

66. Franco GRAZIOSI e Giuseppe RUSSO — Studio al microscopio elettronico di un batteriofago attivo sul *B. megatherium*.

Riassunto. — Gli AA., dopo aver riferito le modalità tecniche dei loro esperimenti, descrivono la morfologia e le dimensioni di un batteriofago attivo su un ceppo di *B. megatherium* (batteriofago BM e *B. megatherium* Parigi), nonché vari aspetti dell'adsorbimento e della lisi bacillare. Il batteriofago BM si presenta in forma simile a quella di uno spermatozoo, con una testa rotondeggiante di circa 72 μ di diametro medio ed una coda lunga 150 μ e dello spessore di 10-15 μ , come risulta dalle misurazioni eseguite, con il microscopio comparatore, su fotografie di materiale trattato con la tecnica delle ombre. La lisi dei bacilli infetti si osserva con rigonfiamento del corpo bacillare, seguito da rottura della parete cellulare e fuoriuscita del protoplasto e con la comparsa nel protoplasto stesso di zone opache caratteristiche riferibili, forse, ad agglomerati di fago.

Gli AA. riportano un'ampia documentazione fotografica.

Résumé. — Les Auteurs, après avoir relaté les modalités techniques de leurs expériences, décrivent la morphologie et les dimensions d'un bactériophage actif sur une souche de *B. megatherium* (bactériophage BM et *B. megatherium* Paris), ainsi que divers aspects de l'adsorption et de la lyse bacillaire. Le bactériophage BM se présente dans une forme semblable à celle d'un spermatozoaire, avec une tête à peu près ronde ayant environ 72 μ de diamètre moyen et une queue longue 150 μ et d'une épaisseur de 10-15 μ , ainsi qu'il résulte des mesurages exécutés, avec le microscope comparateur, sur des photos de matériel traité par la technique des ombres. La lyse des bacilles infectés se présente par un renflement du corps bacillaire, suivi de la rupture de la paroi cellulaire et de la sortie du protoplaste, avec l'apparition dans ce même protoplaste de zones opaques caractéristiques, qu'on peut, peut-être, rapporter à des agglomérés de phagus.

Les Auteurs joignent une ample documentation photographique.

Summary. — The Authors, after having reported the technical modalities of their experiments, describe the morphology and dimensions of an active bacteriophage on a strain of *B. megatherium* (bacteriophage BM and *B. megatherium* Paris) as well as the various aspects of bacillary adsorption and lysis. Bacteriophage BM appears in a shape similar to that of a spermatozoon with a roundish head about 72 μ in diameter on the average and a tail 150 μ long and 10 to 15 μ thick as it appears from measurements

made with a comparator microscope on photographs of the material treated with shadows method. The lysis of infected bacilli is observed with a swelling of the bacillary body, followed by the rupture of the cell wall, egress of protoplast, and the appearance in protoplast of typical opaque areas assignable, perhaps, to the agglomerations of phage.

The Authors supply ample photographic documentation.

Zusammenfassung. — Verff. berichten zuerst über die Technik ihrer Versuche und beschreiben die Morphologie und Abmessungen eines aktiven Bakteriophagus auf einem *B. megatherium*-Stamm (Bakteriophagus BM und *B. megatherium* Parigi), sowie verschiedene Bedingungen der bazillaren Adsorption und Lyse. Der Bakteriophagus BM erscheint in einer Spermatozoe-ähnlichen Form, mit rundlichem Kopf, Durchmesser etwa 72 μ und einen 150 μ langen und 10-15 μ dicken Schweif. Diese Messungen wurden mit einem Vergleichsmikroskop auf Lichtbildern von nach der Schattentechnik behandeltem Material ausgeführt. Die Lyse der infizierten Bazillen kann durch eine Schwellung des Bazillenkörpers verfolgt werden, auf die der Bruch der Zellenwand und Austritt des Protoplastus folgt; in dieser Ursubstanz können matte charakteristische Zonen beobachtet werden, die möglicherweise auf Phagus-Agglomerate zurückzuführen sind.

Der Bericht ist durch eine reiche photographische Dokumentierung vervollständigt.

In precedenti lavori (1) sono state descritte le caratteristiche di un sistema batteriofagico costituito da un ceppo di *Bacillus megatherium* e da un fago specifico denominato BM (batteriofago del *B. megatherium*); furono stabiliti, mediante esperimenti a ciclo unico, le modalità dello adsorbimento del fago, la durata del periodo di latenza, la durata del periodo di lisi, il numero medio di unità litiche liberate dai germi infetti (« burst size average » degli AA. anglosassoni), la variabilità del numero di scoppio dei germi infetti, nonché gli aspetti morfologici della lisi bacillare mediante l'osservazione di miscele di germi e fagi con il microscopio a contrasto di fase.

Nel presente lavoro ci siamo proposti di studiare al microscopio elettronico questo stesso sistema batteriofagico per mettere in evidenza gli aspetti morfologici del batteriofago, dell'adsorbimento e dei bacilli durante il periodo di latenza e di lisi.

MATERIALI E TECNICA. — Abbiamo eseguito questa ricerca servendoci del microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità (*).

Il germe in studio è un ceppo di *B. megatherium* esistente nella collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'Università, denominato *B. megatherium* Parigi. Il batteriofago attivo su questo microrganismo fu isolato dal terreno (2). Il *B. megatherium* è stato sempre coltivato in « Nutrient broth » (Difco) e con lo spettrofotometro Coleman è stata determinata la curva standard della torbidità in funzione della concentrazione dei bacilli.

Per la preparazione delle sospensioni di batteriofago è stato seguito il metodo seguente: 50 cc. di brodo erano insemenzati con una quantità tale di germi da avere un titolo iniziale di 10^5 bacilli per cc.; indi venivano posti a 37°C . e fortemente aereati fino a raggiungere un titolo di 10^8 bacilli per cc.. Si aggiungeva, poi, fago in quantità di 10^8 fagi per cc. e si continuava l'aereazione della cultura a 37°C fino alla lisi completa. Tutto questo ciclo aveva la durata di circa 8-10 h ed il titolo finale del lisato, dopo filtrazione per candela, oscillava tra 10^{10} e 10^{11} fagi per cc.. Il titolo del fago era determinato mediante la conta delle aree litiche sviluppatesi su piastre di agar-germi preparate col metodo di Gratia.

Allo scopo di ottenere concentrazioni più forti di fago abbiamo adoperato una ultracentrifuga Huguenard, sottoponendo i lisati filtrati a $7,7 \times 10^4$ - $1,2 \times 10^5$ campi gravitazionali per 20-30' e raccogliendo poi il sedimento.

Il materiale da osservare al microscopio elettronico era posto su membrana di collodio distesa sugli appositi portaoggetti.

Per lo studio della forma e delle dimensioni del batteriofago si deponeva una gocciolina del lisato, o del sedimento ottenuto con la ultracentrifugazione, sulla membrana; si lasciava che la gocciolina si asciugasse e successivamente si eseguiva un rapido lavaggio (5-10'') del portaoggetti in acqua distillata, per allontanare il deposito di cristalli e di altro materiale residuo dal prosciugamento del brodo.

Per osservare le modalità dell'adsorbimento dei fagi sui bacilli si eseguivano miscele costituite da un numero noto di germi e di fagi, in modo da ottenere determinati rapporti di infezioni (da 10 a 1000 e più fagi per ogni bacillo), che si lasciavano per 5-10' a 37°C e si centrifugavano per 5' a 4000 giri; il sedimento era lavato ripetutamente con centrifugazione in acqua distillata. Una gocciolina del sedimento era posta sulla membrana, lasciata asciugare ed osservata al microscopio.

(*) Ringraziamo il Prof. G. C. TRABACCHI, la Prof. D. BOCCIARELLI, la Prof. N. MORTARA ed il Dott. C. CASTAGNOLI, del Laboratorio di Fisica, per la loro preziosa assistenza nell'uso del microscopio elettronico.

Per osservare la morfologia dei bacilli durante lo sviluppo del fago e nel periodo litico, si operava nel seguente modo: a 10 cc. di brodo si aggiungevano germi nella quantità di 10^5 per cc., che si lasciavano sviluppare a 37°C fino ad un titolo di 10^7 bacilli per cc. e quindi si aggiungevano fagi in numero tale da avere una infezione sicuramente multipla di tutti i bacilli presenti (10^8 fagi per cc.); si lasciava poi la miscela così preparata a 37°C . Per cogliere i momenti più significativi per l'osservazione microscopica si controllavano le modalità della lisi seguendo il comportamento della torbidità della miscela germi-fago con determinazioni turbidimetriche al Coleman in tempi successivi. In base a queste prove, la miscela germi-fago veniva centrifugata dopo 30 o 40' dall'infezione e, dopo un rapido lavaggio per centrifugazione in acqua distillata, si deponeva una gocciolina di sedimento sulla membrana, si lasciava essiccare e si osservava al microscopio elettronico.

Tutti i preparati erano trattati con la tecnica delle ombre, facendo uso del cromo e di un angolo di incidenza dei raggi molecolari di 30° . Di tutte le fotografie venivano eseguiti i controtipi. Le misure delle dimensioni dei fagi sono state fatte mediante il microscopio comparatore su ingrandimenti fotografici e determinate in centesimi di millimetro.

RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI. - *Morfologia del batteriofago.* — Il batteriofago si presenta come un piccolissimo corpicciolo di forma rotondeggiante provvisto di un'appendice molto sottile. Sia la testa che la coda non presentano strutture apprezzabili nel loro interno. Il diametro medio della testa, calcolato, a mezzo del microscopio comparatore, con la misurazione di tutti i batteriofagi della fotografia n. 2, è risultato di 72 μ . Tuttavia questa misura si riferisce al diametro delle teste ricoperte dallo strato di cromo usato nella tecnica delle ombre; infatti da ricerche ulteriori ⁽³⁾ risulterebbe che il diametro reale di questo batteriofago si aggira intorno a 60 μ . La lunghezza della coda è risultata di circa 150 μ ed il suo spessore di 10-15 μ ; ma anche per quest'ultimo dato bisogna ritenere che lo spessore reale è certamente minore.

Modalità dell'adsorbimento. — Come risulta dalle fotografie 3-4-5 i batteriofagi sono aderenti alle pareti cellulari dei bacilli. E' da osservare che, nei germi orientati normalmente alla direzione dei raggi molecolari, i fagi adsorbiti sul lato rivolto verso l'ombra risultano invisibili o quasi. Infatti in fotografie di miscele molto concentrate di germi e fagi si è potuto osservare che i fagi situati nelle zone di ombra dei bacilli sono difficilmente visibili (fig. 6).



Fig. 1. - Batteriofago BM non centrifugato ($1 \mu = \text{mm } 39$).

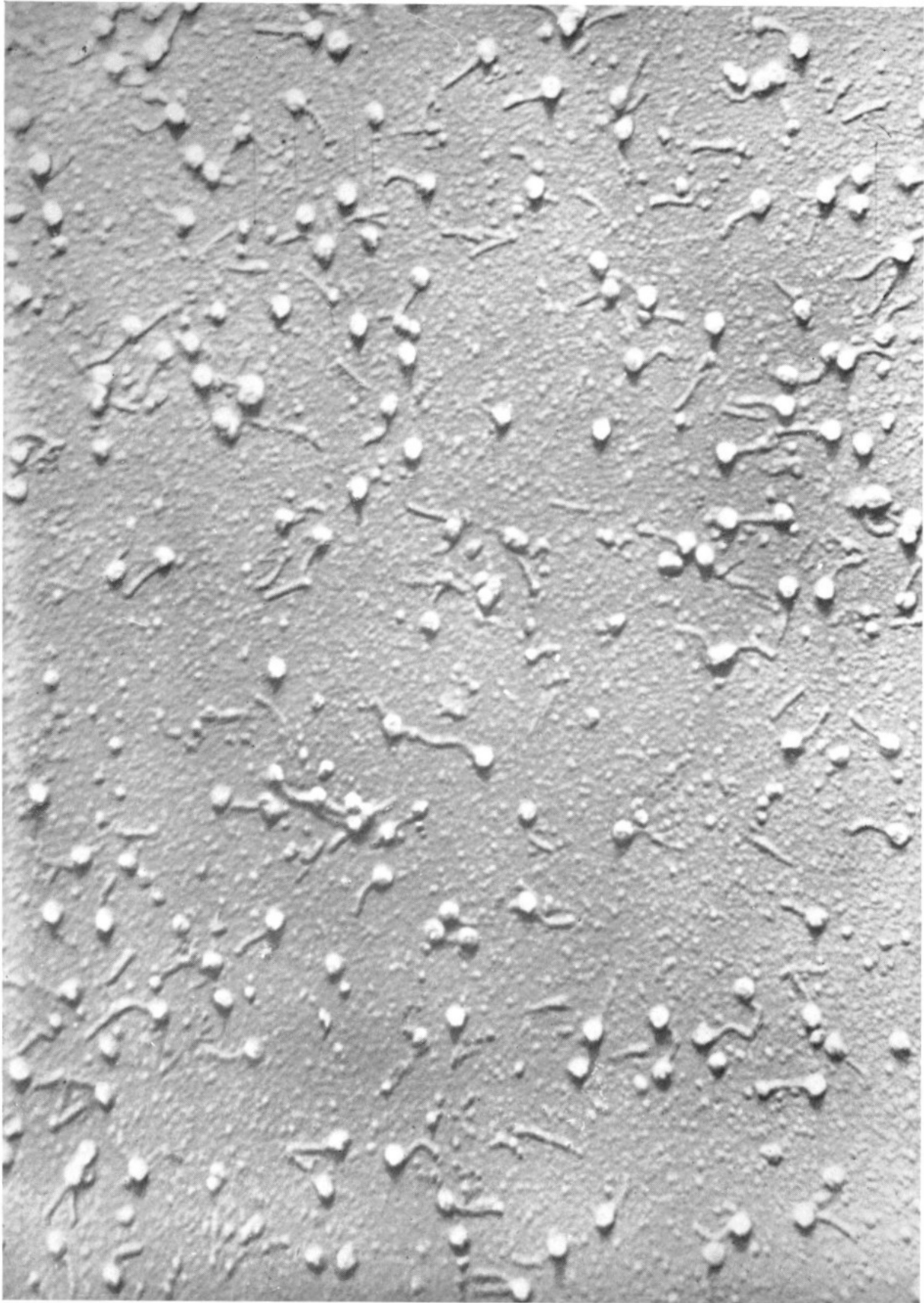


Fig. 2. - Batteriofago BM1 ultracentrifugato. Fotografia su cui sono state eseguite le misure
(1 μ = mm 39).

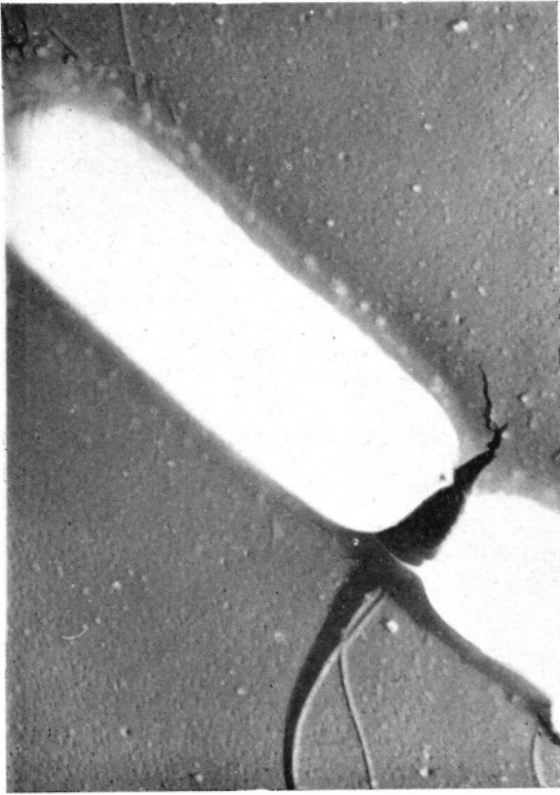


Fig. 3.

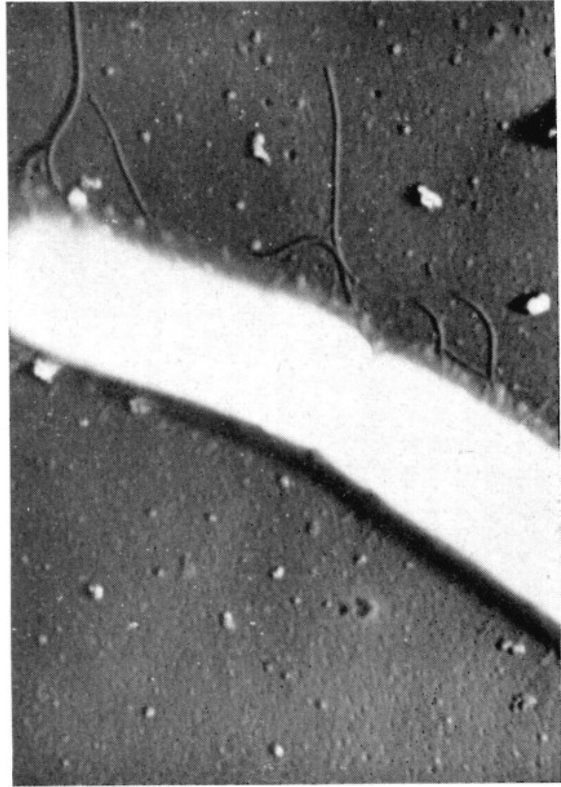


Fig. 4.

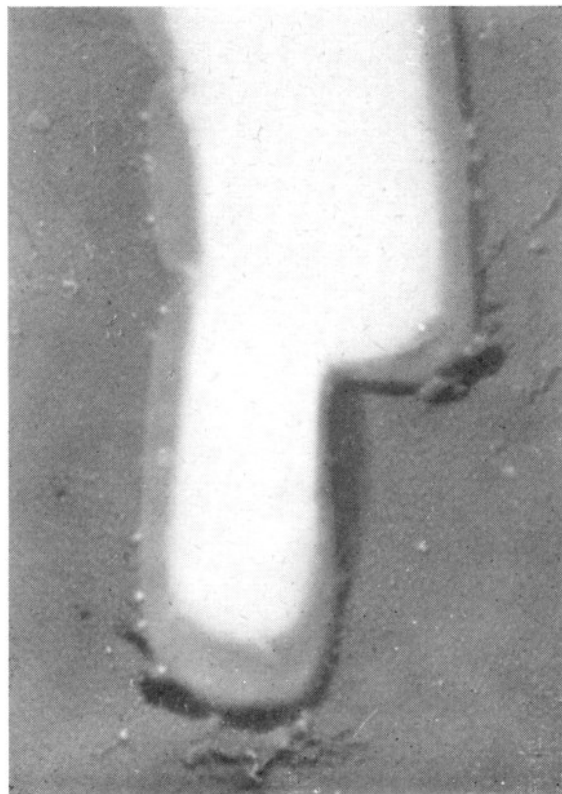


Fig. 5.

Figg. 3-4-5. - Batteriofago adsorbito su *B. megatherium*.

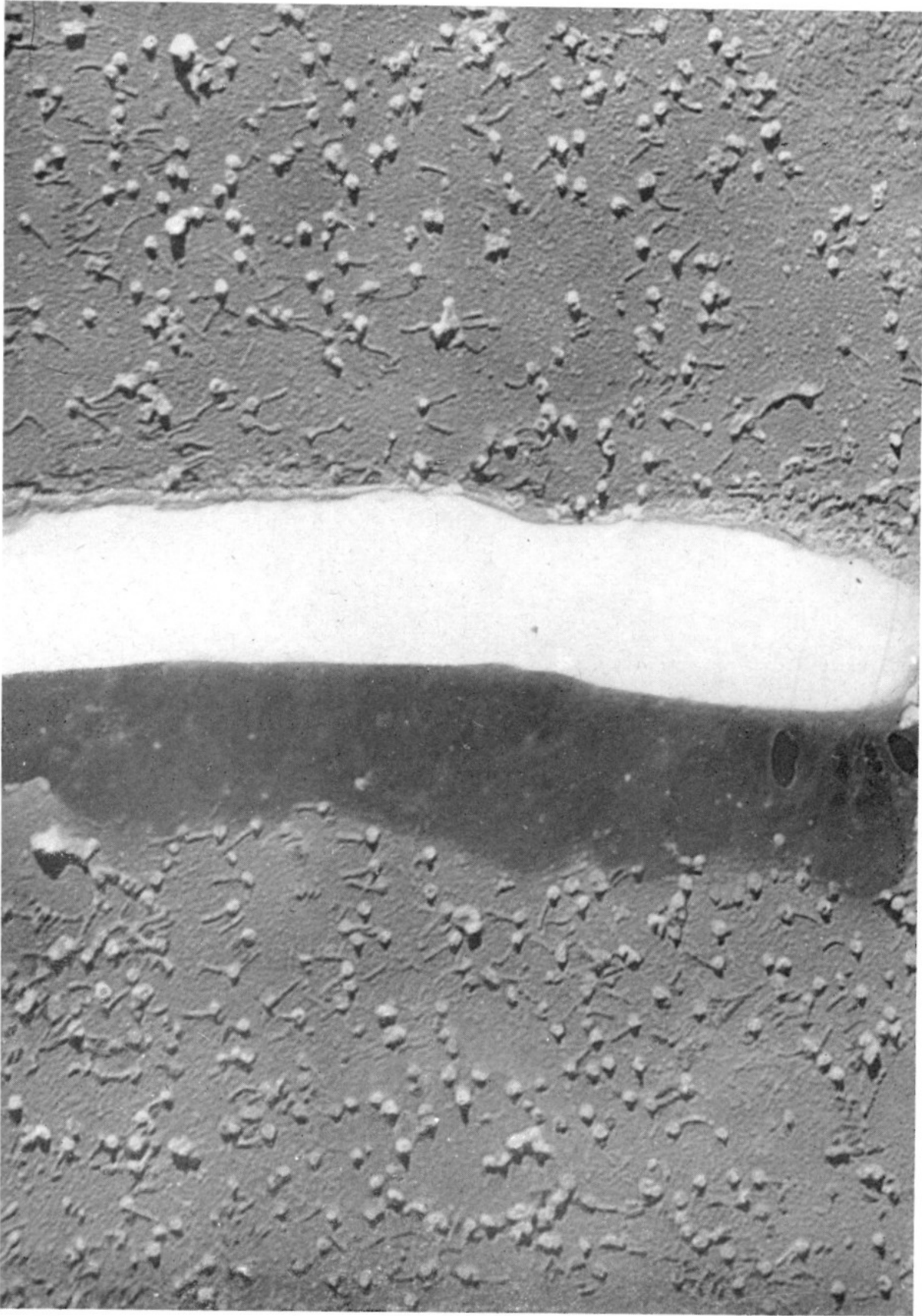


Fig. 6. - Batteriofago BM e *B. megatherium* orientato normalmente alla direzione dei raggi molecolari.

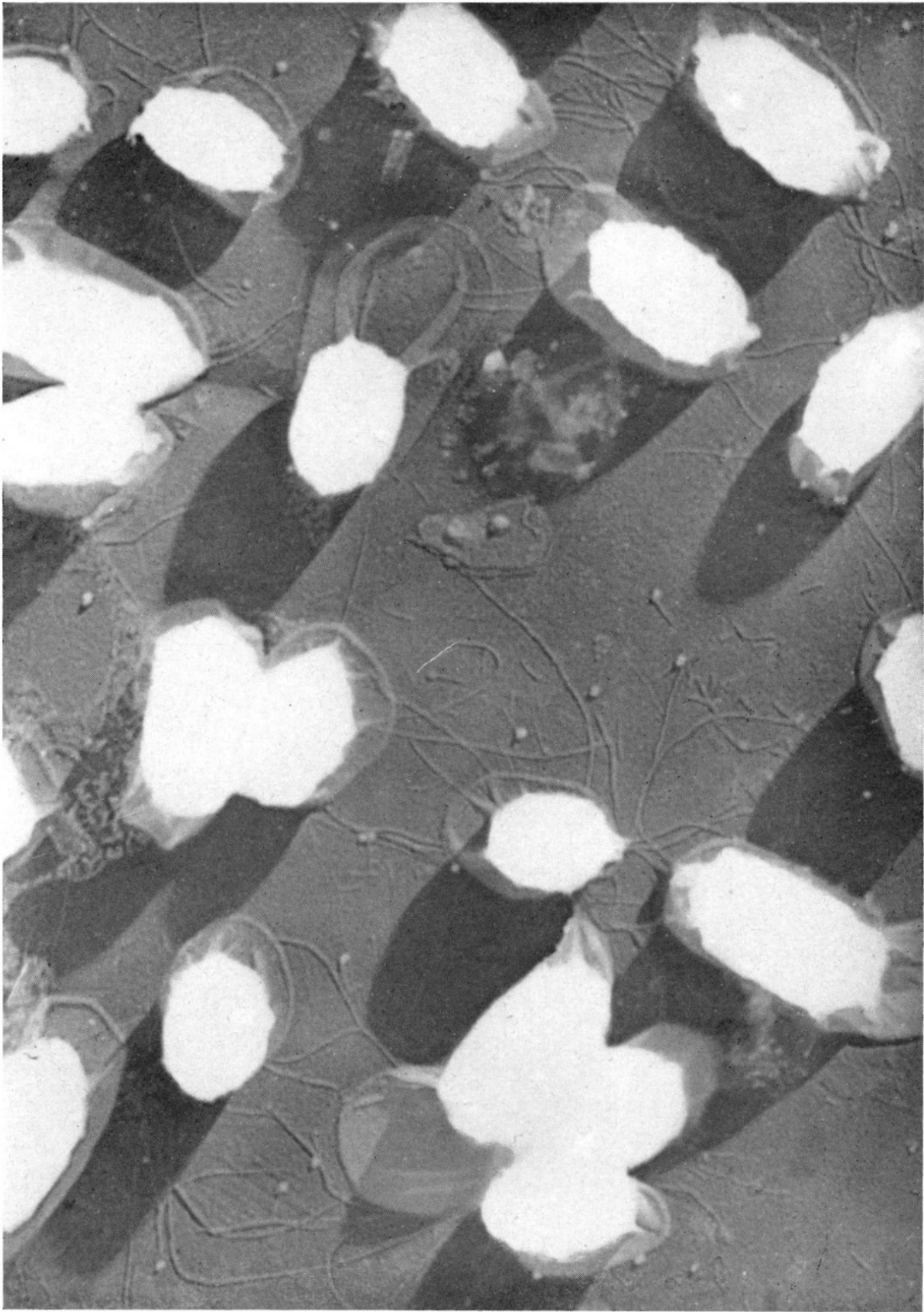


Fig. 7. - Spore di *B. megatherium* e fagi BM.

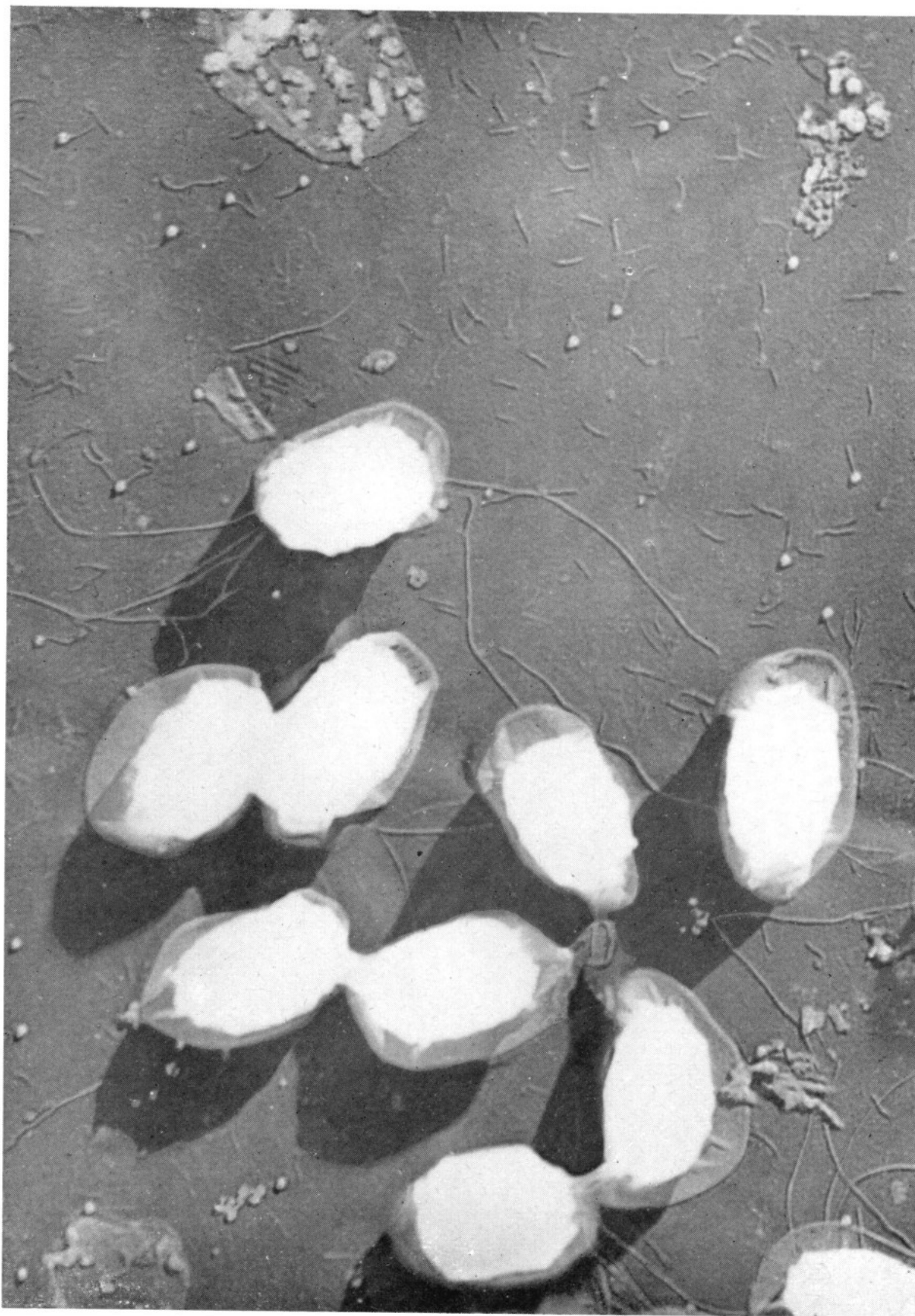


Fig. 8. - Spore di *B. megatherium* e fagi BM.

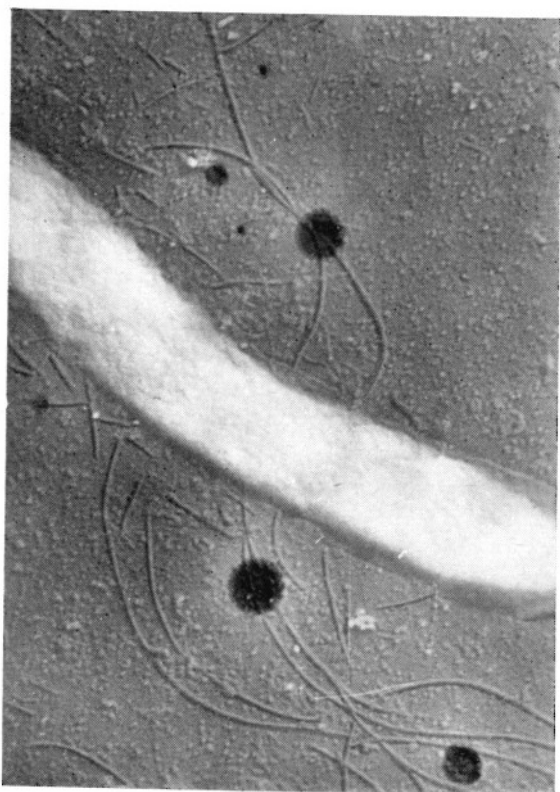
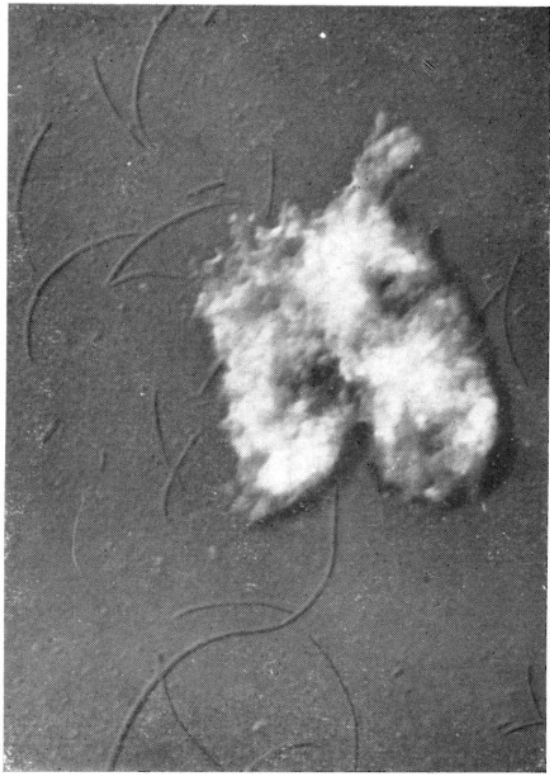
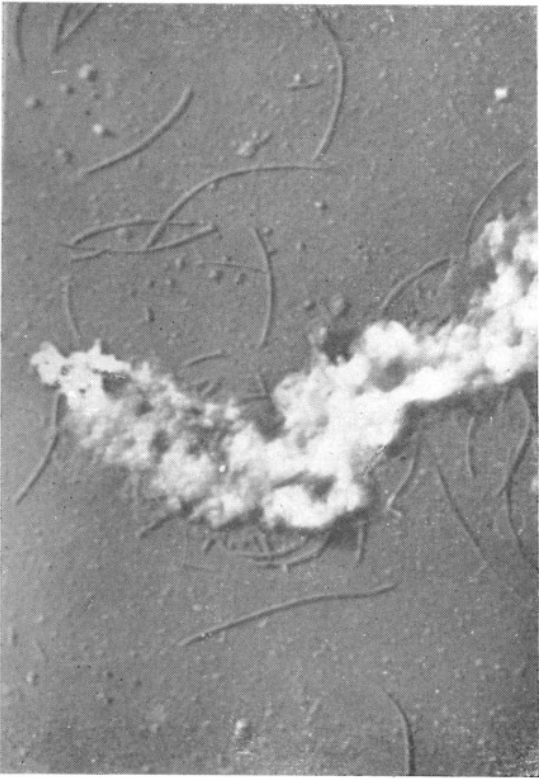


Fig. 9. - *B. megatherium*. Allungamento notevole del corpo cellulare ancora intatto.

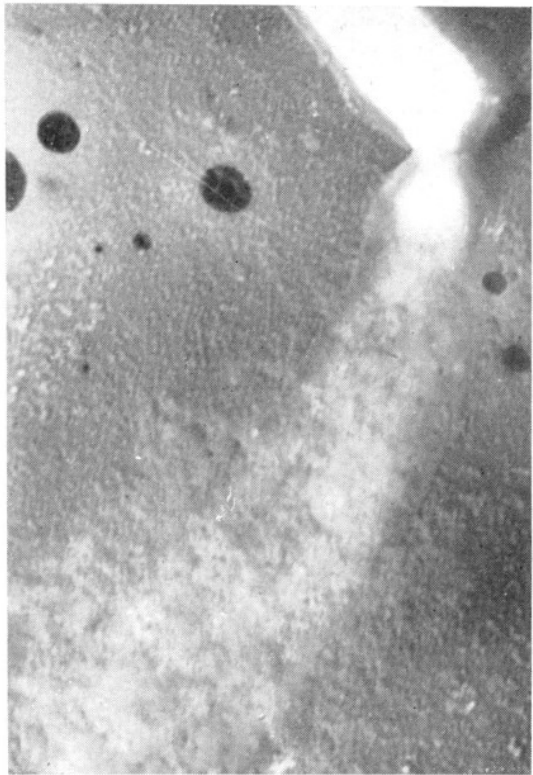
Fig. 10. - *B. megatherium*. Aspetti della lisi bacillare.



Figg. 11 e 12. - *B. megatherium*. Altri aspetti della lisi.



Figg. 13 e 14. - B. megatherium. Ulteriori aspetti della lisi.



Figg. 15 e 16. - B. megatherium. Aspetti della lisi con rottura della parete cellulare e fuoriuscita del protoplasto.



Fig. 17.



Fig. 18.



Fig. 19.

Figg. 17-18-19. - *B. megatherium*. Aspetti della lisi con zone opache caratteristiche.

I batteriofagi appaiono adsorbiti sia per la testa che per la coda, come del resto è stato osservato da diversi AA. per altri batteriofagi.

Sono state eseguite anche delle prove con miscele di spore dello stesso *B. megatherium* e fago BM per accertare un eventuale adsorbimento dei fagi sulle spore; nelle foto riportate (fig. 7 e 8) l'adsorbimento non è evidenziabile, dato il piccolo numero di fagi che compaiono ai margini delle spore.

Modalità della lisi. — Nelle fotografie 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 si osservano germi in stati diversi di lisi. Poichè da una ricerca precedente ⁽¹⁾, eseguita con microscopio a contrasto di fase, era risultato che la maggior parte dei bacilli infetti si lisa rapidamente, nel giro di pochi secondi, senza lasciare residui di sorta, mentre alcuni germi si lisano più lentamente dando luogo ad un residuo che persiste più a lungo, è da ritenere che le immagini ottenute al microscopio elettronico si riferiscano probabilmente ai germi che si lisano più lentamente.

In base alle fotografie riportate si può così riassumere il processo della lisi: in un primo tempo, probabilmente durante il periodo di sviluppo dei fagi, i bacilli si allungano senza che compaiano particolari modificazioni della opacità rilevabile nei bacilli in rapido accrescimento. Successivamente appare una discontinuità della opacità e a volte si osserva la rottura della parete cellulare con la fuoriscuta del protoplasto; si osserva anche un ingrandimento cospicuo dei bacilli. In stadi successivi questi fenomeni si accentuano fino alla distruzione completa del corpo bacillare, finchè si osservano ammassi protoplasmatici in stato di avanzata disgregazione con frammiste ciglia e mostranti nel loro interno zone opache riferibili, forse, ad agglomerati di fago; questi ultimi aspetti sono assai simile a quelli riscontrati da WYCKOFF ⁽⁴⁾ in *Escherichia coli* infetto con fago T₂ ed interpretati dallo stesso A. come ammassi di fago in procinto di liberarsi dal corpo batterico. In effetti anche in alcune delle nostre fotografie (fig. 17, 18, 19) si intravedono in queste zone opache degli elementi tondeggianti che per le loro dimensioni potrebbero essere interpretati come fagi.

In rapporto al problema della natura dei batteriofagi, tuttora controverso, WYCKOFF ⁽⁵⁾ interpreta alcuni aspetti della lisi, da lui osservati, come l'espressione morfologica della moltiplicazione nel protoplasto batterico del fago considerato come un microrganismo indipendente, mentre LEVADITI ⁽⁶⁾ interpreta gli stessi aspetti come l'espressione morfologica della sintesi del batteriofago considerato come una virus-proteina. Le nostre osservazioni al riguardo non ci sembrano ancora sufficienti per contribuire alla soluzione del problema.

CONCLUSIONI. — Dalle nostre osservazioni risulta quanto segue:

1) il batteriofago BM si presenta in forma simile a quella di uno spermatozoo, con una testa rotondeggiante del diametro medio di 72 μ , ed una coda della lunghezza media di 150 μ e dello spessore di 10-15 μ , come risulta dalle misurazioni eseguite con il microscopio comparatore su fotografie di materiale trattato con il metodo delle ombre. Le dimensioni sono quindi alquanto minori di quelle riscontrate da altri AA. (7) per un batteriofago attivo su un altro ceppo di *B. megatherium* originalmente studiato da COWLES (8);

2) il batteriofago BM si adsorbe sulle cellule del *B. megatherium* sia per la testa che per la coda e l'adsorbimento è meglio osservabile nei bacilli orientati con il loro asse maggiore nella direzione dei raggi molecolari. I nostri risultati non ci autorizzano ad affermare, finora, un adsorbimento del batteriofago sulle spore;

3) la lisi dei bacilli infetti si verifica con un rigonfiamento del corpo bacillare, seguito dalla rottura della parete cellulare con fuoriuscita del protoplasto, con la comparsa di una discontinuità nella normale opacità e con l'apparizione nel protoplasto di zone opache caratteristiche, riferibili, forse, ad ammassi di fagi.

Roma, Istituto Superiore di Sanità ed Istituto di Microbiologia dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F. GRAZIOSI E G. B. PULVIRENTI - Riv. di Biol., 42, 367, (1950); « Studio di un batteriofago attivo sul *B. megatherium* ». Atti del VII Congresso Naz. di Microb., Napoli 1950.
- (2) L. SILVESTRI - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 25, f. 7, (1949).
- (3) C. CASTAGNOLI E F. GRAZIOSI - Rendiconti dell'Ist. Sup. San. (in corso di pubblicazione).
- (4) R. W. G. WYCKOFF - Nature, 162, 649, (1948).
- (5) R. W. G. WYCKOFF - in C. LEVADITI, Images Électroniques en Microbiologie, Maloine, Paris, 1949 (p. 82-88).
- (6) C. LEVADITI - Images Électroniques en Microbiologie, Maloine, Paris, 1949 (p. 87).
- (7) T. A. McLAUCHLAN, E. M. CLARK, F. W. BOSWELL - Nature, 160, 755 (1947).
- (8) P. B. COWLES - J. of Bact., 20, 15 (1930).
-