
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIUSEPPE VISICATO

Isolamento di ceppi batterici capaci di riprodursi su terreno carente di Magnesio

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.2, p. 253–258.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_2_253_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 ceppi batterici capaci di riprodursi su terreno carente di Magnesio* (*). Nota di GIUSEPPE VISICATO (**), presentata (***) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — (The isolation of bacterial strains able to grow in magnesium deficient medium). In this work the results about bacterial strains of *E. coli* BS^R 5 able to grow in Mg⁺⁺ concentration level of less than $4 \cdot 10^{-6}$ Moli/l are shown. Only one in 10^5 wild type bacterial are able to grow in this conditions. The isolation methods are described.

Molti recenti risultati sperimentali sembrano concordemente dimostrare la fondamentale importanza dello ione Mg⁺⁺ nei principali processi cellulari. È ad esempio ben noto che la concentrazione del magnesio rappresenta uno dei parametri importanti nella sintesi proteica. I processi di dissociazione e riassociazione dei ribosomi sembrano infatti dipendere in modo critico da tale concentrazione. Le particelle ribosomali di *E. coli* estratte col metodo di Tissieres-Watson [1] e caratterizzate dal coefficiente di sedimentazione 70 s [2-13], stabili *in vitro* a concentrazioni di Mg⁺⁺ 10^{-3} M, si associano formando dimeri con coefficiente di sedimentazione 100 s, quando la concentrazione di Mg⁺⁺ è portata a 10^{-2} M e si dissociano in due subunità con coefficienti di sedimentazione 30 s e 50 s quando la concentrazione di Mg⁺⁺ è abbassata a 10^{-4} M. Tutti questi processi di associazione e dissociazione *in vitro* sono reversibili. Altri lavori recenti sembrano dimostrare che il magnesio abbia un ruolo importante anche nella formazione dei complessi RNA messaggero-ribosoma-RNA solubile [14-24].

Infine, la funzione biologica del magnesio è stata anche studiata *in vivo* da vari Autori, esaminando il comportamento di culture batteriche in condizioni varie di carenza da magnesio [25-29]. Cellule di *E. coli* in fase esponenziale trasferite da un terreno completo ad un terreno carente da magnesio ed ivi incubate a 37° C, interrompono dopo poche ore la crescita e mostrano, dopo 24^h di aver perduto il 90 % dei loro ribosomi [25]. Se tuttavia si aggiunge magnesio alla cultura, le cellule ricostituiscono i ribosomi e dopo poche ore riprendono a crescere in modo normale [26].

Che la carenza di magnesio determini l'interruzione della crescita di una cultura batterica era del resto già stato ampiamente dimostrato per una vasta gamma di microorganismi [27-29]. La concentrazione optimum di Mg⁺⁺ ai fini della crescita batterica è risultata essere 10^{-3} M.

(*) 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. Ringrazio il sig. Antonio Araco per l'assistenza tecnica.

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

(***) Nella seduta del 10 febbraio 1968.

Tali risultati sembrano dunque indicare che il magnesio, nella forma di ione bivalente, sia indispensabile alla vita. È questo il punto che ci siamo proposti di mettere in chiaro, determinando se, in condizioni di estrema carenza di ioni magnesio, la riproduzione batterica risulti in ogni caso veramente del tutto arrestata. In questa Nota vogliamo dare un resoconto preliminare dei nostri esperimenti, che ci hanno, viceversa, portato all'isolamento di un certo numero di ceppi batterici capaci di riprodursi in modo apparentemente normale anche su terreno estremamente povero di magnesio.

Ci siamo serviti del ceppo di *E. coli* BSR 5. Il terreno completo da noi usato [25] contiene $2,4 \cdot 10^{-3}$ g/l di $MgSO_4$, corrispondente a 10^{-3} moli/l. Per realizzare un terreno esente da magnesio, abbiamo soppresso questo costituente, lasciando inalterate le proporzioni degli altri. Inoltre, abbiamo fatto uso di componenti puri per analisi, di ciascuno dei quali fosse dato un limite superiore per il suo contenuto in Mg^{++} . Possiamo pertanto dire che il contenuto in Mg^{++} del terreno che chiameremo d'ora in poi brevemente « esente da Mg^{++} » era non superiore a $4 \cdot 10^{-6}$ moli/l. Aggiungiamo che il contenuto effettivo è risultato inferiore alla sensibilità del metodo d'analisi colorimetrica di Young e Gill [28].

Usando per gli inoculi i batteri prelevati da una cultura di *E. coli* BSR 5 su terreno normale, abbiamo in diverse riprese realizzato cinque culture su terreno carente da magnesio. Tutte e cinque le culture si sono regolarmente sviluppate, raggiungendo tuttavia la fase stazionaria a concentrazioni batteriche relativamente basse. I dati relativi sono raccolti nella Tabella I.

TABELLA I.

Prima serie di culture di E. coli BSR 5 su terreno esente da Mg^{++} .

CULTURA	Volume	Inoculo n. batteri	n. totale finale batteri
1 ^a	50 ml	$6 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^8$
2 ^a	100 ml	$6,4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^9$
3 ^a	100 ml	$6,4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^9$
4 ^a	500 ml	10^5	10^{10}
5 ^a	500 ml	10^5	10^{10}

Queste culture hanno sostanzialmente confermato i precedenti risultati di altri Autori. I batteri si moltiplicano per un certo tempo anche su terreno carente da magnesio, ma a un certo punto la moltiplicazione si arresta. Che il magnesio sia un fattore limitante è chiaro. Con l'inoculo si immette nella cultura una certa quantità di magnesio che permette in un primo tempo la

moltiplicazione. È da ritenersi che questa si arresti quando tutto il magnesio disponibile è stato effettivamente utilizzato dai batteri.

Abbiamo tuttavia ritenuto che l'arresto della moltiplicazione batterica nelle nostre colture non fosse una prova sufficiente della indispensabilità del magnesio ai fini della vita. Se infatti solo qualcuno dei batteri (eventualmente un mutante) avesse mantenuto la capacità di moltiplicarsi, sarebbe stato assai difficile accorgersene. Pertanto, abbiamo usato i batteri delle culture della Tabella I per gli inoculi di una seconda serie di cultura sempre su terreno carente da magnesio. In queste nuove culture, la quantità di magnesio introdotta con l'inoculo risultava del tutto trascurabile.

In diverse riprese, abbiamo avviato in totale 247 culture e, come ci attendevamo, la maggior parte di esse non si è minimamente sviluppata, neppure in tempi dell'ordine di tre-quattro giorni. Tuttavia, 10 di esse, dopo un tempo dell'ordine di 30-40 ore hanno preso a svilupparsi regolarmente, giungendo alla fase stazionaria in un tempo e a concentrazioni non molto diverse da quella delle culture normali. La Tabella II riassume i dati relativi a questa seconda serie di culture.

TABELLA II.

Seconda serie di culture di E. coli BSR 5 su terreno esente da Mg⁺⁺.

PROVA	n. delle culture	ciascuna ml	Inoculo n. totale batteri	n. delle culture sviluppate	n. finale totale di batteri
1 ^a	1	50	$7 \cdot 10^3$	1	
2 ^a	1	100	$4 \cdot 10^4$	1	
3 ^a	5	100	$5 \cdot 10^4$	—	
4 ^a	100	5	$2 \cdot 10^5$	2	
5 ^a	140	5	$4 \cdot 10^5$	6	
Totale . . .	247		$7 \cdot 10^5$	10	

Se si ammette che ciascuna delle 10 culture che si sono sviluppate derivi da un singolo batterio capace di riprodursi su terreno carente da magnesio, la frequenza dei batteri dotati di tale capacità in culture di *E. coli* BSR 5 risulterebbe pari a $1,4 \cdot 10^{-5}$, dato questo compatibile con le normali frequenze di mutazione. Inoltre, se si ammette una distribuzione poissoniana dei batteri capaci di moltiplicarsi, la probabilità che una delle nostre 10 culture sia dovuta a più di un batterio iniziale risulta dell'ordine di 10^{-3} , mentre la probabilità che una cultura si sviluppi, contenendo almeno un batterio capace di multi-

plicarsi risulta dell'ordine di $4 \cdot 10^{-2}$. Ciò giustifica l'ipotesi iniziale che ciascuna delle 10 culture selezionate sia originata da un singolo batterio. I tempi di attesa perché divenga misurabile l'aumento della densità ottica della cultura sono compatibili con l'ipotesi che ciascuna cultura derivi da un unico batterio dell'inoculo.

La fig. 1 mostra l'andamento delle successive curve di crescita ottenute ciascuna partendo da un inoculo prelevato dalla cultura precedente. La curva 0 è una curva di crescita di *E. coli* B SR 5 su terreno completo (tempo di duplicazione 60^m). Dalla relativa cultura è stato prelevato un inoculo che è stato

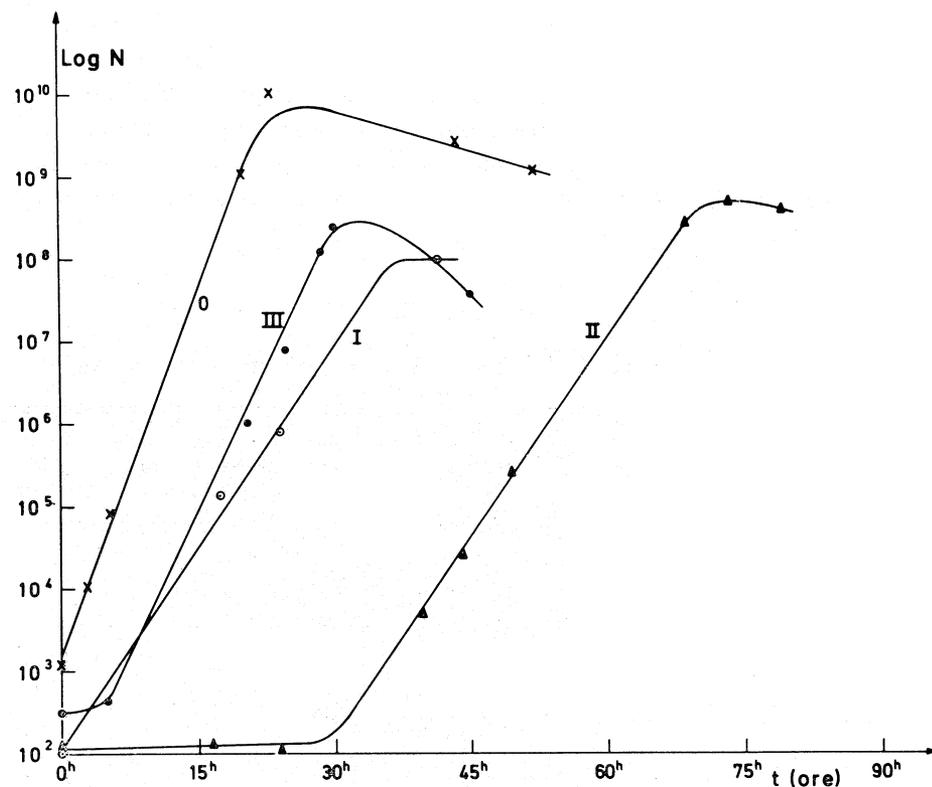


Fig. 1.

fatto crescere su terreno privo di Mg^{++} . La curva di crescita ottenuta è la curva I. Un inoculo prelevato da questa seconda cultura è stato nuovamente fatto crescere su terreno privo di Mg^{++} e la relativa curva di crescita è la curva II. Come si vede si ha un apparente lag di circa 30^h , dopo di che la crescita avviene regolarmente con tempo di duplicazione di circa un'ora e mezza. Da questa terza cultura è stato nuovamente prelevato un inoculo che è stato fatto sempre crescere su terreno privo di Mg^{++} . La curva di crescita relativa (curva III) non mostra praticamente lag. Sono stati eseguiti in seguito numerosi altri successivi trapianti su terreno esente da Mg^{++} e le relative curve di crescita hanno sempre mostrato queste stesse caratteristiche.

Ci siamo quindi proposti di accertare se le capacità dei batteri dei 10 ceppi selezionati, di vivere e moltiplicarsi su terreno privo di Mg^{++} , corrispondesse a un carattere ereditario o fosse semplicemente un adattamento delle cellule batteriche alle nuove condizioni ambientali.

A questo scopo i batteri di uno dei ceppi selezionati, sono stati fatti crescere su terreno completo, trapiantando alla fine di ogni curva di crescita un inoculo su nuovo terreno pure completo. In fig. 2 sono mostrate cinque di queste curve di crescita consecutive.

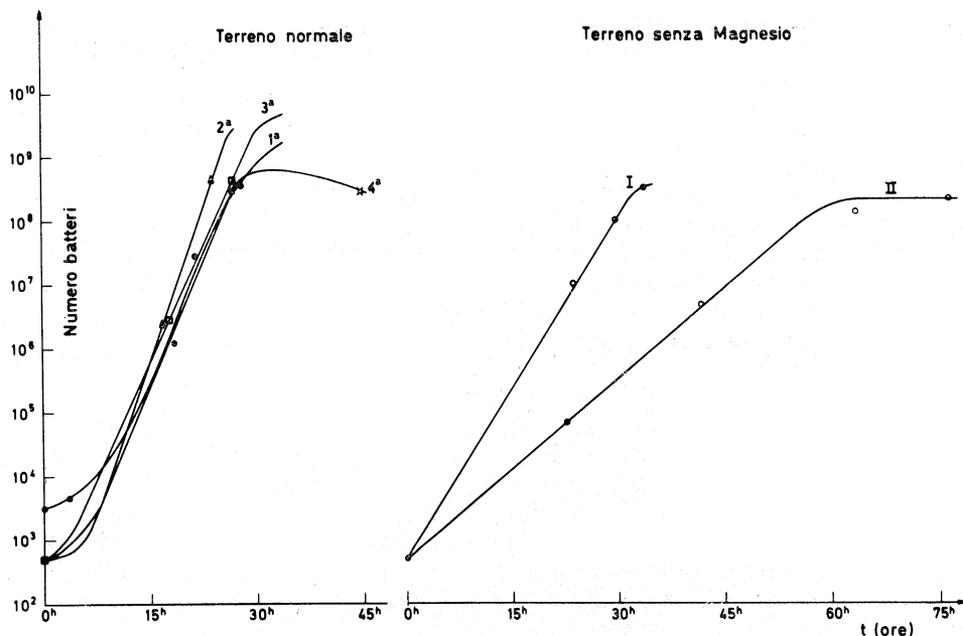


Fig. 2.

Fig. 3.

All'inizio della fase stazionaria della 5^a curva di crescita su terreno completo, un inoculo è stato poi trapiantato su terreno privo di magnesio. Si è ottenuta una curva di crescita normale (curva I Mg^- di fig. 3) e un successivo trapianto sempre su terreno privo di magnesio ha dato luogo a curve di crescita senza lag, il che dimostra che i batteri discendenti dal ceppo selezionato, pur essendosi lungamente moltiplicati su terreno normale, non hanno perduto la capacità di svilupparsi su terreno privo di magnesio.

Da questa e altre analoghe esperienze eseguite su altri ceppi, ci sembra quindi di poter concludere che i dieci ceppi da noi selezionati corrispondono molto probabilmente a mutanti di *E. coli* B SR 5. Sono attualmente in corso esperienze dirette a caratterizzare meglio questi ceppi e a studiarne le proprietà e caratteristiche sia strutturali sia funzionali.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. S. SPIRIN, *Macromolecular Sstructure of RNA*-Reinhold. N.Y. (1964).
- [2] M. PETERMANN, *The Physical & Chemical Properties of Ribosomes*. Elsevier (1964).
- [3] S. OSAWA, *Biosynthesis of Ribosomes in Bacterial Cells*, in « Prog. Nucl. Acid Research & Mol. Biol. », 4, 161 (1965).
- [4] P. TS'O, J. BONNER e J. VINOGRAD, « Journ. Bioph. Bioch. Cytol. », 46, 1450 (1956).
- [5] S. BRENNER e R. W. HORNE, « BBA », 34, 103 (1959).
- [6] I. ENDELMANN, P. TS'O e J. VINOGRAD, « BBA », 43, 393 (1960).
- [7] A. TISSIERES e J. D. WATSON, « Nature », 182, 778 (1958).
- [8] A. TISSIERES, J. D. WATSON e D. SCHLESSINGER & HOLLINGWORTH, « J.M.B. », 1, 221 (1959).
- [9] H. E. HUXELEY, G. ZUBAY, « J.M.B. », 2, 10 (1960).
- [10] B. HALL, « Journ. Bioph. Bioch. Cyt. », 1, 1 (1955).
- [11] A. GOLDBERG, « J.M.B. », 15, 663 (1966).
- [12] Y. CHOI e C. W. CARR, « J.M.B. », 25, 331 (1967).
- [13] GROSS et AL., « Nature », 190, 581 (1961).
- [14] S. BRENNER, E. JACOB e M. MESELSON, « Nature », 190, 576 (1961).
- [15] M. TAKANOMI e T. OKAMOTO, « J.M.B. », 7, 360 (1963).
- [16] M. CANNON, R. KRUG e W. GILBERT, « J.M.B. », 7, 360 (1963).
- [17] W. GILBERT, « J.M.B. », 6, 374 (1963).
- [18] D. SCHLESSINGER e GROS, « J.M.B. », 7, 150 (1963).
- [19] J. MARCOT-QUEIROZ e R. MONIER, « J.M.B. », 14, 490 (1965).
- [20] M. REVEL e H. HIATT, « J.M.B. », 11, 467 (1965).
- [21] D. ELSON, « BBA », 61, 460 (1962).
- [22] D. ELSON, « BBA », 80, 379 (1964).
- [23] J. D. WATSON, « Science », 117, 140 (1963).
- [24] C. LEVINTHAL, FAN, HIGA e ZIMMERMANN, « Cold Spring Harbor Symp. », 28, 183 (1963).
- [25] B. J. MC-CARTHY, « BBA », 55, 880 (1962).
- [26] H. SUZUKI e Y. HAYASHI, « BBA », 87, 610 (1964).
- [27] M. WEBB, « Science », 118, 607 (1953).
- [28] YOUNG e GILL, « Anal. Chemistry », 23, 751 (1951).
- [29] R. C. JOHNSON e D. GARY, « Journ. of Bact. », 85, 983 (1963).