Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **14**[7] *71—75, 1967*

DEFEKTIV LYSOGENE BACILLUS ANTHRACIS-STÄMME

Von

G. IVÁNOVICS

Mikrobiologisches Institut (Direktor: G. IVÁNOVICS) *der Medizinischen Universität, Szeged*

(Eingegangen am 26 Oktober, 1966)

Zusammenfassung. Aus der in CO_2-Atmosphäre bereiteten Kultur eines mit einer virulenten Mutante des W-Phagen infizierten kapsulogenen *B. anthracis*-Stammes konnten defektiv lysogene Isolate gewonnen werden. Diese defektive Prophagen tragenden akapsulogenen Mutanten setzen Phagen nicht frei, und nur ihre Immunität W-Phagen gegenüber läßt auf ihre lysogene Natur schließen. Entgegen diesen defektiv lysogenen Stämmen adsorbiert das phagenresistente Isolat die homologen Phagen nicht. Aus den W-Phagen konnten temperierte und virulente Mutanten isoliert werden, die mit den defektiven Stämmen einen lysogenen Komplex bilden oder diese Zellen auflösen.

McCLOY [1] hatte 1951 aus dem einen lysogenen Stamm des *Bacillus cereus* einen temperierten Phagen isoliert, der verschiedene *Bacillus anthracis*-Stämme sehr spezifisch beeinflußte. Er nannte diesen Phagen und seine Mutanten W-Phagen. Mit diesem Phagen befassen sich zahlreiche Mitteilungen [2, 3, 4, 5, 6, 7,]. Den aus dem lysogenen *B. cereus*-Stamm freiwerdenden, temperierten Phagen bezeichnete McCLOY mit β, und seine Mutanten mit α und γ. Mit dem β-Phagen sind der atypische, asporogene Davis-Stamm des *B. anthracis* und die typischen Anthraxstämme gleichermaßen lysogenisierbar. McCLOY vermochte mit dem α-Phagen lysogene Bakterien nicht zu erhalten [2]. Unlängst hatte ich mitgeteilt, daß mitunter auch mit der α-Mutante mit typischen Anthraxstämmen lysogene Komplexe hergestellt werden konnten. Die mit dem Vollum-Stamm des *B. anthracis* gewonnenen α-lysogenen Komplexe haben sich als äußerst labil erwiesen, und der Prophag wird durch Kohlendioxyd induziert. Eine weitere Mutante des α-Phagen ist αC, mit der Bakterien nicht zu lysogenisieren waren [8].

Ich beobachtete, daß mit dem αC-Phagen unter entsprechenden Bedingungen Isolate zu erhalten sind, welche nicht nur gegen die α- und β-, sondern auch gegen die αC-Phagen immun sind. Obwohl die W-Phagen diese Isolate nicht angreifen, werden die Phagen doch ausgiebig adsorbiert, sie sind also nicht als resistent, sondern als immun zu betrachten. Diese immunen Stämme lassen aus ihrem Inneren keine infektiven Phagenteilchen freiwerden, so daß für die Immunität lediglich defektive Prophagen verantwortlich sein können.

Die vorliegende Mitteilung schildert die Isolierung der defektiv lysogenen *B. anthracis*-Stämme und einige ihrer Eigenschaften.

Material und Methoden

Zu den Versuchen wurden kapsulogene VC^+- und akapsulogene VC^--Varianten des Vollum-Stammes sowie der Davis-Stamm benutzt. Im Laufe früherer Arbeiten [7, 8] hatten wir das Derivat $VC^-/128$ isoliert, welches sich als eine dem W-Phagen gegenüber resistente Mutante des Vollum-Stammes erwies.

Über die benutzten W-Phagen gibt die vorangegangene Arbeit [8] Aufschluß. Die Phagen A_2 und A_3 sowie ihre Eigenschaften haben wir unlängst beschrieben [9], und die Mitglieder dieser beiden Phagengruppen unterschieden sich scharf von den W-Phagen.

Eine Beschreibung der Nährböden und der angewandten Methoden enthalten frühere Mitteilungen [7, 8].

Ergebnisse

Isolierung defektiv lysogener Stämme. Von dem VC^+-Sporenmaterial wurden auf 50% Pferdeserum enthaltendem YP-Agar diagonale Abimpfung vorgenommen und darüber kreuzweise mehrere parallele Linien mit einer αC-Phagenverdünnung von 10^{-4} gezogen. Die Kulturen wurden 96 Stunden in Thermostat in 25%iger CO_2-Atmosphäre inkubiert. Aus den stark mukoiden Kolonien gingen trockene Fortsätze hervor. Nur wurde an verschiedenen Stellen Sporenmaterial entnommen und das Probegemisch nach 5 Minuten Erwärmen bei 80°C in Davis-Indikator und auf Agarplatten ausgebreitet. Auf den mit Davis-Indikator bereiteten Platten kamen lysogene Klone nicht zur Beobachtung. Das Sporenmaterial lieferte akapsulogene Kolonien (in der Co_2-Atmosphäre), die sich gegenüber den αC-Phagen teils als resistent, und teils als empfindlich erwiesen. Die meisten der resistenten Kolonien trieben ungewöhnlich stark und schnell Sporen, wodurch die Kolonien porzellanweiße Farbe erhielten. Von diesen Kolonien wurden weitere Ausbreitungen hergestellt und von den in der Subkultur gefundenen Kolonien einige wieder auf ihre Phagenempfindlichkeit geprüft. Die aus den resistenten Kolonien bereiteten zweiten Subkulturen segregierten schon keine phagenempfindlichen Kolonien mehr. Auf solche stabilen Isolate beziehen sich unsere Beobachtungen.

Die Eigenschaften der phagenresistenten Isolate. In zwei gesonderten Versuchen wurden 14 resistente Isolate untersucht. Bei der Ausbreitung des Sporenmaterials dieser Isolate auf 10^4/ml αC-Phagenteilchen enthaltende Agarplatten wurde die gleiche Zahl von Kolonien gefunden wie im Falle der phagenfreien Kontrollplatten. Somit schienen die Isolate homogen zu sein.

Die Morphologie der Kolonien der phagenunempfindlichen Isolate unterschied sich von der des parenten Stammes, sie waren etwas kleiner und unregelmäßiger als die VC^--Kolonien. In zahlreichen Versuchen trachteten wir unter verschiedenen Bedingungen Phagen aus den Isolaten nachzuweisen. Im Falle der mit dem Davis-Stamm hergestellten gemischten Kulturen gelang dies auch dann nicht, wenn vorher die resistenten Stämme verschieden lange Zeit mit UV-Licht bestrahlt oder mit Mitomycin-C behandelt worden waren. Trotz ihrer Resistenz gegen W-Phagen haben sie diese Phagen ausgiebig adsor-

biert, während von dem früher isolierten resistenten Derivat *VC*⁻/128 W-Phagen überhaupt nicht gebunden wurden. Der allen W-Phagen gegenüber resistente Stamm erwies sich den heterologen A_2- und A_3-Phagen gegenüber als empfindlich. Dies demonstrieren die »e. o. p.« (efficiency of plating)-Werte (s. Tabelle I).

Tabelle I

Der e. o. p.-Wert des homogenen αC- und der heterologen A_2- und A_3-Phagen im Falle des nicht lysogenen, des defektiv lysogenen (dl) und des resistenten (VC⁻/128) Stammes, sowie die Adsorption des αC-Phagen

Stamm	E. o. p.-Werte mit verschiedenen Phagen			Adsorption des αC-Phagen %
	αC	A_2	A_3	
Davis	1,0	1,0	1,0	96
VC⁻	0,8	0,7	1,0	95
5*VC*⁻ *dl*	10^{-5}	1,0	1,0	92
6a*VC*⁻ *dl*	10^{-5}	1,0	1,0	92
6b*VC*⁻ *dl*	10^{-5}	1,0	1,0	90
7*VC*⁻ *dl*	10^{-6}	1,0	1,0	74
8*VC*⁻ *dl*	10^{-5}	1,0	1,0	88
9*VC*⁻ *dl*	10^{-7}	1,0	1,0	82
10*VC*⁻ *dl*	10^{-6}	1,0	1,0	87
11*VC*⁻ *dl*	10^{-6}	1,0	1,0	85
VC⁻/128	$<10^{-7}$	1,0	1,0	0,0

Auf Grund der verschiedenen Evidenzien ist der *VC*⁻/128-Stamm als »echter resistenter« Stamm zu betrachten, während die übrigen immun für den homologen Phagen sind. Da es nicht gelang, aus unseren Stämmen infektionsfähige Phagen zu isolieren, sind die Stämme als defektive Lysogene zu werten. Deshalb nehmen wir im weiteren und in Tabelle I hierauf mit der Bezeichnung *dl* Bezug. Die Ziffern bedeuten die einzelnen Isolate.

Ein Teil der *dl*-Stämme lieferte für das αC-Phagenmaterial Plaques mit sehr niedrigen e. o. p.-Werten. Durch Propagieren der aus den Plaques erhaltenen Phagen auf seinem eigenen defektiv-lysogenen Stamm oder auf dem Davis-Stamm ließ uns zu einem Phagenmaterial gelangen, dessen e. o. p.-Wert dem der nicht lysogenen und *dl*-Stämme analog war. Das heißt, hier hatten wir Phagenmutanten vor uns, die auf nicht lysogenen und defekt-lysogenen Stämmen gleichermaßen gut gediehen. Gleichzeitig blieb der *VC*⁻/128-Stamm auch für diese Phagen resistent. Demnach verleiht der defektive Prophage dieser Mutante gegenüber, die wir im weiteren h-Mutante nennen, keine Immunität.

Auch die β-Mutanten des W-Phagen bildeten auf den *dl*-Isolaten Plaques mit sehr niedrigen e. o. p.-Werten. Einen aus dem Stamm 5VC$^-$ *dl* gewonnenen Phagen haben wir aus einem Plaque in Davis-Stamm propagiert und sein Wirkungsspektrum auf Grund der e. o. p.-Werte kontrolliert.

Tabelle II

E. o. p.-Werte des β-Phagen und seiner auf dem Stamm 5VC$^-$dl erhaltenen Mutante (βh) bei den Stämmen VC$^-$ und 5VC$^-$dl

Phag	E. o. p.-Werte bei den Stämmen	
	VC$^-$	5VC$^-$dl
β	1,0	10^{-5}
βh	1,0	1,0

Wie ersichtlich, konnte auch aus β-Phagen eine *h*-Mutante isoliert werden, welche sich für den ursprünglichen Stamm und die *dl*-defektiv lysogenen Stämme als gleichermaßen wirksam erwies.

Mit dem βh-Phagenmaterial konnten sowohl der originale VC$^-$-Stamm als auch die *dl*-Stämme lysogenisiert werden. Der mit βh-Prophagen aus dem lysogenen VC$^-$*dl* (βh)-Stamm freigewordene Phage stimmte hinsichtlich seiner Antigenstruktur mit dem β- und dem αC-Phagen überein.

Besprechung

Auf Grund der Studien von Buck und Mitarbeitern [10] wissen wir, daß sich unter den in der Natur vorkommenden *B. anthracis*-Stämmen auch lysogene befinden können. Aus 25 der zahlreichen Laboratorien entstammenden 139 Sammelstämme vermochten sie Phagen zu isolieren. Mit diesen Phagen sowie mit dem γ-Phagen unternahmen sie den Versuch einer Typisierung von 246 verschiedenen *B. anthracis*-Stämmen. Ein Teil derselben erwies sich als resistent gegenüber allen oder einzelnen Test-Phagen. Die Bemühungen, aus einigen solchen resistenten Stämmen Phagen zu isolieren, blieben jedoch erfolglos.

Unsere Beobachtungen deuten darauf hin, daß im Falle des *B. anthracis* nicht nur mit typischen lysogenen Stämmen, sondern auch mit solchen gerechnet werden muß, die Träger defektiver Prophagen sind. Gegenüber seinen homologen Phagen sichert auch der defektive Prophag eine Immunität [11]. Zahlreiche Mitteilungen [1, 5, 10, 12, 13] berichten darüber, daß sich unter den *B. anthracis*-Stämmen auch verschiedenen Phagen gegenüber resistente befin-

den können. Wie wir sahen, ist im Falle einer Resistenz gegen die Phagen mit zwei Mechanismen zu rechnen: (1) mit dem Fehlen des Rezeptors, welches ein Analogen zu der beim T-Phagen-Sytem erkannten Resistenz ist, und (2) mit der seitens des Prophagen gebotenen Immunität. Der Umstand, daß die *B. anthracis*-Stämme auch defektive Prophagen tragen können und daher in ihren Kulturen infektive Teilchen nicht nachweisbar sind, macht es nötig, daß zwecks Ermittlung der beiden möglichen Mechanismen mit den resistenten Stämmen auch Untersuchungen bezüglich der Phagenadsorption angestellt werden.

LITERATUR

1. McCloy, E. W.: J. Hyg. (Lond.) **49,** 114 (1951).
2. McCloy, E. W.: J. gen. Microbiol. **18,** 189 (1958).
3. Meynell, E. W.: J. gen. Microbiol. **28,** 103 (1962).
4. Cineu, M., Stamatin, N., Zilisteanu, E., Nafta, J., Anghelesco, S.: Arch. roum. Path. exp. **18,** 169 (1959).
5. Stamatin, N., Anghelesco, S.: Arch. roum. Path. exp. **20,** 357 (1961).
6. Stamatin, N.: Ann. Inst. Pasteur, **105,** 515 (1963).
7. Ivánovics, G., Lantos, J.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **9,** 237 (1962).
8. Ivánovics, G.: J. gen. Microbiol. **28,** 87 (1962).
9. Lantos, J., Varga, I., Ivánovics, G.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **7,** 31 (1960).
10. Buck, C. A., Anacker, R. L., Newman, F. S., Eisenstark, A.: J. Bact. **85,** 1423 (1963).
11. Lwoff, A.: Bact. Rev. **17,** 269 (1958).
12. Brown, E. R., Cherry, W. B.: J. infect. Dis. **96,** 34 (1955).
13. Ivánovics, G., Földes, J.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **5,** 89 (1958).

Anschrift des Verfassers:

György Ivánovics

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Beloianisz tér 10, Szeged, Ungarn