
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANGELO PISTOLA, GIORGIO TECCE, GIOVANNA VITALI

Isolamento di mutanti asporigeni di *Bacillus thuringiensis* ottenuti mediante bromuro di etidio

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.2, p. 293–298.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_2_293_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/>

Biologia molecolare. — *Isolamento di mutanti asporigeni di Bacillus thuringiensis ottenuti mediante bromuro di etidio.* Nota di ANGELO PISTOLA, GIORGIO TECCE e GIOVANNA VITALI, presentata (*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — AcrySTALLIFEROUS and asporigenous mutants of *Bacillus thuringiensis* were induced by ethidium bromide; the morphology of their colonies was altered. The high percentage of mutant colonies obtained suggests that mutations induced by ethidium bromide involve some genetic extrachromosomal determinants.

The wild-type and the mutant strain DNAs were studied in the analytical centrifuge. The results showed that the DNA of *B. thuringiensis* has a G+C content of about 39% whereas no density difference exists between the sporeforming and the asporigenous bacteria.

Bacillus thuringiensis è un bacillo che nel corso del processo di sporificazione produce un grosso cristallo proteico che precede la formazione della spora stessa. Tutto ciò suggerisce la possibilità che vi sia un fenomeno di ridondanza o di amplificazione genica o, alternativamente, qualche meccanismo di regolazione per la produzione di proteine specifiche in così notevole quantità. Lo studio di questo bacillo può quindi fornire utili informazioni sui vari aspetti del processo di sporificazione in *Eubacteria*.

La genetica della sporulazione nei batteri ha avuto soprattutto negli ultimi anni un notevole sviluppo [1, 2]. Alcuni Autori hanno avanzato l'ipotesi che tutta o parte dell'informazione genetica relativa alla sporulazione possa essere trasportata da un plasmidio o da un episoma che si integra durante la germinazione delle spore e che diventa autonomo qualora si realizzino condizioni ambientali che determinano la sporificazione. Le difficoltà incontrate per dimostrare questa ipotesi sono state notevoli tanto che alcuni Autori negano una eventualità del genere [3]. In questa pubblicazione riferiamo sull'isolamento di mutanti di *Bacillus thuringiensis* che non sporificano, ottenuti mediante l'impiego di bromuro di etidio (EB) che si lega in modo preferenziale al DNA dei plasmidi e che viene pertanto utilizzato per provocare la perdita di questi elementi extracromosomiali.

MATERIALI E METODI

Bacillus thuringiensis, ceppo 13337 ATCC è stato gentilmente fornito dal prof. Aristide Carilli dell'Istituto Superiore di Sanità.

Terreni di coltura. Il ceppo era coltivato a 37°C in brodo Difco con il 0,2 % di glucosio (terreno A). Per la coltivazione in piastre, si usava il terreno

(*) Nella seduta del 10 febbraio 1973.

così composto: 20 gr di Agar Difco, 8 gr di brodo Difco e 2 gr di glucosio per litro (terreno B). Per la sporificazione era aggiunto al terreno B MnCl_2 10^{-5} M (terreno C). Glucosio e cloruro di manganese erano sterilizzati a parte. Il bromuro di etidio (Calbiochem) era sterilizzato con filtri Millipore GSW.

Preparazione del DNA. Le cellule batteriche coltivate su terreno A erano lavate e sospese nel terreno di coltura descritto da Young e Spizizen: 14 gr K_2HPO_4 , 6 gr KH_2PO_4 , 2 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gr di citrato sodico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 gr glucosio (sterilizzato a parte), 0,005 gr di L-triptofano, 0,1 di idrolisato acido di caseina, 0,01 M MgSO_4 , 0,0001 M EDTA, 0,5 M saccarosio, pH7. Alla sospensione era aggiunto lisozima (Sigma grade 1, 3 volte cristallizzato) 1 mg/ml per 30 min a 30°C. I protoplasti venivano centrifugati e risospesi in EDTA salino. Il DNA veniva preparato secondo il metodo Marmur semplificato. Ai protoplasti sospesi in EDTA veniva aggiunto SDS e perclorato di sodio. Venivano eseguite due estrazioni con cloroformio alcool isoamilico, un trattamento con RNAsi (Worthington) (50 γ /ml) per 30 min a 30°C e pronasi (Sigma) nelle stesse condizioni e due successive estrazioni con cloroformio e alcool isoamilico. Il DNA era sciolto e conservato in SSC.

Gradiente di densità in CsCl. 5 γ di DNA erano centrifugati in gradiente di densità di CsCl. Indice di rifrazione iniziale 1,3990. La centrifugazione in ultracentrifuga analitica Beckman mod. E veniva eseguita per 24 h a 44771 rpm. Per riferimento veniva usato il DNA di *Serratia marcescens* ($\rho = 1,718$ gr/ml).

Centrifugazione preparativa in gradiente di densità di CsCl in presenza di bromuro di etidio. Circa 100 γ di DNA marcato con timidina metil ^3H e con timidina-2- ^{14}C erano diluiti con 4 ml di SSC. Veniva aggiunto EB alla concentrazione finale 100 γ /ml. Successivamente veniva aggiunto CsCl solido fino ad ottenere un indice di rifrazione di 1,3940. La centrifugazione era condotta in ultracentrifuga preparativa Spinco L2-65B con rotore Beckman tipo 65 per 43 h a 43000 rpm.

RISULTATI

Isolamento mutanti. Per l'isolamento dei mutanti asporigeni il ceppo 13337 ATCC di *B. thuringiensis* era trattato con EB. L'azione del bromuro di etidio era saggiata su cellule in crescita esponenziale. Una coltura in fase esponenziale era seminata (circa 10 cellule/ml) in terreno A contenente EB alla concentrazione di 0,01-0,05-0,1-0,2-0,5-1-1,5 γ /ml. La coltura era mantenuta a 37°C su bagnomaria con piano oscillante. Dopo 24 h le cellule cresciute erano seminate in piastre su terreno C. Dopo 48 h a 30°C le colonie cresciute non si discostavano per il loro aspetto da quella del ceppo non trattato e contenevano cellule con spore e cristalli.

L'azione dell'EB è stata anche saggiata su terreno agarizzato. Cellule vegetative di *B. thuringiensis* erano seminate su terreno C contenente concen-

trazioni crescenti di EB. Nel grafico di fig. 1 è riportato il numero di colonie cresciute in funzione della concentrazione di EB. Dopo 48 h a 37° C le colonie presentano una morfologia particolare: dimensioni ridotte rispetto a quelle che derivano dal ceppo non trattato e a contorno frastagliato. La formazione delle spore e dei cristalli è fortemente ritardata e si ha dopo circa 15 giorni ma interessa soltanto una piccola frazione delle cellule di cui sono formate le colonie.

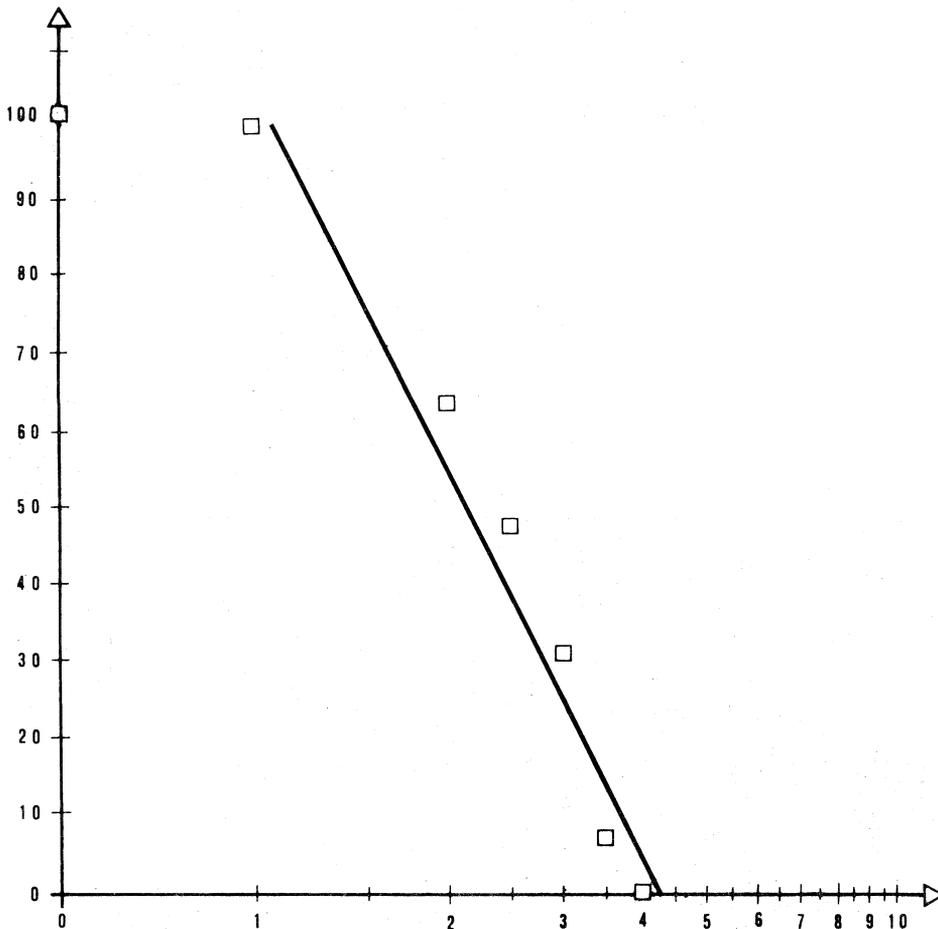


Fig. 1. - Numero di colonie cresciute in presenza di concentrazioni crescenti di EB a 37° C. In ordinate il numero di colonie cresciute dopo 72 h e in ascisse la concentrazione (γ/cc) di EB.

20 colonie cresciute su 2,5 γ/ml di EB (concentrazione alla quale circa il 50% delle cellule seminate formano colonie) venivano risospese in altrettante provette contenenti brodo. Ognuna di queste sospensioni veniva piastrata su terreno C. Dopo 48 h di crescita a 37° C le colonie venivano esaminate per la loro morfologia e per la loro capacità di formare spore e cristalli.

Circa l'88% delle colonie presentano una morfologia normale e formano spore e cristalli. Il 12% delle colonie si presentano traslucide, di minore

spessore e sono asporigene e acristallifere, e conservano queste caratteristiche dopo successivi passaggi su terreno privo di EB. Passaggi intermedi su terreno A non modificano il loro comportamento.

Caratterizzazione del DNA. Il DNA delle cellule sporigene e asporigene era estratto e purificato come descritto precedentemente. La densità del DNA del ceppo 13337 ATCC in gradiente di densità di cloruro di cesio è $\rho = 1,698 \text{ g/cm}^3$ corrispondente a un contenuto di G+C del 39%. L'analisi di uno dei mutanti asporigeni da noi isolati (mutante T72) dà un valore di $1,699 \text{ gr/cm}^3$, non significativamente diverso dal ceppo selvaggio.

Al fine di evidenziare un'eventuale eterogeneità della preparazione del DNA ottenuto dal *wild type* e dal mutante T72 si è proceduto alla ultracentrifugazione del DNA in presenza di EB. I risultati sono riportati nel grafico di fig. 2. I profili delle due curve relative al DNA del wild type (^{14}C) e del mutante (^3H) sono sostanzialmente coincidenti.

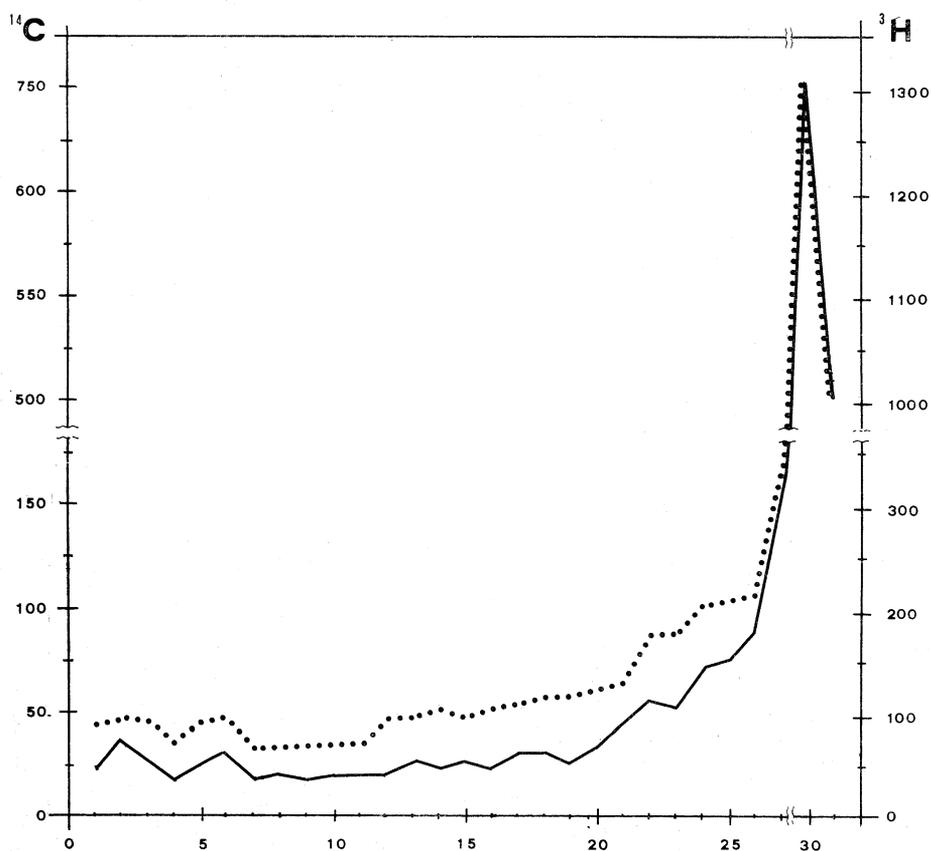


Fig. 2. - Profili di sedimentazione in CsCl del DNA di *B. thuringiensis* 13337 e del mutante T72. Il ceppo selvaggio era cresciuto in presenza di Timidina 2- ^{14}C , il mutante in presenza di Timidina metil- ^3H . Il DNA estratto e purificato era centrifugato in presenza di EB. In ordinate il numero di colpi per minuto, in ascisse il numero di frazioni. ····· DNA *B. thuringiensis* 13337; — DNA *B. thuringiensis* T72.

Dopo la scoperta del fattore sessuale F in *E. coli* sono stati individuati nelle cellule batteriche un gran numero di plasmidi responsabili in particolare della resistenza agli antibiotici, colicine, ioni inorganici, raggi UV e batteriofagi nonchè la produzione di tossine [4]. Per alcuni di questi plasmidi (episomi) è stata dimostrata la capacità di integrarsi nel cromosoma batterico. Il DNA corrispondente a un certo numero di differenti plasmidi è stato isolato con vari metodi ed esaminato al microscopio elettronico. Senza eccezione, esso risulta nella configurazione di duplex circolari chiusi. Generalmente il DNA dei plasmidi ha una composizione in basi simile o identica a quella del cromosoma batterico. Per la sua separazione alcuni metodi si avvantaggiano della capacità differenziale che hanno coloranti come l'EB, di legarsi alle supereliche rispetto alle forme di DNA lineari o circolari aperte. L'unione di questi coloranti determina infatti un diverso comportamento del DNA plasmidico in gradienti di densità di cloruro di cesio. La capacità di EB di legarsi al DNA plasmidico è anche utilizzata frequentemente per cercare di indurre la perdita in cellule microbiche, di questi elementi genetici extracromosomiali.

La maggior parte dei geni che controllano la sporificazione sono localizzati nel cromosoma batterico e secondo alcuni Autori è da escludere che l'informazione genetica, relativa a tutte le funzioni che si ritengono fondamentali per la sporificazione, sia presente in un episoma [3]. Tuttavia Takahashi [5] ha riportato l'isolamento di *B. subtilis*, con una grande delezione, incapace di formare ricombinanti Sp⁺ quando usato come donatore in esperimenti di transduzione con mutanti puntiformi Sp⁺ che mappano in varie regioni del genoma. Secondo l'autore questi risultati possono essere spiegati assumendo che la delezione è localizzata in un determinante extracromosomico.

La genetica del *B. thuringiensis* è pressochè sconosciuta. Tuttavia, come abbiamo detto, questo microrganismo presenta caratteristiche tali da suggerire il suo impiego per studi sul processo di sporificazione nei batteri. Infatti, oltre alla formazione di una spora ovale, subterminale, il bacillo produce un cristallo proteico, che costituisce circa il 30 % in peso dello sporangio maturo ed esplica un'azione tossica sulle larve di lepidotteri. La formazione del cristallo avviene durante le prime fasi della sporificazione ed è costituito da polipeptidi (uno dei quali, in base a studi elettroforetici, risulta in comune con la spora). È stata anche rilevata una parziale omologia antigenica tra spora e cristallo. Sebbene siano stati trovati mutanti acristalliferi e mutanti asporigeni e acristalliferi, non sono stati ancora descritti mutanti asporigeni ma capaci di formare cristalli [6]. I meccanismi di sporificazione e di formazione del cristallo sono dunque almeno in parte correlati (e data la notevole quantità di proteina-cristallo, si può ipotizzare una forma di ridondanza o di amplificazione genica o qualche particolare meccanismo di regolazione).

I nostri mutanti sono sia asporigeni che acristalliferi, in accordo dunque con quanto osservato da altri Autori con altri metodi. Il numero elevato di questi mutanti che si ottengono per azione del bromuro di etidio sembrerebbe indicare una perdita di determinanti genetici extracromosomiali. L'elevato

numero di colonie non sporigene e acristallifere che si ottengono non sembra essere in accordo con mutazioni a carico del cromosoma. Allo stato attuale delle nostre ricerche non siamo in grado di stabilire a quale livello sia avvenuto il blocco della formazione della spora e del cristallo anche se appare probabile che si tratti di un evento abbastanza importante per questo processo in quanto porta alla scomparsa di entrambe le formazioni cellulari.

Non siamo in grado di spiegare la differenza di comportamento del ceppo di *B. thuringiensis* nei riguardi del BE, cioè la formazione di mutanti soltanto quando il ceppo è seminato su terreno solido. Può tuttavia essere avanzata l'ipotesi che vi possa essere un passaggio di plasmidi tra le cellule, facilitato dalla crescita in terreno liquido. Il tentativo di identificare una frazione di DNA plasmidico nel ceppo selvaggio di *B. thuringiensis* è stato negativo, ma ciò non è necessariamente in contrasto con gli altri risultati in quanto tale DNA potrebbe essere presente in piccola quantità.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. S. HANSOW, J. A. PETERSON e A. A. YANSTEN, «Ann. Rev. of Microbiol.», 24, 53 (1970).
- [2] P. SHAEFFER, «Bacteriol. Rev.», 33, 48 (1969).
- [3] F. JACOB, P. SHAEFFER e E. L. WOLLMAN, In *Episomic Elements in Bacteria*, «Symp. Soc. Gen. Microbiol.», 10, 67 (1960).
- [4] R. P. NOVICK, «Bacteriol. Rev.», 33, 210 (1969).
- [5] I. TAKAHASHI, citato nella bibliografia di (1).
- [6] M. H. MARTIN e A. A. YOUSSTEN, «Ann. Rev. of Microbiol.», 23, 357 (1969).