

69. R. CAVANNA e S. PALADINO. — **Esperimenti di crescita su larga scala di *Agrobacterium tumefaciens*.**

**Riassunto.** — Allo scopo di intraprendere una dettagliata ricerca sui lipidi dell'*Agrobacterium tumefaciens*, sono state condotte a termine alcune crescite, su terreno sintetico, in fermentatori da 50 litri e una in fermentatore da 3000 litri. Si danno dettagli tecnici sulla crescita e il raccolto.

**Résumé.** — Dans le but d'entreprendre des recherches détaillées sur les lipides de l'*Agrobacterium tumefaciens* on a effectué plusieurs cultures, sur terrain synthétique, dans des réservoirs de 50 litres et une dans un réservoir de 3000 litres. On donne des détails techniques sur la croissance et la récolte.

**Summary.** — In order to start an extended investigation on lipids from *Agrobacterium tumefaciens*, several 50 liters and one 3000 liters tank growths on synthetic medium have been performed. Technical details on growth and harvesting are given.

**Zusammenfassung.** — Um eingehende Untersuchungen über Lipiden des *Agrobacterium tumefaciens* unternehmen zu können, hat man verschiedene 50 Liter- und eine 3000 Liter- Tankkulturen auf synthetischen Boden durchgeführt. Es werden technische Angaben über die Entwicklung und Ansammlung angegeben.

---

In una precedente comunicazione <sup>(1)</sup> si tentò di stabilire la struttura dell'acido fitomonico, isolato dall'*Agrobacterium (Phytomonas) tumefaciens* da S. F. VELICK e R. J. ANDERSON <sup>(2)</sup>. Furono sintetizzati ambedue gli antipodi ottici dell'acido 11-metil-nonadecanoico, ma nè l'uno nè l'altro risultarono essere identici al prodotto naturale descritto da VELICK <sup>(3)</sup>.

Per stabilire la costituzione dell'acido fitomonico e studiare più a fondo i grassi del batterio, sembrò necessario avere a disposizione una grande quantità di batteri cresciuti su mezzo sintetico. W. B. GEIGER jr. e R. J. ANDERSON <sup>(4)</sup> avevano già fatto crescere l'organismo su larga scala,

---

<sup>(1)</sup> CAVANNA R. e STAELLBERG-STENHAGEN S., Atti Acc. Lincei, s. VIII, vol. III, sez. II, 2 (1950).

<sup>(2)</sup> J. Biol. Chem. 152, 523 (1944).

<sup>(3)</sup> J. Biol. Chem. 152, 533; 156, 401 (1944).

<sup>(4)</sup> J. Biol. Chem. 129, 519 (1939).

basandosi sull'esauriente studio di A. A. HENDRICKSON, I. L. BALDWIN e A. J. RIKER <sup>(5)</sup> sulle condizioni ottimali di crescita dell'*Agrobacterium*. La resa totale in un esperimento in fermentatore da 850 galloni, usando un mezzo di coltura che in seguito si dimostrò non essere il più adatto (v. Nota 1), fu di 266 g di batteri (peso secco) dopo 52 giorni di crescita. In un altro esperimento gli stessi AA. usarono un gran numero di beute sec. Fernbach e un mezzo di coltura differente (v. Nota 2): la resa migliorò sensibilmente, giungendo a ca. 1,6 g di batteri per litro (peso secco) dopo una settimana di crescita.

L'esperienza fatta durante il recente lavoro all'Impianto Pilota dell'Istituto Superiore di Sanità ha dimostrato l'importanza di un adatto sistema di aerazione per la crescita di microorganismi <sup>(6)</sup>. Abbiamo perciò condotto a termine una serie di esperimenti di crescita dello stesso ceppo di *Agrobacterium* (American Type Culture Collection n. 4720) in fermentatori usando 50 litri di mezzo *b* (v. Nota 2) ogni volta. Le migliori condizioni di aerazione furono ottenute con il sistema a vortice <sup>(6)</sup>. La resa media in 5 crescite fu di 3,4 g di batteri per litro (peso secco) dopo 60 ore di crescita (v. fig. 1).

Sulla base di questi risultati preliminari abbiamo condotto a termine un esperimento su scala di 3000 litri usando lo stesso mezzo sintetico, allo scopo di poter disporre di una ingente massa batterica proveniente dallo stesso ceppo in un'unica crescita.

Il fermentatore in acciaio inossidabile, facente parte dell'attrezzatura sperimentale del Centro Internazionale di Chimica microbiologica dell'Istituto Superiore di Sanità, fu munito di sistema di agitazione e aerazione a vortice (elica del tipo turbina a 8 pale, diam. mm 200, velocità  $710 \pm 10$  giri al minuto) <sup>(7)</sup>. Per il raccolto furono preparate due centrifughe Sharples di tipo industriale (16.000 giri al minuto).

Terminata positivamente una prova di sterilità, il recipiente venne lavato sotto continua agitazione prima per 2 ore con soluzione di NaOH all'1% a 70° C, indi a lungo con acqua corrente fino a scomparsa di reazione alcalina. Fatto passare per 30 minuti del vapore a 130° C at-

---

<sup>(5)</sup> J. Bact. 28, 571, 597 (1934).

<sup>(6)</sup> CHAIN E. B., PALADINO S. *et al.*, Bull. World Health Org. 6, 73 (1952).

<sup>(7)</sup> PALADINO S. e UGOLINI F., Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, English Edition, p. 121.

(1) La fonte principale di carbonio in questo mezzo è rappresentata da glicerolo (2%), e l'azoto è dato prevalentemente in forma molto ossidata (3,4 g/l di KNO<sub>3</sub>). E' inoltre presente del citrato ferrico ammoniacale (0,4 g/litro). Per il resto il terreno è costituito dagli stessi sali del mezzo *b* (v. Nota 2) in proporzioni simili.

(2) In questo mezzo sintetico (che chiameremo *b*) la fonte principale di carbonio è rappresentata da saccarosio (1%) e l'azoto è dato come solfato ammonico (7,5 g/l). E' inoltre presente acido l-(+)-glutamico (2,5 g/l) e i seguenti sali nelle quantità indicate (g/litro): solfato di magnesio e cloruro di sodio 0,2 ognuno, cloruro di calcio 0,1, fosfato bipotassico 1,0.

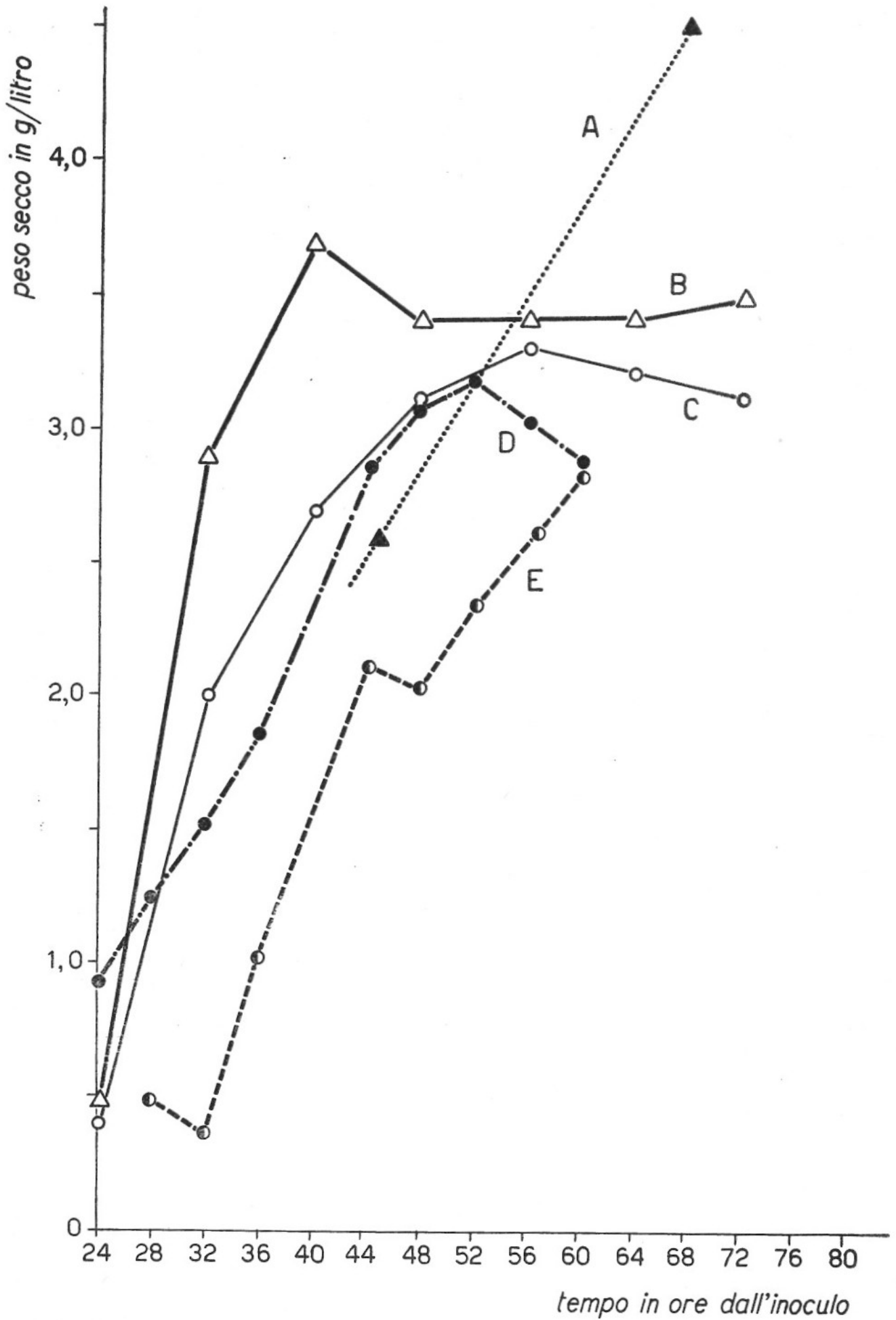


Fig. 1. — Andamento del peso secco durante 5 crescite su 50 litri, (inoculi diversi per età e quantità; D e E stesso inoculo; ABCD: aerazione a vortice; E: aerazione standard)

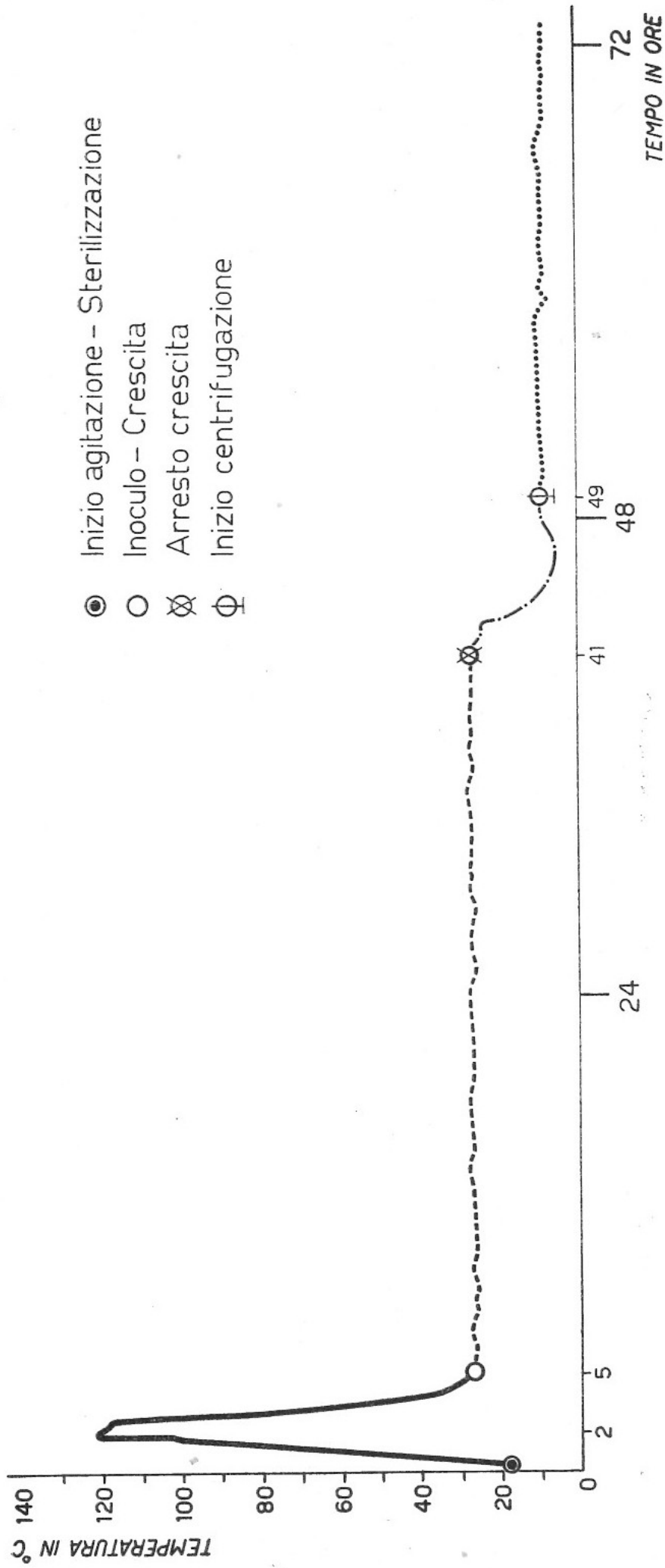


Fig. 2. — Regolazione della temperatura durante l'esperimento su 3000 litri

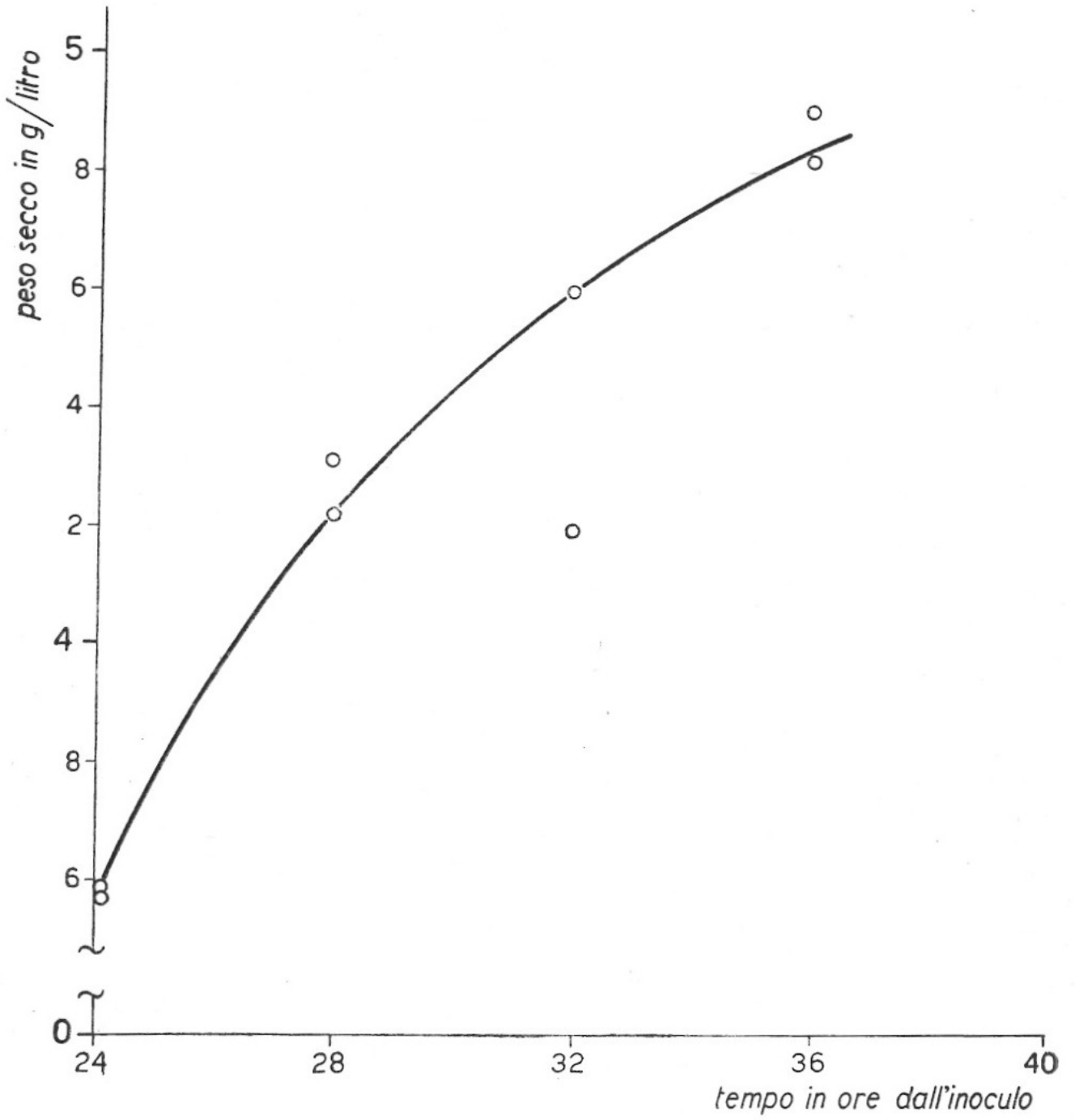


Fig. 3. — Andamento del peso secco durante la crescita su 3000 litri

traverso tutte le tubazioni, valvole e rubinetti, il fermentatore venne riempito con acqua distillata (v. Nota 3), indi con continua agitazione vi si versarono le sostanze pesate (tutti prodotti Carlo Erba, puri per uso scientifico). Portato il pH a 6,8 (cartine Merck, scala pH 5.4-7.0) con ca. 4,5 litri di NaOH 10 N, si chiuse il fermentatore e si sterilizzò per 30 minuti a 118° C.

Dopo 150 minuti, avendo portato il recipiente alla temperatura costante di  $26 \pm 1^\circ$  C (v. fig. 2) vi si inocularono sotto pressione direttamente da un fermentatore da 10 litri, 4,5 litri di coltura batterica cresciuta 30 ore (peso secco 3.8 g/l) nello stesso mezzo sintetico. Subito dopo l'inoculo venne stabilita nel fermentatore da 3000 litri una pressione di  $1.1 \pm 0.1$  kg/cm<sup>2</sup> con un flusso di 1000 litri al minuto di aria in cupola. A cominciare dalla 24esima ora si presero campioni di ca. 0.5 litri ciascuno ogni 4 ore. La fig. 3 mostra l'andamento del peso secco. Le osservazioni microscopiche mostrarono sempre batteri omogenei in attiva riproduzione. Dopo 36 ore la crescita fu arrestata facendo decrescere la temperatura il più rapidamente possibile (v. fig. 2) mediante immissione di salamoia nell'intercapedine del fermentatore. Raggiunti i + 5° C si iniziò la centrifugazione, che durò per 25 ore, con un flusso di ca. un litro al minuto per centrifuga. Ogni ora le centrifughe venivano arrestate, i rotori vuotati e la massa batterica trasferita in un recipiente cilindrico in politene della capacità di 45 litri, che veniva conservato a — 20° C. Il raccolto totale fu di 35,0 Kg. di massa batterica profondamente congelata, che fu trasportata per via aerea in Svezia in adatto imballaggio refrigerato (CO<sub>2</sub> solido). Nell'Istituto di Chimica Medica dell'Università di Uppsala, dove continuano le nostre ricerche sui lipidi dell'*Agrobacterium tumefaciens*, essa viene conservata a — 18° C e sottoposta in porzioni a liofilizzazione (dicembre 1952).

I nostri ringraziamenti vanno al Professor D. MAROTTA, Direttore Generale dell'Istituto Superiore di Sanità, per gli ingenti mezzi messi a nostra disposizione e al Premio Nobel E. B. CHAIN per il suo cortese interessamento. Particolare riconoscenza dobbiamo inoltre a tutti i tecnici e operai addetti alle fermentazioni per la loro efficiente collaborazione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità.

---

(3) Calcoli effettuati in occasione di successivi esperimenti nello stesso recipiente hanno dimostrato che la nostra valutazione della capacità del fermentatore fino al livello utile per questo esperimento era in difetto di ca. il 7%. Di tanto più concentrato va quindi considerato il mezzo di coltura, essendo state le quantità di sostanze calcolate per 3000 litri di soluzione.