
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO, MASSIMILIANO BENINI, MARIA
ANTONIETTA MATRICCIANI

Fattori limitanti la crescita batterica

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 80 (1986), n.6, p. 447–457.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_6_447_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. — *Fattori limitanti la crescita batterica* (*). Nota di MARIO AGENO, MASSIMILIANO BENINI e MARIA ANTONIETTA MATRICIANI, presentata (**) dal Corresp. M. AGENO.

SUMMARY. — The effects of oxygen or glucose starvation on the growth rates and on the saturation levels of a bacterial culture in liquid minimal medium are re-examined. The existence of exponential growth unbalanced growth states and of point-transitions from state to state is confirmed.

Growth curves with different oxygen availabilities are compared and the validity of the theoretical formula:

$$\sum_i \tau_{mi} (D_i - D_{i-1}) = \text{const.}$$

is examined. Here, D_i is the optical density at the i^{th} transition point, τ_{mi} is the doubling time of the optical density between the $(i-1)^{\text{th}}$ and the i^{th} transition point, and the sum is effected all along a growth curve.

The features of the point-transitions are discussed and the conclusion is derived that they might be caused by the switching over of a multimeric enzyme, when some threshold value of the concentration of a normal cellular constituent is reached.

The residual glucose concentration in the liquid medium, when the optical density stops growing, is evaluated with two different methods and it is found to be of the order of $1 \div 2$ mg/l.

1. L'OSSIGENO COME FATTORE LIMITANTE

In un precedente lavoro [1] è già stato da noi esaminato il ruolo svolto da glucosio ed ossigeno, come fattori limitanti la crescita batterica. Ci proponiamo ora di estendere tale esame, anche in relazione al nuovo quadro interpretativo da noi proposto per la crescita di una popolazione batterica in terreno liquido minimo [2].

Per ciò che concerne l'ossigenazione della coltura, abbiamo in precedenza confrontato tra loro colture ugualmente ossigenate, differenti solo per la concentrazione iniziale del glucosio. In tali colture, il raggiungimento della saturazione avviene a valori diversi della numerosità batterica (n. dei batteri per ml), cioè anche a valori diversi della quantità di ossigeno disponibile per batterio, in prossimità della saturazione. Abbiamo potuto verificare che:

1) finché l'agitazione della coltura è sufficiente per mantenerne la omogeneità, malgrado che i batteri non siano tutti alla stessa distanza dalla superficie limite attraverso cui l'ossigeno diffonde nel mezzo liquido, la crescita si mantiene rigorosamente esponenziale fino al raggiungimento della saturazione;

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

(**) Nella seduta del 20 giugno 1986.

2) se, nelle suddette condizioni, a un certo punto la quantità di ossigeno disponibile per batterio risulta inferiore alla richiesta, tutti i batteri della coltura passano contemporaneamente dal loro stato di crescita esponenziale ad altro stato di crescita pure esponenziale, ma con periodo di duplicazione più lungo;

3) se invece la numerosità batterica cresce in modo tale che a un certo punto l'agitazione del liquido non è più sufficiente a mantenere l'omogeneità della coltura, tra la fase di crescita esponenziale e quella di saturazione fa la sua comparsa una fase di transizione, in cui il periodo di duplicazione *medio* si va allungando con continuità. Ciò è dovuto al fatto che a partire dai batteri meno ossigenati, un numero via via crescente di batteri passa a stati di crescita (esponenziale) rallentata.

Vogliamo ora confermare ed estendere tali risultati ponendo a confronto tra loro colture sviluppatesi tutte nello stesso terreno, con concentrazioni iniziali di glucoso uguali, differenti tra loro solo per il flusso di ossigeno disponibile per la crescita batterica.

Anche in questa nuova serie di esperimenti abbiamo fatto uso del solito ceppo di *E. coli* K12 W1485 F⁻, le cui colture sono state fatte crescere in terreno liquido minimo M9 con 0,1% di glucoso come unica fonte di carbonio. Ogni coltura era contenuta in una beuta da 250 ml, mantenuta a 37 °C in un bagno agitatore di Dubnoff, che in tutti i nostri precedenti esperimenti era stato sempre regolato in modo da imprimere al liquido 140 oscillazioni al minuto. È questo ovviamente solo un riferimento convenzionale, un dato legato alle particolari caratteristiche del nostro bagno, non sufficiente a calcolare quanto ossigeno sia in realtà a disposizione dei batteri della coltura. Abbiamo tuttavia verificato che, a parità di tutte le altre condizioni e in particolare a parità di geometria del dispositivo, esso corrisponde a condizioni di aerazione molto ben definite e perfettamente riproducibili. Assicura inoltre alla coltura un rifornimento regolare di ossigeno, non limitante fino a numerosità batteriche prossime a 10⁹ batteri/ml. Abbiamo pertanto deciso di variare l'ossigenazione della coltura, facendo variare il numero delle oscillazioni al minuto del carrello del nostro bagno agitatore, mantenendo tuttavia tale numero sempre entro limiti tali da non compromettere l'omogeneità delle condizioni di crescita per tutta l'estensione del liquido. Le differenze evidenziate sono naturalmente solo qualitative, ma è appunto la varietà qualitativa dei processi di crescita che vogliamo mettere in evidenza a questo punto della nostra ricerca.

Le figg. 1, 2 e 3 mostrano a titolo di esempi le curve di crescita di tre colture realizzate tutte nelle stesse condizioni, salvo che per ciò che riguarda l'ossigenazione, ottenuta rispettivamente con 140, 100 e 155 oscillazioni al minuto del carrello del bagno agitatore.

Osserviamo innanzi tutto che le tre curve hanno in comune le seguenti caratteristiche (confermate da molti altri esperimenti che qui per brevità non si riportano).

1) Nei limiti della precisione delle misure, non esistono fasi di transizione di durata apprezzabile tra la fase di lag e quella di crescita esponenziale,

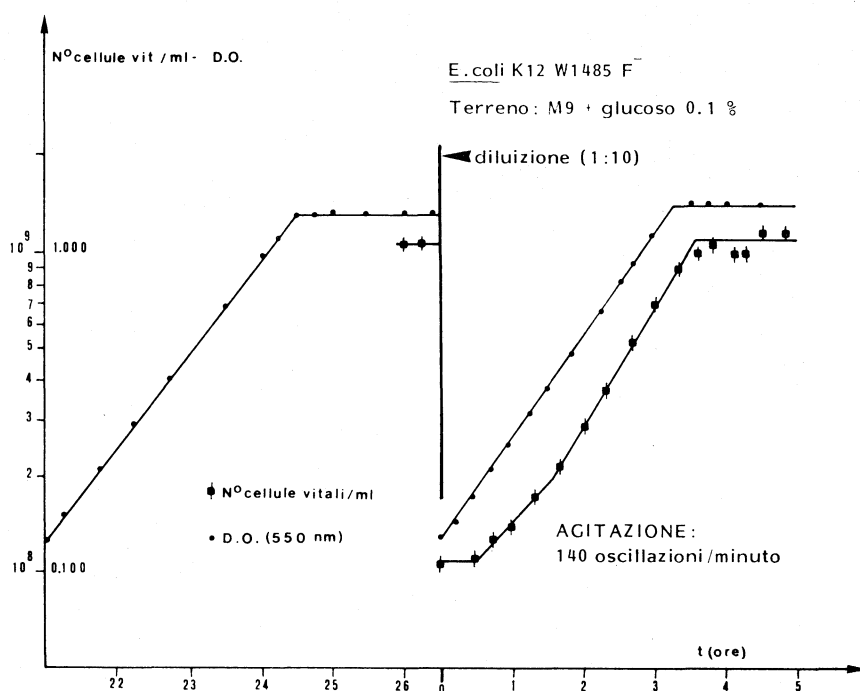


Fig. 1.

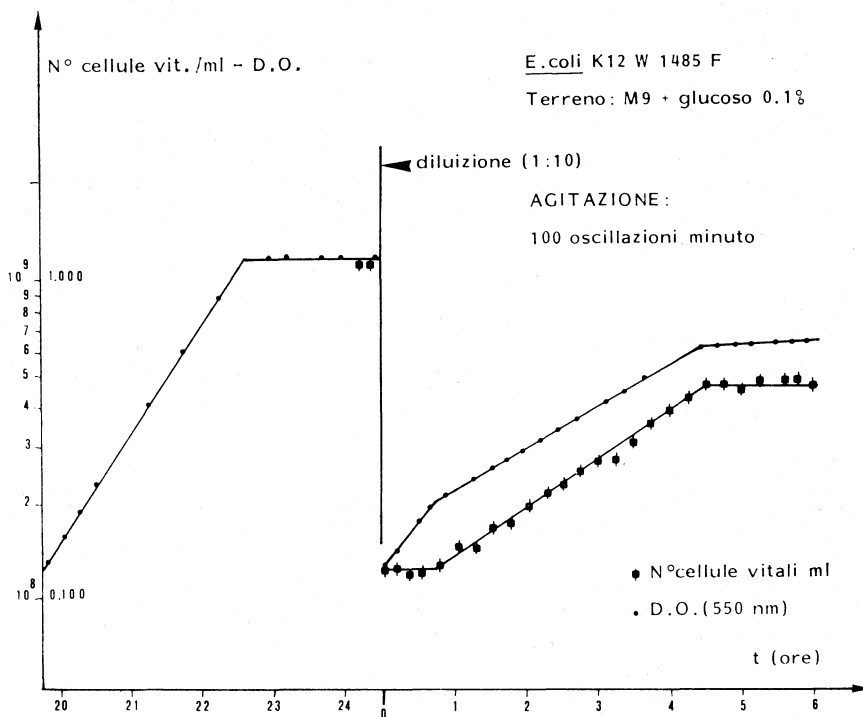


Fig. 2.

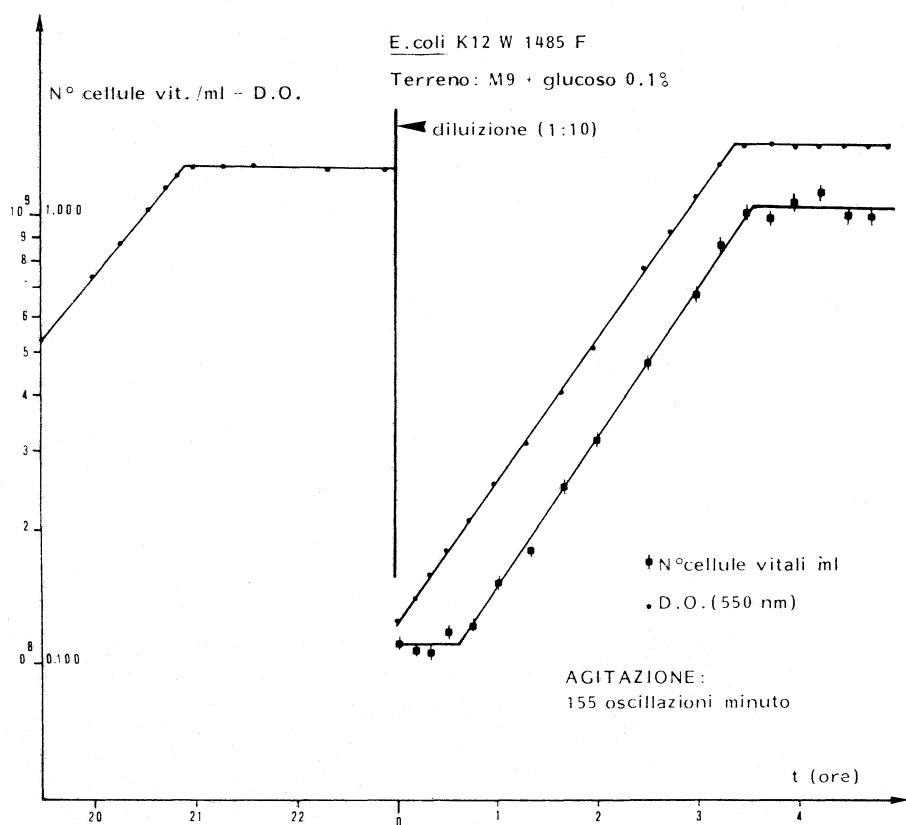


Fig. 3.

tra la fase di crescita esponenziale e quella di saturazione e nel passaggio da una fase di crescita esponenziale ad un'altra con periodo di duplicazione diverso. Ciò vale sia per la coltura madre che per il rinfresco e per le curve di crescita in D.O. come per quelle in numerosità batterica. Ne risulta quindi ancora una volta confermato il quadro interpretativo proposto in [1].

2) In tutti e tre gli esperimenti, il rinfresco è stato eseguito due ore dopo che la coltura madre aveva raggiunto la saturazione in D.O. In tutti, la curva di crescita della D.O. dopo rinfresco non presenta periodo di lag di durata apprezzabile: i batteri, in cui la produzione di materiale biologico a causa della scarsità del glucosio nel mezzo è rimasta bloccata per due ore, riprendono a produrre regolarmente tale materiale in un tempo inferiore a tre minuti dal momento in cui vengono convenientemente alimentati. Il periodo di duplicazione è, entro i limiti della precisione delle misure, quello della coltura madre prima della saturazione, piccole differenze essendo probabilmente da imputarsi alla non identica storia degli inoculi batterici.

3) In tutti e tre gli esperimenti, la curva di crescita della numerosità batterica mostra invece un periodo di lag della durata di circa 30 minuti. Questo

sembra essere il tempo necessario perché i batteri riprendano dimensioni medie compatibili con la ripresa delle divisioni cellulari e quindi della crescita esponenziale del loro numero. Non si può tuttavia escludere, in base ai dati, un periodo di lag leggermente più lungo in condizioni di minore ossigenazione.

2. EFFETTI DELLE VARIAZIONI DI OSSIGENAZIONE

È tuttavia a partire dalla fine del lag che gli effetti della differente ossigenazione diventano particolarmente evidenti. Le due curve di crescita della numerosità batterica a 140 e 155 oscillazioni al minuto sono in questa fase qualitativamente molto simili, salvo che sotto due aspetti:

1) a numerosità batteriche molto elevate, la coltura a 140 oscillazioni al minuto sembra incominciare ad essere lievemente in debito di ossigeno;

2) nella stessa coltura, nella fase iniziale della crescita, per la durata di circa un periodo di duplicazione i batteri vanno rapidamente aumentando le loro dimensioni medie, dopo di che passano bruscamente ad altro stato di crescita, in cui le loro dimensioni medie vanno invece più lentamente diminuendo. Nella coltura a 155 oscillazioni al minuto, c'è solo un accenno ad un andamento del genere: i dati sono tuttavia compatibili anche con crescite praticamente sempre parallele della D.O. e della numerosità batterica.

Molto diverso è in questa fase l'andamento della coltura meno ossigenata, quella a 100 oscillazioni al minuto. In essa gli effetti limitanti della scarsità di

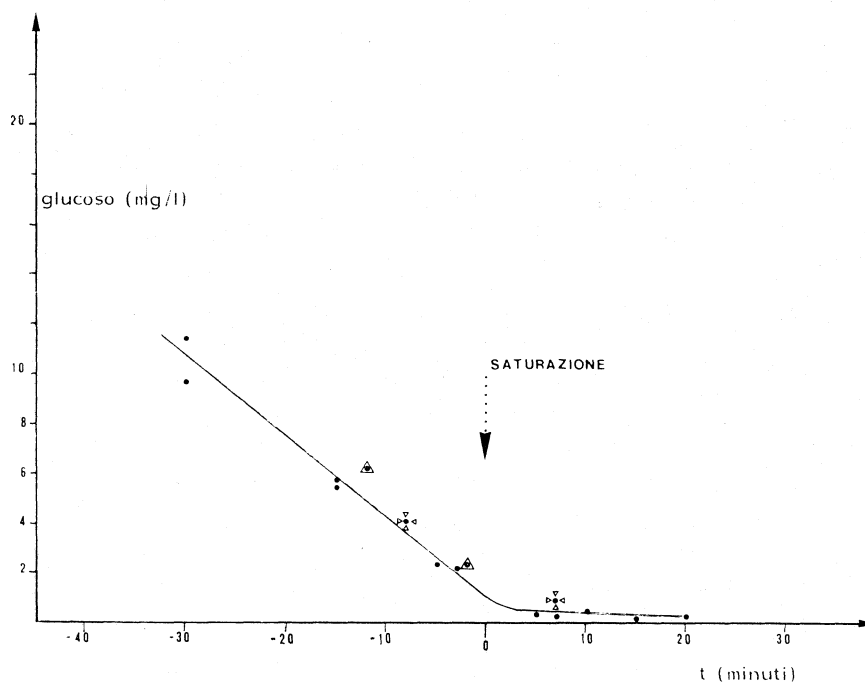


Fig. 4.

ossigeno sono evidenti. Nella fase di lag, l'energia a disposizione di ciascuna cellula è ancora manifestamente sufficiente ad assicurare una crescita del materiale biologico con un periodo di duplicazione che è sostanzialmente quello normale per il mezzo liquido impiegato: l'ossigeno non è qui limitante. Non appena però riprendono la sintesi del DNA e le divisioni cellulari, i batteri passano, *tutti contemporaneamente*, in un nuovo stato di crescita con periodo di duplicazione del materiale biologico assai più lungo. In tale stato i batteri vanno lentamente diminuendo le loro dimensioni medie.

Non siamo per il momento in grado di dire con precisione che cosa determini i periodi di duplicazione durante e dopo il lag. È tuttavia da attendersi che l'insufficienza dell'ossigeno faccia sì che una frazione dei prodotti di demolizione del glucosio, anziché essere ossidata nel ciclo di Krebs e nella catena respiratoria venga rilasciata nel mezzo. Ne consegue evidentemente:

a) una diminuzione del numero medio di molecole di ATP prodotte per molecola di glucosio consumata;

b) un aumento della quantità di glucosio consumata, per batterio generato nella coltura;

c) a parità di concentrazione iniziale di glucosio, una diminuzione proporzionale del livello di saturazione del materiale biologico e presumibilmente anche di quello della numerosità batterica, ammesso che non vi siano forti variazioni delle dimensioni batteriche medie.

Tutto ciò risulta evidente negli andamenti delle curve di crescita presentate. Le due curve di crescita a 155 e a 140 oscillazioni al minuto raggiungono entrambe una D.O. limite di circa 1,4 cui corrisponde una numerosità batterica pari a circa 10^9 batteri per millilitro. La curva di crescita a 100 oscillazioni al minuto raggiunge invece una D.O. limite di appena 0,62, con una numerosità batterica limite di $4,5 \cdot 10^8$ batteri/ml. Ammesso che la concentrazione residua di glucosio nel mezzo sia sempre la stessa, c'è grosso modo nei due casi un fattore 2,2 nel consumo di glucosio per unità di massa batterica o per batterio sintetizzato. Sembra dunque che a 100 oscillazioni al minuto la produzione di energia per molecola di glucosio metabolizzata si riduca a meno della metà.

Non abbiamo per il momento cercato di vedere se questa riduzione sia graduale al diminuire della ossigenazione, o se invece si tratti di due stati alternativi, con un passaggio pressoché istantaneo dall'uno all'altro, quando l'ossigenazione passi attraverso un certo valore critico.

3. CRESCITA DEL MATERIALE BIOLOGICO E SATURAZIONE

È tuttavia possibile mettere in relazione tra loro il periodo τ_m di duplicazione del materiale biologico, con la densità ottica di saturazione D_s della coltura, a parità di concentrazione iniziale di glucosio. Sarà infatti:

$$D = D_0 2^{t/\tau_m} \quad \text{e:} \quad D_s = D_0 2^{T/\tau_m}$$

essendo T la durata totale della crescita della coltura, in condizioni come le nostre in cui non si hanno fasi di transizione tra fase di crescita esponenziale e fasi stazionarie.

Incominciamo con l'ammettere che la quantità q di glucoso che entra in un batterio per unità di tempo e per unità di lunghezza sia costante, nel corso della crescita esponenziale. Il glucoso viene infatti trasferito dal mezzo all'interno del batterio da unità del complesso enzimatico fosfotrasferasi, che è ragionevole supporre distribuite su tutta la superficie batterica con densità costante. Ed è certamente la saturazione del meccanismo di trasporto, che rende la velocità di crescita indipendente dalla concentrazione esterna del glucoso, per tutta la durata della crescita esponenziale. Sia ora L la somma delle lunghezze di tutti i batteri della coltura a un certo istante. Siccome i batteri hanno diametro e densità interna costanti, L è proporzionale al materiale biologico totale presente nella coltura e quindi alla D.O. di quest'ultima. Per cui:

$$L = L_0 2^{t/\tau_m}$$

D'altra parte, la quantità di glucoso consumata nella coltura in un intervallo di tempo dt , è:

$$qL_0 2^{t/\tau_m} dt.$$

Per cui la quantità totale di glucoso consumata in tutta la durata T della crescita risulta essere:

$$\frac{qL_0 \tau_m}{\ln 2} (2^{T/\tau_m} - 1) = \frac{q\tau_m}{\ln 2} (L_s - L_0) = V (c_0 - c_r)$$

dove V è il volume della coltura e c_0 e c_r le concentrazioni iniziale e residua del glucoso nella coltura stessa.

Confrontiamo ora tra loro più colture, come le nostre delle figg. 1-3, per le quali c_0 e c_r sono le stesse e prendiamo di esse volumi uguali. Se la crescita avviene sempre con lo stesso periodo di duplicazione in ciascuna, si avrà per tutte:

$$\frac{q\tau_m}{\ln 2} (L_s - L_0) = \text{cost}$$

ed essendo L proporzionale alla densità ottica D , anche:

$$\tau_m (D_s - D_0) = \text{cost.}$$

Se invece la crescita avviene in più tratti ciascuno con un suo periodo di duplicazione $\tau_{m,i}$, si avrà:

$$\sum_i \tau_{m,i} (D_i - D_{i-1}) = \text{cost.}$$

Per le nostre tre curve risulta:

Osc./min	τ_m	D_{i-1}	D_i	$\Sigma \tau_{mi} (D_i - D_{i-1})$
100	60	0,125	0,20	4,5
	141	0,2	0,62	59,2
				63,7
140	55	0,115	1,38	69,6
155	57	0,121	1,42	72,5

Sembra dunque che q non sia veramente costante ma possa dipendere sensibilmente dalla ossigenazione della coltura. Per un effetto del genere si possono proporre spiegazioni diverse. Per esempio, si può avanzare l'ipotesi che l'attività del complesso enzimatico della fosfotrasferasi venga stimolata o inibita a seconda della concentrazione dell'ossigeno nel mezzo; oppure un tale effetto potrebbe esser dovuto ad un'azione di massa causata da una più o meno rapida eliminazione nella cellula dei primi derivati dalla elaborazione della molecola del glucoso. Ci proponiamo comunque di ritornare su questo punto per approfondirlo.

Una transizione come quella mostrata dalla crescita della D.O. nella fig. 2, sincrona con l'avviarsi, contemporaneo in tutta la coltura, delle divisioni cellulari, può naturalmente essere la conseguenza di un processo complicato, costituito da una catena di eventi. Si tratta di un processo sulla natura del quale non siamo per il momento in grado di fare neppure delle ipotesi. Possiamo affermare tuttavia che esso ha certamente le due caratteristiche seguenti:

1) la sua durata complessiva è sicuramente molto breve, in confronto ai periodi di duplicazione, iniziale e finale, della densità ottica: non più di alcuni minuti, probabilmente meno di tre, come già valutato in diversi altri casi di transizioni sincrone tra stati di crescita diversi. Siccome nella coltura le divisioni cellulari non sono sincronizzate, se ne deduce che il suo verificarsi è indipendente dall'età della cellula, il che fa pensare che esso non coinvolga le « macchine molecolari » cellulari, ma piuttosto che si svolga a livello biochimico.

2) Qualunque sia la catena di eventi che lo costituisce, ci deve essere un primo *evento scatenante*, causato dai normali processi che si svolgono con continuità nello stato di crescita iniziale. L'evento scatenante non può essere ad esempio la sintesi di una nuova sostanza, di regola non presente nella cellula: una novità del genere può ovviamente verificarsi solo se, nell'ordinario svolgersi dei processi cellulari, si determina un evento, che sia una conseguenza di tali processi e insieme costituisca in qualche modo una discontinuità nel loro svolgersi (una discontinuità che può o no verificarsi) e che dia l'avvio a tale sintesi. L'evento scatenante potrebbe quindi essere *il raggiungimento di un va-*

lore di soglia, da parte della concentrazione di un normale costituente cellulare: tutti gli effetti cosiddetti allosterici su enzimi multimerici sono sostanzialmente effetti di questo tipo, mentre non conosciamo altri tipi di eventi cellulari che presentino queste stesse caratteristiche.

4. IL GLUCOSO, COME FATTORE LIMITANTE

Passiamo ora ad occuparci di ciò che avviene, quando in una coltura batterica in crescita esponenziale e sempre sufficientemente ossigenata, diventa limitante il glucoso. Già sappiamo che a densità batteriche elevate, mentre la concentrazione del glucoso nel mezzo va sempre più rapidamente diminuendo, la crescita esponenziale del materiale biologico continua fino a un punto di transizione, al quale si arresta bruscamente: la numerosità batterica continua invece a crescere esponenzialmente ancora per $15 \div 30$ minuti (a D.O. costante), dopo di che si arresta anch'essa, in modo altrettanto improvviso.

La prima domanda che ci siamo posta a questo proposito è quale sia la concentrazione residua del glucoso nel mezzo esterno, nel momento in cui la densità ottica della coltura raggiunge la saturazione. Abbiamo ammesso tentativamente che si tratti di una concentrazione critica, indipendente dalle condizioni di crescita, dalla densità batterica e dalla precedente storia dei batteri della coltura. Si tratta, com'è ovvio, di un dato molto importante ai fini della interpretazione dei nostri risultati.

Fin dalle prime misure orientative, ci siamo però resi conto della difficoltà di determinare tale concentrazione con una certa precisione, perché ai limiti della sensibilità dei metodi analitici correnti. Non siamo riusciti per il momento ad ottenere per essa altro che un ordine di grandezza, che riteniamo tuttavia abbastanza attendibile come tale, per la convergenza su di esso di due diversi metodi di misura.

Il primo metodo è consistito nel seguire una coltura batterica con misure di D.O. fino al raggiungimento della saturazione e nell'eseguire subito dopo una serie di diluizioni in mezzi contenenti piccole concentrazioni di glucoso note e decrescenti. Se la concentrazione del glucoso nel nuovo mezzo è minore od uguale a quella del mezzo originario al momento della transizione, la D.O. non crescerà ulteriormente. In caso contrario, si dovrà osservare una crescita. Il metodo presta il fianco ad alcune critiche. Non è detto che la transizione avvenga esattamente allo stesso valore della concentrazione del glucoso in discesa e in salita, e neppure che il riprendere o meno della crescita della D.O. dipenda solo dalla concentrazione del glucoso nel nuovo mezzo. Nell'intervallo di tempo tra la prima transizione e la diluizione, la concentrazione del glucoso nel mezzo esterno va ancora decrescendo: al passaggio nel nuovo mezzo si può avere un improvviso aumento di tale concentrazione e non si può escludere a priori che ciò possa determinare una temporanea ripresa dell'attività biosintetica, anche se la concentrazione esterna finale è in realtà minore del valore alla transizio-

ne. Infine, la crescita della D.O. dopo diluizione può essere così lenta da essere difficilmente osservabile.

I risultati da noi ottenuti sono riassunti nella tabella che segue.

Coltura madre in M 9 + glucosio 0,1%. Diluizioni eseguite 10 min. dopo il raggiungimento della saturazione in D.O. ($D.O._{sat} = 1,3$)

1° prova		2° prova	
glucosio mg/l	crescita D.O.	glucosio mg/l	crescita D.O.
20	++	4	+
10	+	2	(—)
5	+	1	(+)
2,5	+	0,5	—

Ne abbiamo concluso che la concentrazione del glucosio nel mezzo esterno al momento della transizione è sicuramente maggiore di 0,5 mg/l e probabilmente compresa tra 1 e 2 mg/l.

Il secondo metodo da noi impiegato è quello della titolazione enzimatica diretta del glucosio nel mezzo liquido, dopo eliminazione dei batteri per filtrazione. Il test usato è quello « Glucosio/Fruttosio, Metodo UV » della Boheringer di Mannheim [3], il cui principio è il seguente. Il glucosio viene fosforilato a glucosio-6-fosfato e poi ossidato a gluconato-6-fosfato. In questo secondo passaggio, una quantità stechiometrica di $NADP^+$ viene ridotta a $NADPH_2$. È quest'ultima sostanza che viene titolata spettrofotometricamente e da cui si risale alla quantità di glucosio inizialmente presente. Il limite di sensibilità del metodo è di qualche milligrammo a litro, per cui nel nostro caso non ci si può attendere altro che un risultato indicativo.

Ci sono poi anche altre cause che contribuiscono a rendere incerto il risultato. Siccome non è possibile fare un prelievo esattamente all'istante della transizione, tutto ciò che si può fare è una serie di misure opportunamente intervalate nel tempo, secondo le indicazioni fornite da contemporanee misure di densità ottica. Per non avere a che fare con una discesa troppo ripida della concentrazione, conviene ovviamente mettersi in condizioni di bassa densità batterica: le nostre misure sono per questo state fatte su colture con una concentrazione iniziale di glucosio dello 0,003%, cui corrisponde una numerosità batterica all'istante della transizione di $3,4 \cdot 10^7$ batteri/ml. Siccome le operazioni di filtrazione richiedono un tempo dell'ordine di 30 secondi, durante i quali il consumo di glucosio parzialmente continua, non è ben definito il tempo a cui ciascuna titolazione va riferita.

I risultati delle misure eseguite in diversi esperimenti sono raccolte nella fig. 4. Si tratta di risultati molto incerti e tutto ciò che possiamo dire per il mo-

mento è che, nel loro insieme, essi non sono incompatibili con un valore della concentrazione residua del glucosio alla transizione dell'ordine di 1 mg/l.

Si osservi che dai dati della fig. 1 risulta che per fabbricare $8,9 \cdot 10^8$ batteri sono stati impiegate $3,35 \cdot 10^{18}$ molecole di glucosio. Il che significa che nel corso della crescita esponenziale della D.O. si consumano $3,76 \cdot 10^9$ molecole di glucosio per batterio fabbricato. Risulta che alla transizione rimangono solo $3,35 \cdot 10^6$ molecole di glucosio per batterio presente nella coltura, cioè circa 1/1.000 di quanto necessario per una nuova duplicazione cellulare. È evidentemente a questo punto che il meccanismo di trasporto del glucosio all'interno della cellula (il complesso enzimatico della fosfotrasferasi) cessa di essere saturato. Siccome in un batterio entrano in media circa $1,1 \cdot 10^6$ molecole di glucosio al secondo, il glucosio residuo sarebbe sufficiente ad alimentare ulteriormente l'intero metabolismo batterico per appena 3 secondi. Si valuta [4] che la richiesta energetica per mandare avanti la sola duplicazione del DNA sia tra il 5 e il 10% del totale. Ciò significa che il glucosio residuo potrebbe alimentare la duplicazione cellulare a D.O. costante per non più di un minuto. Il fatto che questo tempo risulti sperimentalmente circa 30 volte più lungo sembra si possa spiegare supponendo che a densità ottica costante vengano consumati essenzialmente la riserva interna di energia e il pool di precursori della cellula.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AGENO M., CLARO M. e DE BLASIO A. (1986) - *Il raggiungimento della saturazione in una coltura batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80 (5) (maggio 1986).
- [2] AGENO M., SALVATORE A.M. e VALLERANI D. (1986) - *Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 80 (4), (aprile 1986).
- [3] Il test ci è stato segnalato dal prof. Alessandro Ballio, al quale va il nostro ringraziamento.
- [4] INGRAHAM J.L., MAALØE O. e NEIDHART F.C. (1983) - *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer, Sunderland Mass., Cap. 3.