

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

GIANFRANCO DONELLI

**Isolamento di un batteriofago di eccezionali  
dimensioni attivo su *B. megatherium***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.1, p. 95–97.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1968\\_8\\_44\\_1\\_95\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_1_95_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



**Biofisica.** — *Isolamento di un batteriofago di eccezionali dimensioni attivo su B. megatherium* (\*). Nota di GIANFRANCO DONELLI (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — (Isolation of a bacteriophage of exceptional dimensions active in *B. megatherium*). — The data relative to the isolation of a temperate bacteriophage of exceptional dimensions are given as well as the identification of the host bacterial strain. The results of an electron microscope investigation of the complex structure of this phage are also reported.

L'esistenza di una nuova forma fagica, di struttura e dimensioni insolite, è già stata in precedenza dimostrata [1] da osservazioni di microscopia elettronica, su alcuni lisati di fago  $\alpha$ . Le circostanze, che hanno inizialmente condotto alla osservazione di tali fagi di grandi dimensioni, erano tali da farli ritenere, in un primo tempo, ospiti dello stesso ceppo batterico su cui è attivo il fago  $\alpha$  [3].

Preparati arricchiti in fago G (« Gigante »), con opportune centrifugazioni differenziali, sono stati quindi utilizzati per saggiarne l'infettività nei confronti di tale ceppo.

Tuttavia occorre dire subito che, in queste prime prove, non si è mai riusciti ad ottenere un isolamento del fago G da  $\alpha$ , dato che:

a) non si osservavano mai aree litiche attribuibili al fago G (tentativi sono stati fatti variando temperatura, concentrazione batterica, terreno di cultura, spessore agar, ecc.);

b) metodi chimico-fisici (quali centrifugazione differenziale, centrifugazione all'equilibrio in gradiente di CsCl, filtrazione su filtri Millipore) non consentivano una purificazione assoluta;

c) trattamento con antisiero anti- $\alpha$  riduceva fortemente il titolo di  $\alpha$ , ma lasciava pur sempre una piccola frazione (1/10000) di  $\alpha$  attivi.

In queste condizioni, dato il vantaggio di  $\alpha$  come tempo di lisi e numero di scoppio, il grado di purificazione ottenuto era perso già dopo un primo ciclo di infezione e lisi.

Per lungo tempo quindi la definizione di G è rimasta esclusivamente morfologica, basata sulle osservazioni al microscopio elettronico.

(\*) Questo lavoro è stato eseguito nel quadro dell'attività svolta dai Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità con l'appoggio del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(\*\*) Laboratori di Fisica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

(\*\*\*) Nella seduta del 13 gennaio 1968.

Le ipotesi possibili per spiegare un tale comportamento erano:

- 1) che  $\alpha$  fosse necessario allo sviluppo di G;
- 2) che entrambi, essendo fagi temperati, si inducessero insieme;
- 3) che l'ospite abituale di G non fosse da identificare col « ceppo Parigi » (su cui è attivo il fago  $\alpha$ ).

Mentre la prima ipotesi non si poteva inizialmente escludere, la seconda ipotesi ha suggerito prove di cura del ceppo, presunto lisogeno, con forti dosi di U.V. Il ceppo curato avrebbe dovuto divenire sensibile all'infezione e dar luogo ad aree litiche. Questo risultato non si è ottenuto con nessuna dose (tra  $1/10^2$  e  $1/10^6$  di sopravvivenza). Per vagliare la terza ipotesi, si sono eseguiti tests di infettività (formazione di aree litiche) e inducibilità con U.V., su alcune centinaia di ceppi batterici isolati in natura: lo scopo era ovviamente quello di trovare un ceppo sporigeno aerobio su cui fosse attivo il fago G. Una attenta osservazione al microscopio elettronico aveva infatti mostrato alcuni batteri, in lisi da fago G (Tav. I, fig. 1), i cui caratteri morfologici e dimensionali indicavano l'ospite del fago come certo appartenente alla famiglia delle Bacillacee, composta appunto da specie batteriche sporigene. Non solo, ma date le condizioni ambientali in cui, pur casualmente, avveniva la lisi, la ricerca dell'ospite era stata ulteriormente ristretta al solo genere *Bacillus*, aerobio, escludendo le numerose forme anaerobie appartenenti alla stessa famiglia. Tutti i tentativi eseguiti in questo senso sono risultati negativi.

A questo punto, riesaminando le circostanze delle prime osservazioni di microscopia elettronica e i dati successivamente acquisiti, è stata formulata una nuova ipotesi di lavoro: che l'ospite del fago G fosse un contaminante di laboratorio, le cui spore presentassero una particolare resistenza ai normali procedimenti di sterilizzazione.

Rigorosi controlli in tal senso hanno permesso di isolare otto specie batteriche sporigene aerobie: tre nell'ambiente di lavoro e cinque nei recipienti contenenti l'estratto di carne usato per la preparazione del terreno culturale solido, utilizzato per la produzione del fago  $\alpha$ .

Tali ceppi sono stati saggiati sia per infezione con fago G, sia per induzione da U.V.: uno degli otto ceppi isolati ha dato risposta positiva con ambedue i tests.

Il fago G è quindi un batteriofago temperato il cui ospite è stato caratterizzato come « ceppo PGH » di *B. megatherium*; tale ceppo presenta caratteristiche molto diverse da quelle del « ceppo Parigi » ospite del fago  $\alpha$ .

L'isolamento del ceppo ospite ha permesso quindi la messa a punto di un metodo di produzione massiva, altamente purificata, del fago G.

Diretta conseguenza ne è stata la possibilità di portare avanti studi morfologici e strutturali, su base quantitativa, relativamente alla struttura di questi fagi, apparsa sin dall'inizio estremamente interessante. Sospensioni fagiche in tampone volatile mescolate con equal volume di una soluzione al 2% di fosfotungstato di potassio a pH 7,0, venivano distese su reticelle ricoperte da un sottile film di carbone; le reticelle venivano quindi esaminate e fotografate a  $80.000\times$ , con un microscopio elettronico Siemens Elmiskop I.

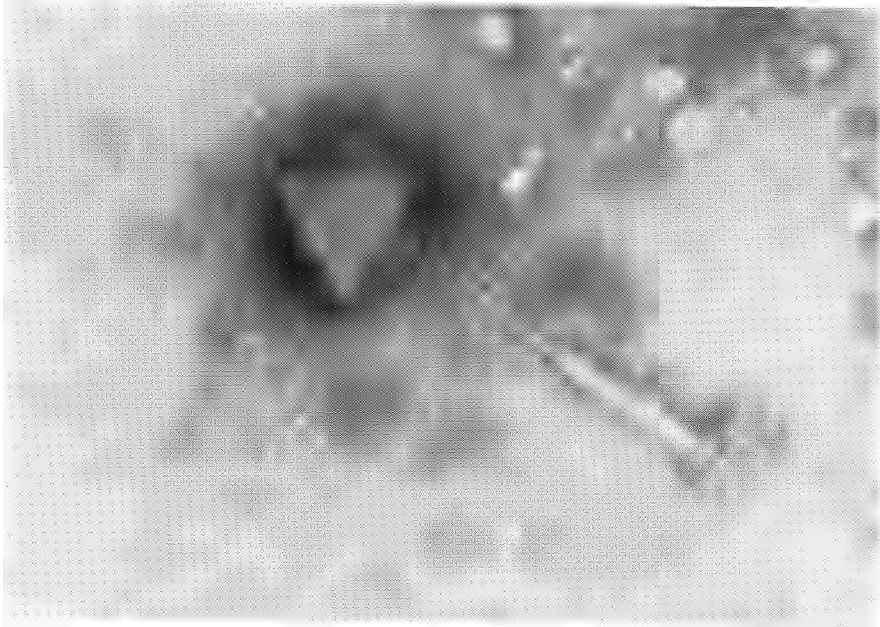


Fig. 1

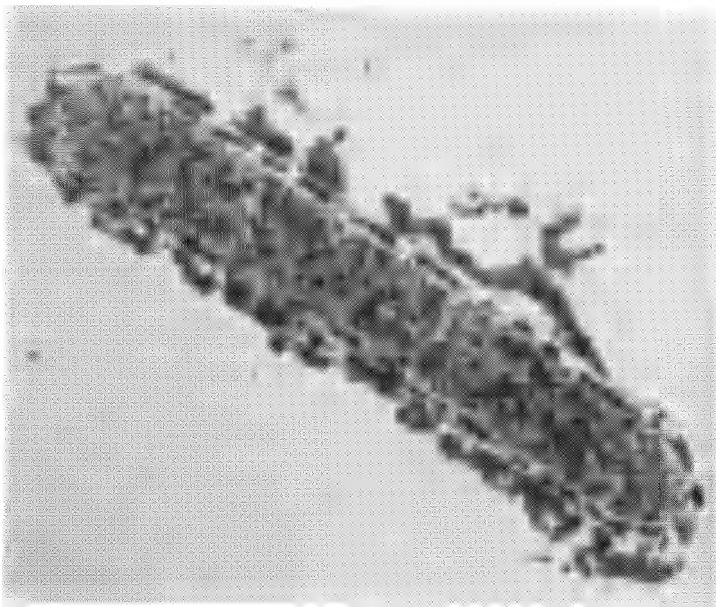


Fig. 2

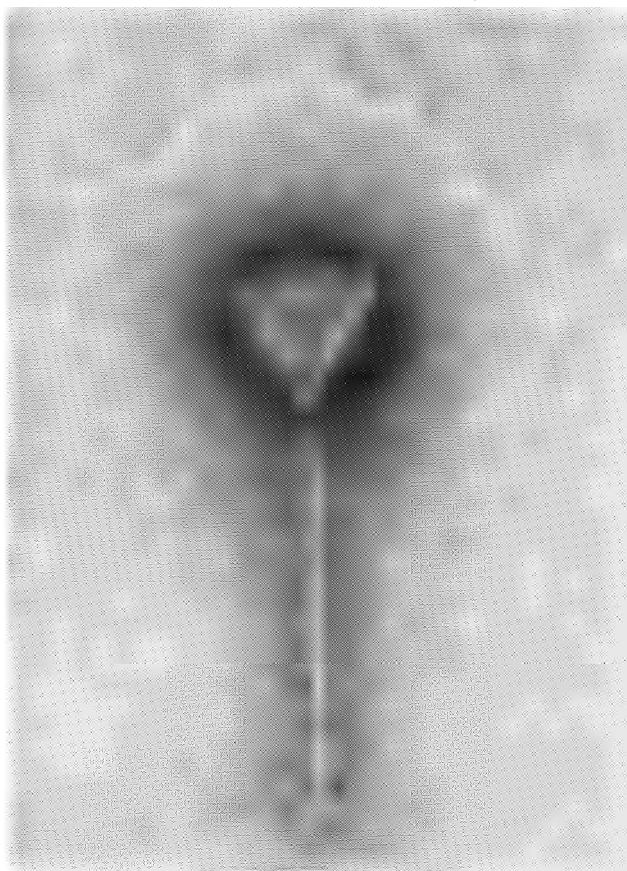


Fig. 1.



Fig. 2.

Le micrografie elettroniche mostrano particelle costituite da un capsido di forma geometrica ben definita e da una coda di complessa struttura (Tav. I, fig. 2). Per quanto riguarda la forma della testa, questa risulta sicuramenteottaedrica, con spigolo di circa  $1400 \text{ \AA}$ . Tutti i fagi osservati presentano capsidi con profilo nettamente esagonale in cui è inscritta una delle facce triangolari superiori (Tav. I, fig. 2) o inferiori (Tav. II, fig. 1), a seconda della faccia su cui si appoggia la particella.

Tale forma, sinora mai osservata per alcun virus, viene inoltre confermata:

a) da fotografie stereoscopiche (Tav. II, fig. 2);

b) da misure di lunghezza degli spigoli effettuate su di un centinaio di particelle fagiche; in particolare il rapporto medio tra il lato della faccia triangolare inscritta nell'esagono ed il lato dell'esagono stesso risulta essere, da misure eseguite con un analizzatore Zeiss di dimensioni delle particelle, pari a  $1,744 \pm 0,006$ , contro un rapporto teorico di  $1,732$ . Il valore sperimentale è compatibile quindi con l'ipotesi fatta [2], discostandosi dal valore teorico non più del doppio dello scarto quadratico medio.

La coda, lunga circa  $4000 \text{ \AA}$ , possiede una struttura chiaramente complessa: avvolta da una spirale per tutta la sua lunghezza, presenta inoltre una guaina contrattile, di struttura e periodicità ben definite, e termina con una placca ancora non chiaramente risolta nelle sue differenziazioni, ma che gioca senza dubbio un ruolo importante nell'attacco del fago alla superficie del batterio ospite.

La fig. 1 è un disegno schematico della probabile struttura del batteriofago G, con le dimensioni approssimative di alcuni suoi componenti principali.

Altre ricerche sono attualmente in corso per completare tali dati strutturali ed approfondire le proprietà fisico-chimiche dei componenti del fago, rivelatesi anch'esse di notevole interesse sin dai primi tentativi d'indagine.

Si ringraziano vivamente i sigg. Franco Tangucci e Mario Araco per la loro valida assistenza tecnica.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. FRONTALI e F. TANGUCCI, « Atti V Congr. Ital. Micr. Elettronica », Bologna, 114 (1965).
- [2] M. AGENO, « Suppl. Nuovo Cimento », 18, 166-175 (1960).
- [3] S. AURISICCHIO, A. CHIOZZOTTO, A. COPPO, P. DONINI, C. FRONTALI e F. GRAZIOSI, « Suppl. Nuovo Cimento », 18, 197-202 (1960).

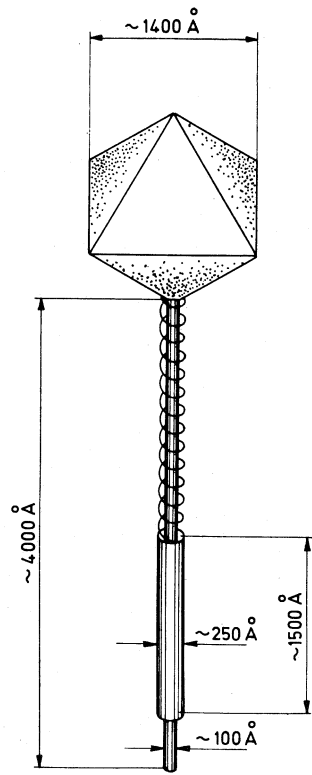


Fig. 1.