = 2,3 \times 50/5 \times \log 100/5,2. K = 23 \times \log 19,2.$$

$$K = 29,6.$$

Wyniki badania szybkości adsorpcji faga do komórek *Brucella* przedstawiają się następująco: Tabela 6.

Tabela 6

| Czas<br>w min. | % zaadsorb. faga<br>wyliczony z ilości<br>zakaż. bakterii | % zaadsorb. faga<br>wyliczony z ilości<br>wolnych fagów |
|----------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 0              | 0                                                         | 0                                                       |
| 15             | 43,1                                                      | 47,8                                                    |
| 20             | 58,8                                                      | 60,0                                                    |
| 30             | 86,3                                                      | 87,3                                                    |
| 40             | 90,2                                                      | 91,8                                                    |
| 60             | 98,0                                                      | 99,2                                                    |

Dane z tabeli 6 podstawiono do wzoru różniczkowego na stałą adsorpcji faga:

$$K = \frac{2,3 \times \log p^0/p}{B \text{ ml} \times t \text{ min.}}$$

gdzie  $p^0$  = ilość badanego faga badanego w czasie 0 (zero);  $p$  = ilość faga niezaadsorbowanego w czasie  $t$  min.  $t$  = czas w min. od chwili dodania faga;  $B$  = ilość bakterii jako liczba komórek na ml. W obli-

czeniu brano pod uwagę wyniki adsorpcji po 30 minutach. Po tym czasie adsorpcja przebiegała bardzo wolno.

$$P = 100,0\%$$

$$- 86,3\%$$

$$13,7 = 14\%$$

$$K = \frac{2,3 \times \log 100/14}{820\,000\,000 \times 30} = \frac{2,3 \times \log 7,143}{820\,000\,000 \times 30}$$

$$K = \frac{2,3 \times 0,8539}{24\,600\,000\,000} \quad K = 7,9 \times 10^{-11} \text{ ml/min.}$$

Wyniki badania czasu generacji, wydajności fagów z jednej komórki i okresu wyzwalania się faga przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7

| Czas<br>w min. | F. G. T.*<br>Liczba<br>łysinek | S. G. T.**<br>Liczba<br>łysinek | Czas<br>w min. | F. G. T.*<br>Liczba<br>łysinek | S. G. T.**<br>Liczba<br>łysinek |
|----------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 35             | 86                             | 0                               | 110            | pełna liza                     | 23                              |
| 40             | 94                             | 1                               | 115            | " "                            | 44                              |
| 50             | 95                             | 0                               | 125            | " "                            | 49                              |
| 60             | 92                             | 0                               | 135            | " "                            | 94                              |
| 70             | 103                            | 2                               | 150            | " "                            | 128                             |
| 80             | 108                            | 0                               | 160            | " "                            | 135                             |
| 85             | 105                            | 1                               | 175            | " "                            | 135                             |
| 90             | 101                            | 0                               | 180            | " "                            | 133                             |
| 95             | 109                            | 1                               | 190            | " "                            | 135                             |
| 100            | 117                            | 1                               | 200            | " "                            | 140                             |
| 105            | 256                            | 10                              | 220            | " "                            | 138                             |

\* F. G. T. = first growth tube (pierwsza próbówka wzrostowa).

\*\* S. G. T. = second growth tube (druga próbówka wzrostowa).

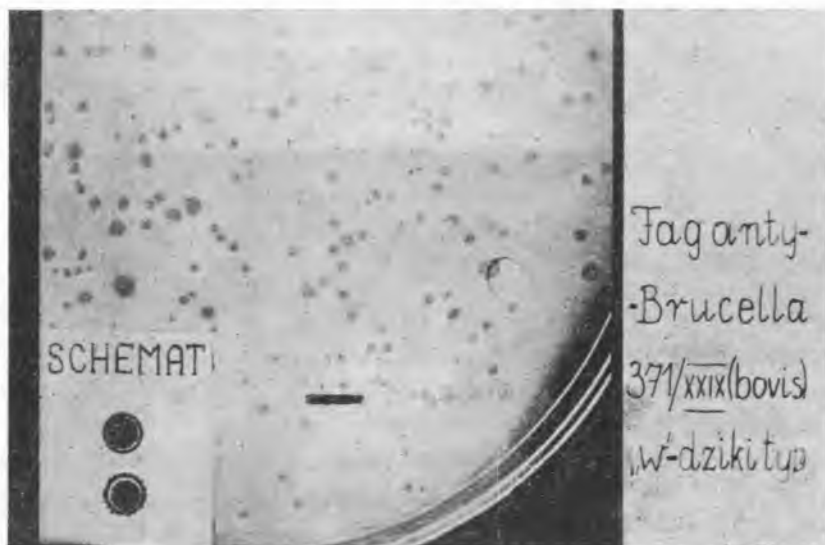
Z tabeli 7 wynika, że okres utajony kończy się między 105—110 min. (FGT). Obliczenia w SGT wykazują wzrost liczby łysinek w 150 min. od czasu zakażenia. Wskazuje to, że w tym czasie kończy się rozpuszczanie zakażonych komórek. Z obliczeń wynika, że w okresie utajonym było przeciętnie 101 zakażonych komórek. Liczba ta pomnożona przez rozcieńczenia  $3,5 \times 10^3$  wykazuje  $3,5 \times 10^5$  zakażonych komórek w 1 ml. Ten sam odsetek zakażenia komórek po 25 min. kontaktu faga z bakteriami ustalono na podstawie uprzednio obliczonej szybkości adsorpcji (10 min. działała surowica neutralizująca fagi). Po całkowitej lizie w SGT przeciętna liczba łysinek wynosiła 130. Mnoży się tę liczbę przez rozcieńczenie  $10^2$  idąc z SGT do FGT co daje 13 000 łysinek

w stosunku do FGT. Przeciętna ilość faga uwalnianego z komórki wynosi 13 000 łyseinek podzielonych przez 101 zakażonych komórek daje 128 cząsteczek faga z jednej komórki.

Z przedstawionych danych wynika: 1. Okres zakażenia utajonego (czas generacji) wynosi 105—110 min. 2. Okres uwalniania się faga od początku lizy do rozpuszczenia wszystkich zakażonych komórek wynosi maksymalnie 50 min. 3. Przeciętna wydajność faga z jednej komórki wynosi 128 fagów. Badając specyficzność działania faga na rodzaj *Brucella*, stwierdzono, że fag nie działa na inne, badane gatunki bakterii.

Mianując faga metodą dwuwarstwową na płytkach z wysokimi rozcieńczeniami ( $10^{-7}$ – $10^{-10}$ ), spostrzegano łyseinki różnej wielkości, o różnej przejrzystości brzegów. łyseinki te pojawiały się w różnym czasie inkubacji. Spostrzegano następujące rodzaje łyseinek:

1. Okrągłe, o równym, nieco zamglonym brzegu, wielkości 3—4 mm, pojawiające się po 20—24 godz. inkubacji. łyseinki o tego rodzaju morfologii są najliczniej reprezentowane na posianych płytkach. Można je uważać za charakterystyczne dla „dzikiego typu”. Nazwano je „wt” — wild type (12) (ryc. 2).



Ryc. 2.

2. Okrągłe, o ostrym, równym brzegu, wielkości 0,2—2 mm, pojawiające się po 12—16 godz. inkubacji. Nazwano je „rm” — rapid, minute plaques — ostre, małe łyseinki (ryc. 3).



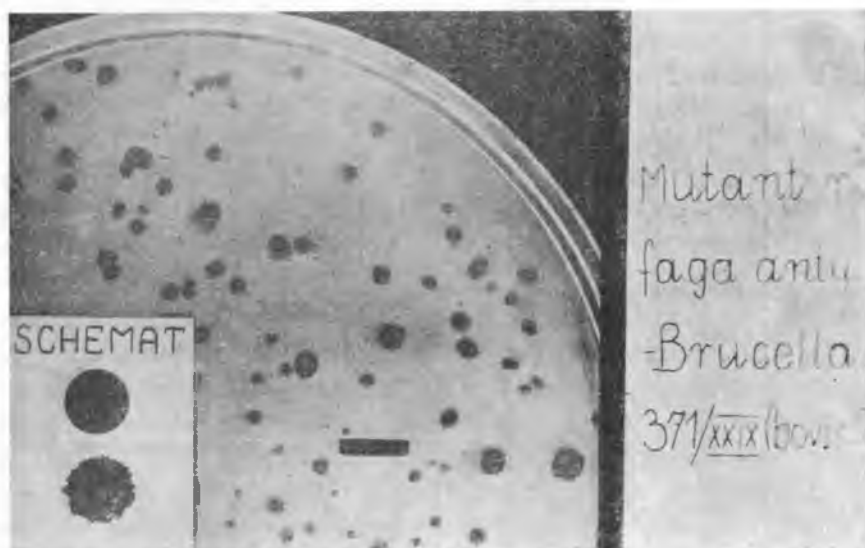
Ryc. 3.



Ryc. 4.

3. Okrągłe, o nierównym brzegu i szerokim pasie zamglenia zajmującego połowę łysej, pojawiające się po 24—30 godz. inkubacji. Nazwano je „tu” — turbid plaques — mętne łysej (ryc. 4).

4. Okrągłe, duże o ostrym brzegu, wielkości 4—5 mm, występujące po 16—20 godz. inkubacji. Nazwano je „r” — rapid lysis — duże, ostre łysej (ryc. 5).



Ryc. 5.

Po otrzymaniu, metodą selekcji, zbiorów poszczególnych mutantów badano wpływ czasu adsorpcji na morfologię łysej. Po 10 min. adsorpcji do mieszaniny faga ze szczepem dodawano surowicę neutralizującą fagi. Następnie, po 30 min., mieszaninę rozcieńczano i wysiewano metodą dwuwarstwową. Stwierdzono, że morfologia łysej poszczególnych mutantów nie uległa zmianom.

Wyniki badania litycznego działania faga i jego mutantów na szczepy *Brucella* przedstawiono w tab. 8.

Z przedstawionej tabeli 8 wynika, że mutant „rm” działa na największą ilość szczepów *Brucella*, a mutant „tu” działa na najmniejszą liczbę badanych szczepów *Brucella*. Tak samo jak fag dziki, niespecyficycznie działają mutanty faga na poszczególne gatunki. Mutanty nie nadają się do typowania poszczególnych gatunków *Brucella*.

Tabela 8

|                  | <i>Brucella</i><br><i>bovis</i> typ. | <i>Brucella</i><br><i>bovis</i> atyp. | <i>Brucella</i><br><i>suis</i> typ. | <i>Brucella</i><br><i>suis</i> atyp. | <i>Brucella</i><br><i>melit.</i> atyp. | <i>Brucella</i><br><i>melit.</i> atyp. | <i>Brucella</i><br>„british”<br><i>melitensis</i> | Razem | Procent. |
|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|----------|
| Ilość            | 143                                  | 30                                    | 60                                  | 20                                   | 20                                     | 7                                      | 11                                                | 291   | 100      |
| Mutant „wt”<br>— | 0                                    | 2                                     | 3                                   | 0                                    | 1                                      | 0                                      | 0                                                 | 6     | 2        |
| +                | 29                                   | 4                                     | 19                                  | 7                                    | 12                                     | 5                                      | 3                                                 | 80    | 27       |
| ++               | 52                                   | 15                                    | 24                                  | 8                                    | 2                                      | 1                                      | 0                                                 | 102   | 35       |
| +++              | 61                                   | 9                                     | 14                                  | 5                                    | 5                                      | 1                                      | 8                                                 | 103   | 35       |
| Mutant „rm”<br>— | 0                                    | 0                                     | 0                                   | 1                                    | 1                                      | 0                                      | 0                                                 | 2     | 0,7      |
| +                | 7                                    | 1                                     | 4                                   | 2                                    | 13                                     | 3                                      | 2                                                 | 32    | 11       |
| ++               | 33                                   | 3                                     | 18                                  | 8                                    | 3                                      | 3                                      | 2                                                 | 70    | 23       |
| +++              | 103                                  | 26                                    | 38                                  | 9                                    | 3                                      | 1                                      | 7                                                 | 187   | 64       |
| Mutant „tu”<br>— | 18                                   | 6                                     | 7                                   | 1                                    | 11                                     | 2                                      | 2                                                 | 47    | 16       |
| +                | 3                                    | 8                                     | 14                                  | 12                                   | 4                                      | 3                                      | 2                                                 | 86    | 30       |
| ++               | 40                                   | 9                                     | 25                                  | 3                                    | 3                                      | 2                                      | 2                                                 | 84    | 29       |
| +++              | 42                                   | 7                                     | 14                                  | 4                                    | 2                                      | 0                                      | 5                                                 | 74    | 25       |
| Mutant „r”<br>—  | 18                                   | 4                                     | 10                                  | 4                                    | 13                                     | 4                                      | 4                                                 | 57    | 20       |
| +                | 48                                   | 11                                    | 20                                  | 10                                   | 15                                     | 2                                      | 6                                                 | 102   | 35       |
| ++               | 31                                   | 8                                     | 14                                  | 2                                    | 1                                      | 1                                      | 0                                                 | 57    | 20       |
| +++              | 40                                   | 8                                     | 16                                  | 3                                    | 1                                      | 1                                      | 1                                                 | 71    | 24       |

— — brak lizy w miejscu nakropienia, + — do 10 lysinek w miejscu nakropi., ++ — do 20 lysinek w miejscu nakropi., +++ — pełna liza w miejscu nakropi.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Drożewkina (6) namnażała fagi na pożywce Martina. Parnas (17, 18) na bulionie wątrobowym. McDuff i wsp. (8), oraz Brinley-Morgan i wsp. (2) na pożywce „Albimi”. Wprowadzenie jonu  $Ca^{++}$  do podłoża pozwala na stałe otrzymywanie wysokich mian namnażanych fagów. Na ogół poglądy autorów co do sposobów przechowywania fagów pokrywają się. Brinley-Morgan (3), McDuff (8), Ostrowskaja (16) podali, że fag przechowywany w lodówce przez 2—3 lata nie traci właściwości litycznych. Parnas (18) wskazał, że zamrożenie faga do  $-20^{\circ}$  powoduje utrzymywanie się miana przez długi okres czasu. Wprowadzenie glicerolu jako środka konserwującego fagi w temperaturze pokojowej może być szczególnie użyteczne podczas przesyłania faga pocztą na dalekie odległości.

Wyniki naszych badań co do wpływu ciepłoty na aktywność faga pokrywają się z badaniami McDuff i wsp. (8) i Brinley-Morgana (3). Natomiast Ostrowskaja (16) podała, że fag Tbilisi jest ciepłostały i ginie w temp. 85—90° po 30 min. Nasze doświadczenia pokrywają się z wynikami badań wymienionych autorów co do wpływu (oddziaływania) środowiska na żywotność faga. Z danych tych wynika, że zakres wpływu pH na działanie faga *Brucella* nie odbiega od zakresów działania fagów innych gatunków bakterii.

Surowicę antyfagową otrzymali Brinley-Morgan i wsp. (2, 3) oraz McDuff i wsp. (8). Stała neutralizacji  $K$  dla faga 371 w badaniach Brinley-Morgana wynosiła 58,7 co świadczy o większej sile neutralizacyjnej tej surowicy w porównaniu z naszą. W badaniach McDuffa  $K = 31,7$  dla „faga nr 3 Drożewkinej”. Z obliczeniowego punktu widzenia wyżej przedstawione dane oraz wyniki własne można zaliczyć do zbliżonych do siebie.

Szybkość adsorpcji faga do komórek w badaniach McDuff i wsp. (8) na jednym szczepie wynosiła  $K = 1,7 \times 10^{-12}$ , na drugim szczepie wynosiła  $K = 3,6 \times 10^{-11}$  ml/min. W badaniach Morgana (3) stała adsorpcji wynosiła  $K = 3,8 \times 10^{-11}$  ml/min. Warunkiem porównalności wyników jest wykonywanie takich badań w tej samej pożywce i w tych samych warunkach doświadczenia. W przeciwnym wypadku porównywanie tych stałych ma względne znaczenie. Adsorpcja brucellafagów do komórek *Brucella* jest bardzo wolna, długa. Dla porównania dla fagów *E. coli*  $K = 6,9 \times 10^{-9}$  ml/min., czyli fagi *Brucella* adsorbują się około 100 razy wolniej niż fagi *E. coli*.

Równocześnie z naszymi badaniami nad kinetyką namnażania się faga w pojedynczej komórce, podobne badania przeprowadzili McDuff i wsp. (8). Okres zakażenia utajonego trwał około 100 min., okres wyzwalania się faga około 45 min., a wydajność faga z 1 komórki 121 cząsteczek. Autorzy ci stwierdzili, że szybkość adsorpcji zależna jest od „wieku” szczepu. Wyżej przedstawione wyniki dotyczą szczepu 12-godzinnego. Adsorpcja fagów i okres zakażenia utajonego wynosiły około 150 min. dla 18-godzinnego szczepu. Nasze badania wykonywano na 15-godzinnej hodowli szczepu wskaźnikowego. Wyniki badań są podobne.

Van Drimmelen (5), Brinley-Morgan i wsp. (2) i Ostrowskaja (16) obserwując łąski fagów *Brucella* zwrócili uwagę na ich różną wielkość i wyrażali przypuszczenie, że badane zbiory faga nie stanowią jednorodnej populacji. McDuff i wsp. (8) stwierdzają, że morfologiczna różnorodność łąsinek uzależniona jest od czasu adsorpcji faga przez komórkę. Przerwanie adsorpcji faga przez

dodanie surowicy antyfagowej po 10-minutowym kontakcie fagów i bakterii powodowało występowanie łyseinek jednakowej wielkości (5—6 mm). Pogląd ten nie wytrzymuje krytyki z dwóch powodów. Po pierwsze nasza surowica antyfagowa, dodawana po 10 min. kontaktu nie wywierała widocznego wpływu na morfologię łyseinek-mutantów. Po drugie obserwowano występowanie pojedynczych łyseinek-mutantów wśród łyseinek typu dzikiego w doświadczeniach, w których czas absorpcji był ograniczony — przy określaniu stałej neutralizacji i przy badaniu kinetyki rozmnażania się faga. Badania Parnasa i wsp. (19) wykazały, że morfologia łyseinek nie zmienia się w tym zakresie pH, w którym mogą rozmnażać się Brucelle, nie zmienia się od 0,3 do 3 % zawartości agaru w górnej warstwie na płycie Petriego. Badania nasze wykazały, że populacja fagowa nie jest jednorodna (12).

Wyniki litycznego działania faga typu dzikiego jak i jego mutantów na badane szczepy pałeczek *Brucella* potwierdzają dane otrzymane przez Drożewkinę (7), Parnasa (18), Brinley-Morgana (3) i Wundta (24). Fagami nie udaje się dotychczas typować gatunków *Brucella*. Z przedstawionych badań (tab. 8) wynika, że mutanty faga 371 także nie mogą być używane do typowania gatunków *Brucella*.

#### STRESZCZENIE I WNIOSKI

Do badań użyto faga 371 wyosobnionego ze szczepu *Br. bovis* i stwierdzono, że fag dobrze namnaża się na szczepie wskaźnikowym wysianym do bulionu wątrobowego z dodatkiem chlorku wapnia. Przeprowadzone różnymi metodami badania nad konserwacją faga wykazały, że przez 10 miesięcy fag najlepiej przechowywał się w zamrażarce —25°, dostatecznie konserwował się w lodówce i w temperaturze pokojowej po uprzednim zmieszaniu zawiesiny faga z glicerolem. Przeprowadzono charakterystykę faga i wykazano, że przez 60 minut ogrzewania przy pH 7,2 100 % fagów przeżywa w temperaturze 50°, a 80 % fagów przeżywa ogrzewanie w 55°. Temperatura 70° zabija wszystkie fagi. Chloroform (10 %) niszczy fagi po 10 min. działania. Badając wpływ oddziaływania środowiska (pH) na żywotność faga, wykazano, że w temperaturze 37° przez 24 godziny 100 % fagów przeżywa w zakresie pH 6,0—8,2, 80 % fagów przeżywa w zakresie pH 5,2—8,8. Otrzymano surowicę antyfagową i stwierdzono, że stała neutralizacji K dla surowicy rozcieńczonej 1/50 wynosi 29,6. Badano przebieg szybkości adsorpcji faga do komórek szczepu wskaźnikowego i stwierdzono, że stała adsorpcji wynosi  $K = 7,9 \times 10^{-11}$  ml/min. Badając kinetykę namnażania się faga wewnątrz komórki stwierdzono, że okres zakażenia utajonego (latent period) trwa 105—110 min., okres uwalniania się faga

(rise period) trwa maksymalnie 50 min., a przeciętna wydajność faga z jednej komórki (burst size) wynosi 128 cząsteczek.

Badano specyficzność działania faga na pałeczki *Brucella*, działano fagiem na inne gatunki bakterii i stwierdzono, że fag działa tylko na pałeczki *Brucella*, na inne gatunki bakterii nie działa.

Ze zbioru faga wyosobniono i opisano następujące rodzaje łyseinek-mutantów: typ rm — rapid minute plaques, typ tu — turbid plaques, typ r — rapid lysis. Opisano także podstawowe, „dzikie” łyseinki faga. Morfologię tych łyseinek przedstawiają ryc. 2—5.

Fagiem i jego mutantami typowano 291 szczepów różnych gatunków pałeczek *Brucella* i stwierdzono, że mutant tu działa znacznie słabiej (na mniejszą ilość szczepów) w porównaniu z dzikim typem. Typ rm działa na największą ilość szczepów. Równocześnie stwierdzono, że zarówno typ dziki jak i mutanty nie działają specyficznie na gatunki *bovis*, *suis* i *melitensis* pałeczek *Brucella*. Z przedstawionych badań wynika, że fag ten odróżnia się od fagów *E. coli* serii T znacznie wolniejszą szybkością adsorpcji, przedłużonym okresem zakażenia utajonego i dłuższym okresem uwalniania się faga z zakażonych komórek.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Adams Mark H.: Bacteriophages. Intersc. Publ. New York, 1959.
2. Brinley-Morgan W. J., Kay B., Bradley D. E.: *Brucella* Bacteriophage. Nature 74, 188, 1960.
3. Brinley-Morgan W. J.: *Brucella* Bacteriophage. Round Table Discussion on *Brucella* Phages. London 1961.
4. Brumfitt W.: Studies on the Mechanism of Adsorption and Penetration by Bacteriophage. J. Path. Bact. 79, 1, 1960.
5. Drimmelen van G. G.: Bacteriophage Typing of *Brucella* Organisms. S. Afric. J. Sci., 56, 8, 187, 1960.
6. Drożewkina M. S.: Brucelleznyj bakteriofag — metodika i perspektywy jego ispolzowanija. Żurnał Mikrobiol. Epid. Immunol. 9, 3, 1957.
7. Drożewkina M. S.: O tipospecificznosti brucelleznych fagow. Trudy Rostowskiego Protiwczumnogo Instituta, 16, 109, 1059.
8. McDuff C. R., Jones Lois M., Wilson J. B.: Characteristics of Brucellaphage. J. Bacteriol. 1962.
9. Gwatkin R.: Search for a *Brucella* Bacteriophage. J. Inf. Dis., 48, 404, 1931.
10. d'Herelle M.: Le bactériophage et son comportement, Paris 1926.
11. Huddleson: cyt.za: Parnas J., Tuszkiewicz A.: Bruceloza, PZWL, Warszawa 1956.
12. Jabłoński L.: Variability of *Brucella* Phages. Nature 193, 4816, 703, 1962.
13. Liu I. I.: Untersuchungen über Vorkommen von Bacteriophagen für *Brucella*-Bakterien und für Sporospilze (Monilia). Inaug.-Diss., Hamburg 1933.
14. Łazuga K., Renoux G.: Quelques essais sur les bactériophages de *Brucella*. Extrait des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis 37, 447, 1960.

15. Mamacaszwili E. G.: O niektórych svojstvach brucellego bakteriofaga. *Žurnal Mikrobiol. Epidem. Immunol.*, 9, 8, 1957.
16. Ostrowskaja N. N.: K charakteristike brucellego bakteriofaga. *Žurnal Mikrobiol. Epid. Immunol.*, 6, 70, 191.
17. Parnas J., Feltynowski A., Bulikowski W.: Anti-Brucella Phage. *Nature*, 182, 1610, 1958.
18. Parnas J.: Further Studies on Brucella Phage. *Path. Microbiol.* 42, 3, 374, 1961.
19. Parnas J.: Informacje osobiste.
20. Popchadze M. Z., Abaszidze T. G.: Charakteristika brucellego bakteriofaga, wydelenego w Tbiliskom NIIWS. W książce: *Bakteriofagija Tbilisi*, 1957, s. 321.
21. Sanderson E. S.: Bacteriophage Tests on the Meconium of Aborted Fetuses. *Jour. Exp. Med.*, 42, 561, 1925.
22. Sergienko F. E., Szulz W. M., Natowicz A. L.: Bakteriofag dla kultur brucell. *Mikrobiologičeskij Žurnal (Kijew)*, 7, 1, 15, 1940.
23. Smith H. W.: A Search for Bacteriophage Active upon Bacteria of the Brucella Genus. *J. Hyg.*, 47, 414, 1949.
24. Wundt W.: Determination of Phage Sensitivity of Brucella Strains by the Agar Layer Method. Round Table Discussion on Brucella Phages, London 1961.

### РЕЗЮМЕ

Исследовались физические, химические, серологические и генетические свойства бруцеллофага нр. 371/XXIX.

1. Констатируется, что скорость адсорбции равняется  $7,9 \times 10^{-11}$  мл/мин., 2. период укрытой инфекции длится 105—110 мин., 3. период освобождения фага максимально длится 50 мин., 4. средняя продуктивность фага из одной инфицированной клетки 128 единиц фага.

По сравнению с фагами *E. coli* серии Т, бруцеллезный фаг характеризуется медленной скоростью адсорбции, удлинением периода укрытой инфекции и удлинением периода освобождения фага.

В популяции фага обнаружено и описано четыре вида негативных колоний фага.

### SUMMARY

The study presents physical, chemical, serological, and genetical properties of the Brucellaphage No. 371/XXIX.

The author states that: 1. velocity of adsorption was  $7.9 \times 10^{-11}$  ml/min., 2. the latent period lasted 105—110 min., 3. the maximum rise period lasted 50 min., 4. burst size was 128 particles per one infected cell.

The comparison of *E. coli* phages, series T, with the Brucellaphage shows that their velocity of adsorption is slower by about 100 times than that of the Brucellaphage, while the latent period is longer by about 5 times in the Brucellaphage. The amount of particles in *E. coli* is lower than that in the Brucellaphage.

In the phage stocks four kinds of plaques were detected and described: wt — wild type, type rm — rapid minute plaques, type tu — turbid plaques, and type r — rapid lysis.

