
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO, MARIA ANTONIETTA MATRICCIANI

Interazioni tra batteri in coltura liquida

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 77 (1984), n.5, p. 205–212.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1984_8_77_5_205_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. — *Interazioni tra batteri in coltura liquida* (*). Nota di MARIO AGENO e MARIA ANTONIETTA MATRICCIANI, presentata (**) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — Experiments carried out with motile bacteria in liquid culture show that bacteria interact through the growth medium by increasing the mean distance between two neighbouring bacteria. This interaction which has the same macroscopic effect as a repulsive force is a consequence of bacterial chemotaxis.

Perhaps, it can explain the reason why prokaryotic cells have never engendered multicellular organisms, which, on the other hand, appeared on the Earth immediately after the eukaryotic cell.

1. INTRODUZIONE

Sulla base delle testimonianze superstiti trovate nei più antichi strati sedimentari, si valuta, com'è ben noto, che le prime forme di vita siano apparse sulla Terra attorno a quattro miliardi di anni fa [1]. Da questi organismi primitivi, di cui per ora possiamo solo ipotizzare che fossero unicellulari eterotrofi [2], si devono essere rapidamente evoluti quegli unicellulari di tipo procariotico, che per quasi 3 miliardi di anni sono stati gli unici inquilini del nostro pianeta. Ricerche a largo raggio, estese praticamente a tutti i continenti [3] hanno infatti dimostrato che solo a partire da circa 1,4 miliardi di anni fa qualche cosa di nuovo appare tra le tracce fossili di questi unicellulari: accurate statistiche rivelano che a quest'epoca incominciano ad apparire anche tracce di cellule di dimensioni maggiori, e poco dopo, attorno a forse un miliardo di anni fa, compaiono negli strati sedimentari le prime tracce attribuibili a cellule eucariotiche. Subito dopo (in termini geologici) fanno la loro comparsa i primi organismi multicellulari e ha inizio la grande e tumultuosa radiazione che porterà all'inizio del Fanerozoico.

Tutto ciò suggerisce due domande importanti. Come mai le cellule eucariotiche hanno tanto tardato a fare la loro comparsa, lasciando che il regno dei procarioti si estendesse per ben tre quarti dell'intero tempo di presenza della vita sulla Terra? E poi, come mai, mentre le cellule eucariotiche hanno inventato

(*) La ricerca è stata in parte finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato per la Fisica.

(**) Nella seduta del 24 novembre 1984.

praticamente subito la multicellularità, i procarioti, che pur hanno fatto tutte le altre invenzioni fondamentali per la comparsa di organismi più evoluti, dalla fotosintesi al parassitismo, dalla motilità stocastica al metabolismo ossidativo e alla predazione, non sono mai riusciti a realizzare (se non in forme embrionali [4]) una divisione del lavoro e una cooperazione tra più cellule?

La risposta alla prima domanda è abbastanza facile. Se si esamina con attenzione ciò che si sa dell'evoluzione della Terra e della contemporanea evoluzione della vita sulla Terra, ci si rende conto che le due sono strettamente interconnesse e che ciò che ne ha fissato i tempi non è stata mai la più o meno piccola probabilità dei singoli eventi fondamentali, punti di svolta dell'evoluzione biologica, ma *il più lento ritmo delle trasformazioni irreversibili dell'ambiente terrestre* [2]. Di tale argomento, comunque, non intendiamo occuparci in questa sede.

Ci proponiamo invece di cercare di dare una risposta alla seconda domanda. Una collaborazione tra due cellule dello stesso tipo, libere in un mezzo liquido, si può evidentemente avviare a seguito dello scambio di « segnali », che in qualche modo determinino un'aggregazione delle cellule stesse e un coordinamento tra i relativi processi interni: i segnali non possono essere che segnali chimici, cioè molecole di un tipo particolare emesse dall'una ed assorbite dall'altra cellula. Si può tuttavia anche pensare che l'aggregazione avvenga a seguito di urti casuali, o che, dopo la divisione in due della cellula madre, le cellule figlie non si separino. Sembra comunque che un contatto non occasionale sia condizione necessaria per uno scambio sistematico di materiali e per una suddivisione di compiti, tra cellule dello stesso tipo.

Ora, com'è ben noto, numerosi procarioti sono dotati di un apparato chemotattico semplificato che, pur non consentendo loro di scegliere la direzione di avanzamento, li rende capaci, nel mentre che si muovono nel mezzo liquido per random walks, di percepire un gradiente di concentrazione, avvicinandosi in media alla sorgente se il soluto è utile, allontanandosene se pericoloso [5]. I batteri dotati di un apparato del genere non rimangono certamente uniti, dopo la divisione cellulare.

Ne segue che, in linea di principio, le posizioni di batteri uguali, liberi nel mezzo liquido, *non sono più del tutto indipendenti*, anche se ciascuno di essi può (come supponiamo) essere considerato puntiforme rispetto alla distanza media tra due primi vicini. Infatti, ciascun batterio assorbe dal mezzo dei materiali nutritivi e crea quindi attorno a sé un gradiente di concentrazione, che tende a far allontanare ogni altro batterio dello stesso tipo. In altre parole, tutto avviene come se tra ogni coppia di batteri esistesse, tramite il mezzo, una interazione repulsiva (si tratta ovviamente di un effetto statistico, che si manifesta come tale solo a livello macroscopico).

Questo in linea di principio. In pratica, i dati di cui disponiamo non sono sufficienti per concludere che un tale fenomeno debba realmente esistere: il gradiente di concentrazione creato nel mezzo da ciascun batterio può essere così piccolo da non essere percepibile dall'apparato chemotattico di quel tipo di batteri. Se tuttavia il fenomeno fosse reale, potrebbe offrire una spiegazione

del fatto che batteri dello stesso tipo mobili nel mezzo liquido, non tendono a formare aggregati, e non hanno, quindi, mai imboccata la strada che può portare alla cooperazione e alla formazione di organismi multicellulari.

2. PROGETTO DELL'ESPERIMENTO

Le considerazioni precedenti ci hanno fatto pensare che mettesse conto di accertare sperimentalmente se esista o meno un'interazione, tramite il mezzo, di tipo repulsivo tra i batteri di una coltura liquida. Una tale interazione avrebbe evidentemente l'effetto di far aumentare in media la distanza tra ciascun batterio e il suo primo vicino.

Supponiamo allora di disporre di una coltura batterica mantenuta omogenea, di volume V e comprendente in totale N batteri. Immaginiamo di prelevare da essa a un certo istante tanti campioni tutti dello stesso volume v ($v \ll V$) e di contare il numero di batteri presenti in ciascun campione. Otterremo una serie di numeri:

$$n_1, n_2, n_3, \dots, n_i, \dots, n_k$$

distribuiti attorno al loro valor medio \bar{n} . Lo studio di questa distribuzione ci deve consentire di concludere se l'interazione repulsiva tra batteri ipotizzata esiste oppure no.

Infatti, se tale interazione non esiste, la posizione di ciascun batterio nella coltura è indipendente dalla posizione di tutti gli altri e i numeri n_i debbono risultare distribuiti secondo la distribuzione di Poisson, con scarto quadratico medio:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (n_i - \bar{n})^2}{k - 1}} = \sqrt{\bar{n}}.$$

Se l'interazione esistesse e fosse così forte da rendere la distanza di ciascun batterio dal suo primo vicino la massima possibile, i batteri risulterebbero situati nei nodi di un reticolo cubico, i numeri n_i sarebbero tutti uguali tra loro e lo scarto quadratico medio sarebbe uguale a zero.

Nella realtà, l'esistenza di un'interazione repulsiva si manifesterà con uno scarto quadratico medio:

$$s < \sqrt{\bar{n}}$$

cioè minore di quello che compete alla distribuzione di Poisson. Una serie di titolazioni ripetute di una coltura batterica omogenea può dunque fornire la risposta al quesito che ci siamo posti.

Dal punto di vista operativo ci sono tuttavia ancora alcuni problemi da risolvere. In primo luogo, occorre che i batteri della coltura siano metabolicamente

attivi, perché sia attiva la chemotassi. Eseguire una lunga serie di titolazioni richiede però tempo e se si facesse l'esperimento con una coltura in crescita esponenziale, si sarebbe costretti a correggere ogni titolazione per l'aumento del numero dei batteri, per riportarla al tempo della prima titolazione della serie. Ciò introdurrebbe una ulteriore causa di fluttuazioni attorno alla media, che si comporrebbe con la fluttuazione poissoniana nella distribuzione spaziale dei batteri, complicando notevolmente l'interpretazione dei risultati e, com'è ovvio, introdurrebbe nuove possibili cause di errori: sarebbe ad esempio difficile accertare che il periodo di duplicazione dei batteri in ciascun prelievo si mantenga esattamente uguale a quello della coltura madre.

Per evitare queste complicazioni, abbiamo deciso di partire da una coltura in saturazione. Un prelievo da tale coltura, inoculato in terreno fresco, dà luogo di regola ad un lag che, se si opera in terreno minimo, può essere di $60 \div 90$ minuti. In questo periodo, il numero delle cellule resta costante, mentre ciascuna di esse è in piena attività metabolica, tanto che la densità ottica della coltura è in crescita esponenziale [6]. Si è visto, per ispezione diretta al microscopio ottico, che anche la chemotassi in questo periodo di lag è pienamente attiva. Abbiamo pertanto deciso di eseguire il nostro esperimento su un tale rinfresco, in fase di lag.

In secondo luogo, se ci si limitasse ad eseguire su tale coltura in fase stazionaria una serie di titolazioni, determinando poi lo scarto quadratico medio s dei risultati, qualunque fosse il valore di s trovato diverso da \sqrt{n} , sarebbe difficile interpretarlo con piena fiducia altrimenti che come effetto di errori di titolazione. Una dimostrazione della realtà o meno del fenomeno che ci interessa si può avere solo confrontando tra loro i risultati di *due* serie di titolazioni, eseguite sullo stesso tipo di batteri, nelle stesse condizioni, la prima serie con la chemotassi attiva, la seconda senza chemotassi. La seconda serie di titolazioni dovrà dare un risultato in accordo con la distribuzione di Poisson, consentendo una valutazione dell'accuratezza del metodo e delle operazioni eseguite. Solo allora il confronto tra i due risultati potrà essere interpretato come dimostrazione dell'esistenza o meno di effetti attribuibili alla chemotassi batterica.

Abbiamo quindi deciso di eseguire, a partire dalla stessa coltura in saturazione, due diluizioni per uno stesso fattore, l'una in terreno fresco, l'altra in tampone fosfato con aggiunta di formaldeide all'1%. Si è visto, per ispezione diretta al microscopio ottico, che nel secondo caso i batteri risultano privi di motilità chemotattica. L'esperimento consisterà quindi nell'eseguire su ciascuna diluizione una serie di titolazioni ripetute e nel confrontare tra loro i risultati.

3. MATERIALI E METODI

Il ceppo batterico da noi usato è: *E. coli* K12 W1485F⁻ (ottenuto dall'Istituto di Microbiologia dell'Università « La Sapienza » di Roma [7]). Una coltura in terreno minimo, con glucosio come unica fonte di carbonio, durante la fase di crescita esponenziale a 37° C ha un tempo di duplicazione di circa 50 minuti.

Il nostro sistema di partenza era costituito da una coltura, cresciuta in terreno M9 contenente glucosio alla concentrazione dello 0.1%, in saturazione da alcune ore. Si avevano in queste condizioni circa $1.3 \cdot 10^9$ batteri per cm^3 , con una densità ottica, letta a 550 nm, di circa 1.2. Il lag dopo rinfresco era di circa 60 minuti.

Per la serie di titolazioni con chemotassi attiva, un prelievo dalla coltura in saturazione veniva diluito di un fattore 3 con lo stesso terreno, addizionato con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ciascuno degli L-aminoacidi serina e acido aspartico, attrattori molto energici tra quelli per cui *E. coli* possiede i recettori appropriati.

Per la serie di titolazioni senza chemotassi invece, un secondo prelievo veniva diluito, sempre di un fattore 3, con tampone fosfato, addizionato a formaldeide all'1%. Ambedue i diluenti erano preriscaldati a 37° C e le due diluizioni venivano mantenute a tale temperatura per tutta la durata delle operazioni di misura.

Osservando al microscopio ottico i movimenti dei batteri in una goccia delle due diluizioni, si controllava che i batteri della seconda apparissero inerti e soggetti solo al moto browniano, mentre quelli della prima percorrevano lunghi tratti più o meno rettilinei, mostrandosi a prima vista capaci di chemotassi. In ambedue le diluizioni si avevano circa $4.33 \cdot 10^8$ batteri per cm^3 .

Tutte le titolazioni sono state eseguite per conteggio dei batteri al microscopio ottico, facendo uso di una camera di Thoma, della profondità di 0.01 mm, dotata di due reticoli uguali, ciascuno diviso in 16×16 quadretti di 50 μm di lato. Il volume elementare era pertanto:

$$v = 2.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$$

e conteneva in media $10 \div 11$ batteri, la distanza media tra due primi vicini essendo dell'ordine di 16 μm .

Si è proceduto con estrema cura sia per ciò che riguarda la pulizia della camera, sia nelle operazioni di caricamento, e controllato sempre al microscopio che nulla potesse influenzare la motilità dei batteri o causare addensamenti, come moti termici d'insieme o bolle d'aria nel liquido. La camera e il piano portaoggetti del microscopio erano termostatati a 37° C.

Non potendosi ovviamente procedere al conteggio visuale diretto dei batteri a causa della loro motilità, dopo il caricamento della camera ciascun reticolo veniva fotografato a 126 ingrandimenti, facendo uso di pellicola Kodak TRI-X-PAN, 400 ASA, con tempo di esposizione di 1/8 di secondo. Ogni fotografia veniva quindi proiettata ingrandita su schermo bianco e il numero di batteri per riquadro contato visualmente. Ogni reticolo forniva così una serie di 256 misure, di cui veniva calcolata la media \bar{n} e lo scarto quadratico medio s , e che venivano raccolte in un istogramma posto a confronto con la poissoniana dello stesso valore medio. La figura 1 mostra due degli istogrammi ottenuti, con e senza attività chemotattica dei batteri.

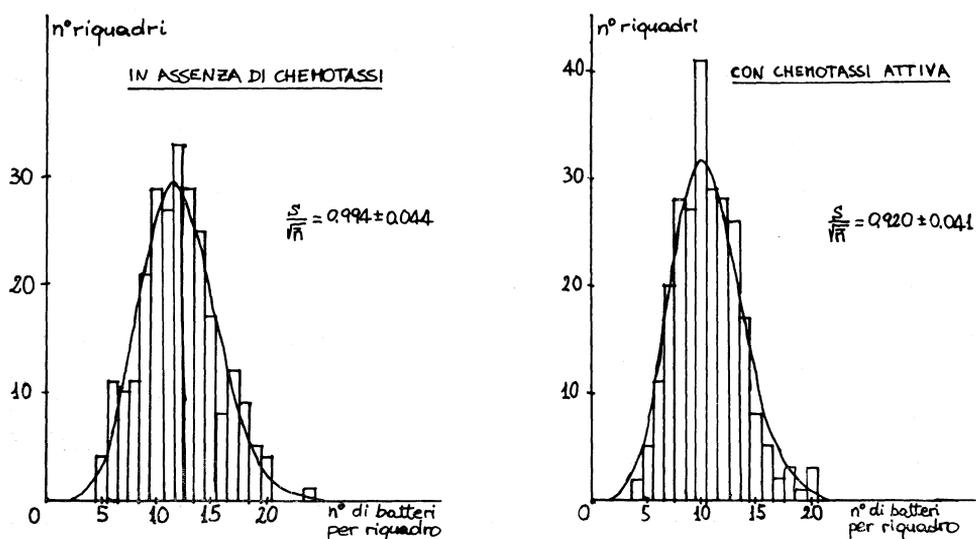


Fig. 1

Per ogni nuovo caricamento della camera, tutte le operazioni, a partire dalla preparazione della coltura in saturazione, venivano ripetute, onde evitare il rischio che la diversa età dei batteri creasse differenze nei risultati e per avere sempre a che fare con batteri che si trovavano allo stesso tempo della fase di lag dopo rinfresco. Ne sono conseguite inevitabili piccole differenze nei valori di \bar{n} da una serie di misure all'altra, per cui abbiamo assunto come risultato da porre a confronto nei due casi e da mediare su tutte le serie di misure dello stesso tipo il rapporto: $s/\sqrt{\bar{n}}$ che nel caso poissoniano e in assenza di errori di titolazione deve risultare uguale ad uno.

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono state eseguite in totale 17 serie di titolazioni, 10 delle quali in terreno e 7 in tampone fosfato. I risultati sono riassunti nelle Tabelle I e II.

TABELLA I.
In assenza di chemotassi

k	n_{TOT}	\bar{n}	$\sqrt{\bar{n}}$	s	$\frac{s}{\sqrt{\bar{n}}}$
256	3091	12.07 ± 0.22	3.47 ± 0.03	3.45 ± 0.15	0.994 ± 0.044
256	2790	10.90 ± 0.21	3.30 ± 0.03	3.36 ± 0.15	1.018 ± 0.046
224	2403	10.73 ± 0.22	3.28 ± 0.03	3.39 ± 0.16	1.034 ± 0.050
256	2672	10.44 ± 0.20	3.23 ± 0.03	3.29 ± 0.15	1.019 ± 0.047
256	2884	11.27 ± 0.21	3.36 ± 0.03	3.32 ± 0.15	0.988 ± 0.046
256	3011	11.76 ± 0.21	3.43 ± 0.03	3.36 ± 0.15	0.980 ± 0.045
255	2992	11.73 ± 0.21	3.43 ± 0.03	3.41 ± 0.15	0.994 ± 0.045

TABELLA II.
Con chemotassi attiva

k	n_{TOT}	\bar{n}	$\sqrt{\bar{n}}$	s	$\frac{s}{\sqrt{\bar{n}}}$
256	2714	10.60 ± 0.20	3.26 ± 0.03	3.00 ± 0.13	0.920 ± 0.041
256	2645	10.33 ± 0.20	3.21 ± 0.03	2.83 ± 0.13	0.882 ± 0.041
256	2962	11.57 ± 0.21	3.40 ± 0.03	3.08 ± 0.14	0.906 ± 0.042
256	2657	10.38 ± 0.20	3.22 ± 0.03	2.97 ± 0.13	0.922 ± 0.041
256	2750	10.74 ± 0.20	3.28 ± 0.03	2.97 ± 0.13	0.905 ± 0.041
256	2658	10.38 ± 0.20	3.22 ± 0.03	2.77 ± 0.12	0.860 ± 0.038
252	2364	9.38 ± 0.19	3.06 ± 0.03	2.61 ± 0.12	0.853 ± 0.040
256	3244	12.67 ± 0.22	3.56 ± 0.03	3.19 ± 0.14	0.896 ± 0.040
256	2012	7.86 ± 0.18	2.80 ± 0.03	2.72 ± 0.12	0.971 ± 0.044
256	1978	7.73 ± 0.17	2.78 ± 0.03	2.59 ± 0.11	0.932 ± 0.041

La media pesata generale di ciascun gruppo di serie di titolazioni è quindi:

$$\text{in assenza di chemotassi: } \frac{s}{\sqrt{\bar{n}}} = 1.003 \pm 0.017$$

$$\text{con chemotassi attiva: } \frac{s}{\sqrt{\bar{n}}} = 0.903 \pm 0.013 .$$

Il risultato relativo al caso in cui la chemotassi non era attiva è compatibile con una distribuzione dei batteri poissoniana entro limiti notevolmente ristretti: ciò del resto è confermato anche dalla semplice ispezione visiva degli istogrammi riassuntivi le singole serie di titolazioni. Ne segue in particolare che, nelle nostre condizioni, il volume proprio totale dei batteri era sempre trascurabile in confronto al volume del liquido in cui erano distribuiti. Ciò è sufficiente per dimostrare l'inesistenza di un fondo apprezzabile di errori di titolazione, che si sovrapponga alle variazioni puramente statistiche del numero dei batteri, e si è quindi ritenuto inutile procedere ad un'analisi statistica dei dati più approfondita.

Il secondo risultato relativo al caso di batteri chemotatticamente attivi, dimostra allora che già a distanza dell'ordine di 16 μm (pari a oltre 6 volte la lunghezza media di un batterio) l'interazione tra batteri tramite il mezzo di coltura fa sentire i suoi effetti, i relativi gradienti di concentrazione ricadendo quindi completamente nei limiti di sensibilità dei recettori batterici.

Potrebbe a questo punto avere un certo interesse vedere come questa interazione dipenda dalla densità dei batteri, cioè dalla distanza media tra due primi vicini, dato difficilmente calcolabile a causa della complessità del processo, ma che viceversa potrebbe fornire elementi di informazione ulteriore sulla chemotassi batterica.

Concludendo, va ancora messo in rilievo che un'interazione del genere non esiste tra procarioti *diversi* con esigenze fortemente complementari: per esem-

pio, tra un fotosintetizzatore, che assorbe dal mezzo la sola CO₂ disciolta, ed un parassita non capace di fotosintesi, ma che vada in cerca dei prodotti della fotosintesi altrui. Essa quindi non ha costituito un ostacolo alla formazione della cellula eucariotica [8]. Quanto agli unicellulari eucariotici, essi sono dotati di motilità *direzionale* e di regola, di un apparato ciliare che rinnova continuamente il mezzo nutritivo nell'immediato intorno della cellula. Sono quindi sempre in grado di neutralizzare il tipo di interazione qui messo in evidenza.

BIBLIOGRAFIA

- [1] YORK D., FARQUHAR R.M. (1972) - *The Earth's Age and Geochronology*, Pergamon Press, Oxford.
- [2] AGENO M. (1984) - *Le difficoltà del problema dell'origine della vita*, « Scientia », in corso di pubblicazione.
- [3] SCHOPF J.W. (1977) - *Earliest evidence of fossil eucariotes*, in: Ponnampereuma C. ed. « Chemical Evolution of the Early Precambrian », Academic Press, New York, p. 107-109.
- [4] STANIER R.Y., ADELBERG E.A. and INGRAHAM J.L. (1976) - *The Microbial World*, 4th ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, p. 90-93.
- [5] KOSHLAND D.E. Jr. (1980) - *Bacterial Chemotaxis as a Model Behavioral System*, Raven Press, New York. BERG H.C. (1983) - *Random Walks in Biology*, Princeton University Press, Princeton.
- [6] CLARO M. (1984) - Tesi di laurea in fisica, presso l'Università « La Sapienza » di Roma.
- [7] BACHMANN B.J. (1972) - *Pedigrees of some mutant strains of E. coli K12*, « Bacteriol. Rev. », 36, 525.
- [8] MARGULIS L. (1970) - *Origin of Eukariotic Cells*, Yale University Press, New Haven and London. MARGULIS L. (1981) - *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment on the Early Earth*, Freeman, San Francisco.