

POZORNA IZOLACJA MYKOBAKTERIOFAGÓW Z PRÓBEK ZIEMI SPOWODOWANA LIZOGENIĄ SZCZEPÓW UŻYTYCH DO WZBOGACANIA

Jovan Sivcev

Instytut Gruźlicy i Chorób Klatki Piersiowej w Sremskiej Kamienicy — Jugosławia
Dyrektor: prof. dr S. Goldman

Podobnie jak wielu innych badaczy, staraliśmy się również wyizolować z próbek bakteriofagi aktywne wobec mykobakterii.

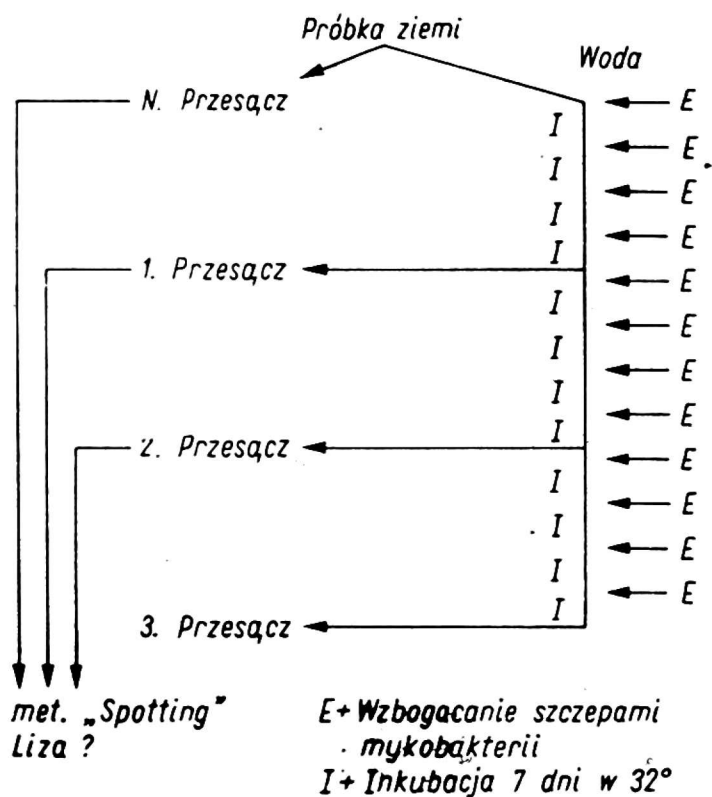
Mimo doniesień o niemożności znalezienia mykobakteriofagów w bezkomórkowych przesączach próbek ziemi nie poddanych żadnym wpływom [7] lub takich, które były tylko inkubowane [4] próbowaliśmy stosować te metody ale również bez powodzenia.

Jako podstawową metodę wzbogacania gleby zastosowaliśmy zmodyfikowaną technikę Gardnera i Weisera [2]. Wzbogaciliśmy próbki ziemi różnymi mykobakteriami — jednorazowo i wielokrotnie, badaliśmy przesącze próbek bez jakiegokolwiek działania, w kierunku aktywności litycznej wobec mykobakterii zastosowanych do wzbogacania. Dla zwiększenia możliwości wykrycia fagów, wzbogacaliśmy próbki różnymi szczepami.

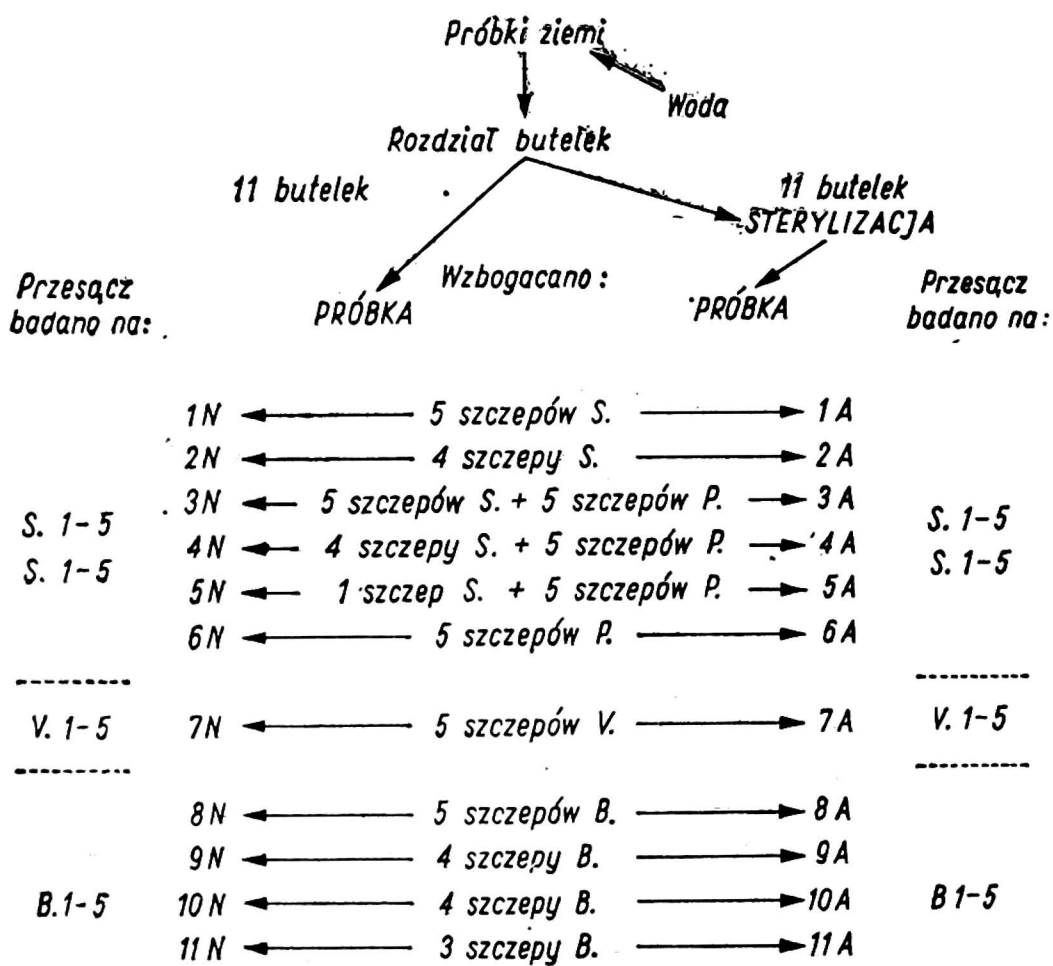
W doświadczeniu 10 próbek różnej ziemi (ziemia ogrodowa, ziemia spod upraw, ziemia leśna, ziemia z obór i kurników, muł rzeczny) wzbogacano zawiesinami 30 szczepów szybko rosnących mykobakterii należących do 6 gatunków (Wykaz zastosowanych szczepów). Przebieg doświadczenia, w którym były otrzymane i badane 4 przesącze przedstawiony jest na ogólnym schemacie wzbogacania (rys. 1).

Przesącze próbek ziemi przed wzbogacaniem nie wykazywały aktywności litycznej wobec żadnego ze szczepów mykobakterii użytych do wzbogacania. Po wzbogaceniu, przesącze wszystkich próbek wykazywały aktywność lityczną wobec niektórych mykobakterii użytych do wzbogacania. Aktywność ta spowodowana była działaniem bakteriofagów (tab. 1).

Ścisłe podobieństwo aktywności litycznej przesączów próbek pochodzących z różnych gleb traktowanych identycznie, nasunęło przypuszczenie, że pewne bakteriofagi są wspólne dla wszystkich przesączów i że dostały się one do próbek wraz ze szczepami użytymi do wzbogacania. Dla wyjaśnienia tego zagadnienia przeprowadzono inne doświadczenie z jedną tylko glebą z pierwszego doświadczenia pobraną z próbki nr 4 tj. ziemią



Rys. 1. Ogólny schemat wzbogacenia



Rys. 2. Schemat badania

Tabela 1

Aktywność lityczna przesączów 10 próbek ziemi wzbogaczanych jednocześnie 30 szczepami mykobakterii wobec zastosowanych szczepów

Szczep prątka	nr próbki ziemi									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>M. smegmatis</i>										
S.1	o	+	o	+	o	o	o	o	o	o
S.2	o	+	o	+	o	o	o	o	o	o
S.3	o	o	o	+	o	o	+	+	o	o
S.4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S.5	o	+	o	+	o	o	o	o	o	o
<i>M. phlei</i>										
P.1	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+
P.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P.4	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+
P.5	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. vaccae</i>										
V.1	+	+	+	+	o	o	+	o	+	o
V.2	+	+	+	+	o	o	+	o	+	o
V.3	+	+	+	+	o	o	+	o	+	o
V.4	+	+	o	+	o	o	+		+	o
V.5	+	+	+	+	o	o	+	o	+	o
<i>M. borstelense</i>										
B.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B.2	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+
B.3	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+
B.4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
B.5	o	o	o	o	o		o	o	o	o
<i>M. diernhoferi</i>										
D.1 — D.5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
<i>M. fortuitum</i>										
F.1 — F.5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

ogrodową. Wyniki tego doświadczenia przedstawione są w niniejszej pracy.

Badanie przeprowadzono zgodnie z ogólnym schematem wzbogacania. Zastosowano 12-krotne wzbogacanie w odstępach tygodniowych; badano 3 przesącze każdej próbki.

Próbkę ziemi o ciężarze ok. 1 kg ucierano na pastę z dodatkiem równej ilości wody destylowanej. Całą objętość tak zhomogenizowanej próbki rozdzielono na 22 równe porcje i umieszczono w 300 ml butelkach. Z tego 11 próbek sterylizowano w autoklawie w ciągu 2 godzin przy ciśnieniu 2 atm.

Zastosowano 11 zestawów po 20 szczepów szybko rosnących mykobakterii, należących do 4 gatunków. Zgodnie ze schematem badań, każdy ze-

staw wzbogacał jedną wyjściową i jedną wysterylizowaną próbkę tej ziemi. Szczepy mykobakterii używano w tym samym zestawie jak to miało miejsce w poprzednim badaniu (wykaz zastosowanych szczepów).

Wykaz zastosowanych szczepów

Gatunek prątka	Szczep	Kod Instytutu Naukowo-Badawczego Borstel (SN)
<i>M. smegmatis</i>	S.1	SN 1
	S.2	SN 2
	S.3	SN 4
	S.4	SN 7
	S.5	SN 9
<i>M. phlei</i>	P.1	SN 101
	P.2	SN 102
	P.3	SN 105
	P.4	SN 109
	P.5	SN 110
<i>M. vaccae</i>	V.1	SN 901
	V.2	SN 902
	V.3	SN 920
	V.4	SN 951
	V.5	SN 963
<i>M. borstelense</i>	B.1	SN 281
	B.2	SN 282
	B.3	SN 283
	B.4	SN 284
	B.5	SN 285
<i>M. diernhoferi</i>	D.1 — D.5	SN 1401, 1402, 1411, 1412, 1420
<i>M. fortuitum</i>	F.1 — F.5	SN 201, 202, 204, 207, 208

Wszystkie szczepy otrzymano z Naukowo-Badawczego Instytutu w Borstel. Szczepy były hodowane na skosach podłoża UIT, przeszczepiane w odstępach tygodniowych. Zawiesinę (raczej gęstą) szczepu wykonywano w roztworze fizjologicznym soli kuchennej. Każda próba wzbogacana była 10 ml mieszaniny zawierającej równe ilości odpowiednich szczepów prątków.

Po 4, 8 i 12 tygodniach inkubacji w 32° pobierano 10 ml próbki i sączono je przez bakteriologiczne filtry szklane. Badano aktywność lityczną przesączów wobec szczepów mykobakterii metodą „spotting” stosując technikę dwuwarstwowego agaru. Badania wykonywano na płytkach Petriego. Technika dwuwarstwowego agaru była modyfikacją metody opisanej przez Gratia [3]. Użyte podłoże to bulion z dodatkiem 2% glicerolu, który w dolnej warstwie zawierał 2%, a w górnej 1% agaru.

Żaden z użytych szczepów mykobakterii nie był lizogenny. Szczep

M. smegmatis był badany krzyżowo na lizogenność przy użyciu zmodyfikowanej metody Fiska [1].

Bezkomórkowe przesącze hodowli bulionowej i zawiesiny szczepów ze stałego podłoża były nakraplane na powierzchnię dwuwarstwowego agaru na płytkach. Zawiesinę szczepu gospodarza dodawano do górnej warstwy agaru. W ten sam sposób badano szczepy *M. vaccae*. Wyniki badań nie wskazywały na lizogenność szczepów *M. smegmatis* lub *M. vaccae* (tab. 2 i 3).

Aktywność lityczną wszystkich przesączów stwierdzano już w pierwszym badaniu jak również po 4 wzbogaceniach i 4 tygodniach inkubacji. Aktywność ta pozostała niezmienną w ostatnich przesączach po 12 wzbogaceniach i 12 tygodniach inkubacji.

Aktywność lityczna wszystkich przesączów była spowodowana obecnością bakteriofagów. Eluaty z przejaśnień uzyskanych na płytkach agarowych nakropione ponownie pozwoliły na otrzymanie pojedynczych łąsinek.

Wyniki badania przesączów wzbogacanych próbek metodą „spotting” przedstawiają tabele 4—6.

Tabela 2

Testy krzyżowe występowania lizogenii u szczepów *M. smegmatis*

Szczep	Nakraplano na:									
	zawiesinę szczepu					przesącz hodowli bulionowej szczepu				
	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5
S.1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S.2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S.3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S.4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
S.5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Tabela 3

Testy krzyżowe występowania lizogenii u szczepów *M. vaccae*

Szczep	Nakraplano na:									
	zawiesinę szczepu					przesącz bulinowej hodowli szczepu				
	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5
V.1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
V.2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
V.3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
V.4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
V.5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Tabela 5

Badanie aktywności litycznej próbek wyjściowych (*N*) oraz ich sterylizatów (*A*) wzbogacanych pięcioma szczepami *M. vaccae*

Próbka	Wzbogacano:					Aktywność lityczna przesączów wobec:				
	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5
7 <i>N</i>	×	×	×	×	×	+	+	+	+	+
7 <i>A</i>						o	o	o	o	o

Tabela 6

Badanie aktywności litycznych przesączów próbek wyjściowych (*N*) oraz ich sterylizatów (*A*) wzbogacanych szczepami *M. borstelense*

Próbka	Wzbogacano:					Aktywność lityczna przesączów wobec:				
	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5
8 <i>N</i>	×	×	×	×	×	+	+	+	o	o
8 <i>A</i>						+	+	+	o	o
9 <i>N</i>	×	×	×	×		o	o	o	o	o
9 <i>A</i>						o	o	o	o	o
10 <i>N</i>	×	×	×		×	+	+	+	o	o
10 <i>A</i>						+	+	+	o	o
11 <i>N</i>	×	×	×			o	o	o	o	o
11 <i>A</i>						o	o	o	o	o

Tabela 4 wykazuje aktywność przesączów próbek wzbogacanych szczepami *M. smegmatis* i/lub *M. phlei* w różnych kombinacjach, badaną wobec wszystkich użytych szczepów *M. smegmatis* i *M. phlei*.

Stwierdzono aktywność lityczną przesączów zarówno wyjściowych jak też sterylizowanych próbek wzbogacanych szczepami *M. smegmatis* wobec tych szczepów (próbki 1 *N* i 1 *A*).

Stwierdzono aktywność lityczną wobec *M. smegmatis* S.5 przesączów wyjściowych próbek wzbogacanych mieszaniną zawierającą ten szczep (próbka 1 *N*, 2 *N*, 3 *N* i 4 *N*), natomiast nie stwierdzono aktywności litycznej w analogicznych próbkach po sterylizacji (próbka 1 *A*, 2 *A*, 3 *A* i 4 *A*).

W próbkach wzbogacanych szczepami *M. phlei* aktywność lityczną wobec *M. phlei* stwierdzono jedynie w przesączach próbki wyjściowej (próbka 6 *N*), natomiast brak jej wystąpił w analogicznym przesączu próbki sterylizowanej (próbka 6 *A*).

Aktywność lityczną wobec szczepów *M. phlei* stwierdzono również w próbkach wzbogacanych szczepami *M. phlei* oraz niektórymi szczepami *M. smegmatis* (próbka 3 *N*, 4 *N* i 5 *N*), natomiast nie stwierdzono w analogicznych przesączach sterylizowanych (próbka 3 *A*, 4 *A* i 5 *A*).

Stwierdzono aktywność lityczną wobec *M. phlei* w przesączach wyjściowych próbek wzbogacanych 5 szczepami *M. smegmatis* (próbka 1 N), ale aktywność ta nie zaznaczyła się w analogicznych przesączach sterylizowanych (próbka 1 A).

Dane tabeli 5 wykazuje aktywność lityczną przesączów 2 próbek wzbogacanych szczepami *M. vaccae*, badanych wobec szczepów *M. vaccae* użytych do wzbogacania. Aktywność lityczna była obecna jedynie w przesączach próbek wyjściowych (próbka 7 N), natomiast brak jej było w analogicznych przesączach sterylizowanych (próbka 7 A).

Dane tabeli 6 wykazują aktywność lityczną przesączów próbek wzbogacanych szczepami *M. borstelense*, badanych wobec szczepów użytych do wzbogacania. Aktywność lityczną wobec *M. borstelense* stwierdzono w przesączach wyjściowych i sterylizowanych próbek, które były wzbogacane *M. borstelense* B.5 (próbki 8 N i 8 A, 10 N i 10 A).

Dane tabeli 7 wykazują aktywność przesączów próbek wyjściowych wzbogacanych szczepami należącymi do jednego gatunku sumuje się z aktywnością przesączów próbek wyjściowych tej samej ziemi wzbogacanej — w pierwszym doświadczeniu — mieszaniną 30 szczepów należących do 6 gatunków mykobakterii.

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono obecność bakteriofagów w przesączach wyjściowych i sterylizowanych próbek ziemi po ich wzbogacaniu szczepami mykobakterii. Jak wykazali Hauduroy i Tanner [5] nie jest możliwe stwierdzenie bakteriofagów aktywnych wobec mykobakterii w wyjałowionej ziemi. Bakteriofagi stwierdzone w wyjściowych próbkach lecz nieobecne w identycznie wzbogacanych próbkach sterylizowanych powinny być uznane za obecne w ziemi przed wzbogacaniem. Takimi były fagi stwierdzone w wyjściowych próbkach po monowalentnym wzbogacaniu szczepami *M. phlei* lub *M. vaccae*. Z drugiej strony, bakteriofagi stwierdzone w identycznie wzbogacanych wyjściowych i sterylizowanych próbkach (wzbogacanie szczepami *M. smegmatis* i *M. borstelense*) nie mogą być uznane za obecne w ziemi przed wzbogacaniem. Fagi te powinny być traktowane jako wprowadzone do próbki ze szczepem mykobakterii użytym do wzbogacania. W przypadku *M. borstelense*, szczep B.5 wprowadził fagi do próbki. W przypadku *M. smegmatis* nie można określić takiego, czy takich szczepów. Pomimo tego na podstawie aktywności wobec *M. smegmatis* (S.5) stwierdzonej jedynie w próbce wyjściowej, przypuszczamy, że ziemia zawierała również faga aktywnego wobec *M. smegmatis*.

Fagi stwierdzone zarówno w wyjściowych jak też sterylizowanych próbkach traktowanych identycznie są odpowiedzią na naszą wąpliwość zawartą w pierwszym doświadczeniu: pewne fagi znajdują się w próbkach ziemi na skutek wprowadzenia szczepów wzbogacających i to jest właśnie wyjaśnieniem niezwykłego podobieństwa wzorów fagowych w przesączach tych próbek. W ten sposób wprowadzone fagi jedynie na-

Tabela 7

Aktywność lityczna przesączów próbek ziemi po zróżnicowanym wzbogacaniu szczepami mykobakterii

Szczep	Próbka wyjściowa	Próbka wyjściowa	Próbka sterylizowana
	mieszane — 30 szczepów 6 gatunków	Jednorodne — 5 szczepów 1 gatunek	
<i>M. smegmatis</i>			
S.1	+	o	+
S.2	+	+	+
S.3	+	+	+
S.4	o	o	+
S.5	+	+	o
<i>M. phlei</i>			
P.1	+	+	o
P.2	+	+	o
P.3	+	+	o
P.4	+	o	o
P.5	+	o	o
<i>M. vaccae</i>			
V.1	+	+	o
V.2	+	+	o
V.3	+	+	o
V.4	+	+	o
V.5	+	+	o
<i>M. borstelense</i>			
B.1	+	+	+
B.2	+	+	+
B.3	+	+	+
B.4	o	o	o
B.5	o	o	o

mnażają się w obecności szczepów zawartych w ziemi lub na jednym z tych szczepów, które dodano do próbki w celu jej wzbogacenia. Wyjaśnienia obecności fagów w próbkach sterylizowanych widzimy jedynie w zjawisku lizogenii niektórych szczepów wzbogacających. Pierwszy naturalnie lizogeny szczep mykobakterii stwierdził już w 1953 r. Hnatko [6]. W naszym doświadczeniu za lizogenią szczepu *M. borstelense* B.5 przemawia fakt, że B.5 był jednym z dwóch szczepów niewrażliwych na działanie lityczne przesączów uzyskanych po wzbogacaniu szczepami zawierającymi B.5.

Nie przeprowadzono badania lizogenii u szczepów *M. borstelense*. Natomiast proste testy na lizogenię przeprowadzone ze szczepami *M. smegmatis* nie wykazały lizogenii u tych szczepów, co jednak w naszym doświadczeniu powinno to być wzięte pod uwagę.

Wobec tego proste testy na lizogenię, które stosowaliśmy, nie są wystarczające we wszystkich przypadkach, aby wykazać lizogenię badanych szczepów. Gdy jest to konieczne dla stwierdzenia ewentualnej lizogenii użytych szczepów (jak w badaniach nad izolacją nowych bakteriofagów z ziemi za pomocą techniki wzbogacania), wskazane są porównawcze badania z próbkami sterylizowanymi, które stanowią kontrolę badania.

LITERATURA

1. Fisk R. T.: J. Infect. Dis. 1942, 71, 153
2. Gardner G. M., Weiser R. S.: Proc. Soc. Exper. Biol. 1947, 66, 205
3. Gratia A.: Ann. Inst. Pasteur. 1936, 57, 652
4. Hauduroy P., Rosset W.: C. R. Acad. Sci. 1948, 227, 917
5. Hauduroy P., Tanner F.: Ann. Inst. Pasteur 1963, 104, 826
6. Hnatko S. I.: Cand. J. Med. Sci. 1953, 31, 462
7. Penso G., Ortali V.: Rend. Inst. Sup. di. Sanita 1949, 12, 903

J. Sivcev

SPURIOUS ISOLATIONS OF MYCOBACTERIOPHAGES FROM SOIL SAMPLES ASCRIBABLE TO LYSOGENY OF ENRICHMENT STRAINS

Summary

For isolation of mycobacteriophages 10 soil specimens were enriched with suspensions of 30 strains of rapid growing mycobacteria, simultaneously, and repeatedly.

Filtrates of soil specimens before enrichment showed no lytic activity for any of the strains used for enrichment. After enrichment filtrates of all samples showed lytic activity due to bacteriophages. Close similarity of lytic activity patterns of different samples raised suspicion that some lytic agents may be common to all of them, and that they samples with enrichment strains.

To check this, one of the soil samples was divided in 22 portions and 11 of them were autoclaved. Twenty enrichment strains were set on in 11 combinations, and each of them was added repeatedly to a native and an autoclaved portion of the sample. Comparing the activity of filtrates of native and autoclaved portions identically treated, it was established that this soil specimen contained some autochthonous mycobacteriophages, but also some mycobacteriophages were inoculated in the sample with the strains used for enrichment.

Tests of lysogenicity performed crosswise with strains of mycobacteria used for enrichment belonging to the same species, failed to show any lytic effect of surface culture and cell free filtrates of any strain tested on lawns of continuous growth of other strains. The results advocate use of parallel enrichment of an autoclaved part of each sample examined for mycobacteriophages, whenever the enrichment is performed with more than one strain of mycobacteria.