

34. Giuseppe PENSO — La cinetica della lisi fagica.

Riassunto. — L'Autore descrive e illustra — con una serie di fotogrammi, presi alla velocità di 400 al secondo — il fenomeno dell'infezione fagica di un batterio e conseguente sua lisi e scoppio.

Résumé. — L'Auteur décrit et illustre — avec une série de photographies, pris à la vitesse de 400 à la seconde — le phénomène de l'infection phagique d'une bactérie, de sa lyse consécutive et de son éclatement.

Summary. — The A. describes and illustrates with a series of photographs — taken at the speed of 400 for second — the process of phage infection in a bacterium and consequently its lysis and burst.

Zusammenfassung. — Der Verfasser schildert und illustriert an Hand einer Serie von Fotogrammen — Aufnahmegeschwindigkeit: 400 pro Sekunde — den Vorgang der fagischen Infektion eines Bakteriums und der darauf folgenden Lyse und Sprengung.

Lo studio della lisi fagica, da me compiuto al microscopio elettronico [PENSO (¹, ²)], mi aveva permesso da un lato di seguire l'evolversi degli aspetti morfologici del batterio parassitato, e dall'altro di cogliere le successive fasi di sviluppo del fago parassitante.

L'osservazione al microscopio elettronico di un qualsiasi ciclo biologico è, però e purtroppo, una osservazione statica: solo con particolari tecniche, solo realizzando una serie di osservazioni, spartite nel tempo e praticate con ritmo conosciuto, è possibile ricostruire un ciclo o un qualsiasi altro fenomeno evolutivo realizzantesi nel tempo: si tratterà però sempre di osservazioni seriali, compiute sopra un succedersi di fatti analoghi, ma diversi, comportando — l'osservazione al microscopio elettronico — la fatale perdita biologica delle cellule su cui si osserva ogni singolo fenomeno.

Malgrado queste difficoltà, io potei stabilire che i batteri, su cui i fagi vanno a fissarsi, sono sul principio di aspetto normale, mentre nel proseguio presentano una zona di chiarificazione localizzata là dove i fagi aderiscono, zona che si estende presto all'intero corpo del batterio. Questa chiarificazione è concomitante a una intensa attività evolutiva

del fago il quale, lasciata all'esterno del suo ospite la propria spoglia, inietta nell'interno del batterio i granuli di cui è riempito, granuli (*sporozi*) che si moltiplicano dando luogo a corpi moruliformi (*morule*) dai quali si distaccano anellini (*merofagi*) che si moltiplicano ancora dando luogo a formazioni a rosetta (*rosette*). Da queste si distaccano elementi provvisti di una coda, dapprima rudimentaria e poi più pronunciata (*teleofagi*), elementi che daranno vita ai fagi maturi. Una volta riformatosi il fago, il germe si rompe, si spezzetta o scoppia liberando i propri parassiti che saranno pronti a invadere nuovi batteri ancora indenni.

Tutto questo ciclo si compie spesso in un batter d'occhio, raramente — e solo con i fagi dei micobatteri — in un tempo tale da permettere di osservarlo serialmente al microscopio elettronico.

Per completare le ricerche sull'argomento, io ho cercato di seguire al microscopio a contrasto di fase il fenomeno della lisi fagica, e ciò allo scopo di cogliere il reale succedersi dei vari episodi che caratterizzano l'invasione virale del batterio, la chiarificazione, la lisi o lo scoppio di questo.

Il microscopio a contrasto di fase non permette certo di vedere i fagi, permette però di osservare le variazioni degli aspetti morfologici che i batteri presentano per alterazioni esterne e soprattutto per alterazioni interne.

Operando in camera calda, e miscelando batteri e fagi, è possibile seguire facilmente tutto l'evolversi della prima fase del fenomeno: periodo di latenza, infezione, sofferenza del germe, successivi cambiamenti morfologici di questo. L'ultima fase del fenomeno, lisi o scoppio, si avvera così improvvisamente e in un tempo tanto piccolo da non lasciar all'occhio la possibilità di afferrarla e tanto meno di analizzarla. Neanche la fotografia è di aiuto, giacchè è praticamente impossibile far scattare l'otturatore nel tempuscolo brevissimo che intercorre tra l'inizio e la fine del fenomeno.

Si è girato allora l'ostacolo ricorrendo alla cinematografia: facendo scorrere rapidissimamente la pellicola — 400 fotogrammi al secondo — si riesce a cogliere le varie fasi della lisi e dello scoppio e ad analizzarle nei loro vari momenti.

La tecnica cinematografica di ripresa è stata molto difficile: si è dovuto innanzi tutto lavorare all'interno di una camera termostatica onde evitare sbalzi di temperatura nelle diverse fasi di esperimento; si è dovuto realizzare poi tutto uno speciale sistema di illuminazione, onde potere avere abbastanza luce osservando ad immersione; si è dovuto infine zavorrare convenientemente la base che sopportava la macchina

da ripresa, nonchè il tavolino che sosteneva il microscopio, giacchè le più piccole vibrazioni dell'ambiente alteravano la ripresa cinematografica compiuta ad alta velocità.

Come batterio da sottoporre all'osservazione ho scelto il megaterio, trattandosi di un germe di grandi dimensioni e perciò facilmente visibile al microscopio.

Precedenti osservazioni elettroniche — inedite — mi avevano mostrato che megaterio e fago omologo si comportano in maniera del tutto identica a quella da me già descritta per i micobatteri e loro fagi.

Al microscopio a contrasto di fase risulta che una miscela di batteri e di fagi, preparata di fresco, non dà adito ad alterazioni immediate della struttura morfologica del batterio. Soltanto dopo un certo periodo di tempo — variabile da germe a germe — si comincia coll'osservare una certa sofferenza del batterio, manifestantesi con una sua chiarificazione.

Tale chiarificazione può sembrare in un primo momento uniforme, ben presto però ci si accorge come essa sia irregolare, nel senso che alcune parti del batterio risultano più chiare, altre più scure. Le parti più chiare assumono spesso un aspetto vacuolare, mentre le pareti del vacuolo qualche volta si distendono a « bolla » per poi rientrare in se stesse, raramente si ha lo scoppio in questa fase; succede come se si soffiasse in un cilindro le cui pareti, in un punto, fossero di minore resistenza ed elastiche, permettendo alla porzione di parete presente in quel punto di protuberare o rientrare a seconda dell'aumentare o diminuire della pressione interna del cilindro.

Da che cosa sia dato questo aumentare della pressione interna del batterio non è possibile stabilirlo con esattezza, si potrebbe sospettare tra l'altro che il fago, attaccando i componenti del protoplasma batterico, dia luogo a reazioni chimiche che comportano liberazione di gas: così, mi sembra, si potrebbe spiegare la formazione delle bolle e il concomitante o successivo scoppio improvviso del germe, scoppio che comporta movimenti ben visibili e spostamento dei frammenti di frattura.

La ripresa cinematografica veloce ha permesso altre osservazioni e particolarmente una sulla concomitanza della parassitosi fagica, nel senso che, mescolando germi e fagi in proporzioni tali da permettere la possibilità di una contemporanea infezione di tutti i germi presenti, tale infezione non si avvera e non evolve contemporaneamente, ma si realizza per *poussées* successive: in una stessa catena batterica si hanno germi normali e sofferenti, si vedono divenire sofferenti i normali, mentre quelli che erano sofferenti si vedono lisarsi o scoppiare (fig. 1).

La lisi fagica, perciò, non avviene tutta su uno stesso piano, non si realizza con identica tempestività di fenomeni, ma si compie a mandate

subentranti quasi che la sensibilità di ogni singolo germe verso i fagi fosse diversa e la durata della malattia fosse differente per ogni singola cellula batterica, a meno che l'adsorbimento dei fagi sui germi avvenga in periodi, sia pur ravvicinati, ma diversi, il che vedemmo noi stessi al microscopio elettronico dove era possibile osservare, nello stesso campo, batteri parassitati e in via di lisi, batteri con fagi appena adsorbiti, batteri ancora indenni e con fagi ancora liberi intorno ad essi.

L'osservazione cinematografica compiuta in riprese ad alta velocità ci ha permesso di seguire la fase finale del fenomeno: i germi parassitati, prima di scoppiare, spesso si contraggono, quasi avessero uno spasmo, per riprendere subito dopo le loro dimensioni normali, poi si chiarificano improvvisamente e si disfanno: o scoppiando nel vero senso della parola (fig. 4) — e allora i frammenti si disperdono tutti intorno —, o contraendosi e spezzandosi — e allora i frammenti rimangono sul posto (figg. 1 e 3), pur essendo spostati rispetto all'asse originario del batterio —, o lisandosi a poco a poco e riducendosi a un'ombra o, direi addirittura, a frammenti di ombra (fig. 2).

I tre aspetti del fenomeno si possono osservare non soltanto con lo stesso batterio e lo stesso fago, ma addirittura nello stesso campo microscopico. Io credo che i tre fenomeni, pur differendo tra loro, siano sovrapponibili: il fago maturo attacca il protoplasma della cellula ospite demolendolo in qualche maniera — di qui la chiarificazione protoplasmatica —, durante la demolizione, si ha aumento della pressione interna del germe, aumento che provoca anormali distensioni locali — bolle — o addirittura lo scoppio dell'intero germe.

Il rientro delle bolle non deve meravigliare, giacchè potrebbe avvenire che l'aumentata pressione interna trovasse improvvisa via di uscita da una piccola lacerazione locale (figg. 5 e 6) e conseguente afflosciamento delle pareti (fig. 7).

In conclusione io penso che l'energia necessaria allo scoppio del germe non può essere data che da un aumento di pressione nell'interno del batterio, aumento che non può essere che la conseguenza di processi chimici che accompagnano la demolizione del protoplasma batterico.

Le fotografie che pubblichiamo illustrano quanto abbiamo esposto; esse costituiscono alcuni fotogrammi del nostro film « Il Batteriofago ».

Esaminiamo ora queste fotografie.

In ognuno degli otto fotogrammi che compongono la fig. 1 si vedono distintamente tre gruppi di germi: un gruppo a sinistra e in basso costituito da un solo germe; un gruppo al centro, costituito da cinque batteri di diversa lunghezza; un gruppo a destra e a media altezza, costituito da due germi.

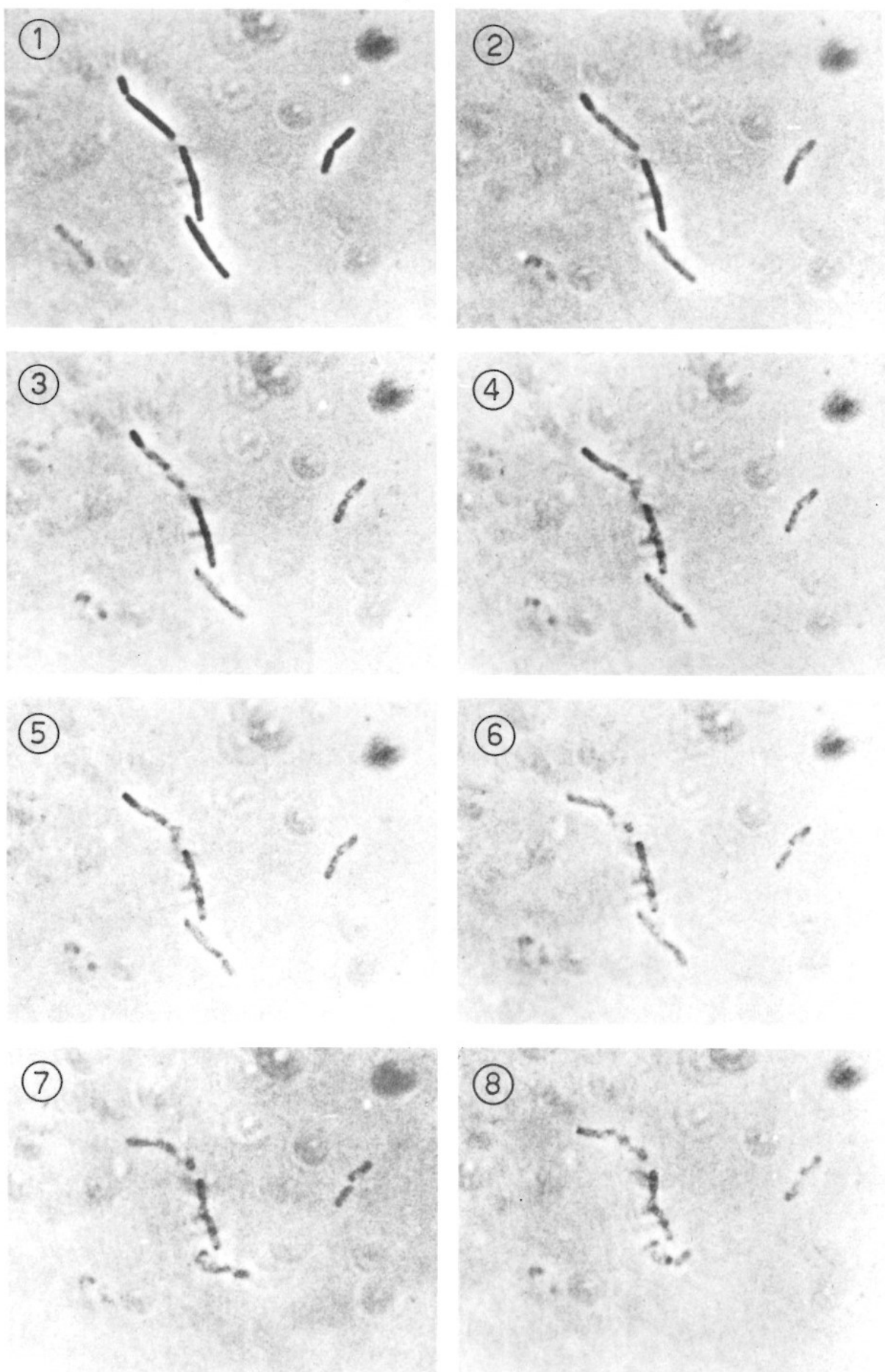


Fig. 1. - Invasione, chiarificazione, spezzettamento e lisi di megateri parasitati dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).

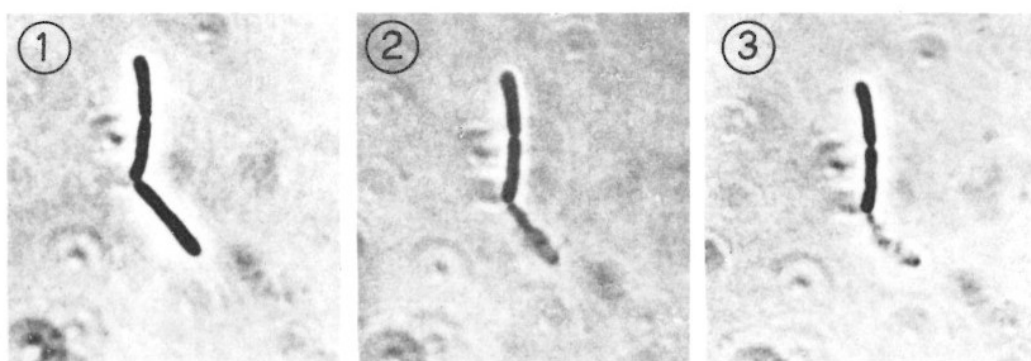


Fig. 2. - Lisi di un megaterio invaso dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).

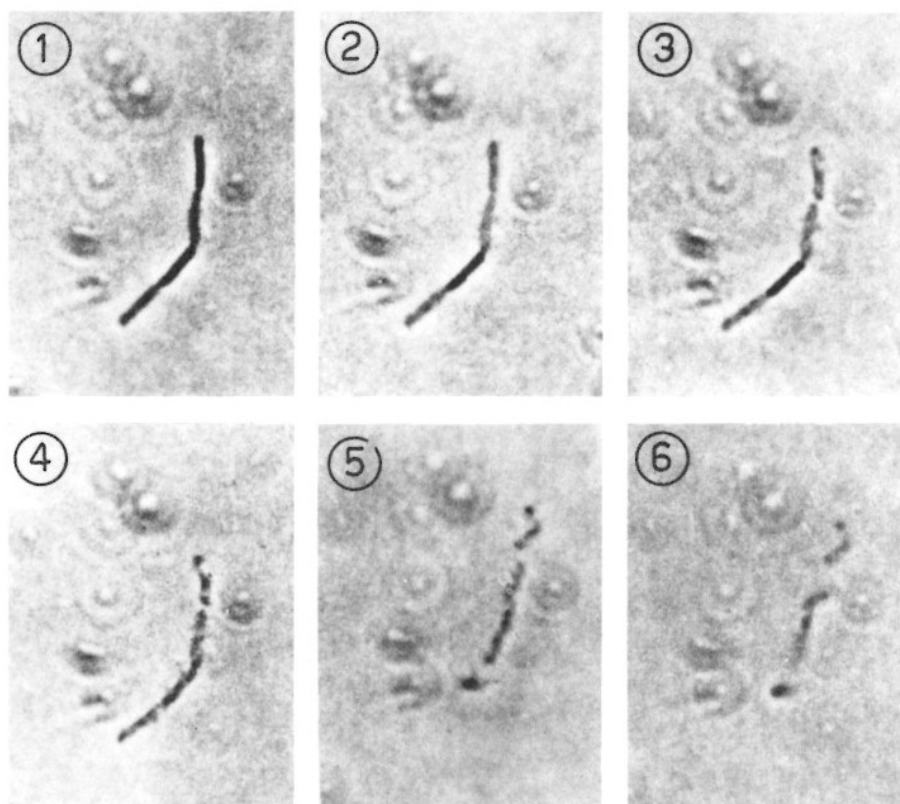


Fig. 3. - Invasione, chiarificazione e lisi di megateri parassitati dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).

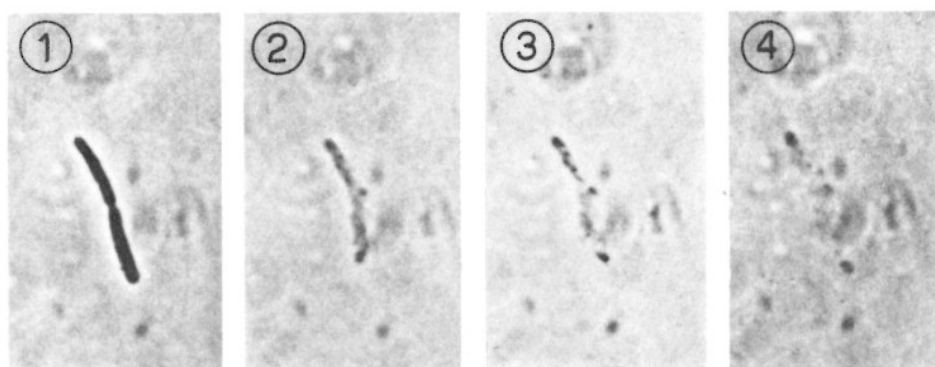


Fig. 4. - Invasione, chiarificazione e scoppio di due megateri parassitati dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).



Fig. 5. - « Bolla » che si spezza con fuoriuscita di fagi in un *Myc. minetti* parassitato dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).



Fig. 6. - Ingrossamento dell'intera estremità di un *Myc. minetti* invaso dal fago omologo e rottura della membrana nel punto di minor resistenza (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).



Fig. 7. - Estremità di un *Myc. minetti*, parassitato dal fago omologo, dopo la rottura della membrana (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).

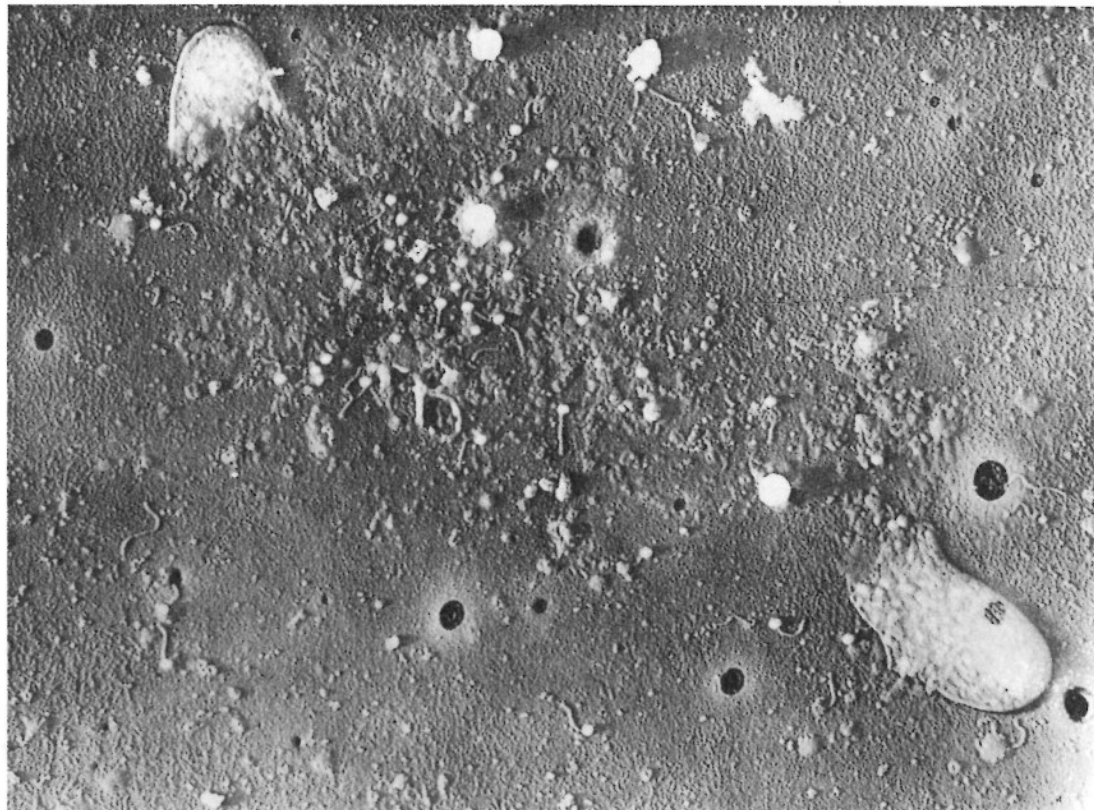


Fig. 8. - Scoppio di un *Myc. minetti* invaso dal fago omologo (per ulteriori spiegazioni vedi il testo).

Nel fotogramma n. 1 il germe in basso e a sinistra sembra sfuocato rispetto agli altri germi presenti, esso è invece in via di lisi fagica: ancora integro come conformazione generale, presenta il protoplasma profondamente alterato. Tutti gli altri germi presenti sono di aspetto perfettamente normale.

Nel fotogramma n. 2, il germe descritto poc'anzi si è incurvato a parentesi; nel suo interno si nota un granulo più scuro, mentre tutta la compagine batterica appare profondamente variegata e alterata. Evidenti modifiche si hanno anche nel gruppo centrale: il primo e il terzo germe sembrano ancora normali, il secondo e gli ultimi due si sono invece schiariti, hanno il protoplasma di aspetto non più uniforme, le pareti cellulari non sono più nette, il penultimo germe è rigonfio.

Anche i due batteri di destra si sono profondamente modificati, nel frattempo: il primo in alto presenta la porzione centrale dilatata a bulbo e chiara all'interno, mentre il germe in basso si è schiarito.

Nel fotogramma successivo (3) l'attacco fagico ha portato alla pratica distruzione del germe in basso a sinistra. Al centro, invece, il primo germe sembra ancora resistere, mentre il terzo comincia a presentare segni di sofferenza. Il secondo germe, dall'alto, si è ormai spezzato: si vede nettamente la linea di frattura al disotto di un granulino centrale più scuro. Anche i due germi di destra sono profondamente alterati: numerosi vacuoli sono disseminati nel loro interno.

Nel 4° fotogramma, tutti i germi sono ormai attaccati dai fagi: nel gruppo centrale il secondo germe ha una nuova linea di frattura, il frammento più basso si è spostato ed ha ruotato il proprio asse verso destra; il terzo germe presenta una diffusa vacuolizzazione interna. Gli ultimi due germi in basso, che nei fotogrammi precedenti erano arcuati verso destra, presentano adesso una curvatura verso sinistra.

Nel 5° fotogramma si ha una accentuazione dei caratteri descritti poc'anzi, mentre nel 6° si ha una netta evoluzione: il germe in basso e a sinistra praticamente non esiste più, non vi sono che delle ombre; il primo germe del gruppo centrale è ormai anch'esso in via di lisi, e piegato verso sinistra; il secondo è spezzettato e distrutto, gli altri in via di lisi più avanzata. I due del gruppo di destra si sono spostati e separati.

Nel fotogramma 7 si ha una forte accentuazione della curvatura del germe del gruppo centrale; i due in basso si sono spezzettati e i frammenti si sono disposti ad arco con curvatura verso l'alto.

Nell'ultimo fotogramma si ha uno spezzettamento generale dei germi, senza previo scoppio; i frammenti restano sul posto se pure spostati rispetto all'asse primitivo dei batteri integri.

Paragonando il primo fotogramma con l'ultimo si ha la netta visione del fenomeno ai suoi primordi e alla sua fine.

L'insieme delle fotografie dimostra come in uno stesso gruppo di germi, e usando lo stesso fago, l'evoluzione della lisi non proceda contemporaneamente per tutti gli individui presenti.

Esaminiamo adesso la figura n. 2. In essa si susseguono tre fotogrammi che illustrano le tre successive fasi della lisi fagica di un sol germe su tre presenti: il primo in basso. Nel primo fotogramma i tre germi sono di aspetto uniformemente normale, nel secondo fotogramma il primo germe in basso si presenta profondamente modificato: non è più compatto, non ha più margini netti, non è più cilindrico, il protoplasma è vacuolato, i margini sono irregolari, la forma è a clava, la grandezza è diminuita. Nel terzo fotogramma lo stesso germe si presenta arcuato, più chiaro che precedentemente, con vacuoli interni bene evidenti e più ampi e con materiale disorganizzato che sembra diffondersi nell'ambiente dalla porzione subterminale superiore del germe. Siamo di fronte a un fenomeno di lisi senza scoppio.

Nella terza figura, si vede ancora una volta il successivo evolversi del dramma fagico per una catenella di batteri, i cui singoli individui sono stati colpiti in fasi successive dal morbo virale. Nel primo fotogramma sono attaccati dai fagi solo il secondo germe dall'alto e il quarto; nel secondo fotogramma anche il primo è stato attaccato e il processo evolve in esso più rapidamente che negli altri, come si constaterà nel terzo fotogramma. Nel quarto tutti i germi sono stati colpiti; il primo dall'alto presenta al centro una tipica bolla, poi si ha uno scoppio parziale della catenella in alto e in basso: nel quinto fotogramma si vede infatti il primo germe in alto incurvarsi ad angolo e separarsi dal secondo, mentre dell'ultimo germe in basso non si vede più nulla se non un piccolo moncone insignificante. Lo scoppio di quest'ultimo germe ha prodotto tanta energia da spostare verso l'alto l'intera catenella batterica, fenomeno ben visibile nel 5° fotogramma ove si compari la posizione dei batteri con quella dei frustoli e delle bollicine presenti nel campo. Nel 6° fotogramma la catenella è praticamente distrutta. Non dimentichiamo che i vari fotogrammi, particolarmente quelli compresi tra i numeri 4 e 6 sono stati ripresi alla velocità di 400 al secondo.

A questa velocità è stato possibile fissare l'improvviso scoppio di due batteri che, in partenza, sembravano sani. Osservate la figura 4: nel primo fotogramma si hanno due germi di aspetto pressochè normale, l'unico sospetto che ci spinse a soffermarci su di essi con la camera da presa fu una loro minore compattezza del protoplasma. Improvvisamente i due germi si contrassero e si schiarirono irregolarmente, come

mostra il fotogramma 2; poi scoppiarono come si vede nel fotogramma 3, che ha colto la prima fase dello scoppio ultimatosi nel fotogramma 4, in cui si vedono gl'informi frammenti sparsi all'intorno, lungo l'asse occupato in origine dai due batteri, dei quali restano soltanto le due sole estremità superiore e inferiore. Questa sequela di avvenimenti è stata fissata dalla macchina da presa, ma non fu vista dall'occhio, giacchè la velocità della sequenza fu tale che l'occhio non vide che un improvviso scomparire dei due germi.

Desidero terminare l'illustrazione del lavoro ripubblicando alcune micrografie elettroniche che chiariscono alcuni punti di quanto è stato osservato al microscopio a contrasto di fase, micrografie che ci lasciarono a suo tempo incerti e perplessi, ma che oggi risultano chiare e facilmente inseribili nella cinetica della lisi fagica.

Nella figura 5 si vede, nella porzione centrale del germe, una « bolla » che si spezza; e così nella figura 6 in cui tutta una estremità batterica è tesa e ingrossata sino alla rottura del *locus minoris resistentiae*. Nella figura 7 si vede l'estremità di un batterio, estremità che doveva essere molto più ingrossata prima che la parete cellulare cedesse sul fianco destro, ciò lo si arguisce dalla parete opposta a quella dove si è formata la breccia, parete che appare nettamente afflosciata.

Per ultimo riproduco una micrografia che dà conto dello spostamento dei frammenti che si avvera durante lo scoppio, micrografia che ricalca esattamente quanto riproduce il quinto fotogramma della figura 4.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità. - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PENSO G.: « Symposium on interaction of viruses and cells ». - Supplemento ai Rendiconti Istituto Superiore di Sanità, Roma (1953), pag. 58.
(²) PENSO G. - Protoplasma, 45: 251 (1955).
-