

## Batteriologia

Classi di microorganismi:

- Batteri
- Virus
- Funghi
- Protozoi (non sono oggetto di studio della microbiologia).

Batteri: procarioti.

La maggior parte delle specie viventi sono procarioti. All'interno della classe dei procarioti si trova molta più variabilità rispetto a qualsiasi altra classe di organismi.

Si stima il numero di specie batteriche in circa  $10^{12}$ , il loro numero si stima in circa  $10^{31}$ .

Nel corpo umano si trovano tantissimi batteri che svolgono anche funzioni benefiche, come competere con le infezioni esogene proteggendoci da esse.

La cellula batterica può contenere corpi inclusi, probabilmente riserve energetiche. È circondata da una membrana citoplasmatica che può presentare invaginazioni dette mesosomi. La membrana citoplasmatica è circondata da una parete. Oltre la parete si può trovare una capsula, che non è sempre presente, si riconoscono batteri capsulati e batteri non capsulati. Altro elemento non sempre presente è il flagello, che rende il batterio capace di locomozione.

Criteri di classificazione:

- **Proprietà tintoriali:** Colorazioni di Gram e Ziehl-Neelsen.
- **Morfologia.**
- **Caratteri metabolici.**

### Colorazione Gram:

1° colorante: cristalvioletto.

Mordenzante: soluzione a base di iodio.

Decolorazione con miscela di alcol e acetone.

2° Colorante: safranina, per colorare anche i batteri Gram-

Nei batteri Gram+ la parete cellulare è molto spessa e ciò permette di ritenere la colorazione al cristalvioletto.

I batteri Gram- hanno una parete più sottile che contiene una membrana esterna.

### Colorazione Ziehl-Neelsen:

I micobatteri contengono nella loro parete cere e lipidi che non li rendono colorabili con il metodo di Gram (appaiono come Gram+) (NdA appaiono come Gram+ perché la parete è impermeabile al decolorante a base alcolica della colorazione Gram). Nella colorazione Ziehl-Neelsen si usa un metodo di decolorazione acido più forte che decolora tutto tranne i micobatteri.

1° colorante fucsina fenicata (rosso).

2° colorante blu di metilene.

### Morfologia:

- **Cocchi:** forma sferica. Quando si dividono possono rimanere aggregate, quando si osservano cocci disposti a catenella si parla di **streptococchi**, coppie di cocci si dicono **diplococchi**, cocci aggregati in ammassi o grappoli irregolari si chiamano **stafilococchi**.
- **Bacilli:** forma bastoncellare. Anche i bacilli possono rimanere aggregati, si parla quindi di **streptobacilli**. Un batterio che ha forma intermedia tra un cocco ed un bacillo si chiama **coccobacillo**.
- **Spirilli(Vibrio, Spirillum, Spirochete):** A spirale, il vibrio è molto corto, "a virgola". Lo spirillum è una spirale più lunga Gram+, lo spirochete è una spirale più lunga Gram-.

### Batteri sporigeni:

Di interesse medico 2 generi: genere **bacillus** e genere **clostridium**. Producono una spora quando si trovano in condizioni molto sfavorevoli, soprattutto carenza di nutrienti. Le spore sono molto resistenti anche ai disinfettanti, in alcuni casi si possono osservare anche le spore con la colorazione

Gram, si osserva una zona all'interno della cellula resistente alla colorazione (la spora che si sta formando).

### **Caratteri metabolici:**

1. **Batteri aerobi stretti:** Necessitano di ossigeno per svilupparsi e replicarsi.
2. **Anaerobi obbligati:** Non crescono in presenza di ossigeno.
3. **Aerobi/anaerobi facoltativi:** Possono crescere sia in assenza che in presenza di ossigeno.

Treponemi: Sono a spirale ma non sono classificati come Gram+ o Gram- perché sono molto sottili e non sono visibili al microscopio ottico, sono visibili al microscopio a contrasto di fase.

### **Citologia Batterica:**

**Fimbrie o pili:** Filamenti che sporgono dal batterio.

**Capsula:** Strato lasso generalmente di natura polisaccaridica, in alcuni casi di natura proteica. I carboidrati sono sostanze idrofiliche quindi la capsula protegge il batterio dall'essiccamento. Si trova indifferentemente su batteri Gram+ o Gram-, non si trova in tutti i batteri (non è indispensabile) si dividono i batteri in capsulati e non. Quando è sottile prende il nome di microcapsula, quando invece non è compatta ma ha margini sfrangiati si dice strato mucoso o glicocalice. Le capsule di batteri vicini possono fondersi, si possono avere aggregazioni di cellule batteriche in un'unica matrice capsulare (biofilm).

Di solito i batteri patogeni sono capsulati in vivo.

Metodi di visualizzazione della capsula: inchiostro di china, reazione di rigonfiamento capsulare di Neufeld.

### **Funzioni della capsula:**

- Accumulo di materiale energetico.
- Maggiore resistenza all'essiccamento.
- Modifica l'aspetto delle colonie (colonie lisce con capsula presente o colonie ruvide senza capsula).
- Fattore di virulenza.
- Impedisce la penetrazione di farmaci.
- Protegge dalla fagocitosi (maschera i siti di legame per i recettori dei macrofagi).
- Adesione a superfici.
- Antigene (anticorpi anti-capsulari).

All'interno della stessa specie nella capsula si osserva una variabilità di composizione.

Il biofilm consente di colonizzare superfici inerti.

**Parete:** Se privati della parete i batteri muoiono. Gli unici batteri privi di parete sono i micoplasmi. Costituita da catene di carboidrati concentriche a cui sono legati aminoacidi (peptidoglicano). È una struttura rigida. Si trovano fino a 40 strati di peptidoglicano nei batteri Gram+. Nei batteri Gram- invece si trovano solo 2-3 strati di peptidoglicano, tutti gli altri componenti sono organizzati a formare la membrana esterna. In entrambi i casi la funzione della parete è la stessa: proteggere i batteri dalla lisi per shock osmotico. Conferisce la forma ai batteri e ne determina le proprietà tintoriali, può contenere fattori di patogenicità batterica.

L'unità strutturale del peptidoglicano batterico è costituito da due carboidrati azotati: N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico (specifico dei batteri). Legame beta-1,4.

Al NAM è legato un tetrapeptide, il legame tra polipeptidi avviene tra il 3° residuo di una catena e il 4° della successiva. L'ultimo aminoacido è una D-Alanina (per la composizione completa vedere slide). Nei gram+ si può trovare un ponte di pentaglicina che lega le catene polipeptidiche.

Nei batteri Gram- in terza posizione è presente acido meso-diammino-pimelico, nei Gram+ abbiamo invece lisina.

La differenza tra Gram+ e Gram- sta anche nel numero di legami crociati, più basso nei Gram-

(minore compattezza).

**Sintesi del peptidoglicano:** Sintesi del NAM a cui sono aggiunti gli aminoacidi, la D-Alanina deve essere sintetizzata perché non è normalmente presente, viene aggiunta anche in posizione 5 (pentapeptide), viene poi aggiunta l'N-acetilglucosamina. Il monomero viene trasportato all'esterno dal bactoprenolo. Una volta all'esterno si formano prima i legami tra glucidi e poi tra aminoacidi, una transpeptidasi rimuove la 5° D-alanina e lega il 3° residuo di una catena al 4° di quella vicina, si riduce così la catena peptidica ad un tetrapeptide.

Antibiotici come la bacitracina inibiscono il recupero di bactoprenolo inibendo la sintesi di nuova parete.

La cicloserina inibisce la trasformazione di L-Alanina in D-Alanina.

La penicillina inibisce la transpeptidasi che crea i legami crociati tra catene peptidiche.

Tra i componenti inseriti nello strato di peptidoglicano dei batteri Gram+ si trovano:

- Acidi teicoici.
- Acidi lipoteicoici, che includono parti lipofile (costituite da un acido grasso) inserite nella membrana citoplasmatica.
- Carboidrati (es carboidrato C negli streptococchi).
- Proteine varie con varie funzioni.

### **Parete dei Gram-:**

Fuori dalla membrana citoplasmatica si hanno pochi strati di peptidoglicano e una membrana esterna molto diversa dalla membrana citoplasmatica, in particolare lo strato interno del doppio strato fosfolipidico è formato da fosfolipidi come la membrana interna, lo strato esterno invece è formato da **lipopolisaccaride** (elemento fondamentale). Nella membrana esterna si trovano varie proteine, tra cui porine che permettono l'entrata di nutrienti (altrimenti la membrana esterna sarebbe molto impermeabile) e lipoproteine che la ancorano alla membrana citoplasmatica.

Il lipopolisaccaride è anche chiamato **endotossina** perché ha effetti tossici, distinto dalle **esotossine** perché queste ultime non sono componente fondamentale della cellula batterica ma vengono sintetizzate all'interno e rilasciate successivamente. Essendo parte integrante della cellula batterica le endotossine vengono rilasciate solo quando la cellula batterica va incontro a lisi.

Nella membrana esterna si trovano frequentemente porine, proteine canale trimeriche, e lipoproteine con funzione di ancoraggio della membrana esterna al peptidoglicano.

La membrana esterna è una struttura impermeabile ed altamente selettiva per quanto riguarda le molecole che possono passare.

**Porine:** Proteine aggregate a formare pori dedicati al passaggio di sostanze idrofiliche. Si ritrovano proteine **aspecifiche** che permettono il passaggio di ampie classi di molecole e porine **specifiche**.

Gli antibiotici o i farmaci antibatterici penetrano nella cellula tramite le porine, uno dei meccanismi di antibiotico-resistenza è la modificazione delle porine che smettono di legare la molecola antibiotica.

Le porine hanno importanza anche nell'adesione alle cellule dell'ospite, nell'invasività delle cellule dell'ospite e nell'attività citotossica.

**Lipopolisaccaride:** Costituito da tre porzioni, il **lipide A**, porzione lipidica che sostituisce i fosfolipidi sulla membrana esterna, una parte centrale **core** di natura polisaccaridica, ed una lunga catena di zuccheri chiamata **antigene O**.

- Lipide A: glicofosfolipide, componente endotossico, interagisce tramite gruppi P con lipopolisaccaridi adiacenti.
- Core: Polisaccaride ramificato, 9-12 zuccheri, acido cheto-desossi-octonico e un eptoso.
- Antigene O: 50-100 ripetizioni di una unità da 4-7 zuccheri.

Es. di tossicità da lipopolisaccaride: meningite da meningococco. Il batterio libera vescicole (dette blebs) contenenti lipopolisaccaride, si può avere morte da infezione con meningococco senza neanche avere meningite, il rilascio di endotossina è sufficiente ad uccidere il paziente prima ancora

che il patogeno raggiunga le meningi.

Siamo continuamente esposti a bassi livelli di endotossina (flora batterica) che però a bassi dosaggi ha funzione immunomodulatrice.

### **Effetti dell'endotossina:**

1. Effetto pirogeno.
2. Attiva cellule che producono interleuchine (macrofagi, linfociti B, cellule endoteliali, piastrine, granulociti).
3. Infiammazione.
4. Vasodilatazione → ipotensione → shock.
5. Attivazione del complemento.
6. Stimola la coagulazione (coagulazione intravasale disseminata, segno caratteristico di infezione da Gram- (ad esempio discriminazione della meningite da meningococco da altri agenti che possono causare meningite, importante perché la terapia è diversa e deve essere applicata tempestivamente): **petecchie**).

Si hanno questi effetti per tutte le infezioni da Gram- perché il lipide A risulta uguale.

Esiste una classe di batteri privi di parete: i **micoplasmi**, da tenere presente perché sui micoplasmi non sono attivi tutti gli antibiotici che agiscono sulla sintesi del peptidoglicano.

I **micobatteri** hanno invece una parete con struttura peculiare in cui il peptidoglicano è legato covalentemente con un polimero di arabinogalattano e circondato da uno strato di lipidi complessati con cere.

### **Struttura della parete dei Micobatteri:**

Oltre a ricca di lipidi e cere, esternamente alla membrana lo strato di peptidoglicano è presente lo strato di peptidoglicano con polisaccaridi a lunga catena come arabinogalattani, lipoarabinomannani e lipomannani che agiscono da ponte tra peptidoglicano e micomembrana. Strato interno composto da acidi micolici e strato esterno costituito da clicolipidi e lipidi fenolici. Si replicano molto lentamente.

Es. tubercolosi, lebbra.

**Membrana citoplasmatica:** composta da proteine, lipidi e carboidrati. Permeabilità altamente selettiva. Non sono presenti steroli, sostituiti da terpenoidi con la stessa funzione di stabilizzazione. Rispetto alle cellule eucariotiche abbiamo le seguenti funzioni aggiuntive:

- Sito di ancoraggio per proteine coinvolte anche in reazioni bioenergetiche.
- Sito di conservazione energetica (forza motrice protonica).
- Segrega i cromosomi.
- Sede di proteine coinvolte nella sintesi del peptidoglicano e nella trasduzione del segnale.

(NDA qualcosa di questo ce l'hanno anche le membrane eucariotiche).

**Mesosomi:** Invaginazioni pluristratificate della membrana, funzioni varie nella divisione cellulare (legame di materiale genetico, mesosomi settali). Respirazione cellulare (mesosomi respiratori). Biosintesi di componenti della parete (mesosomi biosintetici).

**Nucleoide:** Genoma batterico addensato, enzimi necessari alla duplicazione e alla trascrizione del DNA, a volte corpi inclusi.

### **Citoplasma:**

- Cromosoma: Singolo, circolare, doppio filamento.
- Ribosomi: Fanno la sintesi proteica.
- Granuli: Riserva energetica.

**Ribosomi batterici:** Differenti da quelli eucariotici, differenze importanti che rende possibile

sviluppare farmaci selettivi.

**Cromosoma batterico:** Circolare, si può trovare aperto in caso di rottura oppure superavvolto. A seconda della specie è grande 1000-5000 kbp. Non è diploide. Presenti sequenze codificanti su entrambi i filamenti. In genere geni che codificano per proteine con funzioni correlate sono vicini (operoni). Non ci sono introni.

Si possono avere frammenti di DNA extracromosomiali detti plasmidi, sono generalmente molto più piccoli, dotati di replicazione autonoma e non hanno analogia di sequenza con il DNA genomico, alcuni presentano regioni di omologia e possono quindi integrarsi nel genoma (episomi). Alcuni plasmidi possono essere trasferiti tra batteri aumentando la variabilità genetica dei batteri. Sul plasmide si possono avere geni che codificano per tossine, fattori di resistenza agli antibiotici, o altro.

**Flagello:** Non sempre presente, responsabile della locomozione. Costituito da tre componenti:

- Filamento: elicoidale, all'esterno, formato dalla proteina flagellina. Composizione specie-specifica.
- Uncino: Membrana ricurva (guaina).
- Corpo basale: Fissa il flagello alla membrana e fornisce energia per il movimento. Costituito da una serie di anelli, 4 nei Gram- (LPS, peptidoglicano, parete, membrana), 2 nei Gram+ (parete, membrana).

I flagelli possono essere in numero variabile:

- Monotrichi: 1 flagello.
- Lofotrichi: Più flagelli in posizione terminale.
- Peritrichi: Flagelli distribuiti su tutta la superficie.

### **Come fanno i batteri a muoversi e cambiare direzione?**

Consideriamo i batteri peritrichi: quando devono andare in una certa direzione si spostano tutti i flagelli dalla parte opposta e ruotano in senso antiorario, quando deve cambiare direzione i flagelli si riorganizzano dall'altra parte e di nuove per rotazione antioraria fanno spostare il bacillo nella direzione opposta.

I batteri con flagelli polari (monotrichi e lofotrichi) non possono spostare il/i flagello/i ma invertono il suo senso di rotazione.

La presenza di un flagello è un fattore importante, spesso la mobilità è un importante fattore della patogenicità (es. *Helicobacter Pylori*).

Il movimento non avviene a caso ma seguendo uno stimolo chimico o luminoso esterno (chemotassi o fototassi).

Lo stimolo può essere positivo (attrae il batterio) oppure negativo (repelle il batterio). In assenza di stimoli il movimento è casuale.

La presenza di flagelli, come già detto, influenza la patogenicità in molti modi:

- *H. Pylori* ha la capacità di attraversare il muco gastrico.
- *E. Coli* può migrare verso le vie urinarie.
- Altri batteri possono migrare verso il circolo ematico oppure essere facilitati nell'invasione cellulare e nell'adesione a superfici.

Oltre ai flagelli si trovano ulteriori appendici: **fimbrie o pili**

Costituite da proteine chiamate piline, non hanno ruolo nel movimento ma sono coinvolte nell'adesione e nell'ancoraggio (anch'esse importanti nella patogenicità). es. gonococco che lega le cellule della mucosa genitale, i gonococchi privati delle fimbrie non sono più in grado di dare malattia.

FINE DELLA CITOLOGIA BATTERICA (ARGOMENTO FONDAMENTALE DELLA PROVA IN ITINERE).

## **Riproduzione e crescita dei batteri**

Avviene per scissione binaria (asessuata): una cellula madre si divide in due cellule figlie identiche alla madre.

Prima della divisione il cromosoma è legato al mesosoma settale ed inizia a duplicarsi, nel frattempo in posizione centrale si forma un setto, le due copie del cromosoma si spostano in direzioni opposte, il setto si va a chiudere e le cellule figlie si separano.

**Tempo di generazione:** tempo necessario ad una cellula per replicarsi. es. Germi comuni come E. Coli: 20 minuti. Batteri a lenta crescita come i micobatteri: 20 h.

Il cromosoma di E.Coli però si duplica in 40 min, come è possibile? Il cromosoma già mentre è ancora parzialmente replicato prima della divisione già inizia un'altra replicazione.

(omissis: basi di genetica, la replicazione del DNA è semiconservativa, ecc...)

Le forcelle replicative si formano lungo tutto il genoma (multiple origini di replicazione) ed operano contemporaneamente.

La crescita dei batteri non è solo esponenziale, si divide in varie fasi.

1. **Fase di Latenza:** Praticamente assenza di crescita.
2. **Fase Esponenziale:** Massima attività replicativa.
3. **Fase Stazionaria:** Il numero di cellule batteriche rimane costante.
4. **Fase di Morte:** Le cellule vanno incontro a morte.

### **Fase di Latenza**

Una volta inoculati i batteri in un terreno fresco non iniziano subito a crescere, devono adattarsi al terreno ed esprimere gli enzimi necessari ad utilizzare i nutrienti del terreno. Per non avere latenza bisognerebbe usare lo stesso terreno di provenienza e prelevare i batteri da una coltura in fase esponenziale.

### **Fase Esponenziale**

Il numero di batteri raddoppia ogni tempo di generazione, la velocità può essere condizionata dalle caratteristiche del terreno ed ambientali.

### **Fase Stazionaria**

In un sistema chiuso la crescita esponenziale non può continuare indefinitamente, è limitata dall'esaurimento delle risorse o dall'accumulo di sostanze di scarto.

I batteri sporigeni quando finiscono i nutrienti invece di andare incontro a morte si trasformano in spore.

### **Fase di Morte**

Se si lascia incubare la coltura dopo la fase stazionaria i batteri muoiono, in alcuni casi vanno incontro a lisi, in altri rimangono cellule intere ma non più vitali.

Per mantenere le colture in fase esponenziale si usa un apparato chiamato **chemostato** con un contenitore in cui proliferano i batteri e nel quale viene continuamente aggiunto terreno mentre altro terreno viene scaricato.

### **Conta Batterica:**

Si usano vetrini speciali con "camere di conta". Non è possibile distinguere i batteri vivi da quelli morti.

Per contare i batteri vivi (unità formanti colonie) si prende un campione e si diluisce a vari livelli. Si seminano le preparazioni diluite su piastre solide e si contano le colonie formate. Le colonie devono essere distanziate in modo da essere sicuri che ogni colonia sia dovuta ad un singolo batterio, ecco perché la diluizione.

Un terzo metodo è contare la massa cellulare misurando la torbidità (spettrofotometro).

(Si potrebbe anche misurare il peso secco facendo asciugare la massa ottenuta per centrifugazione.)  
Si tratta ancora una volta di conta totale perché le cellule morte se non si lisano contribuiscono alla torbidità.

### **Di cosa ha bisogno un batterio per crescere?**

Sostanze nutritive che servono al metabolismo energetico (produzione di ATP) ed al metabolismo biosintetico (sintesi dei componenti della cellula batterica).

### **Vie metaboliche usate dai batteri per produrre energia:**

**Fermentazione:** avviene in assenza di ossigeno, i substrati possono essere carboidrati, proteine o acidi organici. Processo veloce ma poco efficiente (lo stesso substrato metabolizzato in presenza di ossigeno genera molto più ATP).

**Respirazione:** Richiede ossigeno, più efficiente.

**Fotosintesi:** Non di interesse medico.

**Acqua:** Solvente fondamentale, alcuni batteri possono sopravvivere in mancanza di acqua, sono i batteri sporigeni.

### **Macroelementi**

**Fonte di Carbonio:** I batteri si dividono in autotrofi se possono utilizzare carbonio inorganico o eterotrofi se devono usare carbonio di origine organica.

**Fonte di Azoto:** possono usare varie forme, sia organico che inorganico, alcuni addirittura atmosferico.

**Ossigeno:** esigenza variabile a seconda delle specie di batteri, alcuni ne hanno bisogno, per alcuni è tossico, altri possono vivere con o senza.

**Fosforo:** componente degli acidi nucleici e dei fosfolipidi.

**Zolfo:** componente di alcuni aminoacidi.

**Altri elementi:** K, Mg, Ca, Na.

**Fattori organici di crescita:** fattori indispensabili alla crescita del batterio ma che il batterio non può sintetizzare.

Oltre alle sostanze presenti i batteri dipendono dalle caratteristiche ambientali come la temperatura o il pH.

### **Batteri anaerobi:**

Non sono dotati di catena di trasporto degli elettroni, non possono utilizzare l'ossigeno come accettore finale di elettroni. Si dividono in

- **Anaerobi tolleranti (facoltativi):** tollerano la presenza di ossigeno perché riescono a detossificare i suoi prodotti dannosi, non lo usano tuttavia per il metabolismo.
- **Anaerobi obbligati o stretti:** Non sono capaci di detossificare le specie prodotte dall'ossigeno, non proliferano con  $pO_2 > 10^{-2}$ .

### **Batteri aerobi:**

Hanno catena respiratoria, usano l'ossigeno come accettore finale di elettroni.

- **Aerobi stretti:** Ossigeno indispensabile per la loro crescita.
- **Aerobi facoltativi:** In presenza di ossigeno usano la respirazione, in sua assenza proliferano ma usano la fermentazione.
- **Microaerofili:** Usano l'ossigeno ma hanno bisogno di una concentrazione più bassa rispetto a quella atmosferica.

Sulla base del range di pH a cui crescono i batteri si classificano:

- Acidofili
- Neutrofili

- Alcalofili

La maggior parte dei batteri di interesse medico sono neutrofili, ma si incontrano anche alcalofili come il vibrio cholerae.

In base alla temperatura si classificano:

- Mesofili (vicino a 37°C)
- Termofili (45-70°C)
- Ipertermofili (> 80°C)
- Psicrotrofi (10-15°C)
- Psicrofili (intorno a 0°C)

### Attività dell'acqua

- Alofili (concentrazioni saline 1-30%)
- Alotolleranti (crescono anche senza sale ma tollerano basse concentrazioni).

### Come si coltivano i batteri:

Si cerca di ottenere la riproduzione dei microorganismi in un ambiente artificiale, fornendo loro le sostanze nutritive necessarie e le condizioni ambientali adatte.

Il terreno di coltura ovviamente deve essere sterile.

I terreni di coltura si classificano in base a:

Composizione chimica:

- **Organici complessi** (naturali). Es. estratto di lievito, infuso di cervello, ecc... Usati per l'isolamento di germi esigenti.
- **Sintetici** (composizione nota).

Stato fisico:

- **Liquido**. Limpido quando sono sterili, evidenziano la crescita batterica tramite intorbidimento. Es. infuso di cuore e cervello.
- **Solido** (contiene agar). Consistenza ottenuta tramite aggiunta di agar. es. agar-sangue, agar-cioccolato (agar-sangue trattato ad 80°C\* per indurre la lisi dei globuli rossi, è più nutriente e permette la crescita di germi più esigenti). Permettono isolamento in coltura pura e osservare morfologia delle colonie.

\*I terreni sono solitamente sterilizzati in autoclave, le eventuali sostanze non termoresistenti (es. sangue o antibiotici) sono aggiunte dopo il trattamento termico.

Prestazioni:

- **Nutrizionali**
- **Selettivi**. Sono terreni che selezionano e permettono la crescita solo di alcune specie batteriche, nel terreno è stato aggiunto un agente inibitorio per i batteri che non voglio isolare (selezione negativa). Es. agar sale-mannite (7.5% NaCl, solo gli stafilococchi possono crescere a queste concentrazioni). Agar MacConkey, contiene sali biliari che inibiscono la crescita della maggior parte dei batteri Gram+ (selettivo per isolare Gram-), agar Thayer Martin (agar cioccolato con aggiunta di antibiotici, gli unici a crescere sono neisserie). Gli esempi sono tutti solidi ma i terreni selettivi possono anche essere liquidi.
- **Differenziali**. Permettono alle colonie di un dato batterio di essere riconosciute a prima vista, es. agar sale-mannite che contiene un indicatore di pH, crescono solo stafilococchi. Il tessuto cambia colore solo attorno alle colonie di S. aureus che fermenta la mannite. Agar MacConkey, seleziona enterobatteri contiene lattosio ed indicatore di pH, discrimina chi fermenta il lattosio (acidificazione) e chi non lo fa.
- **Arricchimento**. Ha lo scopo di arricchire il numero di batteri che si vogliono isolare. Il terreno di arricchimento è sempre liquido. es. se voglio indagare una sospetta salmonellosi devo analizzare un campione di feci (non sono commensali, sono presenti solo in caso di malattia). Potrebbero essere troppo pochi per essere visti nella coltura su piastra, si usa allora il terreno al selenito che allunga la fase di latenza dei batteri commensali, dopo



un'incubazione di 6-8h si può seminare su terreno solido perché la coltura si è arricchita della specie di interesse. Rimangono comunque altre colonie. Se si aspetta troppo anche i batteri commensali vanno in fase esponenziale e non si vede nulla comunque.

Nella semina su piastra solida si usa una tecnica particolare (vedi slide) per ottenere su una porzione della piastra una patina di crescita batterica ed in un'altra colonie isolate.

In laboratorio più che di crescita si parla di unità formante colonia.

Le piastre si incubano al contrario per evitare condensa.

**Coltivazione degli anaerobi obbligati** Bisogna utilizzare contenitori o buste chiusi in cui si immettono sostanze riducenti che riducono l'ossigeno presente. La manipolazione avviene in camere specializzate con atmosfera priva di ossigeno.

### **La spora batterica**

Da non confondere con le spore fungine, che sono elementi replicativi. Nei batteri la spora non ha ruolo nella replicazione ma rappresenta una cellula particolare in cui si trasformano alcuni batteri (sporigeni) in condizioni avverse, è quindi una struttura che permette al batterio di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli. Dal punto di vista metabolico è una struttura quiescente e inattiva. I generi di batteri sporigeni che ci possono infettare sono *Bacillus* e *Clostridium*. I bacilli sono Gram+ aerobi, i clostridi sono Gram- sempre a forma bacillare, anaerobi stretti (es.

*Clostridium tetani*, che prolifera nelle ferite lacerate contuse con compressione dei vasi quindi si genera un ambiente anaerobico. In queste condizioni le spore di tetano possono proliferare e tornare alla fase metabolicamente attiva che produce tossina dannosa per il sistema nervoso centrale).

Al microscopio durante la formazione della spora si osserva la caratteristica forma a "bacchetta di tamburo" quando il diametro della spora supera lo spessore del bacillo.

Nella spora si hanno vari strati di protezione. È la forma microbica più resistente in assoluto, spesso resiste ai disinfettanti.

La spora si forma dentro la cellula vegetativa (ha una fase di endospora). La spora essendo metabolicamente inattiva non contiene RNA.

*Clostridium botulinum* non prolifera nel corpo ma uccide per ingestione della tossina preformata nel cibo.

Nel botulismo la paralisi è flaccida, nel tetano è spastica, in entrambe le patologie la morte insorge quando la paralisi interessa i muscoli respiratori.

La conversione da spora a forma metabolicamente attiva si chiamano **germinazione** ed **esocrescita**, la conversione da batterio a spora si chiama **sporificazione** o **sporulazione**.

### **Struttura della spora:**

- **Core:** Anche detto protoplasto, contiene una copia del genoma, ribosomi, materiali di riserva energetica. Privo di acqua, la funzione di stabilizzazione delle macromolecole è sostituita dall'acido dipicolinico complessato con ioni calcio (dipicolinato di calcio). L'acido dipicolinico in natura è stato osservato solo nelle spore.
- **Membrana interna**
- **Parete della spora:** peptidoglicano uguale alla parete batterica, fa da primer per la ricostruzione della parete.
- **Corteccia:** Peptidoglicano un po' più lasso di quello cellulare, può rimuovere acqua dal protoplasto (l'interno della spora) tramite osmosi, fornisce protezione dai danni da calore e irradiazione.
- **Membrana esterna**
- **Rivestimento proteico (tuniche sporiali):** Spessa struttura composta da strati proteici, dal 30 al 60% del peso secco della spora. Tanta cisteina quindi tanti ponti disolfuro. Tanti aminoacidi idrofobi.
- **Esosporio:** Strato lasso che circonda la spora, ruolo non chiaro.

Forma e posizione della spora all'interno della cellula variano da specie a specie e possono avere

interesse diagnostico (vedi slide). La spora alla colorazione di Gram rimane incolore. La spora per germinare deve essere attivata, in natura l'attivazione è ottenuta con l'invecchiamento, la spora che invecchia perde compattezza negli strati esterni. In laboratorio la spora può essere attivata con trattamento ad alta temperatura.

### **Fasi della sporificazione:**

Viene attivata da fattori che prendono il nome di fattori di differenziamento extracellulare.

1. Si forma in filamento assiale costituito da materiale genetico.
2. Si inizia a formare il setto come nella replicazione batterica. Nel caso della produzione della spora il setto è asimmetrico.
3. Il setto continua a crescere ed ingloba in una seconda membrana la spora immatura. Il processo diventa irreversibile.
4. Si forma la corteccia, si ha la disidratazione del protoblasto, accumulo di calcio e acido dipicolinico.
5. Intorno alla corteccia si accumulano strati proteici (tunica).
6. Spora matura, diventa rifrangente e resistente al calore.
7. Enzimi litici distruggono lo sporangio e liberano la spora all'esterno.

### **In cosa il peptidoglicano della corteccia è diverso dal peptidoglicano della parete?**

È molto simile in specie diverse, anche quando la composizione della parete è molto diversa. Contiene molti meno legami crociati a differenza della parete. Il tetrapeptide non è presente in tutti i residui, in molti casi si ha solo l'L-alanina oppure un gruppo lattamico. Anche quando è presente il tetrapeptide non sempre forma legami crociati.

**Acido dipicolinico** contribuisce alla termoresistenza della spora, sostituisce l'acqua nella stabilizzazione delle macromolecole, costituisce il 15% del peso secco della spora. È un prodotto intermedio del metabolismo della lisina.

Le spore sono estremamente resistenti, quelle di botulino (le più resistenti) resistono a 100°C per 330 minuti, (per confronto una cellula batterica resiste ad 80°C al massimo per 10 minuti).

La spora per germinare deve essere attivata cioè deve diventare permeabile ai fattori stimolanti (es. aminoacidi, glicosidi, ioni inorganici) la germinazione, in natura succede per invecchiamento, in laboratorio per trattamento a 65-80°C per qualche minuto o per lunghi periodi a 5°C.

**Germinazione:** Rigonfiamento della spora, riassorbimento di acqua perdita della rifrangenza e della resistenza al calore. Attivazione di un enzima che digerisce la cortex.

Il metodo più sicuro per eliminare le spore è l'autoclave che utilizza vapore a 121°C per 15 minuti, per raggiungere queste temperature è necessario usare un contenitore sotto pressione.

La pastorizzazione invece comporta ciclici riscaldamenti a 70 °C che uccidono le cellule in fase germinativa ed attivano le spore.