
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO, MASSIMO CLARO, ANNA DE BLASIO

**Il raggiungimento della saturazione in una coltura
batterica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 80 (1986), n.5, p. 335–346.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_5_335_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. — *Il raggiungimento della saturazione in una coltura batterica* (*). Nota di MARIO AGENO, MASSIMO CLARO e ANNA DE BLASIO, presentata (**) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY, — As discussed in a previous paper, when a bacterial culture is kept rigorously homogeneous well defined growth states in liquid minimal medium and sudden transitions from state to state are observed. In the present paper, the transition from an exponential growth state to saturation and the effects of oxygen starvation are examined.

The frequently observed transition phase, in which the (average) growth rate is slowly varying, depends on an uneven oxygenation of the culture: as the bacterial density grows, an ever increasing number of bacteria, the farthest from the surface of the liquid, pass into a new state with a reduced growth rate. However, if the stirring is quick enough so as to secure an even oxygen concentration all over the culture, the transition to the new state becomes synchronous.

In a well oxygenated culture, the glucose concentration is decreasing at an ever faster rate as the bacterial density grows exponentially. At a certain point, a biochemical switch stops the production of biological materials (e.g. protein synthesis). The residual energy production is used to support DNA synthesis and cellular division. The bacterial density continues to grow at the same rate as before, at constant O.D. The cellular divisions are eventually blocked at the same time all over the culture by another biochemical switch.

In order to give an account of the results, the concept of functional compartments of the bacterial cell is introduced.

1. STATI DI CRESCITA DI UNA COLTURA BATTERICA

In un precedente lavoro [1], è stato messo in evidenza come la ipotesi corrente dell'esistenza di uno stato di « crescita bilanciata » [2] non trovi conferme in una descrizione accurata della fenomenologia della crescita di una coltura batterica in terreno liquido minimo. Se le condizioni di crescita vengono accuratamente mantenute costanti (salvo che per il progressivo impoverirsi del terreno e il corrispondente aumentare della densità batterica, col passare del tempo) e sempre omogenee su tutta l'estensione della coltura, ciò che si osserva è di regola un susseguirsi di stati di crescita esponenziale non bilanciata, ciascuno dei quali tende a compensare, almeno in parte, gli squilibri residui dello stato

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

(**) Nella seduta del 10 maggio 1986.

di crescita precedente. Le transizioni da uno stato di crescita al successivo avvengono, in tali condizioni, sempre in tempi assai brevi, in confronto ai relativi periodi di duplicazione. Gli stati attraverso cui passa una data coltura, oltreché dal ceppo e dalle condizioni di crescita, dipendono anche dalla precedente storia dei batteri dell'inoculo.

Dal punto di vista più generale da noi proposto, anche la cosiddetta *fase di saturazione* della coltura e la *fase di lag* dopo rinfresco vanno considerati stati di crescita particolari. Del primo di essi vogliamo occuparci nel presente lavoro. Tutti gli esperimenti di cui parleremo sono stati eseguiti facendo uso del ceppo di *E. coli* K 12 W 1485 F⁻ [3], fatto crescere in terreno liquido minimo M 9, con glucosio come unica fonte di carbonio. Ciò che ci proponiamo è, per il momento, solo di estendere e di approfondire l'esame fenomenologico dello sviluppo di una coltura batterica, alla ricerca soprattutto di un nuovo orientamento concettuale, che ci consenta di capire la fisiologia dei batteri, in termini di quei processi biochimici che sicuramente ne costituiscono la base.

Ci siamo prima di tutto assicurati che, nelle condizioni da noi prescelte, l'arresto della crescita batterica non fosse da imputarsi al rilascio nel mezzo di materiali tossici da parte degli stessi batteri. A tale scopo, oltre al mantenere sempre sotto controllo il pH del mezzo liquido, abbiamo eliminato per centrifugazione i batteri da una coltura in saturazione ed usato il sopranatante, addizionato con una conveniente quantità di glucosio, come terreno per una nuova coltura. Il regolare sviluppo del nuovo inoculo ha dimostrato l'assenza di materiali tossici in quantità apprezzabili.

Nelle nostre condizioni dunque la saturazione è da imputarsi esclusivamente al fatto che un componente del terreno diventa a un certo punto limitante. Esclusi (anche in base all'esperimento appena citato) i sali minerali sempre in eccesso, restano da prendere in considerazione da questo punto di vista solo glucosio ed ossigeno.

2. FATTORI CHE POSSONO LIMITARE LA CRESCITA BATTERICA

Se a un certo punto è il glucosio che viene a mancare, in condizioni di ossigenazione della coltura non limitanti, la coltura come sappiamo passa bruscamente dalla crescita esponenziale alla saturazione. A differenza del glucosio, l'ossigeno non diventa invece mai limitante in senso assoluto. Fissate le condizioni di agitazione della coltura, resta fissato il flusso di ossigeno da ripartire tra tutti i batteri. Al crescere della densità batterica, la quantità di ossigeno disponibile per ciascun batterio può a un certo punto diventare non più sufficiente a ossidare completamente il glucosio che il batterio consuma nel corso del suo ciclo vitale. Ciò determinerà evidentemente un rallentamento della crescita: verranno presumibilmente rilasciati nel mezzo prodotti del catabolismo del glucosio non completamente ossidati, ma la produzione di energia (seppure a ritmo ridotto), e quindi anche la crescita della coltura continuerà, finché del glucosio è disponibile.

Se il quadro interpretativo proposto nel precedente lavoro è corretto e se effettivamente in date condizioni di crescita esistono per i batteri stati di crescita esponenziale ben definiti, è da attendersi che, a seconda della quantità di ossigeno disponibile per unità di tempo, possano verificarsi tre casi diversi. In ogni caso, l'ossigeno diffonde nella coltura dall'aria, attraverso la superficie di separazione aria-mezzo di coltura. La beuta contenente la coltura è posta in un bagno agitatore di Dubnoff il che garantisce da un lato la costanza della temperatura (entro una frazione di grado) e dall'altro lato una sufficiente omogeneizzazione e una ossigenazione il più possibile uniforme di tutto il liquido.

In tali condizioni, finché il numero dei batteri per unità di volume è sufficientemente piccolo, tutti i batteri della coltura dispongono largamente dell'ossigeno loro necessario: sono le condizioni in cui la crescita della coltura nel suo complesso appare esponenziale e si possono osservare le improvvise transizioni sincrone da uno stato di crescita ad un altro.

Se però il numero dei batteri per unità di volume aumenta oltre un certo limite rimanendo inalterata l'ossigenazione totale, l'ossigeno può incominciare ad essere limitante. Se il rimescolamento del liquido non è molto veloce ed efficiente, può avvenire che le condizioni di ossigenazione della coltura risultino ora diverse da punto a punto. Può avvenire che i batteri in prossimità della superficie di separazione aria-mezzo di coltura consumino più della loro quota parte di ossigeno e che quote di ossigeno sempre minori restino a disposizione dei batteri via via più lontani da tale superficie. La coltura diventa in tal caso disomogenea: il periodo di duplicazione *medio* si andrà allungando con continuità, ma questo perché un numero via via crescente di batteri passa, per mancanza di ossigeno, a stati di crescita con periodi di duplicazione più lunghi. La crescita della coltura nel suo insieme non sarà dunque più esponenziale.

Se invece il liquido viene sempre molto attivamente rimescolato, la coltura rimarrà omogenea e tutti i batteri avranno sempre a disposizione la stessa quantità di ossigeno per unità di tempo. Al crescere della densità batterica tuttavia, lo stesso flusso totale di ossigeno andrà ripartito tra un numero di batteri sempre maggiore e tutti i batteri saranno a un certo punto forzati a passare a un nuovo stato di crescita esponenziale, con periodo di duplicazione più lungo. Se il quadro interpretativo da noi proposto in [1] è corretto, la transizione avverrà *in modo sincrono* in tutti i batteri della coltura.

Nella fig. 1, tutti e tre i casi a priori possibili sono documentati. Se la concentrazione iniziale del glucosio è molto elevata (0,5%), la densità ottica della coltura tende ad un valore di saturazione molto elevato (superiore a 2,5), ma già a valori della densità ottica attorno a 1, l'ossigenazione e l'agitazione della coltura incominciano ad essere insufficienti: la coltura diventa disomogenea e la saturazione viene raggiunta gradualmente, attraverso un progressivo allungarsi del periodo di duplicazione *medio*. La curva di crescita si presenta simile a quella del paradigma tradizionale [4].

Per valori intermedi della concentrazione iniziale di glucosio (0,1%), solo nell'ultima parte delle curve di crescita, a meno di un periodo di duplicazione

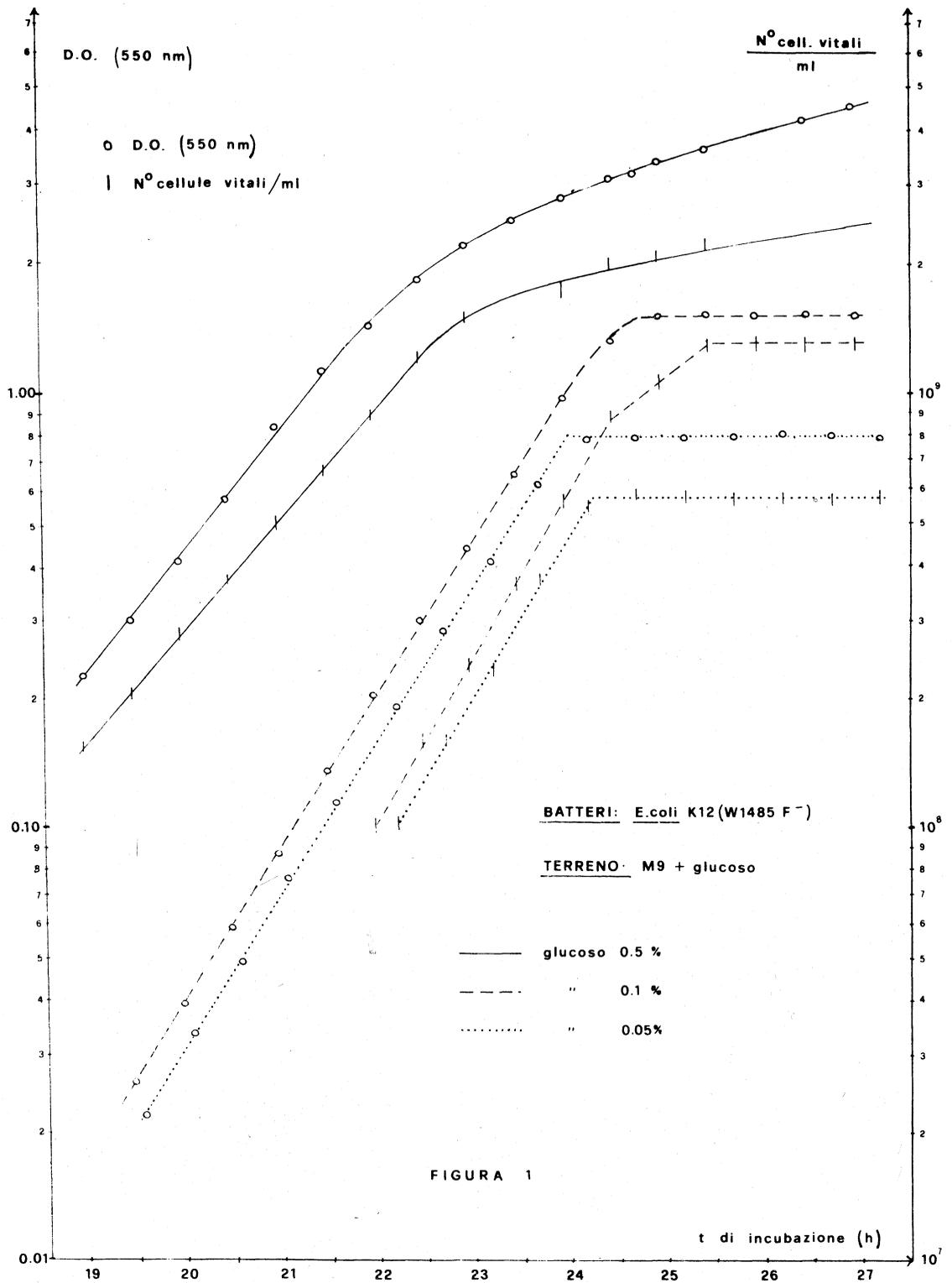


FIGURA 1

Fig. 1.

dalla saturazione, l'ossigenazione della coltura incomincia ad essere insufficiente. L'agitazione è tuttavia ancora tale che tutti i batteri vengono a trovarsi nelle stesse condizioni di crescita. È pertanto il ritmo delle divisioni cellulari che risulta rallentato, quando la densità ottica della coltura è ormai in saturazione: i batteri (che durante la fase di crescita esponenziale precedente, andavano diventando più piccoli molto lentamente) passano ora tutti insieme in un nuovo stato di crescita transitorio, in cui ancora si dividono con ritmo tuttavia molto rallentato, anche a densità ottica ormai costante.

Infine, per valori relativamente bassi della concentrazione iniziale di glucosio (0,05%), la densità batterica non raggiunge mai valori tali che la ossigenazione della coltura risulti insufficiente. Il passaggio dalla crescita esponenziale alla saturazione è sincrono, sia per ciò che concerne la densità ottica, sia per ciò che concerne la numerosità batterica.

Mentre le curve di crescita della fig. 1 sono state tutte eseguite nelle stesse condizioni di ossigenazione della coltura, variando la concentrazione iniziale del glucosio, le fig. 2 e 3 mostrano invece curve di crescita ottenute con la stessa concentrazione iniziale di glucosio e differenti condizioni di agitazione, cioè di ossigenazione della coltura. Esse confermano in modo particolarmente chiaro l'esistenza di stati di crescita transitori, in cui la crescita è rallentata per difetto di ossigenazione. Sulle profonde differenze di andamento di queste due curve ritorneremo per altro in un prossimo lavoro.

3. IL PASSAGGIO DALLA CRESCITA ESPONENZIALE ALLA SATURAZIONE

Riferendoci ora al caso in cui la coltura si mantiene sempre omogenea e l'ossigenazione non è mai limitante, occorre individuare la causa del sincronismo, nel passaggio dalla crescita esponenziale alla saturazione. Si può pensare che tale sincronismo sia più apparente che reale. Infatti, nell'ultima frazione della curva di crescita, il glucosio si va esaurendo molto rapidamente: in un tempo pari a un periodo di duplicazione, ne viene consumato tanto quanto ne era stato consumato lungo tutta la crescita precedente a partire dall'inoculazione del terreno. Tale rapida caduta della concentrazione del nutrimento tende naturalmente a ridurre in un intervallo di tempo molto breve una eventuale fase di transizione tra la crescita esponenziale e la saturazione.

Se questa fosse la corretta interpretazione del fenomeno, la fase di transizione dovrebbe diventare tanto più evidente, quanto minore risulti la densità batterica alla saturazione. Una serie di curve di crescita eseguite tutte nelle stesse condizioni, con concentrazioni iniziali di glucosio sempre più basse, dovrebbe mettere in evidenza come il passaggio dalla crescita esponenziale alla saturazione si faccia corrispondentemente più graduale. Ciò di fatto non si osserva. Seguendo la crescita delle colture mediante misure di densità ottica, come mostra la fig. 4, la durata della transizione appare sostanzialmente indipendente dalla densità batterica alla saturazione e non supera mai, a quanto sembra, i $3 \div 5$ minuti, con tempi di duplicazione dell'ordine di 50 minuti. Ad una ri-

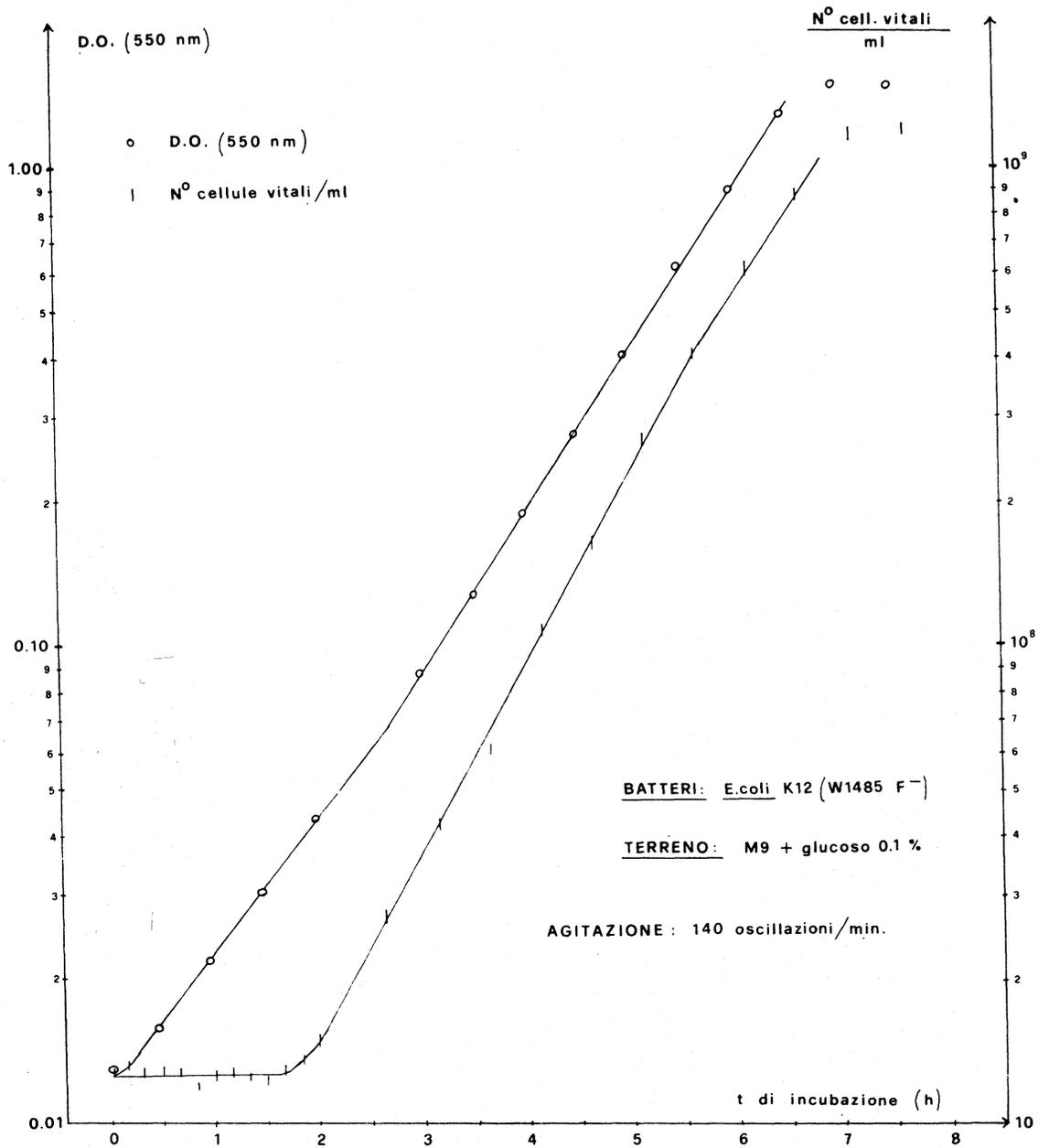


Fig. 2.

duzione per un fattore 30 della concentrazione iniziale del glucosio, dovrebbe corrispondere un allungamento per un fattore dello stesso ordine di grandezza della fase di transizione. Il fatto che un effetto del genere non si osservi porta a concludere che la larghezza naturale della transizione è veramente molto ridotta.

Sembra dunque che si debba concludere che esiste una concentrazione re-

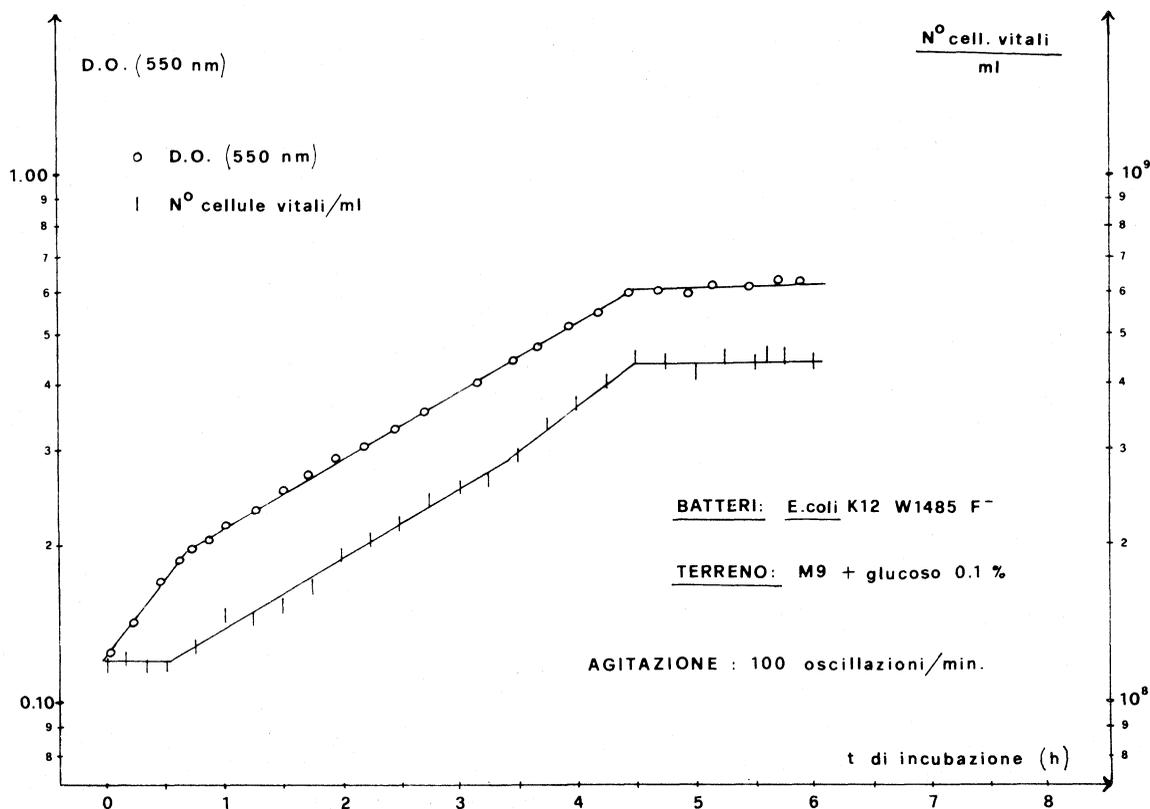


Fig. 3.

sidua critica di glucosio, alla quale la densità ottica della coltura cessa di crescere, alla quale cioè la sintesi *de novo* di materiale biologico si arresta. Ciò pone tutta una serie di domande, ad alcune delle quali cercheremo ora di dare una risposta.

4. BLOCCO DELL'ATTIVITÀ BIOSINTETICA E DIVISIONI CELLULARI

In primo luogo, come abbiamo già posto in evidenza [1], nel momento in cui scatta questa specie di « interruttore » che blocca la sintesi di materiale biologico, le divisioni cellulari non si arrestano. Se la coltura è mantenuta omogenea e sufficientemente ossigenata, il numero delle cellule continua a crescere a densità ottica costante, con lo stesso periodo di duplicazione di prima, per un tempo dell'ordine di 15 ÷ 30 minuti: quelle che ancora si dividono sono evidentemente cellule che avevano iniziato il loro ciclo cellulare prima dello scatto dell'interruttore.

La prima idea che si presenta alla mente è che l'interruttore blocchi effettivamente nella cellula ogni attività biosintetica e che continuino a dividersi solo quelle cellule che erano state programmate a farlo prima del blocco. È stata in-

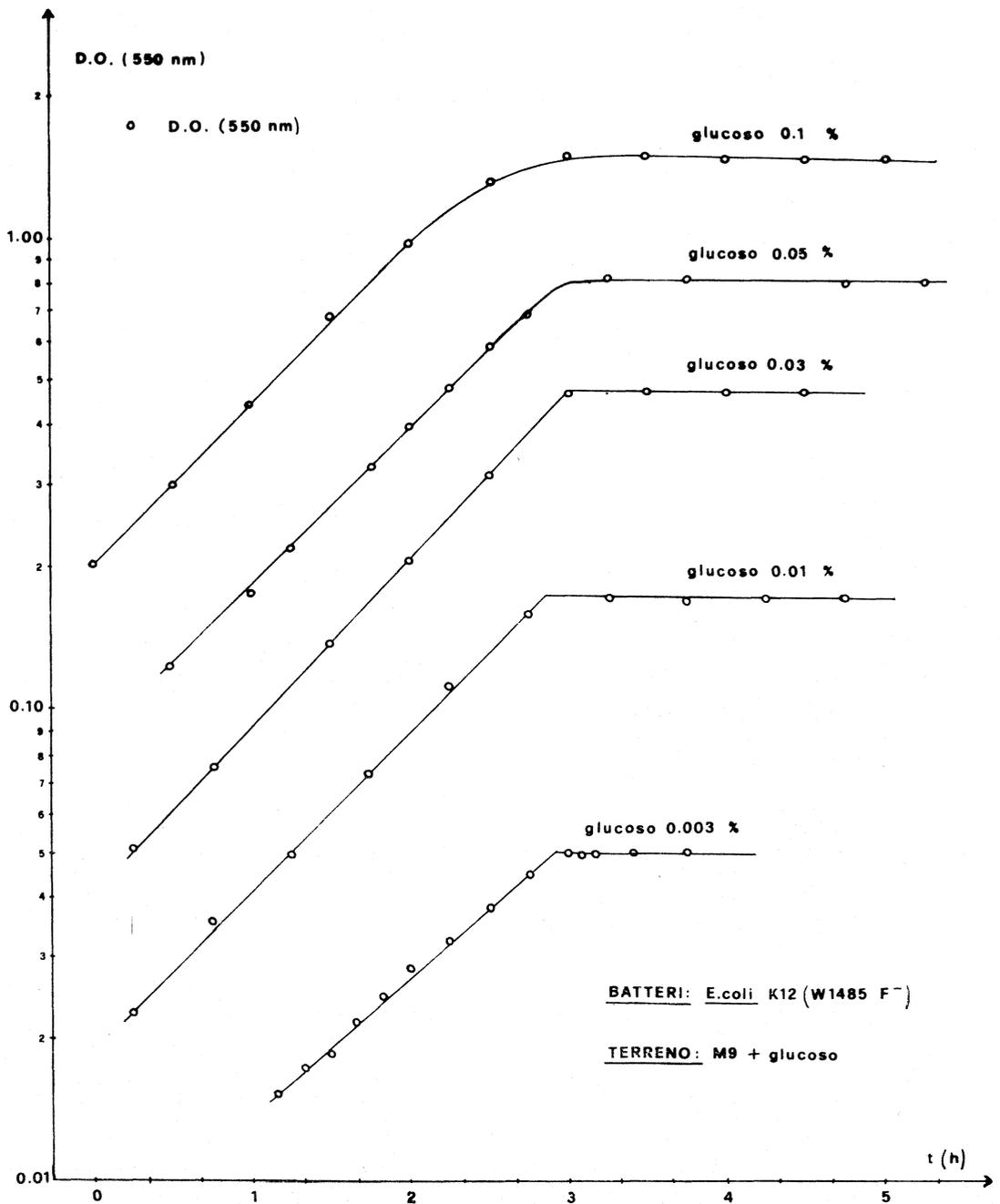


Fig. 4.

fatti, com'è ben noto, avanzata l'ipotesi che l'ordine di dividersi venga impartito al momento in cui ha inizio un ciclo di duplicazione del cromosoma e che tale ordine venga eseguito un certo tempo, D, dopo che tale ciclo di duplica-

zione si è esaurito [5]. Nel nostro caso, l'ordine verrebbe regolarmente eseguito, pur essendo mancata nell'ultimo periodo ogni attività biosintetica.

Ci sono tuttavia diversi fatti che tendono ad escludere questa interpretazione. Per esempio, abbiamo visto che, se la ossigenazione della coltura è insufficiente, il ritmo delle divisioni cellulari in questo periodo rallenta: ciò significa che la divisione cellulare non dipende esclusivamente da una programmazione anteriore, ma richiede per un suo buon esito una produzione regolare continua di energia. Il catabolismo del glucosio deve continuare, anche se non siamo per ora in grado di dire se si tratti di glucosio residuo che la cellula continua ad assorbire dal mezzo, o della utilizzazione ad esaurimento di un suo pool interno.

D'altra parte, sembra che la sintesi del DNA debba continuare regolarmente nell'intervallo di tempo, T , tra il blocco della crescita della densità ottica e il blocco della crescita della numerosità batterica. Se infatti l'avanzamento delle forchette replicative lungo il cromosoma risultasse bloccato in tutte le cellule allo scatto del primo interruttore, potrebbero continuare a dividersi nell'intervallo di tempo T solo quelle cellule che al momento dello scatto erano nella fase D del loro ciclo cellulare, avendo ultimato una duplicazione del loro cromosoma [6]. Ciò tuttavia avrebbe due conseguenze. In primo luogo, T dovrebbe risultare sempre uguale o minore di D (il tempo che passa tra la fine della duplicazione del cromosoma e la successiva divisione cellulare). Anche se T e D sono certamente dello stesso ordine di grandezza, non c'è alcuna indicazione che coincidano o che sia sempre $T < D$, e soprattutto che dipendano nello stesso modo dalle condizioni di crescita. Sull'argomento ritorneremo per altro in un prossimo lavoro.

In secondo luogo, una volta raggiunta la saturazione della numerosità batterica, mancherebbero nella coltura cellule nella fase D e ci sarebbe un eccesso di cellule di età zero, il che si manifesterebbe con fenomeni di sincronizzazione dopo rinfresco. Fenomeni del genere *di regola* non si osservano, mentre è sempre (almeno nelle nostre condizioni): $T > 0$. Anche se questo argomento, tuttavia, ci proponiamo di ritornare.

5. COMPARTIMENTI FUNZIONALI DELLA CELLULA BATTERICA

Se conveniamo di usare il termine « compartimento » in senso figurato, senza alcuna connotazione geometrica, possiamo dunque pensare la cellula come *funzionalmente* divisa in almeno due compartimenti distinti, utilizzando entrambi energia e materiali provenienti dal sistema di alimentazione. Il primo di questi compartimenti comprende l'intero sistema di sintesi del materiale biologico (il sistema di sintesi delle proteine e presumibilmente anche il sistema del metabolismo intermedio), mentre il secondo comprende essenzialmente il sistema del programma.

Al diminuire della concentrazione esterna del glucosio, il sistema di alimentazione in energia e materiali entra a un certo punto in crisi e ciò determina il

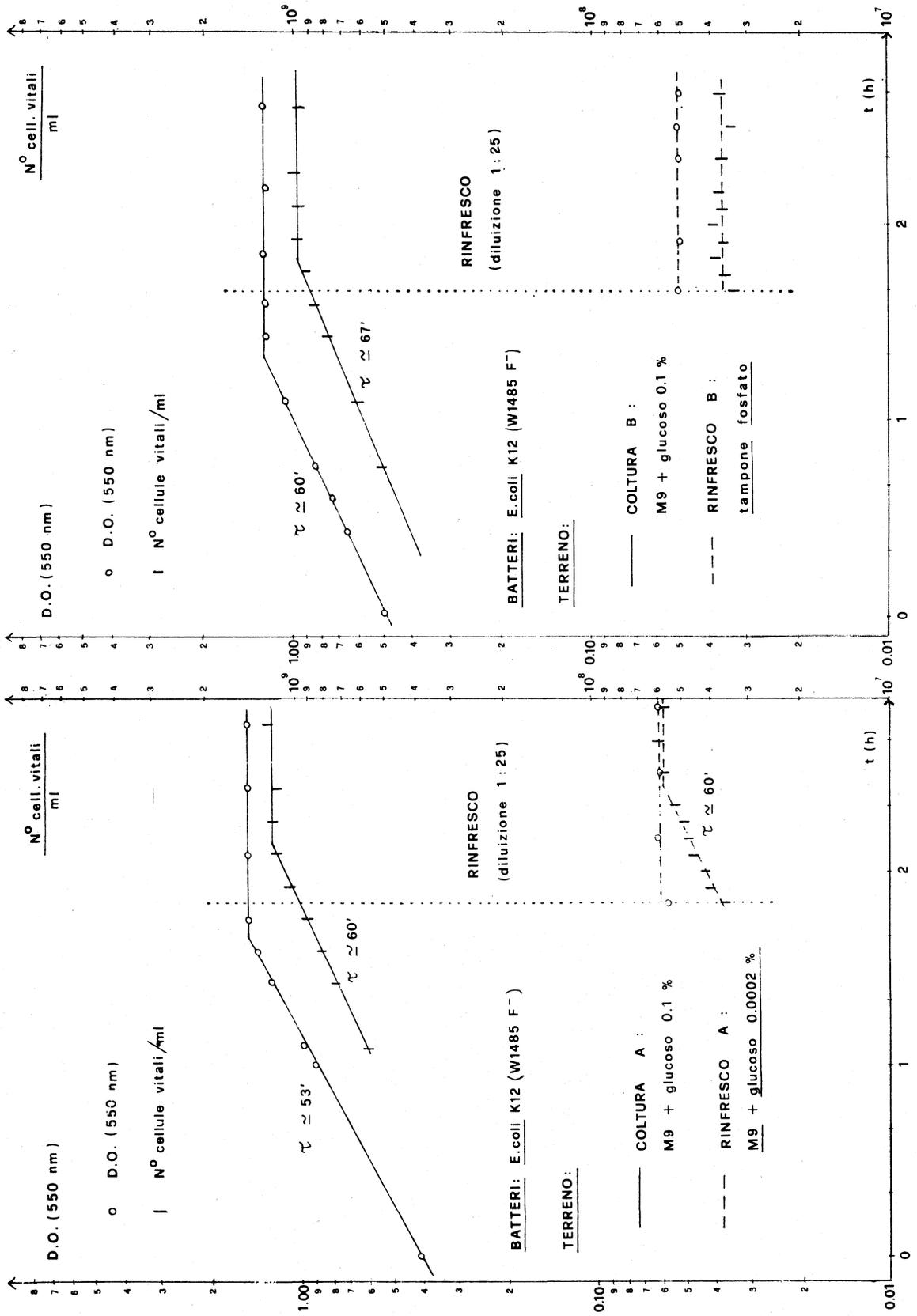


Fig. 5.

blocco del primo compartimento funzionale, che assorbe da solo oltre il 90% dell'energia derivante dal catabolismo del glucosio, mentre il secondo compartimento continua per un certo tempo a funzionare normalmente, con l'energia ancora prodotta dal sistema di alimentazione. Il meccanismo che realizza la divisione in due della cellula sembra legato essenzialmente al compartimento funzionale del programma: anch'esso continua a funzionare, utilizzando probabilmente materiali specifici presintetizzati

Il blocco del secondo compartimento funzionale potrebbe essere causato appunto da esaurimento di materiali presintetizzati: le cellule che non si dividono nel periodo T potrebbero essere quelle che non hanno fatto a tempo a sintetizzare (prima dello scatto del primo interruttore) i materiali necessari per la successiva divisione cellulare. Tale ipotesi è però smentita dal fatto che se si diminuisce la densità batterica, dopo che la densità ottica ha raggiunto la saturazione, mantenendo invariata la composizione del mezzo, si ottiene un aumento della frazione di cellule che si dividono nell'intervallo di tempo T . Ciò è mostrato nella fig. 5.

È pertanto da ritenere che anche questo secondo blocco, che interessa la numerosità batterica, sia essenzialmente condizionato dalla residua disponibilità di energia, il che è confermato ancora una volta dal fatto che la funzionalità del compartimento si blocca a un certo istante contemporaneamente in tutte le cellule, dopo aver sempre funzionato in tutte in modo normale.

Dopo rinfresco della coltura e dopo il periodo di lag, riprende la crescita esponenziale senza alcuna apprezzabile fase di transizione. La più semplice interpretazione di questo fatto è che il secondo compartimento funzionale riprenda a un certo punto la sua attività contemporaneamente in tutte le cellule, a partire dallo stato in cui era rimasto bloccato al precedente raggiungimento della saturazione della numerosità batterica.

Nel periodo di lag, solo il primo compartimento funzionale è attivo, mentre il secondo non riprende se non dopo il recupero di certe condizioni interne, ancora tutte da determinare. Queste condizioni comportano certamente anche il recupero di dimensioni cellulari medie dello stesso ordine di grandezza di quelle che i batteri della coltura precedente avevano prima della saturazione della densità ottica. Ma questa certamente non è tutta la storia. La durata del lag è legata in modo molto complesso, non solo alle condizioni di crescita della nuova coltura, ma anche all'intera storia precedente dei batteri dell'inoculo, in particolare al tempo per cui essi sono rimasti quiescenti, nella precedente fase di saturazione. L'analisi diretta del fenomeno si presenta quindi, per ora, come un compito oltremodo difficile. Una via possibile per incominciare ad aggredire il problema sembra invece essere quella di cercare di individuare, nella biochimica della cellula, i passi chiave, che per i due compartimenti funzionali sopra individuati possano funzionare da interruttori, al progressivo diminuire della disponibilità di glucosio nel mezzo di coltura.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AGENO M., SALVATORE A.M. e VALLERANI D. - *Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica*. « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80 (4), (aprile 1986).
- [2] INGRAHAM J.L., MAALØE O. e NEIDHARDT F.C. (1983) - *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland Mass., 1983. Pag. 5 e cap. 6.
- [3] BACHMAN B.J. (1972) - *Pedigrees of some mutant strains of E. coli K 12*, « Bacteriol. Rev. », 36, 525.
- [4] Si veda per esempio: WATSON J.D. (1975) - *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed., Benjamin, Menlo Park, pag. 63.
- [5] Si veda per esempio: HELMSTETTER C., PIERUCCI O., WEINBERGER M., HOLMES M. e TANG M.S. (1973) - *Control of cell division in Escherichia coli*, in: Sokatch J.R., Ornston L.N. eds. « The Bacteria, vol. VII. Mechanisms of Adaptation », Academic Press, New York, pag. 517-579.
- [6] COOPER S e HELMSTETTER C.E. (1968) - *Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r*, « J. Mol. Biol. », 91, 519.