

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XV. 19

SECTIO D

1960

---

Z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej  
w Lublinie  
i z Zakładu Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie  
Kierownik: prof. dr Józef Parnas

Józef PARNAS i Elżbieta KOTLIŃSKA

**Dalsze badania nad metabolizmem i zmiennością *Brucella brucei*  
wysoko oporną na działanie streptomycyny**

**Дальнейшие исследования по метаболизму и изменчивости штаммов  
*Brucella brucei* устойчивых в значительной степени к стрептомицину**

**Further Studies on the Metabolism and Variability of *Brucella brucei*  
Strains Highly Resistant to Streptomycin**

W r. 1959 prowadzone były u nas badania nad zmiennością metabolizmu pałeczek *Brucella* opornych na aureomycynę 1000 gamma/ml i streptomycynę 10000 gamma/ml. (J. Parnas, L. Łysikowska, T. Kuzieła). Ustalono, iż różnice między szczepami wyjściowymi i opornymi na antybiotyki dotyczą głównie aktywności enzymatycznej. Szczepy odporne na aureomycynę i streptomycynę rozkładały mocznik szybciej niż szczepy macierzyste — wrażliwe. Otrzymane wyniki, dotyczące aktywności katalazy wykazują podobne różnice. Proces redukcji nadtlenu wodoru przebiegał u szczepów opornych energiczniej niż u wyjściowych.

Wyniki dotyczące wytwarzania siarkowodoru wykazały, że brucele odporne na streptomycynę wytwarzały siarkowodór krócej, lecz intensywniej niż szczepy wyjściowe; u aureomycynoopornych nie zauważono tego.

Doświadczenia z zakresu bakteriostatycznego działania innych antybiotyków i barwników anilinowych ujawniły nieznaczne różnice między szczepami wyjściowymi a ich wariantami opornymi na streptomycynę i aureomycynę. Szczególną uwagę zwraca fakt całkowitej lub częściowej utraty wrażliwości na terramycynę wśród szczepów aureomycynoopornych. Zauważono też, że szczepy lepiej rosły na agarze z dodatkiem tioniny niż szczepy wyjściowe. Analiza serologiczna szczepów opornych i wyjściowych nie wykazała istotnych różnic. Pasażowanie szczepów opornych na streptomycynę na podłożu bez tego antybiotyku, pozwoliło stwierdzić trwałość tej cechy. Oporność na streptomycynę okazała się cechą jakby genotypową, w przeciwieństwie do aureomycynooporności, która ma charakter przejściowy (fenotypowy).

## BADANIA WŁASNE

Celem naszej pracy było otrzymanie szczepów *Brucella brucei* opornych na stężenie 40000 gamma streptomycyny w 1 ml agaru i badanie zmian ich własności w stosunku do szczepów wyjściowych.

## Materiał badań

Przedmiotem badań były szczepy muzealne np. 13, 22, 43, 44, 53, 60, 68, S 19, BA oraz 3 szczepy wzorcowe odmiany: *bovis* 544/24, *suís* 1330, *melitensis* M 16.

## Metodyka badań

Przed rozpoczęciem doświadczeń wszystkie szczepy doprowadzone zostały do czystej fazy „S”.

I etap polegał na otrzymaniu szczepów opornych na 40000 gamma streptomycyny w 1 ml agaru metodą gradientową Szybalskiego. Po 54 pasażach otrzymano brucele o oporności 40.000 razy większej od wyjściowej.

II etap pracy polegał na badaniu własności uzyskanych szczepów opornych w porównaniu z wyjściowymi. W tym celu przeprowadzono następujące próby:

- a) biochemiczne: rozkład mocznika, wytwarzanie siarkowodoru, aktywność katalazy,
- b) bakteriostatyczne: wzrost na fuksynie i tioninie, wpływ preparatu DEDTC, zachowanie się wobec 6 antybiotyków,
- c) działania fagów,
- d) serologiczne.

## Badania biochemiczne

a) Próba na ureazę. Do oznaczenia użyto podłoża o następującym składzie: 4% mocznika, 4,8%  $\text{NaHPO}_4$ , 1,8%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20% wyciągu drożdżowego, 2 mg% czerwieni fenolowej. Odczynniki te uzupełniono do objętości 1 l wodą destylowaną, pH ustalono na 6,8. Uzyskany roztwór przesączono przez filtr Berkefelda. Do probówek aglutynacyjnych wprowadzono po 1 ml pożywki i dodawano 1 ml zawiesiny 48-godzinnej hodowli pałeczek *Brucella* o gęstości 5 mlrd komórek/ml. Alkalinizacja środowiska w procesie rozkładu mocznika powodowała zmianę barwy podłoża z pomarańczowej na różową. W tym momencie notowano czas, jaki upłynął od chwili rozpoczęcia obserwacji.

b) Wytwarzanie siarkowodoru. Badane szczepy wysiewano na agarze skośnym Brauna o pH 7,2—7,4. W każdej probówce umieszczano między ścianką przeciwną do podłoża a korkiem pasek bibuły filtracyjnej (o wymiarach  $0,5 \times 6$  cm), nasyconej 10% roztworem octanu ołowiu. Hodowlę wstawiano do termostatu na okres 7 dni. Co 24 godziny zmieniano paski i mierzono powstałe zacierwienie.

c) Aktywność katalazy. 48-godzinna hodowlę na agarze skośnym splukiwano 0,05% roztworem tryptoz-peptonu w 0,5%  $\text{NaCl}$ . Roztwór ten jał-

wiono w autoklawie i sączono przez filtr Seitza. pH ustalano na 6,8—7,0. Gęstość zawiesiny bakteryjnej, użytej do oznaczenia wynosiła 1,5 mlrd/ml. Do kolb Erlenmayera wprowadzano 5 ml tak wystandaryzowanego materiału i dodawano 15 ml ochłodzonego do +5°C 1/15 n H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (63 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 1000 ml trypto-żo-peptonu). Kolbę zawierającą próbę poddawano wytrząsaniu w ciągu 30 min. Po 5, 15 i 30 min. pobierano 5 ml mieszaniny i dodawano 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> celem zahamowania działania katalazy. Ubytek wody utlenionej oznaczano przez miareczkowanie 0,1 n KMnO<sub>4</sub> do lekko różowego zabarwienia.

### Badania bakteriostatyczne

a) Wzrost na fuksynie zasadowej i tioninie (wg Cruickshanka w modyfikacji Chodkowskiego). Na dnie jałowych płytek Petriego układano równolegle 2 paski bibuły filtracyjnej o szer. 5 mm. Jeden nasycony był roztworem tioniny (rozcieńżonej 1:1000), drugi roztworem fuksyny zasadowej (rozcieńżonej 1:400). Odległość między paskami wynosiła 6 cm. Następnie do płytek tych wlewano pożywkę agarową o pH 6,6—6,8 z dodatkiem 1% glukozy i 5% inaktywowanej surowicy końskiej. Na tak przygotowanym podłożu wysiewano prostopadle do pasków 5 szczepów: 3 wzorcowe M 16, 1330, 544 oraz 2 badane: wyjściowy i pochodzący od niego oporny na streptomycynę. Do posiewów używano 48 godzinnej hodowli, zawieszanej w płynie fizjologicznym i rozcieńżonej do gęstości 5 milionów/ml. Wyniki odczytywano po 3—5 dniach inkubacji w temp. 37°C.

b) Oznaczanie wrażliwości na penicylinę, streptomycynę, chloromycetynę, aureomycynę, terramycynę i erytromycynę. Płytki zawierające 0,5 cm warstwę agaru Brauna zasiewano zawiesiną pałeczek *Brucella* o gęstości 300 milionów komórek w 1 ml. Na zakażone podłoże po 30-minutowym suszeniu w termostacie zakładano rozetki z bibuły filtracyjnej o ramionach zakończonych krążkami, które były oznaczone i nasycone roztworami antybiotyków. Po 3 dobach inkubacji oznaczano stopień wrażliwości na podstawie długości promienia strefy zahamowania mierzonej w milimetrach.

c) Wpływ hamujący preparatu DEDTC. Badania przeprowadzone były na płytkach Petriego, zawierających podłoże agarowe o pH 7,2—7,4. Do posiewu używano 48-godzinnej hodowli na agarze skończym spłukanej 4 ml płynu fizjologicznego. Przed posiewem poddawano płytki suszeniu w termostacie w ciągu 3 godzin. Następnie wylewano na nie zawiesiny, odciągając nadmiar materiału pipetą. Zakażone płytki wstawiano do cieplarki na godzinę. Po upływie tego czasu umieszczano w nich jałowe krążki bibuły, nasyconej 1% roztworem preparatu DEDTC wg Renoux. Wyniki odczytywano po upływie 72 godzin inkubacji w temp. 37°C.

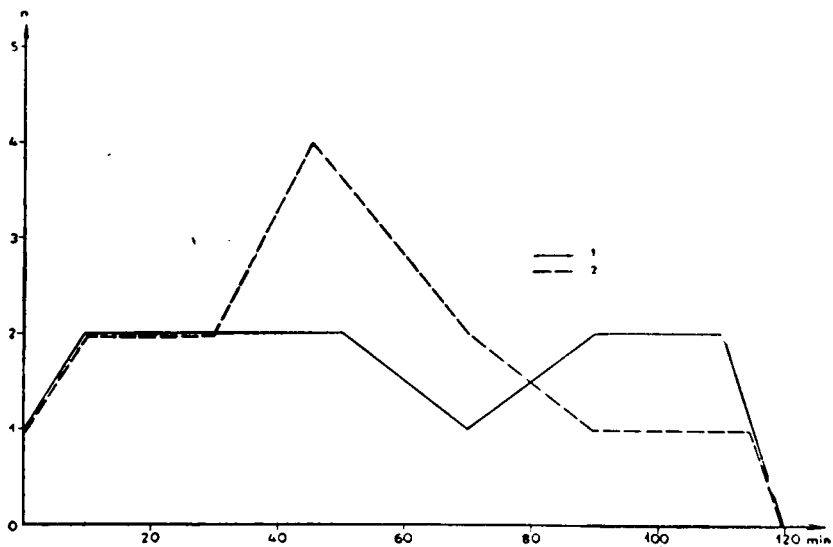
### Badania fagowe

Badanie działania bakteriofaga *anti-Brucella* przeprowadzono wg u nas stosowanej metody. Jedną kroplę zawiesiny 48-godzinnej hodowli po wymieszaniu z 3 kroplami zawiesiny faga wysiewano eżą na 1,4% agarze Brauna o pH 7,2—7,4. Do badań szczepów opornych stosowano również podłoże streptomycynowe. W doświadczeniu używano faga nr 9.

### WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań aktywności ureazy przedstawione są w tab. 1 i na ryc. 1. Dane te wskazują, że 42% szczepów opornych na streptomycynę

40000 gamma/ml wykazuje wyższą aktywność ureazy w porównaniu ze szczepami wyjściowymi. Każdą próbę wykonano dla kontroli 3-krotnie, po czym obliczano średnią. Ryc. 1 opracowano wg metody statystycznej szeregu rozdzielczego.

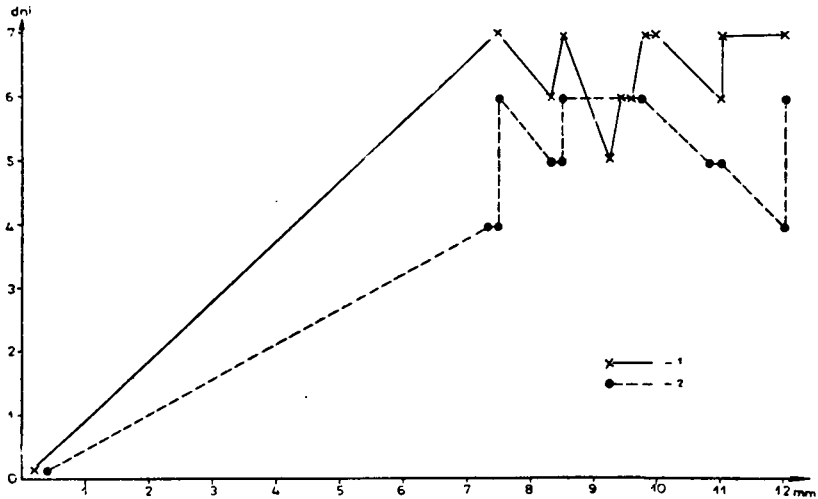


Ryc. 1. Wykres aktywności ureazy; 1 — szczepy wyjściowe, 2 — szczepy oporne, n — ilość szczepów zachowujących się w pewnych granicach podobnie, t — czas. Graph showing the activity of urease; 1 — initial strains, 2 — resistant strains, n — number of strains whose behaviour within certain limits is similar, t — time

Tab. 1. Aktywność ureazy  
The activity of urease

Nr szczepu wyjściowego	Czas rozkładu mocznika w min.	Nr szczepu opornego	Czas rozkładu mocznika w min.
13	37	13,40 mg	42
22	29	22/40 mg	21
43	54	43/40 mg	59
44	62	44/40 mg	48
53	45	53,40 mg	46
60	106	60/40 mg	91
68	101	68/40 mg	115
S19	15	S19/40 mg	19
M16	89	M16/40 mg	59
1330	4	1330/40 mg	12
544/24	0	544/24/40mg	0
BA	80	BA/40 mg	76

Wytwarzanie  $H_2S$ . W badaniu tym zauważono, że szczepy odporne wytwarzają siarkowodor w czasie krótszym i mniej intensywnie niż szczepy wyjściowe. Wyniki badań przedstawiliśmy na ryc. 2, na której oznaczono czas wytwarzania  $H_2S$  (w dniach) i intensywność (w mm zaczernienia paska bibuły).



Ryc. 2. Wykres zależności między czasem a intensywnością wytwarzania  $H_2S$ ; 1 — szczepy wyjściowe, 2 — szczepy odporne.

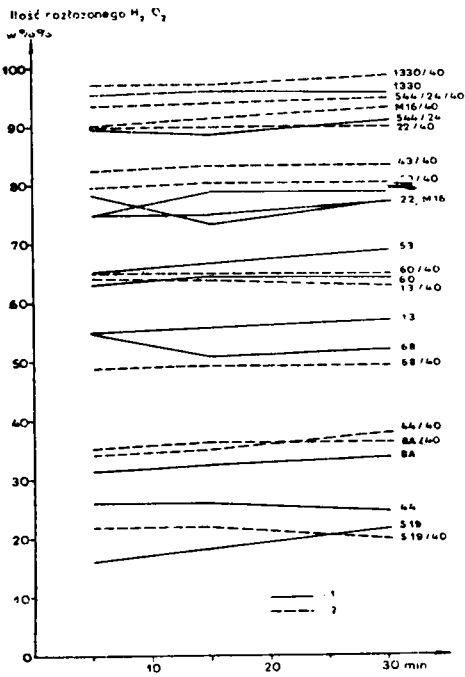
Graph showing the correlation between the time and the intensity of the formation of  $H_2S$ ; 1 — initial strains, 2 — resistant strains

Aktywność katalazy. Wyniki doświadczenia zamieszczono na ryc. 3 i 4. Szczepy streptomycynoporne wykazują wyższą aktywność katalazy w porównaniu ze szczepami wyjściowymi.

Działanie bakteriostatyczne barwników anilinowych (fuksyny i tioniny). Nie stwierdzono w tych próbach żadnych różnic między szczepami wyjściowymi i opornymi na działanie streptomycyny. To samo dotyczy analizy serologicznej.

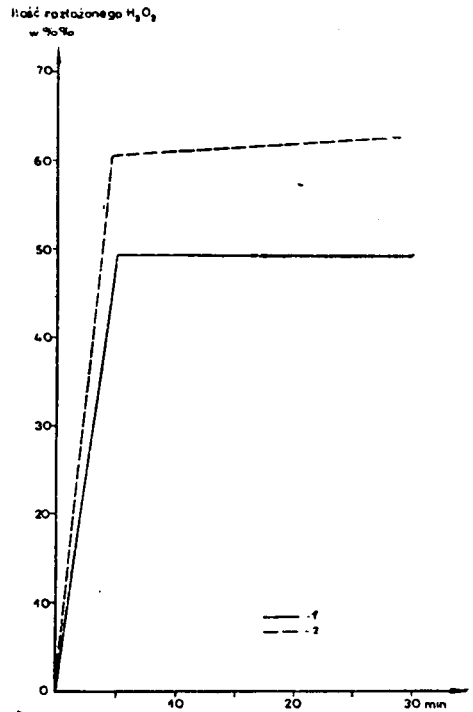
Wrażliwość na inne antybiotyki. Zauważono zmniejszenie wrażliwości szczepów streptomycynopornych na działanie chloromycetyny. W działaniu pozostałych antybiotyków nie było istotnych zmian.

Badanie fagowe. Wyłoniły się tu 3 grupy szczepów, różniące się wrażliwością na działanie faga (tab. 2). 1) szczepy wyjściowe i pochodzące od nich streptomycynoporne wrażliwe na działanie faga, 2) szczepy wyjściowe i odporne-wrażliwe na działanie faga, 3) szczepy wyjściowe-niewrażliwe i odporne na działanie faga.



Ryc. 3. Wykres aktywności katalazy; 1 — szczepy wyjściowe, 2 — szczepy odporne, t — czas.

Graph showing the activity of catalase

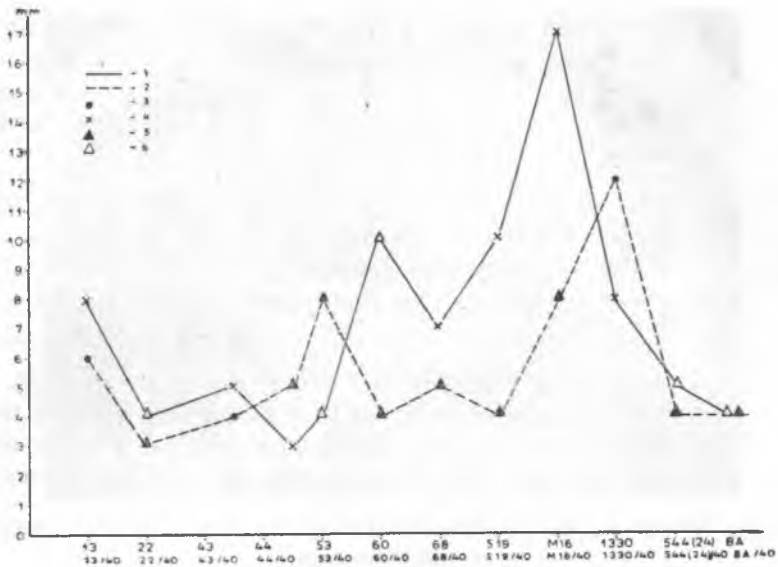


Ryc. 4. Wykres aktywności katalazy; 1 — średnia szczepów wyjściowych, 2 — średnia szczepów opornych.

Graph showing the activity of catalase

Tab. 2. Wyniki badania działania bakteriofaga *anti-Brucella*

Grupa	Nr szczepu wyjściowego	Działanie faga	Nr szczepu opornego	Działanie faga na podłożu zwykłym	Działanie faga na podłożu streptomycyny
I	M 16 544/24	— —	M 16 544/24/40	— —	— —
II	53 BA	+ +	53/40 BA/40	+ +	+ +
III	13	—	13/40	+	+
	22	--	22/40	+	+
	43	—	43/40	+	+
	44	—	44/40	+	+
	60	—	60/40	+	+
	68	—	68/40	+	+
	S 19	—	S19/40	+	+
	1330	—	1330/40	+	+



Ryc. 5. Wykres działania preparatu DEDTC, 1 — szczepy wyjściowe, 2 — szczepy odporne, 3 — zona pojedyncza szczep odporny, 4 — zona pojedyncza szczep wyjściowy, 5 — zona podwójna szczep odporny, 6 — zona podwójna szczep wyjściowy.

Graph showing the action of DEDTC.



Ryc. 6. Po lewej stronie silne działanie faga. Szczep 53/40 odporny na 40 000 streptomycyny. Po prawej stronie ten sam szczep wyjściowy nr 53, bardzo słabo wrażliwy na działanie faga.

To the left: strong action of the phage. Strain 53/40 resistant to 40 000 of streptomycin. To the right: the same initial strain No. 53 showing very weak sensitivity to the action of the phage.



Ryc. 7. Szcepek wyjściowy *Brucella brucei* BA bardzo silnie wrażliwy na działanie faga.

Initial strain *Brucella brucei* BA highly sensitive to action of the phage.

Do pierwszej grupy należały dwa szczepy wyjściowe i ich warianty odporne na streptomycynę: *bovis* 544/24; 544/24/40 mg oraz *melitensis* M 16; M 16/40 mg. Drugą grupę stanowiły również dwa szczepy *bovis* BA; BA/40 mg *bovis* 53; 53/40 mg. Najliczniejsza była grupa trzecia obejmująca 8 szczepów muzealnych, u których nie stwierdzono litycznego działania faga oraz 8 pochodzących od nich szczepów streptomycynoopornych, wrażliwych na faga.

Wrażliwość na preparat DEDTC wg Renoux. Badanie dało wyniki ciekawe, przedstawione na ryc. 5. Jak widać szczepy odporne na streptomycynę odznaczają się mniejszą wrażliwością na DEDTC od szczepów wyjściowych.

#### WNIOSKI

1. Przy pomocy metody Szybalskiego uzyskano 12 szczepów *Brucella brucei* opornych na 40.000 gamma streptomycyny. W badaniu poprzednim używaliśmy szczepów *Brucella* opornych na 10.000 gamma streptomycyny i  $\pm$  1000 gamma aureomycyny.

2. Szczepy odporne na 40.000 gamma w porównaniu z szczepami wyjściowymi wykazały w naszym doświadczeniu następujące zmiany w ich właściwości:

a. Aktywność ureazy u 42% badanych szczepów streptomycynoopornych była wyższa, zaś u reszty szczepów prawie taka sama jak u szczepów wyjściowych (ryc. 1).



b. Aktywność katalazy była większa u szczepów opornych na streptomycynę aniżeli u szczepów wyjściowych (ryc. 3 i 4).

c. Aktywność  $H_2S$  była krótsza u szczepów streptomycynoopornych. Niektóre z nich wykazywały większą intensywność zaczernienia bibuły (ryc. 2).

d. Wrażliwość na fuksynę, tioninę i preparat DEDTC: nie stwierdzono istotnych różnic we wrażliwości na tioninę i fuksynę szczepów opornych i wyjściowych, natomiast wyraźnie zaznaczyła się zmniejszona wrażliwość na działanie preparatu DEDTC.

e. Zmiana wrażliwości na lityczne działanie faga *anti-Brucella*: szczepy streptomycynooporne wykazały większą wrażliwość na lityczne działanie faga aniżeli szczepy wyjściowe. 8 szczepów niewrażliwych na działanie faga wykazało dużą wrażliwość po uzyskaniu streptomycynooporności (tab. 2, ryc. 6 i 7).

---

#### P I S M I E N N I C T W O

1. Artman M., Markenson J.: Studies on serine and threonine desaminases of *E. coli* and the action of dihydrostreptomycin therapeutic. *Israel* 1, 9—15, 1958.
  2. Bladergroen W.: Wstęp do energetyki i kinetyki procesów biologicznych. P.W.N. Warszawa 1957, 198—286.
  3. Chodkowski A., Parnas J., Hryniewicz H.: Badania nad szczepami pałeczek *Brucella* występującymi w Polsce. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. DD*, 10, 1—55, 1955.
  4. Dobrzański Wl.: Aktualne poglądy na pochodzenie bakterii opornych na antybiotyki. *Postępy Hig. i Med. Dośw.* 12, 677—695, 1959.
  5. Frankas-Himsley H.: Metabolic studies of streptomycin sensitive, resistant and dependent *Vibrio comma* (type Ogawa). *Bull. Res. Council of Israel*, 6 E, 1957.
  6. Huddleson F.: *Brucellosis in men and animals*. New York, The Commonwealth Fund, 38—62, 1943.
  7. Olitzki A. L., Olitzki Z.: Quantitative determination of streptomycin in organs after subcutaneous and intraperitoneal injections with the aid of a streptomycin-dependent *Vibrio comma*. *Bull. Res. Council of Israel*. 7 E, 171—174, 1958.
  8. Parnas J., Tuszkiewicz A. R.: *Bruceloza*. Monografia PZWL, 1956, 54—60.
  9. Parnas J., Łysikowska L., Kuzieła T.: Badania nad zmiennością metabolizmu i wirulencji szczepów *Brucelli* streptomycyno- i aureomycynoopornych. *Zbl. Bakter Oryg.*, 1960 (w druku).
  10. Szybalski W., Bryson V.: Cross-resistance of *E. coli* to filter antibiotics. *J. Bacter.*, 64, 489—499, 1952.
  11. Wundt W.: Die Typenbestimmung von Brucellen und ihre Bedeutung für die Systematik des Genus *Brucella*. *Zeitschr. Hyg. Infekt.*, 145, 235—251, 1958.
-

## Р Е З Ю М Е

У 9-и штаммов *Brucella brucei* и 3-х штаммов т.е. *B. bovis*, *B. suis* и *B. melitensis* авторам, при применении метода градиентов Ш и б а л ь с к о г о, удалось вызвать устойчивость к 40.000 гамма стрептомицина. Далее авторами были обследованы особенности, приобретенные устойчивыми к стрептомицину штаммами, по сравнению с исходным, путем определения уреазы, каталазы,  $H_2S$ , чувствительности к фуксину, тионину и препарату DEDTC, а также восприимчивость к литическому воздействию фага anti *Brucella*. Штаммы устойчивые к стрептомицину обладают высшей активностью уреазы (у 42% штаммов) и каталазы, более короткой активностью  $H_2S$ , затем сниженной чувствительностью к действию препарата DEDTC и повышенной чувствительностью к литическому воздействию фага.

Табл. 1. Активность уреазы.

Табл. 2. Результаты исследования по действию бактериофага anti *Brucella*.

Рис. 1. Кривая активности уреазы.

Рис. 2. Кривая зависимости между промежутком времени а интенсивностью образования  $H_2S$ .

Рис. 3. Кривая активности каталазы.

Рис. 4. Кривая активности каталазы DEDTC.

Рис. 5. Кривая действия препарата.

Рис. 6. Слева сильное воздействие бактериофага. Штамм 53/40 устойчивый к 40.000 гамма стрептомицина. Справа этот же исходный штамм № 53 в ничтожной степени чувствительный к воздействию фага.

Рис. 7. Исходный штамм *Brucella brucei* BA в очень значительной степени чувствительный к воздействию фага.

## S U M M A R Y

9 museum strains of *Brucella brucei* and 3 standard strains (*bovis*, *suis* and *melitensis*) were transformed by the gradient method of S z y b a l s k i into strains resistant to 40 000 gamma of streptomycin. The properties of these resistant strains were compared with those of the initial strains; the authors determined urease, catalase,  $H_2S$ , sensitivity to fuchsin, thionine and the preparation DEDTC as well as sensitivity to the lytic action of the anti-*Brucella* phage. Strains which are resistant to streptomycin show a higher activity of urease (42 per cent of strains) and catalase, a shorter activity of  $H_2S$ , a decreased sensitivity to the action of DEDTC and a greater sensitivity to the lytic action of the phage.