

5. ALFREDO ZAMPIERI. — Concentrazione numerica del *Phagus pellegrini* (P. e O., 1948) nelle placche litiche su agar-patina.

Riassunto. — L'A. studia la concentrazione numerica del *Phagus pellegrini* (P. e O., 1948) nelle placche litiche su agar-patina e constata come tale fago raggiunga la sua massima concentrazione in quinta giornata, allorchè il diametro delle placche stesse è di 3 mm. Dopo la quinta giornata, il numero dei fagi diminuisce progressivamente — malgrado il diametro della placca raggiunga 1-2 cm — sino a toccare il suo minimo in trentesima giornata.

Résumé. — L'A. étudie la concentration numérique du *Phagus pellegrini* (P. et O., 1948) dans les taches lytiques sur agar-patine et constate que ce phage atteint sa concentration maxima le cinquième jour, lorsque le diamètre des taches est de 3 mm. Après le cinquième jour, le nombre des phages diminue progressivement — bien que le diamètre de la tache atteigne 1-2 cm — jusqu'à présenter son minimum au cours de la trentième journée.

Summary. — The author has studied the numerical concentration of *Phagus pellegrini* (P. e O. 1948) in lytic plaques on agar films. He has found that this phage reaches its highest concentrations on the fifth day, with plaque diameters of 3 mm. After the fifth day, the number of the phage particles diminishes progressively though the plaque diameters reach 1-2 cm; it reaches the minimum on the thirtieth day.

Zusammenfassung. — Der V. beobachtet die numerische Konzentration des *Phagus pellegrini* (P. und O., 1948) in den lytischen Flecken (Plaques) auf Agar-Belag und stellt fest, dass dieser Phagus am 5ten Tage seine maximale Konzentration erreicht, wenn der Durchmesser der Plaques 3 mm beträgt. Nach dem 5ten Tage nimmt die Zahl der Phagen fortschreitend ab — trotzdem der Durchmesser der Plaques 1-2 cm erreicht — bis sie am 30ten Tage ihr Maximum berührt.

La tecnica più semplice per ottenere una buona concentrazione di batteriofago è quella di coltivare il fago su terreno liquido in presenza del ceppo omologo.

In determinate condizioni, con ceppi o specie microbiche che hanno tendenza a dare ammassi o pellicole, o a crescere soltanto in superficie

(fasi R. micobatteri e simili), è difficile ottenere una moltiplicazione del fago stesso.

In questi casi occorre preparare le emulsioni fagiche partendo dalle aree di lisi che si ottengono sul ceppo ospite coltivato in terreno solido con la tecnica dell'agar-germi o con quella dell'agar-patina.

L'agar-germi viene usato soltanto di rado, e ciò perchè l'agar, come la gelatina, inibisce l'attività del fago come i lavori di Doerr e Berger (1923), Brutsaert (1924), Hauduroy (1924), Nakamura (1936), hanno dimostrato. Per lo più l'agar-germi si adopera nel caso in cui il germe seminato in superficie non dà patine omogenee.

Con il metodo dell'agar-patina si ottengono risultati molto più netti anche se, in tali condizioni, la concentrazione del fago è notevolmente inferiore a quella che si ottiene su terreni liquidi.

Trovandomi di fronte al problema di dover preparare notevoli quantitativi di batteriofago su terreno solido, ho voluto studiare in quale momento della cultura si dovesse filtrare l'agar onde ottenere la massima concentrazione di fagi per cm³. Occorreva perciò stabilire in quale momento della sua esistenza una placca fagica presentasse il maggior numero di fagi.

TABELLA I

TEMPO DI CRESCITA (in giorni)	NUMERO FAGI PER PLACCA	TEMPO DI CRESCITA (in giorni)	NUMERO FAGI PER PLACCA
1	370.000/400.000	16	38.000/40.000
2	590.000/600.000	17	36.000/62.000
3	2.600.000/3.000.000	18	38.000/40.000
4	6.800.000/7.100.000	19	30.000/36.000
5	23.000.000/27.000.000	20	17.000/21.000
6	10.000.000/12.000.000	21	15.000/19.000
7	6.000.000/6.600.000	22	10.000/16.000
8	3.000.000/3.400.000	23	10.000/12.000
9	2.000.000	24	10.000/11.000
10	1.300.000/1.600.000	25	400/1.000
11	700.000	26	600/700/1.700
12	340.000/380.000	27	150/1.000
13	200.000/240.000	28	200/1.000
14	70.000/110.000/140.000	29	1.000
15	58.000/70.000	30	70

Per tali ricerche ho adoperato uno dei fagi isolati di recente (Ortali 1948, Penso e Ortali 1948) attivi sui micobatteri e precisamente il *Phagus pellegrini* (P. e O., 1948) attivo sul ceppo Lombardo Pellegrino (1906).

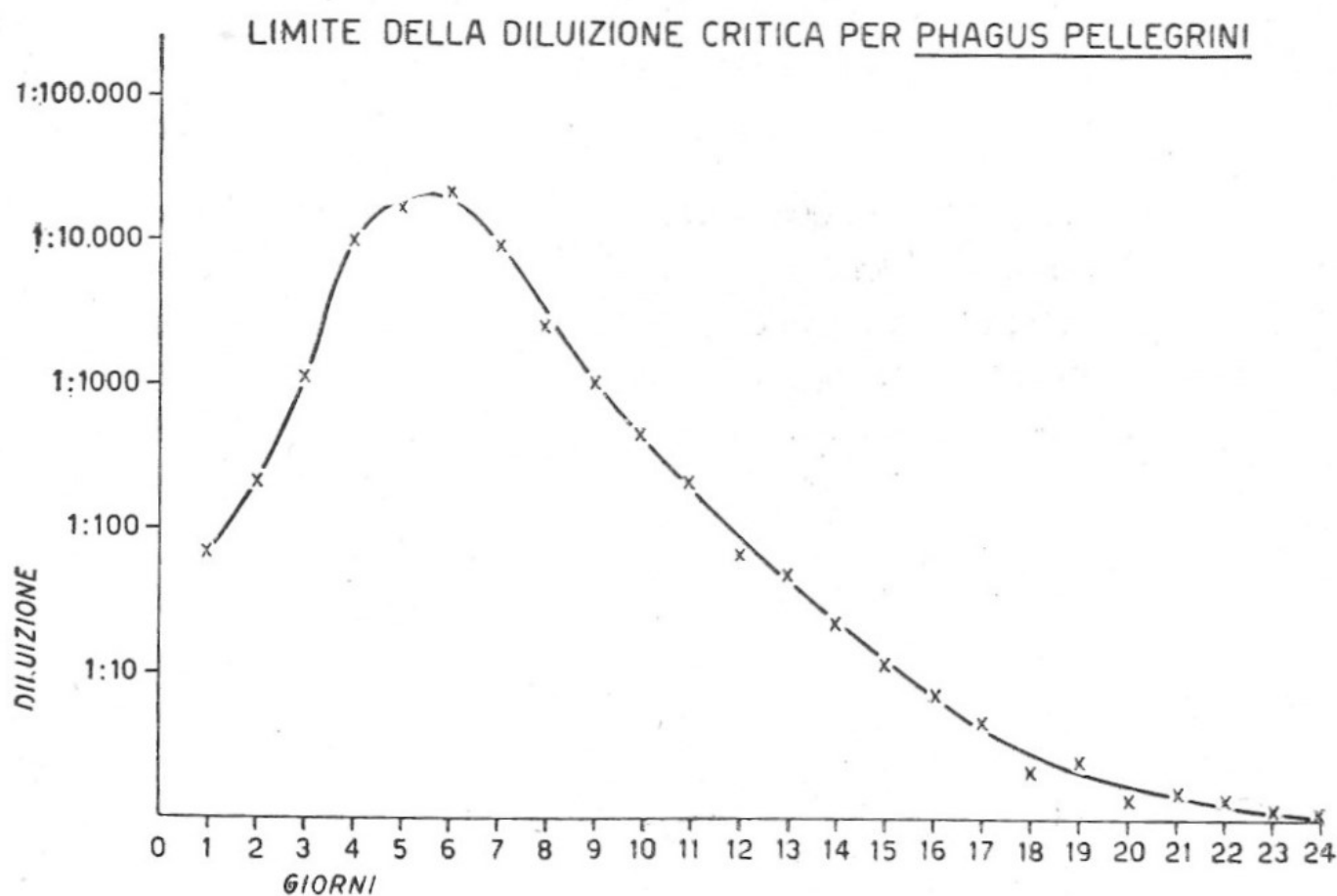
Ho scelto questo fago perchè esso è capace di dare colonie fagiche giganti e tali da far ritenere che in esse il numero di fagi aumenti di continuo coll'aumentare del diametro della placca.

TECNICA. — Su piastre di agar glicerinato al 3 per cento, e bene asciugate in termostato per due giorni, veniva stesa, mediante bacchetta di vetro piegata a gomito, una emulsione in brodo del ceppo sensibile, in maniera da ottenere una patina uniforme. In pari tempo su ogni singola piastra veniva distribuito 1 cm³ di emulsione fagica previamente titolata in modo da ottenere non più di otto-dieci placche di lisi per piastra.

Di giorno in giorno più placche venivano tagliate via dall'agar mediante spatola di platino, avendo cura di escindere la placca con un notevole margine, in quanto i corpuscoli fagici si trovano sia all'interno della placca di lisi che alla periferia e all'esterno.

La placca veniva passata in due cm³ di brodo sterile, e lasciata in tale brodo per circa trenta minuti, agitando di tanto in tanto onde facilitare il passaggio del fago nel liquido. Dopo di che, la sospensione fagica veniva diluita a 1:10, 1:100, 1:1000 sino a 1:10⁷, usando sempre il brodo come diluente e cambiando pipetta fra un passaggio e l'altro.

GRAFICO n. 1



Di tali diluizioni si deponeva una quantità fissa ($1/100$ di cm^3) su aree previamente preparate del ceppo sensibile.

A crescita avvenuta, si prendevano in considerazione le diluizioni che davano placche isolate, da queste si risaliva al contenuto totale di fagi per cm^3 .

RISULTATI. — Sull'agar-patina è impossibile seguire la produzione di batteriofago nelle prime ore, almeno sino a quando non si abbia evidente crescita del ceppo ospite.

Contemporaneamente alla crescita del germe (24 ore circa) compaiono le placche fagiche che seguitano ad aumentare di diametro per circa quindici giorni. In tale maniera si possono ottenere placche di lisi che arrivano sino a due cm di diametro.

La placca contiene il maggior numero di fagi (all'incirca 10^6) in quinta giornata, epoca in cui essa è ancora contenuta nei limiti di grandezza normale (3 mm). Questo valore rimane costante per tre o quattro giorni fino a quando la placca, pur seguitando ad aumentare di diametro, presenta un numero di fagi minore, numero che si riduce al minimo in venticinquesima-trentesima giornata, come risulta dalla unita tabella.

Per meglio controllare il fenomeno, ho seguito, in rapporto al tempo, i limiti di diluizione critica di lisi ottenendo la curva che allego.

Mi limito in questa nota ad enunciare il fatto osservato senza discutere se la diminuzione riscontrata è una diminuzione reale o semplicemente apparente, perchè il fenomeno può attribuirsi o a una vera diminuzione del numero totale dei fagi o a una loro parziale inibizione.

Roma, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Microbiologia, 8 ottobre 1949.

BIBLIOGRAFIA

BRUTSAERT P., Le Bactériophage dans les milieux gelatinés. C. R. Soc. Biol., 90, 1292, (1924).

DOERR R., BERGER W., Studien zum Bakteriophagenproblem, III. Die Antagonistische Wirkung von Gelatine und Agar auf den Ablauf der Bakteriophagenreaction. Zeith. schr. f. Hyg. 97, 422, (1923).

HAUDUROY P., Action de la gélatine sur le phénomène de d'Hérelle. C. R. Soc. Biol., 90, 1463, (1924).

LOMBARDO PELLEGRINO P., Sui bacilli acido resistenti. Annali d'Igiene Sper., 16, 163, (1906).

NAKAMURA O., Die Hemmung der Bakteriophagewirkung durch Gelatine. Ind. J. Med. Res. 24, 13, (1936).

ORTALI V., Isolamento di tre batteriofagi anti-micobatteriei. Rend. Acc. Naz. dei Lincei, S. VIII, 4, 1948.

PENSO G. e ORTALI V., Isolamento e studio di fagi attivi sui micobatteri. Rend. Acc. Naz. dei Lincei, S. VIII, 6, 109, (1948).
