
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIO AGENO

**La crescita batterica. I: La legge di crescita della
numerosità batterica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.2, p. 371–376.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_2_371_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. — *La crescita batterica. I: La legge di crescita della numerosità batterica* (*). Nota (*) del Socio MARIO AGENO.

ABSTRACT. — *Bacterial growth. I: The growth of the number of cells.* When a bacterial culture in liquid medium is kept rigorously homogeneous in well defined and constant growth conditions, the growth rate of the optical density and that of the colony number on agar plates are usually different, because the mean bacterial mass is slowly varying. As a consequence, one must take into consideration three different laws of growth: 1) that of the number of cells (colonies on agar plates); 2) that of the biological mass (optical density); and 3) that of the single bacterial cell.

In the present paper, the first law of growth is examined. The semilogarithmic plot of the growth curve initially feels the effects of the distribution of the bacterial ages in the inoculum. However, it eventually forgets the initial conditions and takes the wellknown linear trend with constant growth rate.

All that demonstrates: 1) That this law of growth and that of the single bacterial cell are independent; and 2) that the doubling time undergoes fluctuations from cell to cell.

When the growth rate is independent from the initial conditions, the distribution law of the cell ages must be stationary. Therefore, the question arises as to what kinds of growth curve and cell ages distribution law are compatible with the stationarity of the last. A very simple functional equation gives the answer: the usual exponential growth curve only, and the corresponding stationary distribution law of the cell ages.

We surmise that a similar stationarity principle may be valuable also for a large category of other systems.

KEY WORDS: Bacterial cell; Bacterial growth; Cell division.

RIASSUNTO. — Quando una coltura batterica in terreno liquido è fatta crescere in condizioni rigorosamente controllate e costanti e tali da garantirne sempre l'omogeneità, la velocità di crescita della densità ottica della coltura e quella del numero dei batteri sono di regola diverse, a causa del fatto che la massa media di ciascun batterio va lentamente cambiando, nel corso della crescita della coltura. Occorre pertanto prendere in considerazione separatamente tre differenti leggi di crescita: 1) quella del numero dei batteri (numero delle colonie su agar); 2) quella della massa biologica per unità di volume della coltura (densità ottica); 3) quella della singola cellula batterica.

Nel presente lavoro viene esaminata e discussa la prima legge di crescita. Dopo aver osservato che la curva di crescita diventa, col passare del tempo, indipendente dalle condizioni iniziali della coltura, in particolare dal grado di sincronizzazione dei batteri dell'inoculo, se ne conclude che ciò dimostra l'esistenza di fluttuazioni da batterio a batterio del periodo di duplicazione. Si osserva inoltre che quando la curva di crescita ha raggiunto la sua forma limite indipendente dalle condizioni iniziali, la distribuzione delle età tra i batteri della coltura deve essere indipendente dal tempo.

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

(**) Presentata nella seduta del 20 novembre 1987.

Risolvendo una semplice equazione funzionale, si dimostra che l'unica legge di crescita compatibile con la stazionarietà della legge di distribuzione delle età batteriche è la legge di crescita esponenziale e contemporaneamente se ne deduce la legge di distribuzione della età stazionaria che le corrisponde.

Si è visto in precedenti lavori [1-5] che nel corso della crescita esponenziale di una coltura batterica in terreno liquido, in condizioni rigorosamente controllate, il periodo di duplicazione sperimentalmente rilevato risulta di regola diverso, a seconda che ciò che si misura sia il numero dei batteri per unità di volume della coltura, oppure la densità ottica della coltura stessa. La diversità tra i due periodi di duplicazione, τ_n e τ_m rispettivamente, è dovuta al fatto che di regola nel corso della crescita le dimensioni medie dei batteri vanno lentamente cambiando.

Per porre le basi di una teoria della crescita batterica, si hanno così da prendere separatamente in considerazione, per una stessa coltura in sviluppo, tre diverse leggi di crescita:

- 1) la legge di crescita della numerosità batterica,
- 2) la legge di crescita della massa biologica per unità di volume,
- 3) la legge di crescita del singolo batterio.

È sempre possibile rilevare sperimentalmente le prime due sulla stessa coltura, la prima mediante piastrature su agar e la seconda mediante misure di densità ottica. Non sembra invece possibile, con le tecniche di cui disponiamo, seguire quantitativamente la crescita di un singolo batterio, in condizioni che risultino veramente costanti e controllate. Anche l'uso di colture in cui i batteri siano sincronizzati introduce, attraverso la procedura impiegata per ottenere la sincronizzazione, perturbazioni delle condizioni iniziali, che rendono poi molto dubbia ogni interpretazione dei risultati delle successive misure.

Tutto ciò che allora si può fare è determinare per via teorica le relazioni intercorrenti tra le tre leggi di crescita, con l'obiettivo di trarre poi dallo studio sperimentale delle prime due anche informazioni e conferme relative alla terza. È questo l'argomento che vogliamo ora trattare, incominciando ad occuparci, nel presente lavoro, della legge di crescita della numerosità batterica.

Se, come si suppone, le condizioni di crescita sono rigorosamente controllate e costanti e la coltura in terreno liquido è pura e si mantiene sempre omogenea, si ritiene in via ipotetica che tutti i batteri abbiano lo stesso periodo di duplicazione τ_n . Ciò significa che, se consideriamo la coltura per un intervallo di tempo uguale a τ_n , nel corso di esso tutti i batteri si dividono una ed una sola volta.

Siccome per ipotesi anche i batteri figli hanno periodo di duplicazione uguale a τ_n , il processo si ripeterà identico (a meno di un fattore due) nell'intervallo di tempo uguale a τ_n che immediatamente segue quello prima considerato. Pertanto, se si riporta in un grafico il logaritmo del numero dei batteri per unità di volume della coltura in funzione del tempo, ciò che si otterrà è una curva di crescita periodica, il cui periodo in ascisse è τ_n e in ordinate è $\log 2$. I punti corrispondenti di ogni periodo stanno su una stessa retta di pendenza $\log 2 / \tau_n$.

La forma dettagliata della curva di crescita dipende evidentemente dalle condizioni iniziali della coltura, cioè dallo stato dei batteri al momento dell'inoculazione: da come sono ripartite tra di essi le età batteriche a tale istante. Nel caso estremo in cui i batteri dell'inoculo siano tutti esattamente sincronizzati, per esempio, la curva di crescita nel grafico semilogaritmico sarà una linea a gradini tutti della stessa altezza ($\log 2$) e della stessa larghezza (τ_n). Ad ogni ripartizione delle età batteriche al tempo $T = 0$, iniziale della coltura, corrisponderà una diversa forma della curva di crescita, che manterrà tuttavia sempre l'andamento generale periodico, che abbiamo detto.

Tutto ciò è già sufficiente per concludere che *l'andamento della curva di crescita della numerosità batterica è in ogni caso completamente indipendente dalla legge di crescita del singolo batterio*.

Nella realtà, l'andamento sperimentalmente osservato di una curva di crescita della numerosità batterica si discosta sempre notevolmente da quello previsto come conseguenza dell'ipotesi che tutti i batteri della coltura abbiano esattamente lo stesso periodo di duplicazione. Ciò che avviene in pratica se i batteri dell'inoculo sono sincronizzati è ben noto: la curva di crescita ha all'inizio l'andamento a gradini che abbiamo descritto, ma col passare del tempo i gradini si vanno sempre più arrotondando e smussando e alla fine il grafico semilogaritmico diventa rettilineo, con periodo di duplicazione pari a quella che era all'inizio la larghezza del gradino. La stessa cosa avviene qualunque sia la ripartizione delle età tra i batteri dell'inoculo: all'inizio la curva di crescita ha l'andamento periodico corrispondente a tale ripartizione, ma ben presto ogni irregolarità si arrotonda e si smussa, fino a che il grafico semilogaritmico si riduce a una retta. Solo nel caso in cui l'inoculo proviene da altra coltura cresciuta esponenzialmente, la curva di crescita ha fin dall'inizio l'andamento limite.

Le cause di questo comportamento delle curve di crescita della numerosità batterica sono ovvie: i batteri non hanno tutti esattamente lo stesso periodo di duplicazione. A ciò possono contribuire piccole variazioni locali residue delle condizioni di crescita e l'inevitabile inomogeneità della coltura dovuta all'insorgere di un numero via via crescente di mutanti, man mano che le divisioni batteriche procedono. Ma la causa fondamentale è certamente di principio, derivante dalla natura statistica di quei processi interni a ciascun batterio, che si concludono con la divisione cellulare: si tratta in gran parte di processi chimici che coinvolgono contemporaneamente numeri elevati di molecole e che sono quindi soggetti a fluttuazioni. Ne deriva, in linea di principio, l'esistenza di fluttuazioni del periodo di duplicazione: il valore di τ_n che noi misuriamo attraverso la curva di crescita è soltanto il valore medio di una ripartizione, per la cui ampiezza si può per ora solo stabilire un limite superiore.

Nel caso delle divisioni sincrone che si osservano in certe condizioni dopo trattamento con acido nalidixico [6], per esempio, il raddoppio del numero dei batteri avviene in un tempo che, nelle misure migliori, è inferiore al 10% del periodo di duplicazione. La semilarghezza della ripartizione è quindi inferiore al 5% di τ_n , dato questo non molto significativo, sia perché non è noto fino a che punto i batteri fossero all'inizio effettivamente sincronizzati, sia perché alla larghezza sperimentale contribuivano certamente altri fattori.

Comunque, supponiamo che τ_n sia un valor medio di una distribuzione gaussiana di semiampiezza a metà altezza σ . Allora, un inoculo di batteri sincronizzati al tempo zero, dopo n generazioni darà luogo a una ripartizione delle età batteriche ancora gaussiana, la cui semiampiezza a metà altezza sarà dell'ordine di $\sqrt{n}\sigma$ e quando questa grandezza risulti dell'ordine di $\tau_n/2$ una ripartizione stazionaria sarà praticamente raggiunta.

Ciò che di fatto avviene nella coltura si può presentare anche nel modo seguente. Un certo batterio che nelle condizioni ideali (τ_n costante e lo stesso per tutti i batteri) avrebbe dovuto dividersi ad un certo tempo \bar{t} , nell'intervallo tra T e $T + \tau_n$, a causa delle fluttuazioni di τ_n avrà invece una certa distribuzione di probabilità di dividersi nell'intervallo di tempo finito tra $\bar{t} - \epsilon$ e $\bar{t} + \epsilon$. E la larghezza 2ϵ di questa distribuzione di probabilità risulterà sempre crescente al crescere dell'intervallo di tempo $T - T_0$, trascorso a partire dalla inoculazione della coltura. Alla fine, tale distribuzione di probabilità invaderà l'intero intervallo tra T e $T + \tau_n$, risultando alla fine completamente piatta.

Quando tale situazione sia raggiunta, la probabilità che ha un qualsiasi batterio di dividersi per unità di tempo, sarà costante su tutto l'intervallo tra T e $T + \tau_n$. Si avrà così, *qualunque fosse la situazione iniziale della coltura*, indicando con dN il numero di batteri che si dividono in un tempuscolo dT :

$$(1) \quad \frac{1}{dT} \frac{dN}{N} = \text{costante} = k$$

da cui, tenendo conto delle condizioni iniziali e introducendo il tempo di duplicazione τ_n :

$$(2) \quad N = N_0 2^{\frac{t}{\tau_n}}$$

che è l'ordinaria curva di crescita esponenziale.

Siamo così giunti a giustificare intuitivamente la curva di crescita esponenziale del numero dei batteri, a cui tende ogni coltura batterica, come conseguenza delle naturali fluttuazioni del valore del periodo di duplicazione.

Ci si può ora chiedere quale sia in tali condizioni la legge di ripartizione tra i batteri della coltura delle età batteriche. A tale legge si giunge immediatamente, osservando che se N è il numero dei batteri presenti nella coltura al tempo T , hanno età compresa tra t e $t + dt$ quelli di essi che si divideranno in seguito, nell'intervallo compreso tra $(T + \tau_n - t - dt)$ e $(T + \tau_n - t)$. Il loro numero dn è quindi:

$$dn = \frac{d}{dT} \left[N_0 2^{\frac{t}{\tau_n}} \right]_{T+\tau_n-t} dt = \frac{2 \ln 2}{\tau_n} N_0 2^{\frac{T + \tau_n - t}{\tau_n}} dt$$

da cui subito:

$$(3) \quad \frac{1}{dt} \frac{dn}{N} = \frac{2 \ln 2}{\tau_n} 2^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad 0 \leq t \leq \tau_n$$

che è la legge di ripartizione cercata. L'aspetto più interessante di essa è la sua indipendenza da T , il che significa che, al contrario di ciò che avviene di regola all'inizio

della crescita, essa non viene alterata dalla continua sostituzione nella coltura di batteri di età τ_n con coppie di batteri di età zero.

Questo risultato, a cui siamo giunti per via semiintuitiva, sembra essere collegato al fatto, sperimentalmente accertato, che tutte le colture indipendentemente dalle loro condizioni iniziali tendono col tempo a portarsi nello stesso stato limite di crescita esponenziale (2), e quindi con l'esistenza di fluttuazioni del periodo di duplicazione.

Si pone con ciò il problema di determinare, più in generale, il legame supposto tra lo stato di crescita limite e la stazionarietà della legge di ripartizione delle età batteriche. In altre parole, si chiede in generale se esistano e quali siano gli stati di crescita per cui la distribuzione delle età batteriche è stazionaria, indipendentemente dal fatto che essa assuma o no la forma (3).

Supponiamo dunque che sia:

$$N(T) f(t) dt$$

il numero dei batteri della coltura che al tempo T hanno età compresa tra t e $t + dt$. Supponiamo che (se possibile) $f(t)$ non dipenda da T , e vediamo di determinare tale funzione, nell'ipotesi che essa sia continua con la sua prima derivata. Dopo un qualsiasi tempuscolo z , sarà evidentemente:

$$(4) \quad N(T) f(t) dt = N(T+z) f(t+z) dt$$

poiché tutte le cellule della coltura sono invecchiate di z . A parte andrebbe considerato l'intervallo di età:

$$\tau_n - z \leq t \leq \tau_n$$

per il quale la (4) va modificata per tener conto della duplicazione dei batteri all'età $t = \tau_n$, ma possiamo non occuparcene in quanto ci proponiamo di far tendere z a zero. Dunque, per z sufficientemente piccolo e t tale che sia $t + z \leq \tau_n$ l'espressione $N(T+z) f(t+z)$ non deve dipendere da z , il che è quanto dire che la sua derivata rispetto a z deve essere identicamente nulla:

$$\left(\frac{dN}{dT} \right)_{T+z} f(t+z) + N(T+z) \left(\frac{df}{dt} \right)_{t+z} = 0$$

Facendo in particolare tendere z a zero, viene:

$$(5) \quad \frac{1}{N} \frac{dN}{dT} = - \frac{1}{f} \frac{df}{dt} = k$$

dove il primo membro non dipende da t , mentre il secondo per ipotesi non dipende da T . Ne segue che k è una costante indipendente sia da T che da t , per cui:

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dT} = k, \quad N = N_0 e^{kt}$$

ed essendo: $N = 2N_0$ per $T = T_0$:

$$(6) \quad k = \frac{\ln 2}{\tau_N}, \quad N = N_0 2^{-\frac{t}{\tau_n}}$$

Si ha anche:

$$-\frac{1}{f} \frac{df}{dt} = k = \frac{\ln 2}{\tau_n}, \quad f = f_0 2^{-\frac{t}{\tau_n}}$$

Ma deve essere:

$$\int_0^{\tau_n} f(t) dt = 1$$

per cui:

$$(7) \quad f_0 = \frac{2 \ln 2}{\tau_n}, \quad f = \frac{2 \ln 2}{\tau_n} 2^{-\frac{t}{\tau_n}}$$

Resta così dimostrato che:

1) la legge di ripartizione delle età batteriche è stazionaria solo nel caso di crescita esponenziale della numerosità batterica;

2) in questo caso, tale legge ha la forma (2), già dimostrata per via semiintuitiva.

Diverse considerazioni suggeriscono che, per i sistemi costituiti da un numero elevato di subunità indipendenti, coinvolte in processi interni al sistema stesso, la tendenza alla stazionarietà della legge di ripartizione delle grandezze relative alle subunità, che variano nel corso e a causa di tale coinvolgimento, sia un fatto generale. L'argomento sarà discusso in altro lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AGENO M., SALVATORE A.M., VALLERANI D., "Stati di crescita stazionari e transitori di una coltura batterica", Rend. Acc. Naz. Lincei, 80, 244 (1986)
- [2] AGENO M., CLARO M., DE BLASIO A., "Il raggiungimento della saturazione in una coltura batterica", Rend. Acc. Naz. Lincei, 80, 335 (1986)
- [3] AGENO M., BENINI M., MATRICCIANI M.A., "Fattori limitanti la crescita batterica", Rend. Acc. Naz. Lincei, 80, 447 (1986)
- [4] AGENO M., "Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 1: Il catabolismo del glucosio", Rend. Acc. Naz. Lincei, 80, 458 (1986)
- [5] AGENO M., "Compartimenti funzionali nella cellula batterica. 2: Ripresa della crescita dopo rinfresco della coltura", Rend. Acc. Naz. Lincei, in corso di stampa.
- [6] AGENO M., SALVATORE A.M., "On the cell damage induced in *Escherichia coli* by a prolonged block of DNA synthesis", Rend. Acc. Naz. Lincei, 80, 394 (1986).