
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO, ANNA MARIA SALVATORE, DANIELA
VALLERANI

**Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura
batterica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 80 (1986), n.4, p. 244–255.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_4_244_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. — *Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica* (*) (**). Nota di MARIO AGENO, ANNA MARIA SALVATORE e DANIELA VALLERANI, presentata (***) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — Balanced growth is currently considered a fundamental concept in the description and the theory of the bacterial cell cycle. Bacterial growth curves in liquid minimal medium, obtained in severely controlled growth conditions and which cannot be interpreted in terms of the above concept are presented in this paper.

If point to point differences in growth conditions in the culture are carefully avoided, the culture growth is always exponential. However the growth rate of the optical density and of the colony number on agar plates are often different, showing that the mean bacterial mass is slowly varying. Furthermore, sudden variations of growth rates and sudden transitions from lag to exponential growth and from exponential growth to saturation are observed. The bacterial density reaches saturation $15 \div 30$ minutes after the saturation of the optical density.

In order to give an account of the results, the concept of stationary and transitory growth states are defined as an introduction to further research work in the organization of the bacterial cell.

1. L'ORGANIZZAZIONE INTERNA DI UNA CELLULA BATTERICA

Nella gerarchia strutturale inclusiva dei sistemi viventi, la cellula batterica rappresenta l'unità di base, al più basso livello della gerarchia. Una comprensione completa della funzionalità e struttura di tale cellula, cioè della sua organizzazione spazio-temporale, rappresenta quindi il primo passo indispensabile per lo sviluppo di una teoria biofisica generale [1].

Siamo però ancora lontani da una tale comprensione, anche se i metodi analitici della biochimica e della biologia molecolare, combinati con quelli della genetica, ci hanno ormai fornito almeno la maggior parte delle informazioni essenziali sulla struttura e funzionalità dei batteri.

Ciò che ancora manca è il passo ovviamente più difficile: la ricostruzione dell'unità sistemica dell'organismo, a partire dalla massa enorme di dati e conoscenze particolari di cui disponiamo. Non che in questa direzione non sia stato fatto ancora nulla. Al contrario, il problema è stato ormai posto esplicitamente e con grande chiarezza, come dimostra il recente volume di Ingraham

(*) Gruppo di Biofisica del Dipartimento di Fisica dell'Università « La Sapienza » di Roma.

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

(***) Nella seduta del 12 aprile 1986.

Maaløe e Neidhart [2], non solo, ma sono anche stati fatti progressi non trascurabili nella interpretazione di quei dati e di quelle conoscenze, al fine di una loro collocazione in un unico quadro descrittivo-esplicativo.

L'enorme complessità del sistema, la cellula batterica, ci pone di fronte a difficoltà metodologiche e anche concettuali sempre crescenti. Non è detto che il sistema di concetti che si è venuto formando nel corso della decifrazione di tanti fenomeni biologici particolari, sia proprio quello più valido, senza alcuna modifica o correzione, per la descrizione del sistema nel suo insieme. E non è certo che la stessa identificazione di fatti biologici fondamentali, la loro separazione da effetti collaterali in condizioni sperimentali definite con sufficiente rigore, sia sempre stata fatta nel modo più conveniente per la successiva impostazione di una teoria. Non c'è alcun dubbio che, in questo senso, molti risultati sicuri debbano essere considerati ancora soggetti a riesame e a discussione.

Un riesame critico è probabilmente necessario già per la fenomenologia (che appare sempre più complessa, quanto più accuratamente e dettagliatamente venga studiata) della crescita di una coltura batterica in terreno liquido. È ciò di cui vogliamo incominciare ad occuparci nel presente lavoro, discutendo alcuni risultati, ottenuti in condizioni ben controllate, e che sembrano suggerire una possibile via per ulteriori ricerche.

2. LA CRESCITA BATTERICA, SECONDO IL PARADIGMA CORRENTE

La descrizione corrente di tale fenomenologia è centrata sul concetto di *stato di crescita bilanciata* della coltura [3]: quello stato sostanzialmente stazionario, in cui tutte le grandezze estensive relative ai batteri della coltura raddoppiano i loro valori esattamente nello stesso tempo. Tale tempo è il tempo di generazione (o tempo di duplicazione) dei batteri, l'età media cioè alla quale ogni cellula si divide in due. Tutti i batteri della stessa età, finché tale stato si mantiene, risultano avere la stessa composizione.

Si ritiene che lo stato di crescita bilanciata della coltura e il relativo tempo di duplicazione dei batteri, dipendano soltanto dal ceppo batterico e dalle *condizioni di crescita*: composizione iniziale del terreno, temperatura, aerazione, pH, ... Sarebbe l'unico stato della coltura esattamente riproducibile e che può essere indefinitamente mantenuto, quando si provveda a rinnovare convenientemente il terreno, o a intervalli o mediante una coltura continua [4].

Quando una coltura si avvia in condizioni di crescita ben definite, le cellule dell'inoculo sono cresciute di regola in condizioni diverse, per cui ci vuole un certo tempo prima che esse si adattino alle nuove condizioni. Si ha cioè, secondo la descrizione corrente, una *fase transitoria*, in cui la crescita non è bilanciata, e lo stato di crescita bilanciata verrebbe alla fine raggiunto *asintoticamente* [5]. Analogamente, una fase transitoria di crescita non bilanciata si avrebbe quando un componente del terreno diviene limitante e la coltura si avvia alla saturazione: in tal caso, la crescita del materiale biologico totale della coltura rallenta prima della crescita del numero delle cellule, per cui le cellule nella

fase di saturazione risultano notevolmente più piccole che nello stato di crescita esponenziale bilanciata.

Per ottenere dati riproducibili da una coltura batterica, sarebbe essenziale (sempre secondo questa descrizione della fenomenologia) accertarsi prima di tutto che lo stato di crescita bilanciata sia effettivamente stato praticamente raggiunto e ciò sarebbe rivelato, per esempio, da una crescita parallela, con lo stesso periodo di duplicazione, della densità ottica della coltura e del numero delle cellule [5]. Eventuali stati di crescita non bilanciata vengono con ciò fin dall'inizio messi da parte come non importanti e non significativi, ai fini della comprensione della fisiologia dei batteri.

3. CONCLUSIONI DI UN CONTROLLO SPERIMENTALE

Abbiamo sottoposto questa descrizione dei fatti ad un accurato controllo sperimentale, facendo uso del ceppo: *Escherichia coli* K 12 W 1485 F⁻ [6], fatto crescere in terreno minimo M 9, con glucosio come unica fonte di carbonio, in condizioni di crescita il più strettamente possibile controllate e costanti. Siamo così giunti alla conclusione che essa, pur tenendo conto nelle grandi linee di ciò che effettivamente si osserva, non prende in considerazione numerosi aspetti particolari della fenomenologia della crescita batterica, che concordano tra loro nel suggerire una parziale revisione del relativo sistema di concetti. Naturalmente, solo l'uso anche di altri ceppi, in condizioni di crescita le più varie, potrà dire come una tale revisione debba essere eseguita, al fine di una descrizione di validità generale.

Ciò che abbiamo osservato col ceppo e nelle condizioni di crescita da noi prescelti, può riassumersi nei seguenti punti, che per chiarezza premettiamo alla presentazione dei risultati degli esperimenti.

1) Lo stato di crescita bilanciata non è lo stato in cui una coltura batterica, in condizioni di crescita ben definite e costanti, tenda sempre a portarsi spontaneamente. È anzi, più che altro un'astrazione.

Ciò che generalmente si osserva è una crescita rigorosamente esponenziale della coltura, in cui però i periodi di duplicazione della densità ottica e della numerosità batterica (pur costanti per lunghi periodi di tempo) non sono uguali. Si tratta quindi non di semplici fasi di transizione, ma di *stati di crescita* perfettamente definiti, in cui le dimensioni medie e la composizione chimica dei batteri vanno progressivamente cambiando, e che non possono di conseguenza mantenersi indefinitamente (anche se si mantengono spesso per diverse decadi del grafico logaritmico). Li chiameremo, per intenderci, *stati di crescita transitori*.

2) Uno stato di crescita transitorio non è sempre seguito da uno *stato di crescita stazionario*, in cui cioè densità ottica e numerosità batterica crescano con lo stesso periodo di duplicazione. Spesso, uno stato di crescita transitorio, in cui le dimensioni batteriche medie vanno cambiando in un certo senso, è se-

guito da un altro stato di crescita trasitorio, in cui le dimensioni batteriche medie vanno cambiando in senso opposto.

Il parallelismo tra i grafici logaritmici della densità ottica e della numerosità batterica, inoltre, non è affatto garanzia che la coltura sia in uno stato di crescita bilanciata.

3) Se le condizioni di crescita sono rigorosamente controllate e costanti e la coltura è mantenuta rigorosamente omogenea, il passaggio da uno stato di crescita al successivo non presenta una fase di transizione di durata apprezzabile, ma avviene in tutti i batteri della coltura in un tempo assai breve in confronto ai periodi di duplicazione.

Questi tre punti sono il risultato dell'analisi di centinaia di curve di crescita, eseguite con le più varie concentrazioni iniziali di glucosio e le più diverse condizioni di ossigenazione della coltura, con inoculi batterici sempre dello stesso ceppo controllato, ma diversa storia precedente. È infatti risultato che gli stati di crescita che una coltura successivamente attraversa dipendono anche dalla precedente storia dei batteri dell'inoculo.

4. RISULTATI SPERIMENTALI

Variazioni continue dei periodi di duplicazione all'approssimarsi della saturazione denunciano che la coltura è divenuta *disomogenea*: le condizioni di crescita dei batteri non sono le stesse in tutti i suoi punti. Ciò si verifica, per esempio, quando le condizioni di ossigenazione nelle regioni più superficiali del mezzo liquido risultano diverse da quelle delle regioni più profonde. Se si evita che la coltura divenga disomogenea, la crescita è sempre esponenziale, almeno nei limiti di approssimazione delle nostre misure.

Se si preleva l'inoculo da una coltura che abbia raggiunto la saturazione senza mai diventare disomogenea, anche la ripresa della crescita della numerosità batterica nella coltura rinfrescata, dopo il lag, è subito esponenziale, senza apprezzabile fase di transizione.

Le figure allegate illustrano i punti sopra enunciati. La fig. 1 mostra il caso di una coltura, in crescita esponenziale fino al raggiungimento della saturazione, in cui i batteri vanno progressivamente aumentando la loro massa media: infatti, la numerosità batterica cresce col tempo più lentamente della densità ottica, che è una misura della massa di materiale biologico per unità di volume della coltura. Due fatti vanno messi particolarmente in rilievo: 1) in ambedue i grafici non c'è traccia di una fase di transizione tra crescita esponenziale e saturazione; 2) la crescita della densità ottica si arresta bruscamente circa 15 minuti prima dell'arresto, altrettanto brusco, della crescita della numerosità batterica.

La fig. 2 mostra il caso opposto di una coltura in cui i batteri vanno progressivamente diminuendo la loro massa media. Anche in questo caso il passaggio dalla crescita esponenziale alla saturazione avviene senza apprezzabile

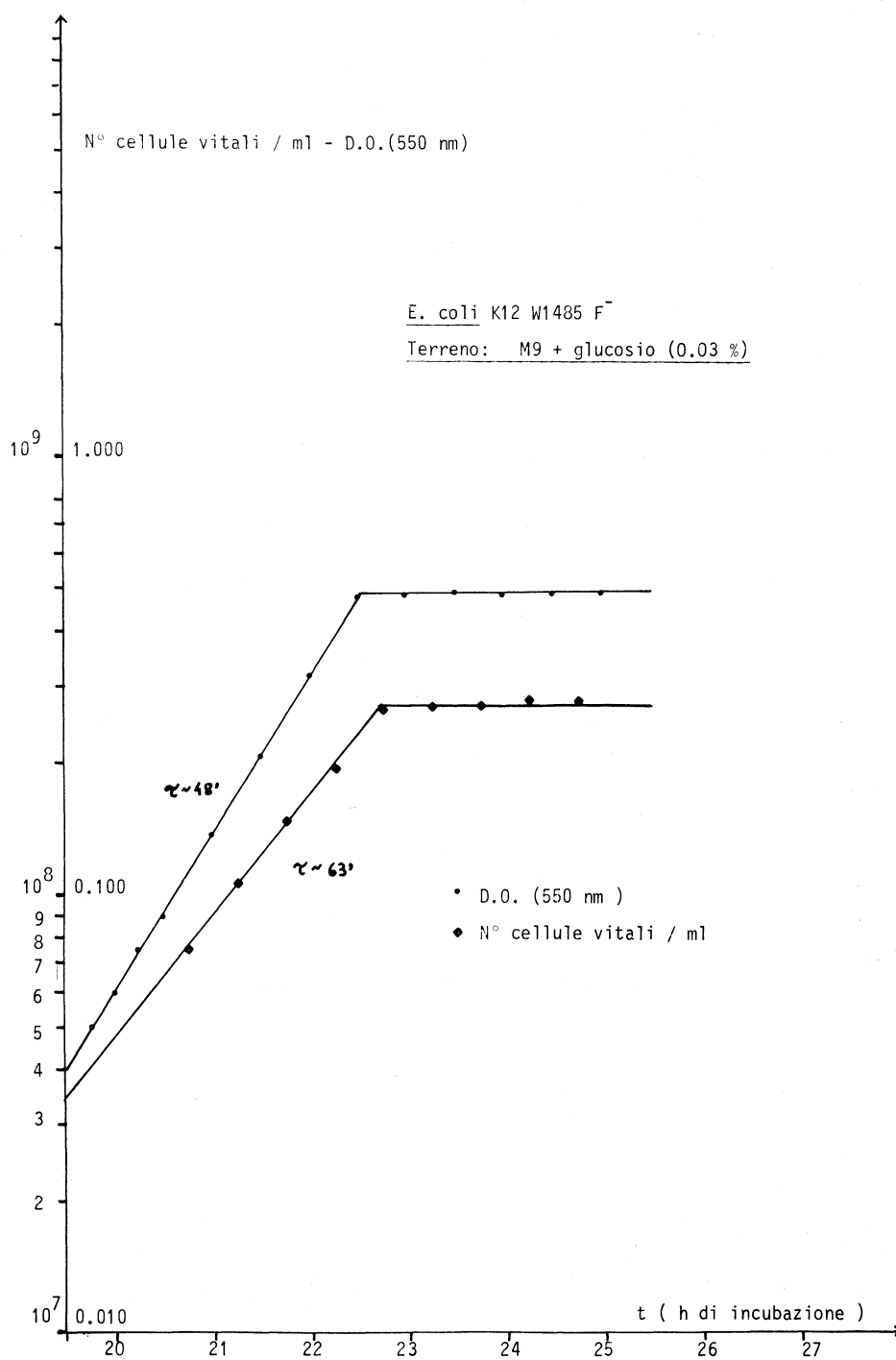


Fig. 1.

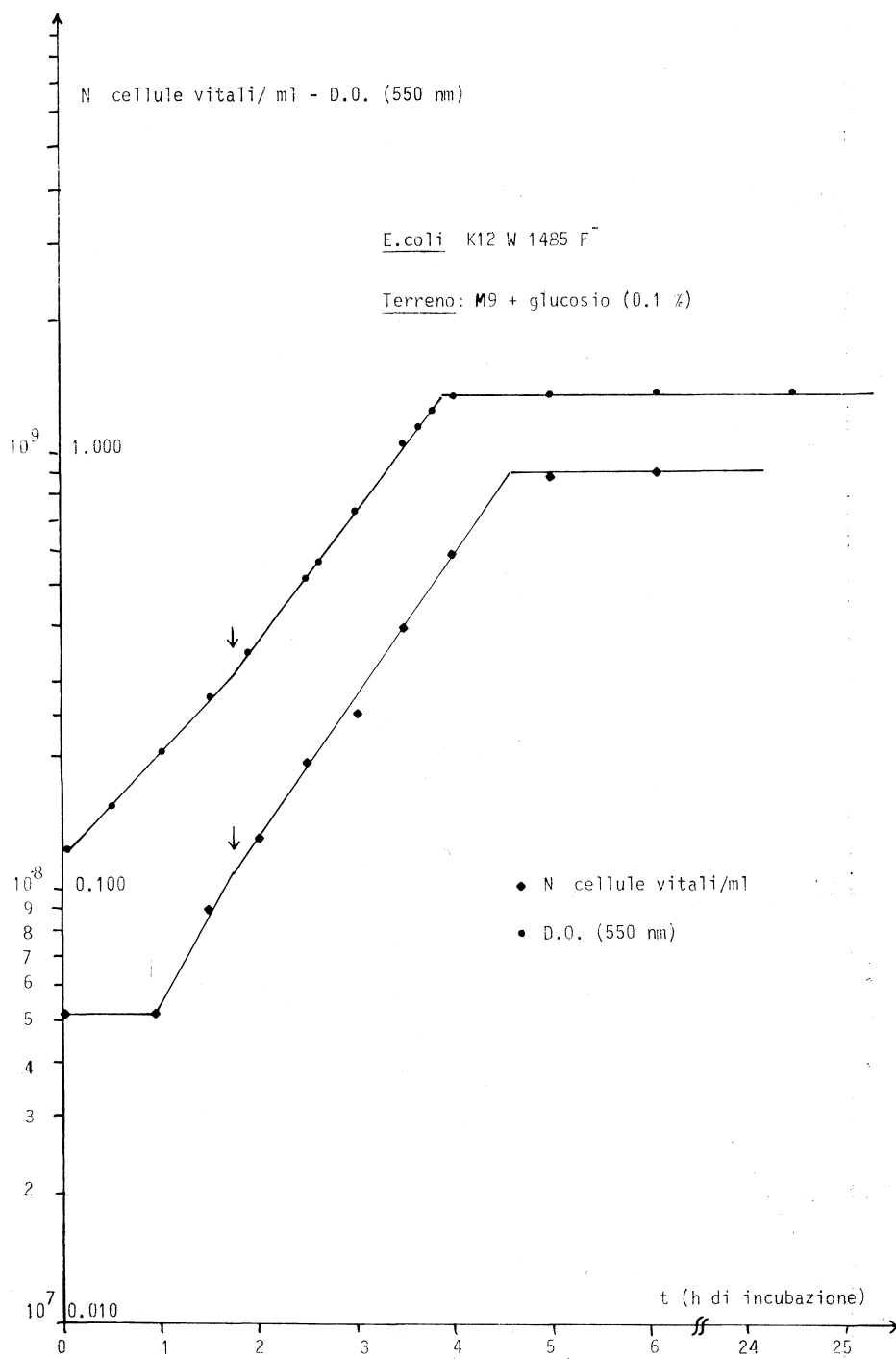


Fig. 2.

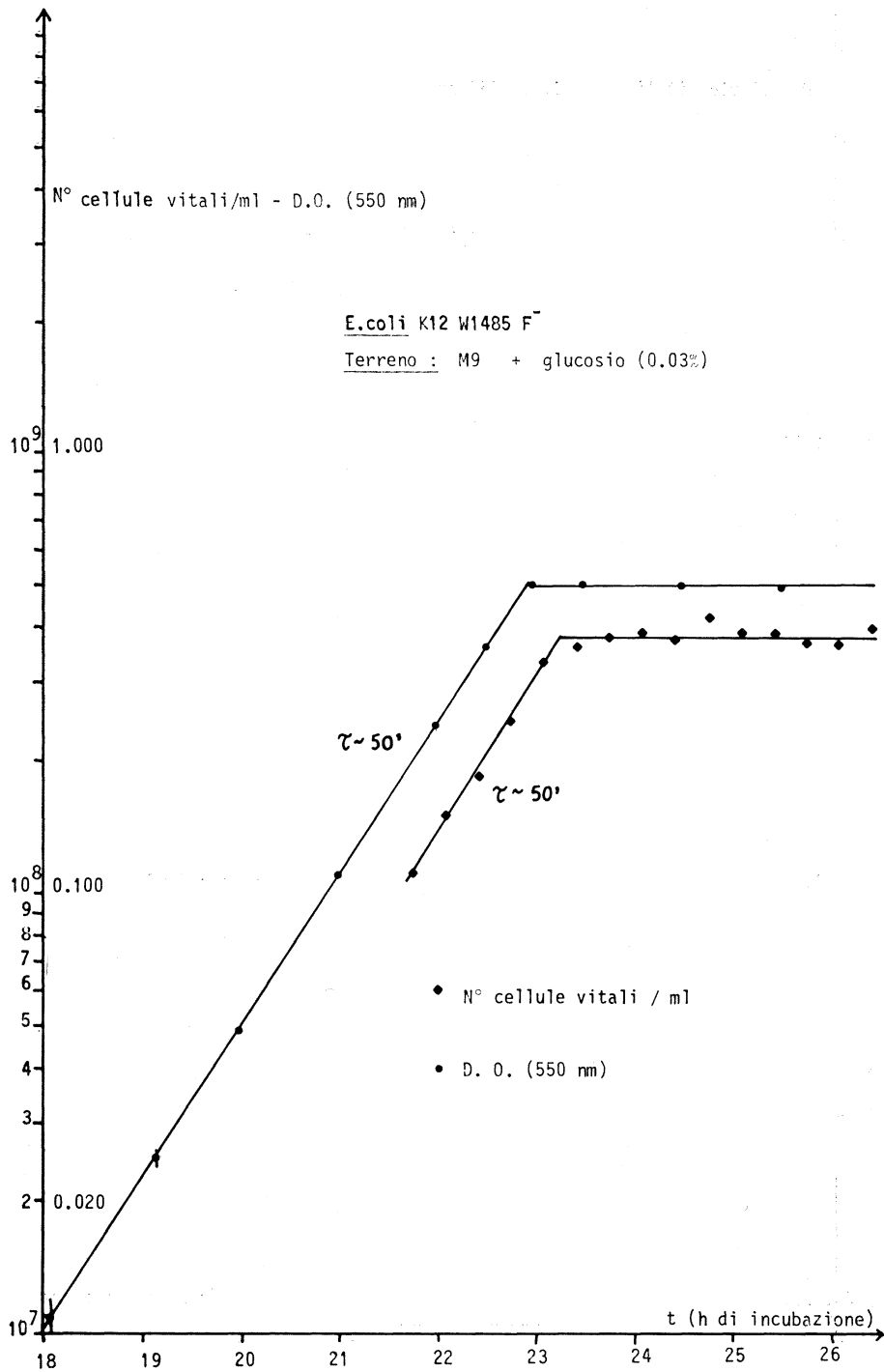


Fig. 3.

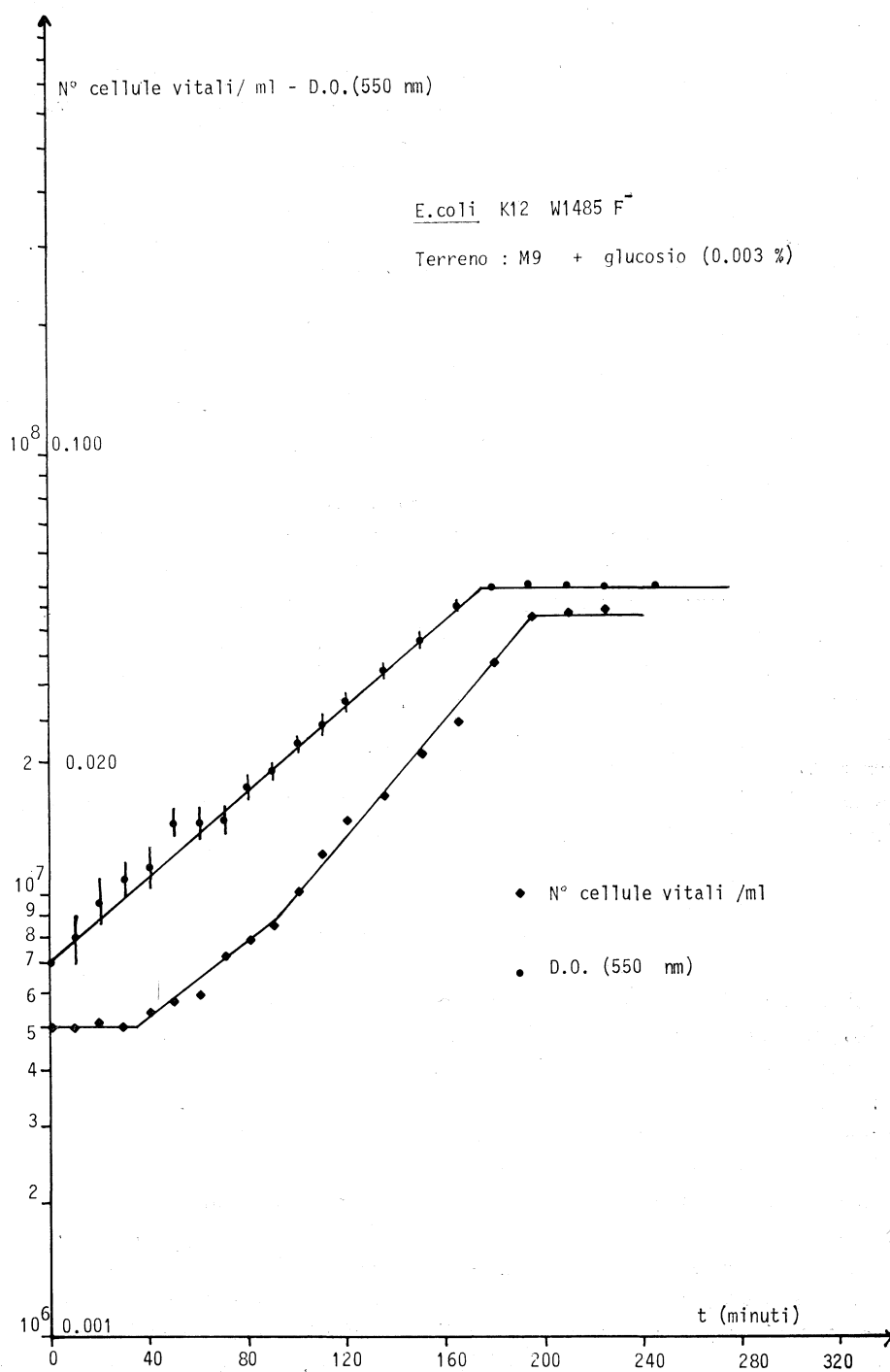


Fig. 4.

fase di transizione e l'arresto della crescita della densità ottica ancora precede, qui di circa 30 minuti, l'arresto della crescita della numerosità batterica. È da notare un accenno ad una brusca variazione di pendenza in ambedue le curve di crescita, dopo circa un periodo di duplicazione dalla ripresa delle divisioni cellulari.

La fig. 3 mostra infine un caso in cui densità ottica e numerosità batterica aumentano con periodi di duplicazione pressoché uguali.

Nelle figure seguenti sono riportati altri esempi del passaggio da uno stato di crescita ad un altro. Anche in questi casi non sembra (nei limiti consentiti dalla precisione delle misure) che si abbiano fasi di transizione di durata apprezzabile. La fig. 4 fa vedere come riprende la crescita di una coltura inoculata con un prelievo da precedente coltura in saturazione. La densità ottica entro 3-4 minuti dal rinfresco riprende a crescere esponenzialmente, mentre il numero delle cellule si mantiene costante, con un periodo di lag di circa 30 minuti. L'interpretazione più semplice è che ciascuna cellula, in questa fase di lag, vada aumentando la sua massa proporzionalmente alla massa stessa. Alla fine del lag, la numerosità batterica riprende a crescere esponenzialmente, anche qui con una transizione abbastanza brusca. È evidentemente l'età che ciascuna cellula aveva al momento dell'arresto delle divisioni cellulari nella coltura precedente, che decide quali debbano essere ora le prime cellule a dividersi nella coltura rinfrescata. Si osservi che il periodo di duplicazione della numerosità batterica non coincide con quello della densità ottica: le cellule che si erano andate rapidamente ingrossando durante il periodo di lag, vanno ora diventando progressivamente in media più piccole. Il contrario avviene nel caso della fig. 5. Qui, le cellule nel corso della crescita esponenziale che segue il lag vanno ulteriormente aumentando la loro massa media.

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Ci sembra che la documentazione che presentiamo, come introduzione al rendiconto delle nostre ricerche, sia sufficiente a dimostrare la non convenienza di centrare la descrizione della fenomenologia batterica sul concetto di « stato di crescita bilanciata ». È molto probabilmente possibile realizzare uno stato di crescita stazionario, in cui la crescita sia almeno apparentemente bilanciata, mediante una coltura continua di sufficiente durata. È però per lo meno dubbio che tale stato corrisponda al manifestarsi di peculiarità importanti della organizzazione della cellula procariotica e che esso sia *unico*, per un dato ceppo, una volta che siano state fissate le condizioni di crescita. Tale unicità, postulata in [2], non è in realtà mai stata dimostrata e l'enorme complessità del sistema allo studio consiglia di non escludere a priori l'ipotesi che lo stato di crescita apparentemente bilanciata che in certi casi si raggiunge possa dipendere anche, per esempio, dalla storia precedente dei batteri della coltura.

Sembra ad ogni modo chiaro che l'idea di uno stato di crescita bilanciata, in cui la coltura tenda in ogni caso a portarsi asintoticamente, attraverso fasi

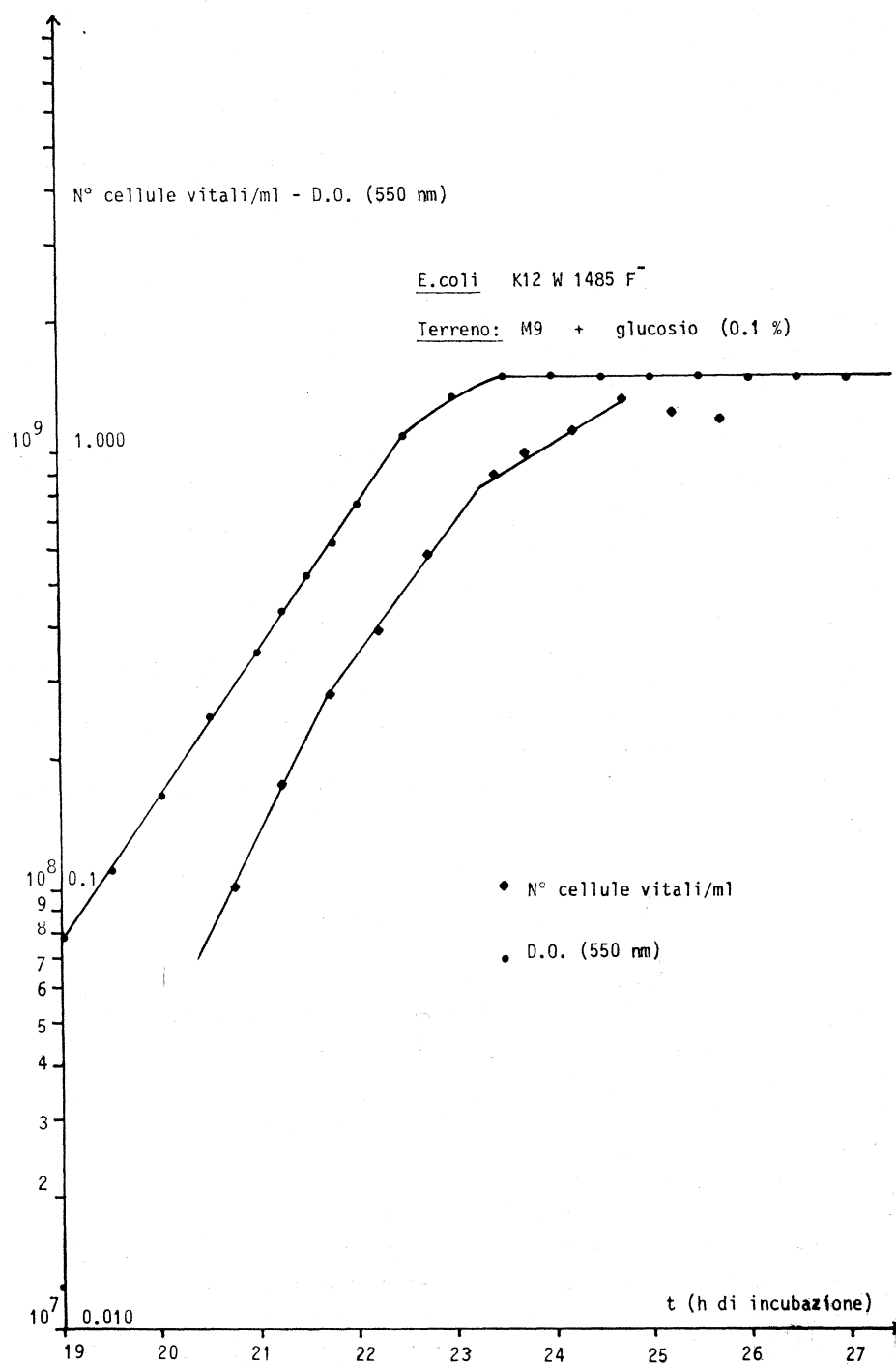


Fig. 5.

di transizioni con crescita non esponenziale, non è una descrizione accurata dei fatti. La crescita batterica sembra potersi realizzare con un numero molto maggiore di gradi di libertà, anche attraverso temporanei squilibri e successive parziali compensazioni, con una dinamica assai meglio descritta dal concetto di stati di crescita esponenziali multipli, sia transitori che stazionari.

La documentazione riportata pone naturalmente molti nuovi problemi. Le condizioni di crescita delle nostre colture non sono a rigore veramente costanti, nel senso che vanno più o meno rapidamente cambiando man mano che il nutrimento viene consumato e la densità batterica aumenta. Ciò non ostante, ogni coltura si mantiene in uno stato di crescita esponenziale ben definito per un tempo relativamente lungo, fino al momento in cui tutti i batteri della coltura passano contemporaneamente ad altro stato di crescita. È senz'altro escluso che la transizione avvenga (come ci si potrebbe aspettare) in un tempo dell'ordine del periodo di duplicazione. Occorre pertanto spiegare l'origine di questa sorprendente *sincronizzazione* delle transizioni.

Che si tratti di artefatto, dovuto al modo in cui le colture vengono fatte crescere, è evidente: altrimenti, si sarebbe costretti a postulare interazioni tra i batteri di una coltura, di fatto inesistenti. Inoltre è chiaro che la sincronizzazione è possibile, in quanto si tratta di transizioni *che non dipendono dall'età della cellula*.

All'origine della sincronizzazione sta probabilmente il fatto che quando la concentrazione del glucosio nel mezzo di coltura scende al di sotto di un certo valore critico, la sintesi di materiale biologico *de novo*, in particolare la sintesi proteica, si arresta (se la coltura è omogenea) in tutte le cellule contemporaneamente, qualunque sia la loro età: è probabilmente un enzima allosterico in posizione chiave, che assolve in questo caso il compito di vero e proprio « interruttore generale ». È pensabile che tutte le altre transizioni, da uno stato di crescita all'altro nei successivi rinfreschi, risultino anch'esse sincronizzate, in quanto dipendenti dal progressivo adeguarsi a nuove condizioni dei pools interni dei metaboliti intermedi o dal raggiungimento di certi livelli per le concentrazioni interne, a cui scattano altri « interruttori allosterici ». I tempi richiesti per tali adeguamenti sono presumibilmente gli stessi per tutti i batteri, se le condizioni di crescita in cui essi vengono a trovarsi sono istante per istante le stesse per tutti. Ritorneremo sulla questione per un esame più approfondito in un prossimo lavoro.

È comunque evidente che, anche se la sincronizzazione delle transizioni è un artefatto, gli stati di crescita che attraverso ad essa si mettono in evidenza e le transizioni stesse da uno stato di crescita ad un altro, non sono artefatti, ma significative manifestazioni della fisiologia dei batteri. Meritano dunque di essere accuratamente studiati nella loro dipendenza e dalle condizioni di crescita e dalla precedente storia dei batteri della coltura, cercando di interpretarli in termini delle informazioni offerteci dalla biochimica sui processi interni dei batteri stessi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AGENO M. (1986) – *Le radici della biologia*, Feltrinelli, Milano.
- [2] INGRAHAM J.L., MAALØE O., NEIDHART F.C. (1983) – *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland Mass. (Indicato nel seguito con IMN).
- [3] IMN, p. 5.
- [4] IMN, cap. 6.
- [5] IMN, p. 270.
- [6] BACHMAN B.J. (1972) – *Pedigrees of some mutant strains of E. coli K 12* », « Bacteriol. Rev. », 36, 525.