

La natura « episomica », del fattore per la fertilità
in *Streptomyces coelicolor*

SARA CULOTTA e ANNA MARIA PUGLIA

Istituto di Genetica, Università di Palermo

Riassunto. — Lo studio della segregazione dei marcatori genetici situati intorno al luogo d'attacco del fattore di fertilità al cromosoma dello *Streptomyces coelicolor* ha portato a concludere che il fattore è legato al cromosoma in alcuni ceppi (donatori ad alta frequenza, NF), mentre è in sede extra-cromosomica in altri (donatori a bassa frequenza, IF). Esso sembra quindi riferibile ad un « episoma ».

Summary (*The « episomic » nature of the fertility factor in Streptomyces coelicolor*). — The segregation of the markers around the site of the fertility factor on the chromosome of *Streptomyces coelicolor* is affected by the situation of the factor in the parents. When the factor is located on the chromosome of the donor strain and absent in the other (UF) the segregation is highly distorted as if the sex factor acted as a selective marker. When the donor strain is of the initial fertility type (IF) the segregation is unaffected, as if the presence of 9 o'clock region (to which the factor is linked in the NF strains) was not compulsory in the zygotes. It is assumed that the fertility factor has an extrachromosomal seat in the IF strains.

INTRODUZIONE

Una prima differenziazione sessuale è stata messa in evidenza nello attinomicete *Streptomyces coelicolor* da SERMONTI & CASCIANO (1963), che hanno distinto un tipo donatore (R^+) e un tipo recipiente (R^-).

Gli incroci risultavano fertili se almeno uno dei genitori era di tipo donatore. Incroci $R^- \times R^-$ presentavano un basso grado di fertilità. Successivamente HORWOOD *et al.* (1969) hanno individuato un'altra classe di varianti di fertilità (UF) che davano ricombinazione ad altissima frequenza in alcuni incroci. Questi varianti furono detti « ultrafertili »; tale designazione può

tuttavia ingenerare confusione poichè i varianti UF risultano di tipo recipiente, e gli incroci fra varianti di questo tipo danno scarsissima progenie ricombinante (VIVIAN & HOPWOOD, 1970).

Il fatto che in *Escherichia coli* sono descritti come ceppi ad alta frequenza di ricombinazione (Hfr) i tipi donatori (HAYES, 1968), mentre in *S. coelicolor* sono detti ultrafertili i tipi recipienti, ha una spiegazione semplicemente cronologica.

In *E. coli* i primi incroci superfertili sono emersi dalla scoperta dei ceppi donatori ad alta frequenza, dopo che i ceppi recipienti (F^-) erano già disponibili, mentre in *S. coelicolor* i ceppi recipienti ad alta efficienza sono comparsi per ultimi e solo in seguito alla loro adozione sono stati realizzati incroci superfertili.

In conclusione, in *S. coelicolor* sono oggi riconosciute almeno tre principali classi di varianti di fertilità: ceppi superdonatori (designati da HOPWOOD *et al.* (1969) come NF e corrispondenti ai ceppi R^+ di SERMONTI & CASCIANO (1963)); ceppi donatori a bassa frequenza (designati da VIVIAN & HOPWOOD (1970) come IF e corrispondenti ai ceppi R^- di SERMONTI & CASCIANO (1963)); ceppi superrecipienti (designati da HOPWOOD *et al.* (1969) come UF). In questo lavoro adotteremo la simbologia proposta da HOPWOOD *et al.* (1969) e VIVIAN & HOPWOOD (1970).

Il fattore per la fertilità sembra avere una sede cromosomica, al centro dell'arco sinistro della mappa dello *S. coelicolor* nei ceppi NF (HOPWOOD *et al.*, 1969), mentre parrebbe del tutto assente nei ceppi UF (SERMONTI, PUGLIA, & FICARRA, 1971). La sua situazione è dubbia nei ceppi IF. HOPWOOD *et al.* (1969; 1970) hanno osservato che la regione che contiene il fattore del sesso è «obbligatoria» negli incroci $NF \times UF$, che risultano fortemente «polarizzati», nel senso che i marcatori del ceppo donatore sono tanto più frequenti nella progenie quanto più sono prossimi alla regione obbligatoria. Negli incroci $UF \times IF$ tale polarità non si osserva, (VIVIAN & HOPWOOD, 1970), come se la regione dove ha sede il fattore di fertilità non fosse indispensabile.

Ciò può essere spiegato supponendo che nei ceppi IF il fattore della fertilità (da ora in poi designato come *sf*) è necessario alla formazione degli zigoti ma si trova in una sede extracromosomica. Questa ipotesi è avvalorata dalle osservazioni di PUGLIA *et al.* (in preparazione), sulla «contagiosità» di *sf* in incroci $IF \times UF$ e sulla prevenzione di tale contagio in presenza di arancio di acridina.

Questo lavoro si propone di stabilire, attraverso l'analisi genetica, se la regione *sf* agisce come marcatore selettivo negli incroci $NF \times UF$ e se dimostra, in tali incroci, una situazione di *linkage* con un marcatore prossimo a tale regione, il locus *ura A*. Comparativamente le stesse situazioni sono state studiate in incroci $IF \times UF$.

MATERIALI E METODI

I ceppi mutanti usati per questo lavoro (vedi Tab. 1) derivano tutti dal ceppo selvatico *Streptomyces coelicolor* A 3 (2). I loci mutanti sono gli stessi localizzati e descritti da HOPWOOD (1967), e sono riportati sulla mappa

Caratteristiche dei ceppi

TABELLA 1

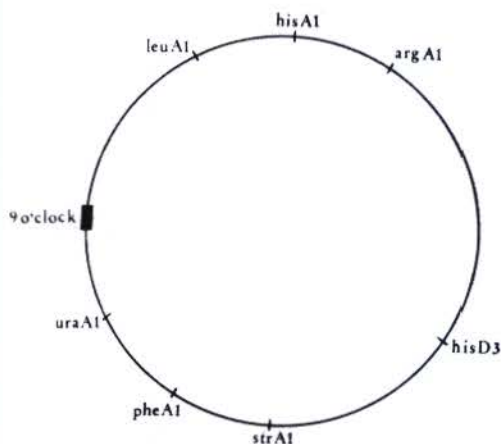
Numero del ceppo	Fenotipo rispetto ai marcatori (a)						Fertilità (b)
	<i>ura AI</i>	<i>phe AI</i>	<i>his D3</i>	<i>arg AI</i>	<i>his AI</i>	<i>leu AI</i>	
79	—	+	+	—	+	+	IF
80	—	+	+	—	—	—	NF
165	+	—	—	+	+	+	IF
312	—	+	+	—	+	+	UF
316	+	—	—	+	+	+	UF
320	+	—	—	+	+	+	NF

(a) Il simbolo — indica la richiesta della sostanza in questione. Tutti i ceppi sono resistenti alla streptomicina

(b) NF, donatore ad alta frequenza; IF, donatore a bassa frequenza; UF, recipiente.

della Fig. 1. I terreni usati sono stati descritti in lavori precedenti (HOPWOOD & SERMONTI, 1962). Le colture miste sono state preparate strisciando spore di entrambi i ceppi parentali su tubi a becco di clarino contenenti terreno completo.

Fig. 1. — La mappa dello *Streptomyces coelicolor*, secondo HOPWOOD 1967; sono indicati solo i marcatori impiegati in questa ricerca. Il rettangolo sulla sinistra (9 o'clock) indica la posizione presunta del fattore di fertilità (*sf*).



Dopo tre giorni le spore, raccolte con l'ansa e sospese in acqua sterile, sono state seminate, a seconda dei casi, o su terreno completo (TCA) o direttamente su opportuni terreni selettivi. Nel primo caso si è poi fatta l'analisi totale. Nel secondo, i ricombinanti già selezionati sono stati saggiati per la fertilità.

RISULTATI

Il fattore di fertilità (sf) come elemento selettivo.

Nell'ipotesi che il fattore *sf* sia obbligatorio negli zigoti di incroci $NF \times UF$, la sua presenza in condizione eterozigote deve distorcere la segregazione nella regione ad esso adiacente. Per controllare questa ipotesi sono stati preparati incroci tra ceppi *NF* ed *UF*, nei quali un marcatore non selezionato (*ura*) era compreso fra un marcatore selezionato (*phe*⁺) e l'elemento *sf*. In due tipi di incrocio l'elemento *sf* è stato posto in accoppiamento o in repulsione rispetto al marcatore non selezionato. Gli incroci sono rappresentati in Fig. 2; i triangoli indicano i marcatori selezionati, mentre l'elemento *sf* è indicato con un rettangolo nella posizione « ore 9 » della mappa.

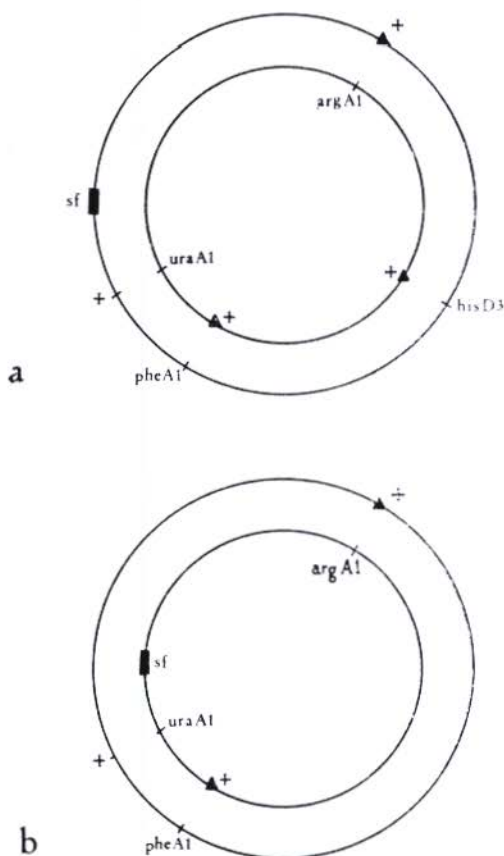


Fig. 2. — Localizzazione dei marcatori in incroci $NF \times UF$. I triangoli indicano gli alleli selezionati, il rettangolo il sito del fattore del sesso (*sf*).

a) *sf* e *pheA*⁺ sono in repulsione. Cerchio esterno, ceppi 320 *NF* o 165 *IF*; cerchio interno, ceppo 312 *UF*.

b) *sf* e *pheA*⁺ sono in accoppiamento. Cerchio esterno, ceppo 316 *UF*; cerchio interno, ceppi 80 *NF* o 79 *IF*.

Sono riportati solo i marcatori selezionati e il marcatore non selezionato *ura*.

Le colture miste sono piastrate su terreni selettivi per i marcatori indicati con i triangoli nella Fig. 2, in presenza di uracile.

Le colonie sviluppate sono quindi saggiate per la richiesta di uracile.

Il marcatore *ura A* è compreso fra l'elemento *sf* ed il locus selezionato *phe A*⁺, a 17 unità dal primo e 11 dal secondo (HOPWOOD *et al.*, 1968). Quando l'elemento *sf* e l'allele *phe A*⁺ sono in repulsione (Tab. 2, a sinistra in alto) le frequenze dei due alleli *ura A*⁻ e *ura A*⁺ sono pressochè uguali nei ricombinanti e non si discostano dall'attesa (17:11) nell'ipotesi di due fattori selettivi ai due lati del locus *ura A* ($\chi^2 = 1,5$, $P > 0,20$). Quando invece *sf* e *phe A*⁺ sono in accoppiamento e comprendono l'allele *ura A*⁻, questo è in grandissimo eccesso sull'allele *ura A*⁺ (Tab. 2, a destra in alto).

TABELLA 2

Segregazione del marcatore *ura A* in incroci reciproci
(per la posizione dei marcatori vedere la Fig. 2)

Incroci NF × UF					
(320 × 312)			(80 × 316)		
<i>ura A</i> ⁻ e <i>sf</i> in repulsione (Fig. 2a)			<i>ura A</i> ⁻ e <i>sf</i> in accoppiamento (Fig. 2b)		
Fenotipi	<i>ura A</i> ⁻	<i>ura A</i> ⁺	<i>ura A</i> ⁻	<i>ura A</i> ⁺	
Ricombinanti	osserv.	23	22	84	4
	% tot.	51	49	95	5
Incroci IF × UF					
(165 × 312)			(79 × 316)		
<i>ura A</i> ⁻ e <i>sf</i> in repulsione (Fig. 2a)			<i>ura A</i> ⁺ e <i>sf</i> in accoppiamento (Fig. 2b)		
Fenotipi	<i>ura A</i> ⁻	<i>ura A</i> ⁺	<i>ura A</i> ⁻	<i>ura A</i> ⁺	
Ricombinanti	osserv.	342	34	22	1
	% tot.	91	2	96	4

In effetti, sempre nell'ipotesi che stiamo trattando, un genotipo (*sf*)⁺ *ura A*⁺ *phe A*⁺, richiederebbe un doppio crossingover nelle regioni ai due lati di *ura A*, con una frequenza attesa di $0,17 \times 0,11 = 0,019$.

La frequenza di tali genotipi risulta appena superiore ($4:88 = 0,045$). Questi dati provano che esiste effettivamente una forte distorsione della segregazione di *ura A*, dovuta alla presenza dell'elemento *sf* che risulta quindi situato sul cromosoma e selezionato negli incroci NF × UF.

Incroci simili a quelli rappresentati nella Fig. 2 sono stati preparati utilizzando ceppi IF in luogo dei ceppi NF. I risultati della segregazione del marcatore *ura A* sono riportati nella parte inferiore della Tab. 2. Dai dati riportati risulta che la posizione dell'elemento *sf* è indifferente per la segregazione di *ura A*.

La frequenza degli alleli di questo locus non si discosta significativamente da quella attesa nell'ipotesi che la selezione sia esercitata solo

sull'allele vicino *phe A*⁺, che si trova a 11 unità di distanza. L'allele *ura A*⁻, in accoppiamento con l'allele selezionato *phe A*⁺, si trova in ambo i casi in grande eccesso.

Linkage tra «*sf*» e «*ura A*»

Negli incroci NF × UF una piccola proporzione dei ricombinanti è di tipo UF (SERMONTI, PUGLIA & FICARRA, 1971). Ciò sta a provare che l'elemento *sf*, che è indispensabile per la formazione degli zigoti e probabilmente per la crescita degli eterocloni, può essere escluso dal cromosoma circolare al momento della ricombinazione e non è indispensabile alla crescita dei ricombinanti.

Esso non agisce quindi come un fattore strettamente selettivo per i ricombinanti, ma solo per gli zigoti. In queste condizioni si rende possibile studiare il «linkage» tra il gene *ura A* e l'elemento *sf*, esaminando tutti i ricombinanti disponibili per la richiesta di uracile e per il tipo di fertilità. I risultati di queste analisi sono riportati nella Tab. 3 e sono estremamente chiari. Il fattore *sf* segrega quasi esclusivamente insieme all'allele del locus *ura A* con cui si trovava associato nel genitore NF.

Se analoghi esperimenti sono condotti in incroci IF × UF il risultato è profondamente differente (Tab. 3. in basso). I ricombinanti portatori

TABELLA 3

Frequenza^(a) di ricombinazione tra *ura A* e *sf*

Incroci NF × UF					
Incrocio	320 (<i>sf</i>) ⁺ <i>ura A</i> ⁻ × 312 (<i>sf</i>) ⁻ <i>ura A</i> ⁺		80 (<i>sf</i>) ⁺ <i>ura A</i> ⁺ × 316 (<i>sf</i>) ⁻ <i>ura A</i> ⁻		
	Fenotipi	Frequenze	Fenotipi	Frequenze	
Parentali	{ <i>sf</i> <i>ura</i> }	82	{ <i>sf</i> + }	36	
	{ 0 + }	0	{ 0 <i>ura</i> }	2	
Ricombinanti	{ <i>sf</i> + }	0	{ <i>sf</i> <i>ura</i> }	3	} 7,3 %
	{ 0 <i>ura</i> }	2			
Incroci IF × UF					
Incrocio	165 (<i>sf</i>) ⁺ <i>ura A</i> ⁻ × 312 (<i>sf</i>) ⁻ <i>ura A</i> ⁺		79 (<i>sf</i>) ⁺ <i>ura A</i> ⁺ × 316 (<i>sf</i>) ⁻ <i>ura A</i> ⁻		
	Fenotipi	Frequenze	Fenotipi	Frequenze	
Parentali	{ <i>sf</i> + }	9	{ <i>sf</i> <i>ura</i> }	43	
	{ 0 <i>ura</i> }	21	{ 0 + }	69	
Ricombinanti	{ <i>sf</i> ^(b) <i>ura</i> }	3	{ <i>sf</i> + }	2	} 73 %
	{ 0 + }	34			

(a) Le frequenze riportate rappresentano le somme delle frequenze osservate in vari incroci.

(b) I ceppi (*sf*)⁺ sono tutti di tipo IF.

dell'elemento *sf* rappresentano innanzitutto una piccola minoranza, e in ogni caso sono di tipo IF. L'elemento *sf* si può trovare associato sia all'allele con cui era in accoppiamento che a quello con cui era in repulsione, senza alcuna preferenza per il primo (si osserva semmai la tendenza opposta).

DISCUSSIONE

Il presente lavoro fornisce, sulla semplice base dell'analisi genetica formale, la prova che il fattore di fertilità dello *Streptomyces coelicolor* (*sf*) si trova in due situazioni chiaramente differenti nei ceppi donatori ad alta frequenza (NF) e nei ceppi donatori a bassa frequenza (IF).

Nel primo caso lo *sf* ha sede sul cromosoma, nella posizione « ore 9 » così come dimostrato da HOPWOOD *et al.* (1969) in base alla misura della polarità degli incroci e da SERMONTI, PUGLIA & FICARRA (1971) in base al tempo di trasferimento di marcatori in esperimenti di accoppiamento interrotto.

L'analogia con le due situazioni del fattore F di *Escherichia coli* K12, nei ceppi Hfr e F⁺ (HAYES, 1968) è evidente ma altrettanto evidente sono le discrepanze. Mentre in *S. coelicolor* il fattore *sf* agisce come elemento obbligato negli zigoti (HOPWOOD *et al.*, 1969, e questo lavoro), in *E. coli* il fattore F è quasi regolarmente escluso dagli zigoti. La funzione di *sf* in *S. coelicolor* non è quella di stabilire un punto d'inizio nel trasferimento del cromosoma, ma quella di svolgere, in seguito a trasferimento nella cellula recipiente, qualcuna delle funzioni essenziali nel processo di formazione degli zigoti.

Il seguente lavoro è stato oggetto della tesi di laurea di una di noi (Sara Culotta), svolta presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Palermo. Gli AA. desiderano ringraziare il Prof. G. Sermonti, per averli indirizzati e guidati durante questo lavoro, e per il suo aiuto nella stesura e nella revisione del manoscritto. La ricerca si è giovata di un contributo del C. N. R.

Ricevuto il 4 gennaio 1972.

Accettato il 18 febbraio 1972.

BIBLIOGRAFIA

- HAYES, W., 1968. *The Genetics of Bacteria and their Viruses*, Blackwell, Oxford.
- HOPWOOD, D. A., 1967. Genetics analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol. Rev.*, **31**, 373-403.
- HOPWOOD, D. A., R. J. HAROLD, A. VIVIAN & M. M. FERGUSON, 1969. A new kind of fertility variants in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics*, **62**, 461-477.
- HOPWOOD, D. A. & G. SERMONTI, 1962. The genetics of *Streptomyces coelicolor*. *Advan. Genet.* **11**, 273-342.
- SERMONTI, G. & S. CASCIANO, 1963. Sexual polarity in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 292-301.
- SERMONTI, G., A. M. PUGLIA & G. FICARRA, 1971. The time course of recombinant production in *Streptomyces coelicolor*. *Genet. Res.* **18**, 133-145.
- VIVIAN, A. & D. A. HOPWOOD, 1970. Genetic control of fertility in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): the IF fertility type. *J. Gen. Microbiol.*, **64**, 101-117.

Chemical sympathectomy and spontaneous diabetes in chinese hamsters

PIETRO U. ANGELETTI and LUIGI CARRATELLI

*Department of Biological Chemistry, Istituto Superiore di Sanità
and Laboratory of Cell Biology, CNR*

Summary. — Chinese hamsters with moderate or severe diabetes mellitus were subjected to a chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine. A significant and long lasting decrease of glycemic values, parallel to the decreased concentration of norepinephrine in peripheral tissues, was observed. Similarly chronic treatment of diabetic animals with *α*-methyl-dopa produces a decrease of blood sugar levels. The results are discussed in connection with the role of sympathetic innervation in regulating the activity of pancreatic islets.

Riassunto (*Sympatectomia chimica e diabete spontaneo in hamster cinesi*). — Hamster cinesi con diabete spontaneo di grado severo e moderato sono stati sottoposti a simpatectomia chimica mediante 6-idrossidopamina. Si è osservata una significativa e durevole diminuzione dei valori glicemici parallelamente alla diminuzione di noradrenalina nei tessuti periferici. Analoghi risultati sono stati ottenuti trattando cronicamente gli animali diabetici con *α*-metildopa. I risultati sono discussi in relazione al ruolo della innervazione simpatica nella regolazione della funzione endocrina del pancreas.

INTRODUCTION

The development of a spontaneous hereditary diabetes mellitus in chinese hamsters has long been known (MEYER & YERGANIAN, 1959). The chemical and biochemical feature of this type of diabetes closely resemble those observed in human diabetes.

From the morphological viewpoint it is of interest to note that an unusual frequency of adrenergic nerves and nerve terminals in intimate asso-

ciation with the β -cells of the pancreas has been observed in these animals (CARAMIA, unpublished observations). The relationship of these sympathetic hyperinnervation of β -cells to the high frequency of spontaneous diabetes mellitus in the chinese hamster is intriguing.

Of recent it has been shown that a long lasting chemical sympathectomy can be produced in adult and newborn animals (THOENEN & TRANZER, 1968; ANGELETTI & LEVI-MONTALCINI, 1970) by injecting a dopamine analogue, 6-hydroxidopamine (6-OHDA). The selective destruction of adrenergic terminals (in adult animals) or of the whole sympathetic neurons (in newborn animals) results in a long lasting or permanent depletion of noradrenaline in all peripheral tissues.

It seemed, therefore, of interest to investigate the effect of chemical sympathectomy on the course of moderate or severe diabetes in chinese hamsters. The results of this study will be reported herebelow.

MATERIALS AND METHODS

Chinese hamsters with diabetes mellitus of various degree were obtained from Tierzucht Institut, University of Zurich; 6-hydroxidopamine was obtained from Merck Sharp & Dohme Lab. (Rahway, New Jersey) through the courtesy of Dr. C. W. Mushett; *α*-methyldopa, injectable form, was also a gift of M.S.D.

Fresh solution of 6-OHDA was prepared in acidified saline solution, just before use. The animals were injected intraperitoneally at a dose of 40 mg/kg body weight. In experiments with *α*-methyldopa, the drug was injected daily at a dose of 0.1 mg/g body weight. Blood samples were collected from the orbital-vein in animals fasting for 15 hours. Blood glucose was determined colorimetrically using the G.O.D. method of Biochemica (Boehringer Mannheim GmbH). Glycosuria was determined by test-tape (Lilly).

In order to check the effectiveness of the 6-OHDA treatment in reducing the norepinephrine content in pancreas, normal golden hamsters were injected with the same doses of 6-OHDA and sacrificed at various time intervals; the pancreas were quickly homogenized in 5% TCA and NE content was estimated by fluorimetric method.

RESULTS

The experimental animals were kept at a standard diet without any insulin treatment, for a period of two months. Blood glucose was assayed every week and glycosuria was determined every second day. The animals were then divided into two groups according to their average glycaemic

values: one group, comprised the hamsters with blood sugar levels between 200 and 300 mg^o/_o; in the other group were the hamsters with more severe diabetes, with glycaemic values above 300 mg^o/_o up to 500 mg^o/_o.

A single injection of 6-OHDA at a dose of 40 mg/kg body weight was administered intraperitoneally. Glycaemic values and glycosuria were then regularly determined every week up the three months.

The results are shown in Figs. 1 and 2. As it can be seen, following the treatment in all animals, the blood sugar values markedly decreased. Practically, two weeks after the treatment in chinese hamsters who had a moderate diabetes, the glycaemia returned to normal values. In the

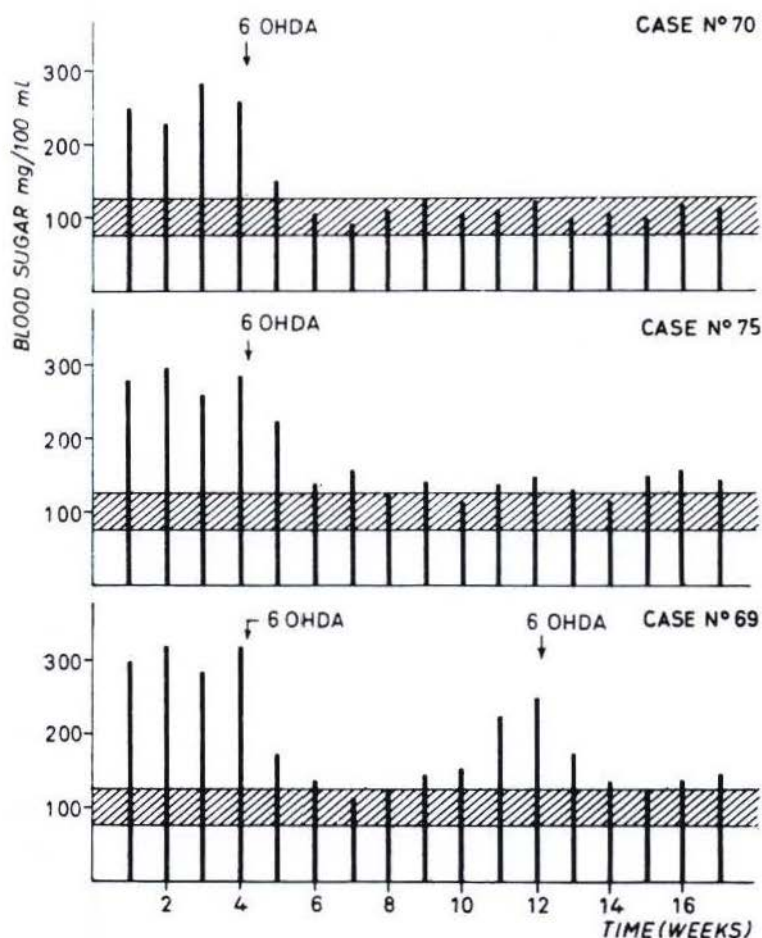


Fig. 1. — Fasting blood sugar levels in chinese hamsters with moderate diabetes before and after 6-hydroxydopamine injection (arrows). The dashed area indicates the range of normal glycaemic values.

other group there was a marked fall in the fasting blood sugar levels although they never reached the range of normal values. Parallel to the reduction of glycaemic values there was a reduction of glycosuria, which again in some

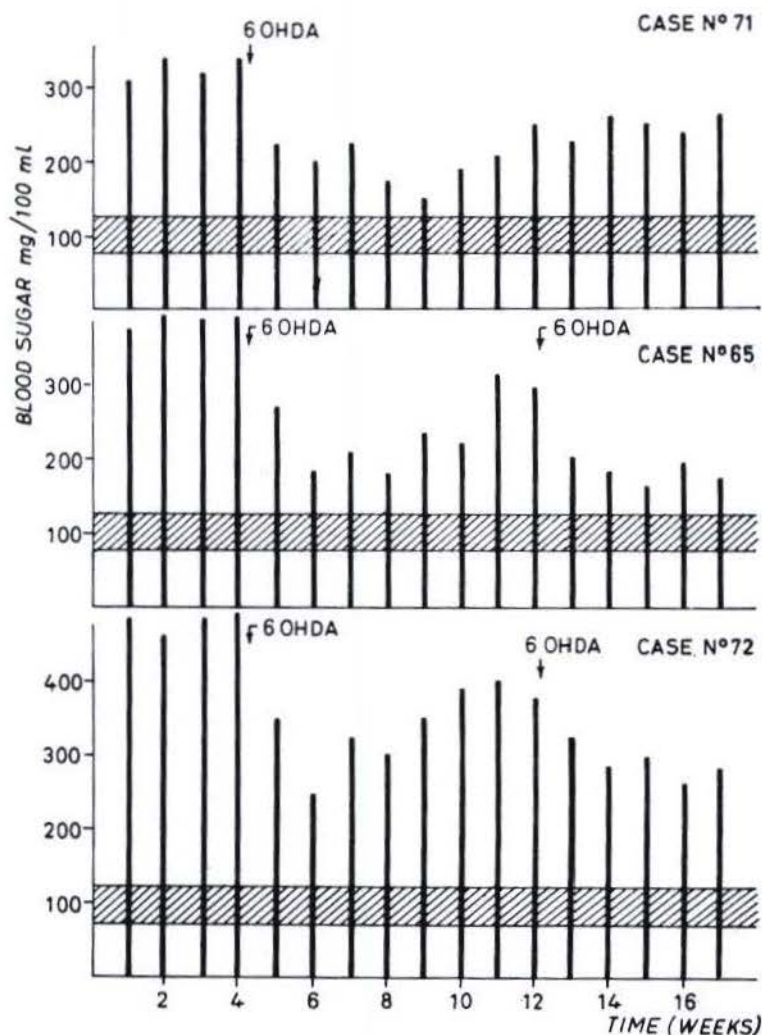


Fig. 2. — Fasting blood sugar levels in chinese hamsters with severe diabetes before and after 6-hydroxydopamine injection (arrows). The dashed area indicates the range of normal glycaemic values.

cases completely disappeared. Five to six weeks after the 6-OHDA treatment in four out of the six animals studied, the glycaemic values started to increase again gradually approaching the original levels (Figs. 1 and 2).

Norepinephrine assays performed in normal hamsters, treated with the same doses of 6-OHDA, showed that, at this time, a partial recovery of the adrenergic stores in pancreas, spleen and heart had occurred (Fig. 3).

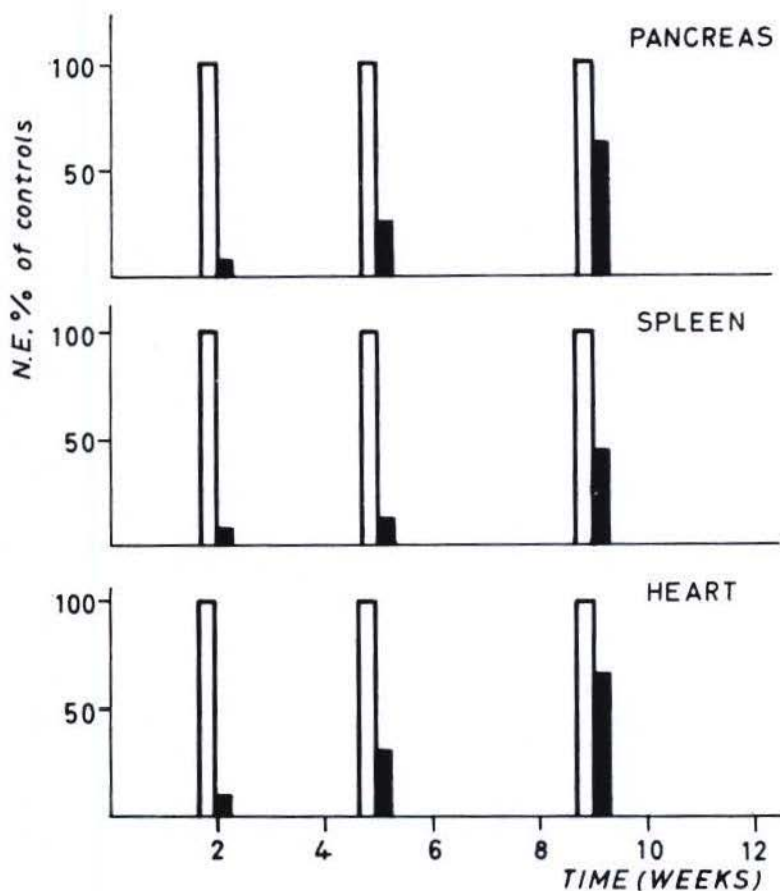


Fig. 3. — Norepinephrine content in normal hamsters at various time intervals after injection of 6-hidroxydopamine. The experimental values (black bars) are expressed as per cent of normal values (white bars).

Therefore, a second injection of 6-OHDA was given to these animals who had a renewal of the diabetic condition. Following this second injection there was a further fall of the blood sugar levels (Figs. 1 and 2).

In another series of experiments, the effect of chronic administration of α -methyldopa which reduces the sympathetic activity by causing the formation of a false transmitter was investigated in a group of diabetic chinese hamsters. Five animals, with values ranging from 200 to 300

mg % were injected daily with α -methyldopa at a dose of 0.1 mg/g. The results are shown in Table 1. It can be seen that upon repeated administration of the drug, all the animals studied showed a consistent decrease of their glycemc values.

TABLE I

**Effect of chronic administration of α -methyldopa (0.1 mg/g)
on fasting blood sugar levels of diabetic hamsters**

Case no.	pre treatment	after 1 week	after 2 weeks	after 3 weeks
	blood sugar mg %			
66	190	165	145	150
67	205	180	165	160
73	215	200	145	170
76	235	172	180	165
80	300	190	175	205
mean \pm SD	229.0 \pm 42.9	181.4 \pm 27.9	162.0 \pm 16.4	170.0 \pm 20.9
		P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001

DISCUSSION

Biochemical studies have shown that the pancreas is capable of uptake and synthesis of catecholamines as other sympathetically innervated organs (SYMCHOWICZ *et al.*, 1968).

The biological function of catecholamine in the pancreas has not been established, although several lines of evidence indicate that the sympathetic nervous system may play a role in the regulation of insulin release (CEGRELL, FALK & HELLMAN, 1964; PORTE & WILLIAMS, 1966). It has been shown that norepinephrine both *in vitro* and *in vivo* inhibits the insulin release from β -cells of pancreas (PORTE & WILLIAMS, 1966; MALAISSE *et al.*, 1967; WONG *et al.*, 1967).

The extraordinary abundance of adrenergic nerves in the pancreas islets of chinese hamsters suggest the possibility that the excessive sympathetic activity may contribute to the development of diabetes in these animals. Indeed the results reported above support this hypothesis. Upon chemical sympathectomy achieved by a single injection of 6-OHDA in all animals studied there was a significant decrease of the glycemc values parallel to the decrease of NE concentration in the pancreas. Since in adult animals the 6-OHDA induced sympathectomy is of temporary nature and a progressive recovery of the adrenergic terminals takes place in few weeks period

the gradual increase of blood sugar levels observed after 5-6 weeks could be attributed to the restored sympathetic function.

The results obtained with α -methyldopa are in agreement with those obtained with 6-OHDA and further strengthen the hypothesis that catecholamine have an important role in the appearance of diabetes in chinese hamsters. There is also some clinical evidence that a reduction of the sympathetic function by α -methyldopa in diabetic patients results in a decrease of fasting blood sugar, uring sugar and a reduced insulin requirement (MORIKAWI & KOHAMA, 1966; PAQUET & BLITTERSDORF, 1967).

It remains to be seen whether the reduction of the glycemc values in our experimental animals is due mainly to an increased insulin secretion from the pancreas or to some other more generalized effect brought about by the chemical sympathectomy. Experiments along this line are in progress.

Received February 15, 1972.

Accepted March 10, 1972.

REFERENCES

- ANGELETTI, P. & R. LEVI-MONTALCINI, 1970. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **65**, 114.
- CEGRELL, L., B. FALK & B. HELLMAN, 1964. *The Structure and Function of the Pancreatic Islet*, Pergamon Press, Oxford, p. 429.
- MALAISSÉ, W., F. MALAISSÉ-LAGAE, P. H. WRIGHT & J. ASMORE, 1967. *Endocrinology*, **80**, 975.
- MEYER, H. & G. A. YERGANIAN, 1959. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **100**, 810.
- MORIKAWI, T. & M. KOHAMA, 1966. *Shirugo Dep. J. Ther.*, **196**, 1715.
- PAQUET, K. S. & F. BLITTERSDORF, 1967. *Med. Welt*, 18/13, 794.
- PORTE, D. & R. H. WILLIAMS, 1966. *Science*, **152**, 1248.
- SYMCHOWICZ, S., C. KORDURA, J. VEALS & I. I. A. TABA-CHICK, 1968. *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2313.
- THOENEN, H. & J. P. TRANZER, 1968. *Nauhyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, **261**, 217.
- WONG, K. K., S. SYMCHOWICZ, M. S. STAUB & I. I. A. TABACHNICK, 1967. *Life Sci.*, **6**, 2285.

Effect of aeration on the growth of *Candida lipolytica* in batch fermentation of gas oil

LUCIA MARTINOLI (*), NICOLA ODDO (**) and ANTONIO TONOLO

Department of Biological Chemistry

Summary. — The submerged culture of a strain of *Candida lipolytica* utilizing as carbon source the gas oil fraction from Libya A-1/100 250–350°C is reported.

Growth of *Candida lipolytica* is directly proportional to the aeration efficiency. Thus, in flasks with three baffles, it is possible to obtain an aeration equal to 700 ml O₂/100 ml of nutritive medium per hour. Under these experimental conditions, the dry weight reaches approximately 9 g/100 ml.

Riassunto (*Effetto dell'aereazione sulla crescita di Candida lipolytica in coltura sommersa*). — Viene descritta la coltura sommersa di un ceppo di *Candida lipolytica* capace di utilizzare, come fonte di carbonio, la frazione 250–350°C di gasolio A-1/100 proveniente dalla Libia.

La crescita della *Candida lipolytica* è direttamente proporzionale alla aereazione. Infatti, in beute con tre frangiflutti, è possibile ottenere una aereazione pari a 700 ml O₂/100 ml di terreno nutritivo per ora. In queste condizioni sperimentali, il peso secco raggiunto è circa 9 g/100 ml.

INTRODUCTION

Several publications and patents report the growth of fungi or bacteria in nutritive media containing different types of gas oils or n-alkanes (DAVIS, 1967).

Recent studies (DOSTALEK *et al.*, 1968; MUNK, DOSTALEK & VOLFOVA, 1969; KLUG & MARKOVETZ, 1969) performed with strains of *Candida lipo-*

(*) Guest in the Department of Biological Chemistry.

(**) Present address: Snam Progetti S.p.A. - Laboratorio Processi Microbiologici - Monterotondo (Roma).

lytica have suggested the possibility of extending these investigations in order to find a correlation between dry weight and percent of n-alkanes added to the medium and effect of aeration on the rate and amount of growth.

MATERIALS AND METHODS

Strain.

A strain of *Candida lipolytica*, kindly obtained from Prof. G. Tambrasev of Zagreb University, Yugoslavia), was used.

Growth media.

a) *Agar media.* A glucose-potato agar medium was used.

b) *Liquid media.* The basal medium had the following composition (MILLER & JOHNSON, 1966):

KH_2PO_4	0.57 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
NaCl	0.05 %
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001%
MnSO_4	0.001%
CaCl_2	0.001%
yeast extract Difco	0.1 %
tap water	

Carbon and nitrogen sources were modified in the course of the different experiments and reported in the experimental section.

Sterilization.

Media were sterilized at 100°C for 20 min and at 120°C for further 20 min.

Submerged cultures.

Submerged cultures were prepared in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of medium, shaken at 200 rotations per min (having a stroke of 5 cm) at 24°C in the dark.

Furthermore, several fermentations using 500 ml Erlenmeyer flasks with three baffles, were performed (CHAIN & GUALANDI, 1954).

The inoculation flasks contained the basal medium added with 2 ml of A-1/100 gas oil and were inoculated with *C. lipolytica* cells 10 days old taken with a loop from a slant.

The fermentation flasks, containing the different nutritive media used in the course of the experiments, were inoculated with 10 ml of a 24 hr culture in broth, obtained from the inoculation flasks.

Dry weight.

The dry weight was determined by filtration of the content of one flask (100 ml approximately) through Buchner filter. The residue was taken up by means of a spatula and subsequently dried at 90°C for 24 hr. Values are given in g/100 ml.

Gas oil.

For all experiments a Lybian oil fraction (boiling point 250–350°C) was used. Analytical data and composition of the crude oil were as follows:

— specific weight at 15°C	0.8042
— ASTM distillation:	
initial point	239°C
distillate 5% volume	257°C
distillate 10% volume	263°C
distillate 20% volume	272.5°C
distillate 30% volume	281.5°C
distillate 40% volume	289.5°C
distillate 50% volume	297°C
distillate 60% volume	305°C
distillate 70% volume	314°C
distillate 80% volume	323°C
distillate 90% volume	334°C
distillate 95% volume	342.5°C
final point	356°C
— flow point	+ 16°C
— aniline point	93°C
— Diesel index	87.7
— cinematic viscosity 100°F	3.99
— cinematic viscosity 50°C	3.11
— n-paraffins content	57% of weight
— aromatic compounds content.	7% of weight
— naphthenes + isoparaffins	36% of weight
— total sulfur	45 ppm
— basic nitrogen	1.4 ppm
— chlorine	1 ppm

RESULTS

Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of Candida lipolytica

In the above mentioned works (DOSTALEK *et al.*, 1968; MUNK, DOSTALEK & VOLFOVA, 1969; KLUG & MARKOVETZ, 1969), n-alkanes concentrations varied from 1 to 3% v/v. Using the same concentration of gas oil our

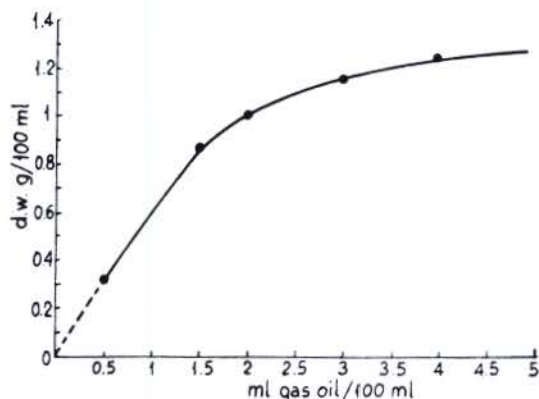
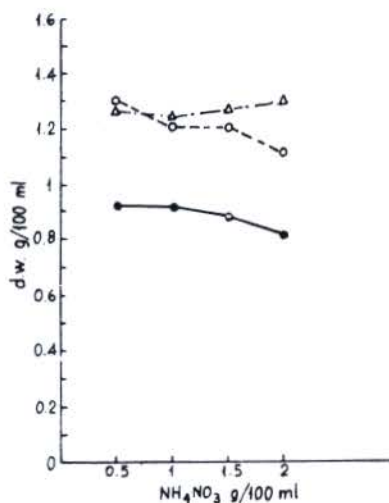


Fig. 1. — Effect of different gas oil concentrations on the growth of *C. lipolytica*. Values obtained after 73 hr. Basal medium + NH_4NO_3 0.5%; flasks without baffles.

results agree with those of literature; increasing the gas oil concentration in broth cultures (Fig. 1), the increase of biomass is not proportional to the corresponding increase of carbon source for concentrations higher than 1.5%.

Fig. 2. — Dry weight obtained after 72 hr of submerged culture of *C. lipolytica* grown at different gas oil and ammonium nitrate concentrations. Basal medium. Flasks without baffles.

- — ● 2 ml gas oil / 100 ml
- — ○ 4 ml gas oil / 100 ml
- △ — △ 6 ml gas oil / 100 ml



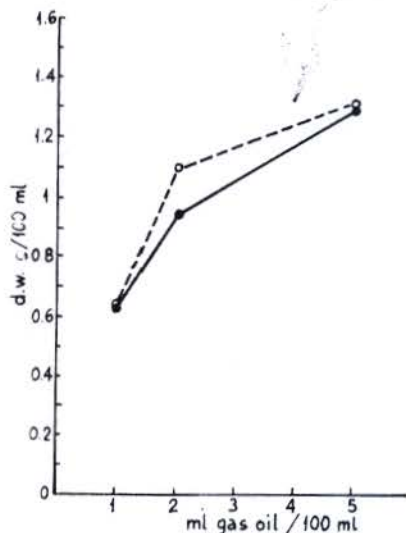
Therefore it was suggested that this absence of correlation could be due to a nitrogen deficiency.

This suggestion was not confirmed by the experiment shown by Fig. 2 where it is possible to observe that, by increasing in the culture medium

the relative percentages of ammonium nitrate and gas oil, the dry weight is practically unchanged. In the course of all these experiments, it was noted, however, that the pH of the culture in broth tended to decrease from initial values of 7 to final values of 3.5-3. Thus, tentatively the ammonium nitrate was substituted with urea. With this last compound, the pH presents the same values through

Fig. 3. — Dry weight obtained after 72 hr of submerged culture of *C. lipolytica* grown at different gas oil, urea and ammonium nitrate concentrations. No remarkable differences are noted between the two nitrogen sources. Basal medium. Flasks without baffles.

○-----○ 0.5 % urea
●————● 0.5 % NH_4NO_3



the whole course of the experiment (final values being between pH 6.3 to 7). In contrast, the final dry weight does not reach values higher than those observed in the case of ammonium nitrate (Fig. 3).

Identical negative results were obtained by increasing at the same time the phosphate salts concentration.

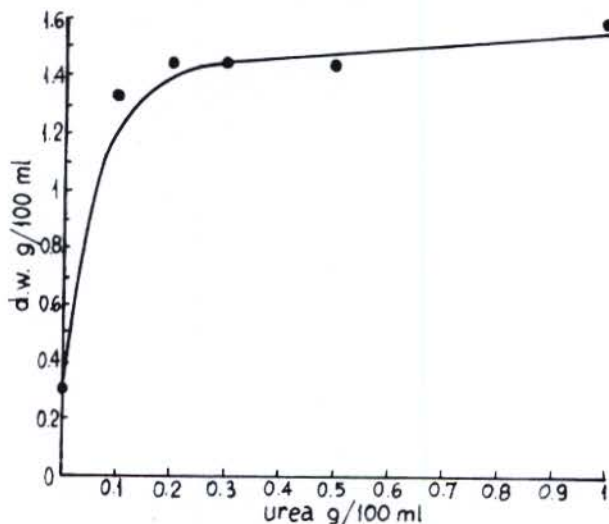


Fig. 4. — Effect of different urea concentrations on the growth of *C. lipolytica*. Values obtained after 72 hr. Basal medium added with 4 ml/100 ml gas oil.

On the other hand, at very low concentrations of gas oil (Fig. 1) or urea (Fig. 4), a correlation between the amount of gas oil or urea present

in the culture medium and the attained final dry weight, was observed. On the basis of these results, it was suggested that this absence of correlation was due to an aeration deficiency.

Effect of aeration on the growth of *Candida lipolytica*

Warburg measurements have given values of Q_{O_2} ($\mu\text{l O}_2/\text{mg dry weight/h}$) of approximately 75 for our strain of *Candida lipolytica*. On the basis of CHAIN & GUALANDI's work (1954), the aeration in flasks rotated on a shaker is greatly increased in baffled flask, therefore, using 500 ml flasks containing

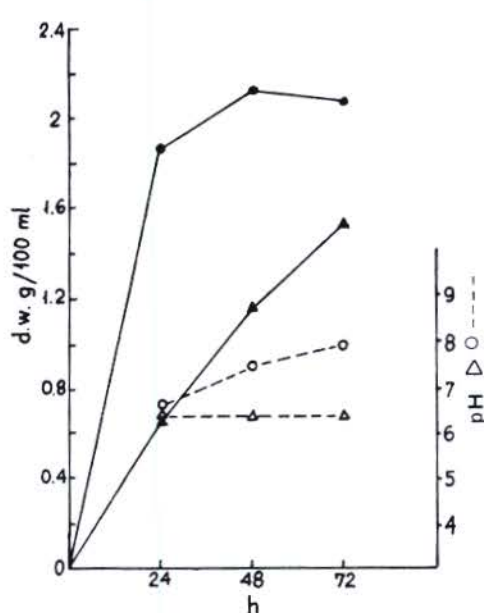


Fig. 5. — Growth curves of *C. lipolytica* in flasks with and without baffles. It is possible to observe how growth is influenced by the higher O_2 amount present in the flasks with baffles.

Basal medium added with 4 ml gas oil/100 ml and 0.5% urea.

▲ — — — ▲ without baffles.

● — — — ● with baffles

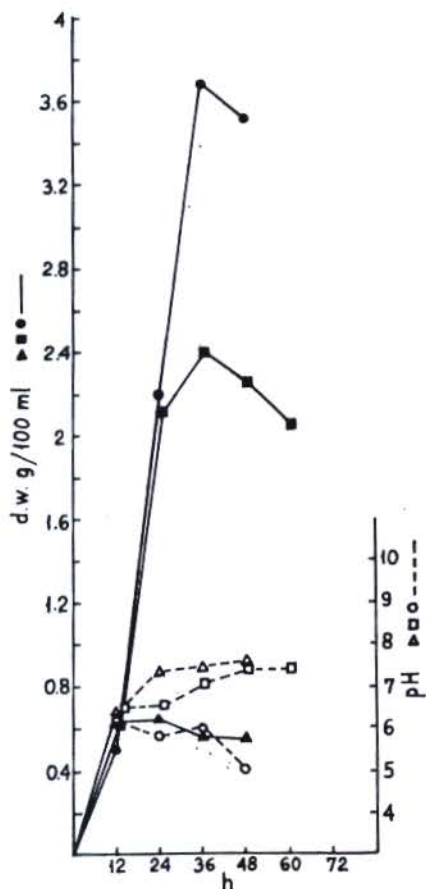


Fig. 6. — Growth curves of *C. lipolytica* at different gas oil concentrations in baffled flasks.

▲ — — — ▲ 1 ml / 100 ml
 ■ — — — ■ 4 ml / 100 ml
 ● — — — ● 8 ml / 100 ml

100 ml of medium, aeration values (given as ml O_2 /100 ml liquid/h) of 35 are reached; in contrast, under the same conditions, but with three-baffled flasks, aeration values of 700 are obtained.

Fig. 5 shows the remarkable difference in growth for the two types of flasks used in the experiment. After a 24 hr fermentation in normal flasks, the obtained dry weight is only 0.6%, while in the case of flasks with baffles, the dry weight reaches values by three times higher.

Fig. 7. — Correlation between gas oil concentration (g/100 ml) and dry weight.

A linear correlation between gas oil concentration in the culture medium and attained dry weight is noted.

Basal medium added with 0.5% urea. Flasks with baffles.

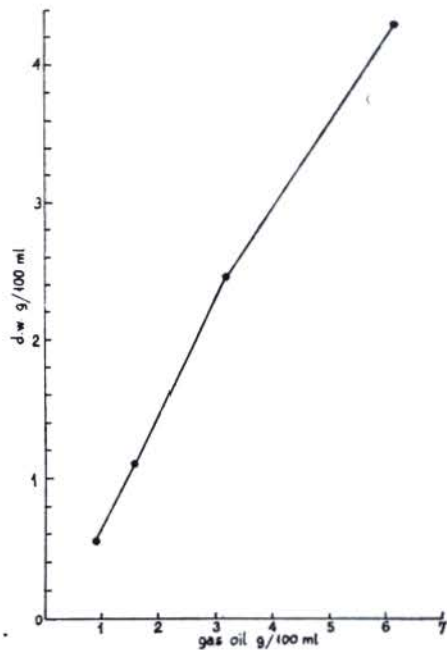


Fig. 5, 6 and 7 show how this proportion can be reached even at high concentrations of gas oil in the culture medium. At higher gas oil values (i. e. 16%) urea and phosphate contents reach the peak, therefore optimal

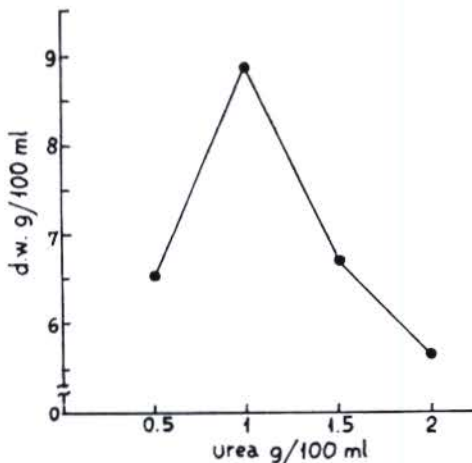


Fig. 8. — Dry weight 48 hr after *C. lipolytica* fermentation at different urea concentrations. Basal medium added with 1.14% KH_2PO_4 and 16 ml gas oil/100 ml. Optimal concentration is 1%.

values of dry weight equal to 9% approximately, are reached by the correspondent increase of the relative urea and phosphate concentrations (Fig. 8).

CONCLUSION

As it has been shown in many works, aeration has a marked effect on the growth of *Candida lipolytica*.

Since the Q_{O_2} of the strain used in this work was equal to 75, by means of a simple calculation, it was possible to determine a subsequent O_2 uptake (based on a dry weight of 9%) of about 675 ml/100 of culture per hour.

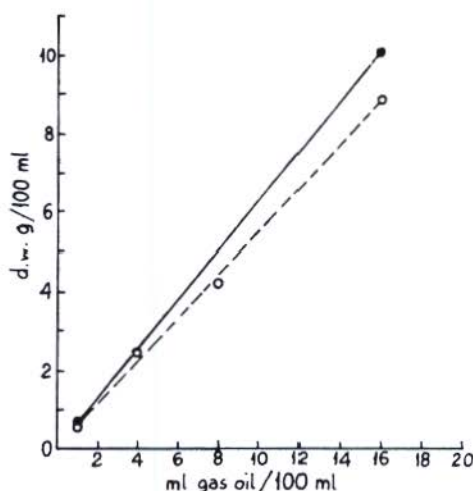


Fig. 9. — ●——● theoretical curve of weight increase in submerged cultures of *C. lipolytica* calculated on the basis of 0.63 g dry weight/ml of gas oil.

○-----○ experimental curve of weight increase in submerged cultures of *C. lipolytica*. The first three values were obtained in a nutritive medium consisting of basal medium added with 0.5% urea. The last value was obtained in a basal medium added with 1% urea and 1.14% KH_2PO_4 . The linear correlation between gas oil concentration and dry weight is to be noted. Values can be considered as maximal in relation to the aeration efficiency obtained in flasks with baffles.

The aeration efficiency in flasks with three baffles is equal to 700, which is adequate to the uptake requirements. Furthermore, since the percentage of n-alkanes present in the gas oil used in the experiments is 57% by weight, the maximal theoretical dry weight that can be reached by *C. lipolytica* on our gas oil could be of 10%, which is very close to the 9% found in our experiments (Fig. 9).

Many thanks are due to Dr. Raffaella Catanzaro Quintiliani for the Q_{O_2} measurements.

Received March 31, 1972.

Accepted April 28, 1972.

REFERENCES

- CHAIN, E. B. & G. GUALANDI, 1954. *Rend. Ist. Super. Sanità* (English Ed.) **17**, 5.
 DAVIS J. B., 1967 *Petroleum Microbiology*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
 DOSTALEK, M., M. MUNK, O. VOLFOVA & K. PECKA, 1968. *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 33.
 KLUG, M. J. & A. J. MARKOVETZ, 1969. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 427.
 MILLER, T. L. & M. J. JOHNSON, 1966. *Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 549.
 MUNK, V., M. DOSTALEK & O. VOLFOVA, 1969. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 383.