

Microbiologia generale

Giacomo Fantoni

Elisa Pettinà

Gaia Faggin

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/MicrobiologiaGenerale>

14 dicembre 2020

Indice

1	Introduzione	8
1.1	Albero della vita	8
1.1.1	Alcuni organismi	8
1.1.2	Batteri e archea	9
1.1.3	Virus	9
1.1.4	Caratteristiche degli esseri viventi	9
1.1.5	Caratterizzazione dei microbi	10
1.2	La macchina cellulare	10
1.2.1	Impatto dei microbi sulle attività umane	10
1.2.2	Ricombinazione del DNA	10
1.3	Microorganismi come modello	11
1.3.1	Il conflitto sulla generazione spontanea	11
1.3.2	Postulati di Koch	11
1.4	I batteri	11
1.4.1	Composizione elementare	11
1.4.2	Strutture e loro funzioni	12
1.4.3	Classificazione	13
2	La struttura della cellula	14
2.1	La parete cellulare	14
2.1.1	Peptidoglicano	14
2.1.2	Gram positivi	14
2.1.3	Gram negativi	15
2.1.4	Lisozima	16
2.2	La membrana citoplasmatica	16
2.2.1	La struttura	16
2.3	Membrana e parete degli archaea	17
2.4	Flagelli	17
2.4.1	Tipologie di flagelli	17
2.4.2	Struttura	17
2.4.3	Movimento flagellare	18
2.4.4	Sintesi flagellare	18
2.4.5	Tipologie di movimento flagellare	18
2.4.6	Spirocheti	19
2.4.7	Motilità batterica	19
2.5	Strutture esterne	20

2.5.1	Glicocalice	20
2.5.2	Fimbrie	20
2.5.3	Pili	20
2.5.4	Biofilm	20
2.6	Inclusioni cellulari	21
2.6.1	Tipologie di inclusioni cellulari	21
2.7	Endospore	22
2.7.1	Struttura	22
2.7.2	Formazione	22
2.7.3	Riattivazione della cellula	22
3	Popolazione batterica	24
3.1	Crescita batterica	24
3.1.1	Processo di scissione binaria	24
3.1.2	Divisoma	24
3.1.3	Sintesi della parete cellulare	24
3.2	Crescita di una popolazione batterica	25
3.2.1	Tempo di generazione	25
3.2.2	Fasi di crescita	25
3.3	Metodi di conta delle colonie batteriche	26
3.3.1	Conta totale	26
3.3.2	Conta vitale	26
3.3.3	Filtrazione su membrana	27
3.3.4	Most Probable Number	27
3.3.5	Misura della torbidità	27
3.4	Sistemi di coltivazione microbica	27
3.4.1	Spread-plate method	27
3.4.2	Pour-plate method	27
3.4.3	Chemostato	28
3.5	Effetti ambientali sulla crescita microbica	28
3.5.1	Temperatura	28
3.5.2	pH	29
3.5.3	Concentrazione <i>NaCl</i>	29
3.5.4	Attività dell'acqua	29
3.5.5	Ossigeno	30
3.5.6	Pressione	31
4	Meccanismi di trasporto cellulare	32
4.1	Tipologie di trasporto	32
4.1.1	Diffusione passiva	32
4.1.2	Diffusione facilitata	32
4.1.3	Trasporto attivo	33
4.2	Secrezione, traslocazione ed esportazione	35
4.2.1	Tipologie di trasporto	35
4.2.2	Il sistema <i>Sec</i>	35
4.2.3	Vie delle secrezioni indipendenti da <i>Sec</i>	37

5	Metabolismo dei microrganismi	39
5.1	Introduzione	39
5.1.1	Elementi fondamentali	39
5.1.2	Tipi di metabolismo	39
5.2	Catalisi ed enzimi	40
5.2.1	Enzimi	40
5.2.2	Parametri esterni che alterano l'azione degli enzimi	41
5.3	Redox	42
5.3.1	Potenziale di riduzione standard	42
5.3.2	Torre degli elettroni	42
5.4	Trasportatori di elettroni	42
5.4.1	<i>NADH</i> e <i>NADPH</i>	42
5.4.2	Ciclo $NAD^+/NADH$	43
5.5	<i>ATP</i>	43
5.5.1	Struttura	43
5.5.2	Funzione	43
5.5.3	Sintesi	43
5.6	Catabolismo dei carboidrati	43
5.6.1	Glicolisi	44
5.6.2	Respirazione cellulare	44
5.6.3	Bilancio globale	47
5.6.4	Le alternative cataboliche	47
5.7	Altre vie cataboliche	49
5.7.1	Lipidi	49
5.7.2	Proteine	49
5.8	La fotosintesi	49
5.8.1	Classificazione degli organismi	49
5.8.2	Tipi di fotosintesi	50
5.8.3	Clorofilla	50
5.8.4	Fotosistemi	50
5.8.5	Reazioni dipendenti dalla luce	51
5.8.6	Reazioni non dipendenti dalla luce	51
5.8.7	Confronto con respirazione aerobica	52
6	Genetica batterica	53
6.1	Introduzione	53
6.1.1	Dogma centrale della biologia	53
6.2	Mutazioni	53
6.2.1	Fenotipo	53
6.2.2	Genotipo	54
6.2.3	Le basi molecolari delle mutazioni	54
6.2.4	Retromutazioni o reversioni	54
6.2.5	Frequenza di mutazione	55
6.2.6	Mutagenesi	55
6.3	Isolamento dei mutanti	56
6.3.1	Mutazioni selezionabili	56
6.3.2	Isolamento di mutanti nutrizionali per selezione indiretta	57
6.3.3	Saggi di laboratorio per l'identificazione dei mutageni	57

6.4	Ricombinazione genetica omologa	58
6.4.1	Processo	58
6.4.2	Identificazione dei ricombinanti	58
6.4.3	Trasferimento genico orizzontale	59
6.5	I trasposoni e la trasposizione	66
6.5.1	Introduzione	66
6.5.2	Trasposizione	66
6.5.3	Tipologie di meccanismi di trasposizione	67
6.5.4	Verifica di un evento di trasposizione	67
6.5.5	Mutagenesi con elementi trasponibili	68
6.5.6	Integrone	68
6.6	Clonaggio genico	68
6.6.1	Scopi del clonaggio genico	68
6.6.2	Enzimi di restrizione	69
6.6.3	Fasi del clonaggio genico	69
6.6.4	I plasmidi come vettori di clonaggio	69
6.6.5	Regioni polilinker	70
6.6.6	Il batteriofago λ come vettore di clonaggio	70
6.6.7	La mutagenesi sito-diretta	70
6.6.8	Mutagenesi a cassetta e inattivazione genica	71
7	Genomica microbica	72
7.1	Branche della genomica	72
7.1.1	Genomica strutturale	72
7.1.2	Genomica funzionale	72
7.1.3	Genomica comparata	72
7.2	Genomi	72
7.2.1	Genoma procariote	72
7.2.2	Componenti del genoma	73
7.3	Sequenziamento genomico di prima generazione (1995)	73
7.3.1	Clonaggio dei frammenti	73
7.3.2	Processo	73
7.3.3	Cromosomi artificiali batterici <i>BAC</i>	73
7.3.4	Cromosomi artificiali di lievito <i>YAC</i>	74
7.4	Sequenziamento del DNA	74
7.4.1	Metodo Sanger	74
7.4.2	Sequenziamento shotgun	75
7.5	Mappe genomiche	76
7.5.1	Genoma di <i>Haemophilus influenzae</i>	76
7.5.2	Contenuto genico e stile di vita	76
7.5.3	Geni identificati	76
7.5.4	Categorie geniche	77
7.6	Genomica comparativa	77
7.6.1	Differenziazione nei genomi	77
7.6.2	Tipologie di mappatura	77
7.6.3	Compattezza del genoma procariote	77
7.7	esempi di genomi batterici	78

8	Virologia	80
8.1	Introduzione	80
8.1.1	Virioni	80
8.2	Struttura dei virus	80
8.2.1	Composizione dei virioni	80
8.2.2	Tipologie di virus	80
8.2.3	Capside e simmetria	81
8.2.4	Envelope	82
8.2.5	Genomi virali	82
8.3	Tassonomia virale	82
8.3.1	International Committee for Taxonomy for Viruses	82
8.3.2	Classificazione di Baltimore	83
8.4	Ciclo replicativo di un virus animale	84
8.4.1	Fasi	85
8.4.2	Conseguenze dell'infezione virale	85
8.4.3	Esempi	86
8.5	I Batteriofagi	88
8.5.1	Genomi	88
8.5.2	Quantificazione della crescita	88
8.5.3	Replicazione dei batteriofagi	89
8.5.4	Batteriofagi virulenti	89
8.5.5	Batteriofagi temperati	91
8.6	Coltivazione dei virus animali	92
8.6.1	Effetti citopatici	92
8.6.2	Saggio delle placche	93
8.6.3	Conta delle particelle virali	93
8.6.4	Purificazione di virus	93
8.7	Particelle sub-virali	94
8.7.1	Viroidi	94
8.7.2	Prioni	94
9	Regolazione metabolica	95
9.1	Introduzione	95
9.1.1	Strategie di regolazione	95
9.2	Regolazione dell'attività enzimatica	95
9.2.1	Inibizione da feedback	95
9.2.2	Modifica covalente degli enzimi	96
9.2.3	Processamento delle proteine	96
9.3	Regolazione a livello trascrizionale	96
9.3.1	DNA binding proteins <i>DBP</i>	96
9.3.2	Controllo negativo della trascrizione	97
9.3.3	Controllo positivo della trascrizione	97
9.3.4	Sistemi di controllo globale	98
9.4	Altri sistemi di controllo globale	99
9.4.1	Fattori σ alternativi	99
9.4.2	Risposta allo shock termico	99
9.4.3	Quorum sensing	99
9.4.4	Sistema per la sintesi di triptofano - attenuazione	100

9.4.5	Trasduzione di segnale e sistemi di regolazione a due componenti	100
9.4.6	La regolazione mediata da RNA e i riboswitches	101
10	Controllo della crescita microbica	103
10.1	Introduzione	103
10.1.1	Metodi di controllo	103
10.1.2	Categorizzazione di agenti o trattamenti antimicrobici in base al loro effetto sul batterio	104
10.2	Metodi fisici	104
10.2.1	Calore	104
10.2.2	Trattamenti fisici alternativi	106
10.3	Metodi chimici	107
10.3.1	Agenti antimicrobici	107
10.3.2	Controllo della crescita in vivo	108
10.4	Misurazione dell'attività antimicrobica	109
10.4.1	Test di Kirby-Bauer	109
10.4.2	Test di Minimum Inhibitory Concentration <i>MIC</i>	110
10.4.3	Etest	110
10.4.4	Minimum bactericidal concentration (MBC)	110
10.5	Meccanismi di azione degli antibiotici	110
10.5.1	Tipologie di meccanismi di azione	110
10.5.2	Classificazione degli antibiotici	110
10.5.3	Inibizione della sintesi della parete cellulare	111
10.5.4	Inibizione della sintesi proteica	112
10.5.5	Distruzione della membrana citoplasmatica	112
10.5.6	Inibizione delle vie metaboliche	113
10.5.7	Inibizione degli acidi nucleici	113
10.6	Farmaci antivirali	113
10.6.1	Nucleoside reverse transcriptase	113
10.6.2	Non- <i>NRTI</i>	113
10.6.3	Inibitori di proteasi	114
10.6.4	Inibitori di fusione	114
10.6.5	Interferoni	114
10.7	Progettazione di nuovi farmaci	114
10.7.1	Progettazione computerizzata di farmaci virali	114
10.7.2	Chimica combinatoriale	114
11	Antibiotico resistenza	115
11.1	Introduzione	115
11.1.1	Esperimento della Harvard Medical School	115
11.1.2	Resistenza intrinseca	115
11.2	Sviluppo e diffusione della resistenza nelle popolazioni microbiche	116
11.2.1	Resistenza multipla e cross-resistenza	116
11.2.2	Ritardare la comparsa della resistenza	116
11.3	Metagenomica dell'antibiotico resistenza in batteri ambientali	116
11.3.1	Resistoma	117
11.3.2	Batteri nel suolo	117
11.3.3	Trasferimento genico dei determinanti della resistenza	117

11.3.4	Modello per l'evoluzione dell'antibiotico resistenza	117
11.4	Future terapie antivirali	117
11.4.1	Virulenza	117
11.4.2	Inibire la patogenesi	117
11.4.3	Elementi di patogenesi	118
12	Patogenicità batterica	119
13	Laboratorio	120
13.1	Prima esperienza - preparazione del terreno di coltura sterile	120
13.1.1	Introduzione	120
13.1.2	Primo giorno	121
13.2	Seconda esperienza - Determinazione della curva di crescita di un ceppo batterico (<i>E. coli</i>)	121
13.2.1	Introduzione	121
13.2.2	Primo giorno	122
13.3	Terza esperienza - Caratterizzazione dei batteri del cavo orale	124
13.3.1	Introduzione	124
13.3.2	Secondo giorno	125
13.3.3	Procedimento	126
13.4	Quarta esperienza - Conta standard su piastra	127
13.4.1	Introduzione	127
13.4.2	Secondo giorno	127
13.5	Quinta esperienza - test di aerobiosi/anaerobiosi su terreno solido	129
13.5.1	Introduzione	129
13.5.2	Seconda giornata	129
13.6	Sesta esperienza - test Kirby-Bauer	130
13.6.1	Introduzione	130
13.6.2	Secondo giorno	131
13.7	Settima esperienza - test biochimico <i>API 20E</i>	132
13.7.1	Introduzione	132
13.7.2	Secondo giorno	133
13.8	Ottava esperienza - Colorazione di Gram	135
13.8.1	Introduzione	135
13.8.2	Terzo giorno	135
13.9	Nona esperienza - Trasformazione di batteri	137
13.9.1	Introduzione	137
13.9.2	Terzo giorno	137
13.10	Decima esperienza - Osservazione della motilità batterica di tipo "swimming" al microscopio ottico	138
13.10.1	Introduzione	138
13.10.2	Terza giornata	139

Capitolo 1

Introduzione

I microbi sono organismi unicellulari origine di tutte le forme di vita, mostrano una grande differenza tra di loro, maggiore di quella esistente tra piante e animali, sono enormemente numerosi e ubiquitari. Trasformano e riciclano la materia organica e influenzano il clima. Hanno relazioni simbiotiche con animali, piante e altri microorganismi. Alcuni sono patogeni. Possono sopravvivere a condizioni estreme:

- 5 megarad di radiazioni gamma.
- pH estremi: da 0 a 11.4.
- Temperature estreme: da -15 a 121 gradi centigradi.
- Pressione idrostatica di 1300 ATM.
- Pressione osmotica corrispondente a 5.2 di NaCl.

Si trovano sulla terra da molto prima della nascita di organismi pluricellulari.

1.1 Albero della vita

Si chiama LUCA il last universal common ancestor, l'antenato comune a tutti i tre regni della vita, un organismo termofilo. Si nota come confrontando rRNA conservati gli eucarioti e gli archea si trovano vicini tra di loro mentre i batteri sono enormemente diversificati rispetto agli altri due. Oltre all'evoluzione in verticale nell'albero della vita possono accadere degli scambi in orizzontale tra specie molto distanti tra di loro.

1.1.1 Alcuni organismi

- I funghi sono eucarioti dotati di cellule con nucleo incapaci di fotosintesi ma possiedono parete cellulare.
- Le muffe sono funghi filamentosi multicellulari, crescono come lunghi filamenti detti hyphae alle cui estremità sono presenti spore. Possono riprodursi sia sessualmente che asessualmente, alcuni uccidono i batteri come *Penicillium chrysogenum* da cui si estrae la penicillina.
- I lieviti sono piccoli organismi unicellulari che si riproducono asessualmente per gemmazione.

1.1. ALBERO DELLA VITA

- Protozoi: sono eucarioti unicellulari che si muovono attraverso pseudopodi, ciglia e flagelli in acqua o all'interno di organismi.
- Le alghe sono organismi unicellulari o pluricellulari che svolgono fotosintesi, producono emulsificanti e una gelatina usata per i terreni di coltura.

1.1.2 Batteri e archea

Batteri e archea sono organismi procarioti, ovvero non hanno nucleo cellulare, possiedono una parete cellulare polisaccaride di peptidoglicano. Svolgono una riproduzione asessuata e sono tipicamente dalle 10 alle 100 volte più piccoli delle cellule eucariote, nell'ordine dei micrometri. Gli archea sono presenti in ambienti inospitali ed estremi. I batteri permettono la degradazione degli animali e il riciclo del materiale che li compone. Differiscono tra di loro per le proprietà chimiche della parete cellulare e delle membrane, i batteri sono sensibili agli antibiotici e possono essere patogeni, mentre gli archea non lo sono e utilizzano enzimi per produrre proteine e acidi nucleici simili agli eucarioti.

1.1.3 Virus

I virus sono acellulari e costituiti da un materiale genetico a DNA o RNA, di un capside proteico e eventualmente di un ulteriore strato lipidico. Dipendono dalla cellula ospite per la loro riproduzione e per questo non possono essere definiti come organismi viventi.

1.1.4 Caratteristiche degli esseri viventi

- Sono dotati di un metabolismo: la cellula è un sistema aperto che assume sostanze nutritive dall'esterno, le elabora ed espelle il materiale di scarto.
- Si riproducono e crescono: le sostanze chimiche assunte dall'ambiente sono utilizzate dalle cellule per fabbricarne di nuove.
- Sono differenziate: presentano strutture specializzate.
- Comunicano attraverso sostanze chimiche rilasciate nell'ambiente.
- Si muovono.
- Si evolvono: acquisiscono nuove proprietà biologiche, gli alberi filogenetici mostrano le relazioni evolutive tra le cellule.

1.1.5 Caratterizzazione dei microbi

	Individuo	Popolazione	Comunità
Ecologia	Fisiologia: differente espressione di geni in risposta a cambiamenti	Demografica: nascita, morte, immigrazione, emigrazione	Ecologia comunitaria: interazioni interspecie che danno forma a struttura e funzione della comunità
Genomica	Mappatura fine di singoli genomi	Genomica della popolazione: analisi genomica comparativa per determinare variazioni	Metagenomica: potenziale genetico dei membri della comunità
Genetica	Genetica dei batteri: ruolo dei geni sotto certe variazioni	Genetica della popolazione: frequenza della distribuzione degli alleli	Genetica comunitaria: interazione tra la composizione genetica della comunità e le proprietà della comunità ecologica

1.2 La macchina cellulare

Le condizioni necessarie affinché la cellula possa riprodursi comprendono un adeguato supporto energetico e la presenza di precursori per la sintesi di nuove macromolecole. Le istruzioni codificate nel genoma devono essere replicate in modo che ogni cellula figlia possa riceverne una copia. Infine i geni devono essere espressi attraverso trascrizione e traduzione per formare le proteine e le macromolecole necessarie per dare origine a una nuova cellula.

1.2.1 Impatto dei microbi sulle attività umane

I microbi svolgono un ruolo fondamentale in varie attività umane:

- Agricoltura: fissazione di N_2 ($N_2 \rightarrow 2NH_3$), necessario per il ciclo dei nutrienti, permettono ai ruminanti di consumare erba.
- Cibo: preservazione del cibo, creazione di cibi fermentati e additivi.
- Alcuni sono agenti patogeni.
- Creazione di biofuels, bioremediation nel caso di petrolio disperso nell'ambiente e microbial mining.
- Biotecnologie: produzione di organismi geneticamente modificati, produzione di prodotti farmaceutici, terapia genetica per certe malattie.

1.2.2 Ricombinazione del DNA

I microbi sono utilizzati per ricombinare il DNA. Il DNA plasmidico e quello del donatore possono essere tagliati attraverso un'endonucleasi di restrizione in modo da ottenere frammenti compatibili. Mescolando e legando il plasmide linearizzato il DNA estraneo digerito i frammenti sono incorporati nel plasmide formando un plasmide ricombinante che viene inserito in cellule batteriche. Quando si riproduce viene riprodotto anche il DNA estraneo. Se il donatore contiene un gene questo può essere espresso producendo una proteina eterologa.

1.3 Microrganismi come modello

I microrganismi sono stati ampiamente utilizzati per la ricerca in quanto si replicano velocemente, sono economici da coltivare e hanno strutture relativamente semplici. Sono stati pertanto utilizzati per studiare i processi cellulari come replicazione del DNA, trascrizione e traduzione.

1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea

Fino all'esperimento di Redi si credeva che gli organismi viventi potessero svilupparsi da materia non vivente o in decomposizione. Questa teoria viene confutata ponendo della carne in putrefazione in tre vasi: uno scoperto (con conseguenza di deposito di larve di mosca), uno sigillato (che rimase senza larve) e uno coperto da una garza (su cui le mosche, attratte dall'odore deposero le larve). Un altro esperimento è quello di Pasteur in cui si prende un'infusione in un pallone a collo di cigno e la si sterilizza. L'apertura del collo permette il passaggio dell'aria fino al punto più basso dove si formano dei sedimenti. Si nota come l'infusione rimane sterile fino a quando non la si fa entrare in contatto con i sedimenti.

1.3.2 Postulati di Koch

1. Il microrganismo deve essere presente in tutti gli individui affetti dalla malattia e assente in quelli sani.
2. Il microrganismo deve essere isolato dall'individuo affetto e, posto in coltura, deve dare origine a una popolazione cellulare omogenea.
3. L'inoculo di una cultura pura del microrganismo in individui sani può causare la comparsa della malattia di cui è ritenuto responsabile.
4. Il microrganismo deve essere reisolato dall'organismo infetto sperimentalmente in cui la malattia sia insorta.

1.3.2.1 I postulati di Koch molecolari

1. Il gene implicato nella patogenicità o virulenza deve trovarsi in tutti i ceppi patogeni di una data specie ed essere assente dalle specie non patogene.
2. L'inattivazione selettiva del gene deve portare a una diminuzione misurabile della patogenicità o virulenza.
3. La complementazione o reversione della mutazione deve ripristinare il livello originale di patogenicità o virulenza. Parimenti l'introduzione del gene in un ceppo non patogeno lo trasforma in patogeno.

1.4 I batteri

1.4.1 Composizione elementare

Le cellule batteriche sono composte per l'8% da idrogeno (H), per il 20% da ossigeno (O), per il 50% da carbonio (C), per il 14% da azoto (N), per il 3% da fosforo (P) e per l'1% da zolfo (S). Se lo zolfo si trova unicamente nelle proteine e il fosforo in proteine e lipidi e polisaccaridi gli altri sono presenti in tutte le macromolecole che formano la cellula che sono:

1.4. I BATTERI

- Polisaccaridi semplici e complessi per il 7%.
- Lipidi e lipopolisaccaridi per l'11%.
- Acidi nucleici per il 23%.
- Proteine per il 55%.

1.4.2 Strutture e loro funzioni

1.4.2.1 Membrana plasmatica

La membrana plasmatica è una barriera dotata di permeabilità selettiva. È il confine fisico della cellula, si occupa del trasporto di nutrienti e prodotti di rifiuto, è sede di molti processi metabolici come respirazione e fotosintesi e si occupa di rilevare gli stimoli ambientali per la chemiotassi.

1.4.2.2 Vacuolo gassoso

Il vacuolo gassoso garantisce la proprietà di galleggiamento in ambienti acquosi.

1.4.2.3 Ribosomi

I ribosomi si occupano della sintesi proteica. Sono composti principalmente da RNA e proteine.

1.4.2.4 Corpi d'inclusione

I corpi d'inclusione svolgono il compito di riserva di carbonio, fosfato e altre sostanze. Sono molto variabili, composti tipicamente da carboidrati, lipidi, proteine e sostanze inorganiche.

1.4.2.5 Nucleoide

Il nucleoide è il sito del materiale genetico (DNA).

1.4.2.6 Spazio periplasmatico

Lo spazio periplasmatico contiene enzimi idrolitici e proteine per l'assorbimento dei nutrienti e il loro utilizzo metabolico. Composto da fosfolipidi e proteine.

1.4.2.7 Parete cellulare

La parete cellulare conferisce ai batteri la loro forma caratteristica e li protegge dalla lisi in soluzione ipotoniche. Composta principalmente da peptidoglicano (mureina).

1.4.2.8 Capsule e strati mucosi

Le capsule e gli strati mucosi offrono resistenza alla fagocitosi e aderenza alle superfici. Sono composti da polisaccaridi o polipeptidi.

1.4.2.9 Fimbrie e pili

Le fimbrie e pili permettono adesione alle superfici e coniugazione batterica (pili sessuali). Sono composti da proteine.

1.4.2.10 Flagelli

I flagelli si occupano del movimento. Sono composti da proteine.

1.4.2.11 Endospora

Le endospore consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali molto avverse.

1.4.3 Classificazione

Le pareti cellulari dei batteri assumono due tipi di strutture caratteristiche, permettendo una loro classificazione in Gram-negativi e Gram-positivi. Le differenze strutturali sono responsabili del diverso comportamento rispetto al Gram-staining. Durante l'esperimento un complesso cristallino insolubile e violetto viene fatto formare nella cellula e poi estratto dall'alcol nei Gram-negativi ma non nei Gram-positivi. Questo avviene in quanto i secondi possiedono una parete cellulare molto spessa che quando disidratata dall'alcol chiude i pori e non permette l'uscita del complesso cristallino. Nei primi invece l'alcol penetra facilmente la membrana esterna estraendo poi il complesso cristallino.

Capitolo 2

La struttura della cellula

2.1 La parete cellulare

Tutti i batteri possiedono una parete cellulare che svolge vari ruoli:

- Strutturale: conferisce forma e rigidità alla cellula.
- Protettivo: impedisce la lisi in un ambiente tipicamente ipotonico in quanto il citoplasma possiede un alta concentrazione di soluti e crea una pressione osmotica nell'ordine delle 2atm.

Oltre a permettere di capire i processi vitali di un procariote lo studio della parete cellulare ha permesso la sintesi di diversi antibiotici che la attaccano specificatamente in quanto assente nelle cellule dell'organismo infetto.

2.1.1 Peptidoglicano

La parete cellulare dei batteri è composta principalmente da peptidoglicano (mureina), un polisaccaride complesso composto da l'*N*-acetilglucosamide (*NAM*) e da *N*-acetilmuramico (*NAG*) che si alterano formando lunghi polisaccaridi formando un legame $\beta - 1, 4$. La sintesi delle catene avviene in zone concentrate, favorendo la formazione di fogli che circondano la cellula. Tra le catene si formano legami crociati tra 4 amminoacidi legatisi in posizioni specifiche al *NAM* creando ponti tetrapeptidici la cui composizione è variabile (tipicamente *L*-alanina, *D*-alanina, *D*-acido glutammico e acido diamino-pimelico).

- Nei Gram negativi il legame crociato si forma tra *DAP* e *D*-alanina.
- Nei gram positivi il legame crociato si forma attraverso un ponte peptidico tipicamente di 5 glicine.

2.1.2 Gram positivi

I Gram positivi possiedono una parete costituita da uno strato solido di peptidoglicano anche 50 volte più spesso e meno elaborato rispetto a quello dei Gram negativi. La parete cellulare è formata per il 90% da fogli di peptidoglicano sovrapposti. Si trovano nella parete oltre a proteine di trasporto e strutturali acidi teicoici e lipoteicoici. Questi sono formati da catene di alcol e zucchero come glicerolo o ribitolo unite da legami fosfodiesterici grazie a gruppi fosfato. Sono spesso associati ad

2.1. LA PARETE CELLULARE

altri zuccheri come glucosio e *D-alanina*. Si dicono lipoteicoici gli acidi teicoici contenenti glicerolo e pertanto legati con i lipidi della membrana citoplasmatica. Queste molecole possiedono una carica negativa e sono in parte responsabili della carica elettrica negativa della superficie cellulare. Sono inoltre fondamentali per il trasporto di ioni calcio e magnesio. Gli acidi lipoteicoici in particolare ancorano la parete cellulare alla membrana citoplasmatica.

2.1.3 Gram negativi

I Gram negativi sono formati da due membrane, una interna e una esterna e nello spazio tra di esse, detto periplasmatico, si trova la parete cellulare di peptidoglicano.

2.1.3.1 Spazio periplasmatico

Lo spazio periplasmatico è largo circa 15nm, ha una consistenza simile ad un gel e contiene:

- Enzimi idrolitici: con ruolo nella degradazione iniziale delle molecole alimentari.
- Proteine leganti: iniziano il processo di trasporto dei substrati.
- Chemiorecettori: che governano la risposta chemiotassica.
- Acqua.
- Nutrienti.

La maggior parte di questi elementi raggiunge il periplasma attraverso un sistema di esportazione di proteine presente nella membrana citoplasmatica.

2.1.3.2 Membrana esterna

La membrana esterna presenta una forte resistenza contro composti chimici dannosi ed è formata nel lato interno da fosfolipidi e proteine, mentre in quello esterno da lipopolisaccaridi *LPS*. Questo è formato da tre parti:

- Lipide *A*: un glicolipide formato da un disaccaride *NAG* legato a fosfati ed acidi grassi grazie ad un legame estere-amminico. Questi disaccaridi sono legati al core polisaccaridico attraverso il chetodeossiottonato *KDO*.
- Core polisaccaridico: oltre il legame con *KDO* è formato da zuccheri a 7 atomi di carbonio *eptosi*, glucosio, galattosio e *NAG*.
- Polisaccaride *O*-specifico o antigene *O*: è una catena di zuccheri lunga fino a 40 residui legata al core contenente galattosio, ramnosio e mannosio oltre a uno o più dideossizuccheri (abequosio, colitosio, paratosio o tivelosio) legati a formare catene lunghe 4-5 elementi, spesso ramificate. La loro ripetizione porta alla sua formazione.

2.1.3.2.1 Porine Le porine sono proteine transmembrana che attraversano completamente la membrana esterna e la rendono parzialmente permeabile a piccole molecole idrofiliche. Sono formate da tre subunità identiche ciascuna con un poro di 1nm che non permette la fuoriuscita di enzimi del periplasma. Le porine si dividono in specifiche o aspecifiche in base alla selettività della molecola a cui permettono il passaggio. Tipicamente le prime formano canali d'acqua attraverso i quali può passare qualsiasi piccola molecola, mentre le seconde presentano un sito di legame specifico.

2.1.3.2.2 Lipoproteine Le lipoproteine sono presenti nello strato interno della membrana esterna e servono da giunzione fra questa e il peptidoglicano.

2.1.4 Lisozima

L'enzima lisozima è una proteina che può rompere i legami $\beta(1,4)$ degli zuccheri NAM-NAG.

- In una soluzione diluita (ipotonica) la degradazione della parete con il lisozima rilascia il protoplasto che va incontro a lisi in seguito all'ingresso di acqua nella cellula
- In una soluzione isotonica non c'è nessun movimento netto di acqua tra ambiente e protoplasti ed essi rimangono stabili.

Esistono archea e micoplasmi che si trovano naturalmente nella forma di protoplasti in quanto vivono in habitat osmoticamente protetti e non necessitano una protezione contro la pressione osmotica. Sono pertanto spesso parassiti.

2.2 La membrana citoplasmatica

La membrana citoplasmatica è spessa 8nm e circonda il citoplasma separandolo dall'ambiente. Nel caso in cui la membrana citoplasmatica sia compromessa, l'integrità della cellula viene distrutta, il citoplasma si disperde e di conseguenza il batterio muore. È una barriera altamente selettiva e funziona anche come sito di ancoraggio per proteine. L'isolamento che fornisce con l'ambiente permette la creazione di un gradiente ionico negativo all'interno e positivo all'esterno che viene usato per generare energia o forza proton-motrice.

2.2.1 La struttura

La struttura generale della membrana è quella di un doppio strato fosfolipidico. I fosfolipidi sono molecole composte da una coda idrofobica (acidi grassi) e una testa idrofila (glicerolo-fosfato). Quando i fosfolipidi si aggregano in una soluzione acquosa, formano naturalmente bistrati. In una membrana fosfolipidica, le code puntano verso il centro del bistrato per formare un ambiente idrofobico, e le teste rimangono esposte all'ambiente esterno o al citoplasma. Gli acidi grassi comuni nella membrana citoplasmatica hanno catene da 14 a 20 atomi di carbonio. Le membrane citoplasmiche di alcuni batteri sono rafforzate da molecole simili allo sterolo chiamate opanoidi. Gli steroli sono molecole rigide e planari che funzionano per rafforzare le membrane delle cellule eucariote, e gli opanoidi svolgono una funzione simile nei batteri. La membrana contiene inoltre un alto numero di proteine, che hanno tipicamente superfici idrofobe in regioni che attraversano la membrana e superfici idrofile in regioni che sono a contatto con l'ambiente e il citoplasma. Molte di esse sono saldamente incorporate nella membrana e sono chiamate proteine integrali. Altre hanno una porzione ancorata nelle regioni della membrana e dell'extramembrana che puntano dentro o fuori la cellula. Altre proteine ancora, chiamate proteine della membrana periferica, non sono incorporate nella membrana, ma rimangono comunque associate alla sua superficie. Alcune di queste proteine periferiche sono le lipoproteine, molecole che contengono una coda lipidica che ancora la proteina alla membrana. Le proteine della membrana periferica in genere interagiscono con le proteine integrali della membrana in importanti processi cellulari come il metabolismo energetico e il trasporto. Spesso le proteine che devono interagire tra loro in qualche processo sono tipicamente raggruppate in cluster per consentire loro di rimanere adiacenti l'una all'altra nell'ambiente semifluido della membrana.

2.3 Membrana e parete degli archaea

In contrasto con i lipidi di batteri ed Eukarya in cui ci sono legami estere tra acidi grassi e glicerolo, i lipidi degli Archaea contengono legami etere tra glicerolo e le loro catene laterali idrofobiche (catena alifatica). I lipidi degli Archaea mancano quindi di acidi grassi, di per sé, anche se le catene laterali idrofobiche svolgono lo stesso ruolo funzionale degli acidi grassi. Le principali differenze sono le catene isopreniche e il fatto che alcune sono a monostrato invece che bistrato. A differenza dei bistrati lipidici, le membrane monostrato lipidiche sono estremamente resistenti al calore e sono quindi ampiamente distribuite tra Archaea ipertermofili, organismi che crescono a temperature superiori a 80 gradi centigradi. Esistono anche membrane con una miscela di carattere bistrato e monostrato, con alcuni dei gruppi idrofobici opposti covalentemente legati e altri no. Un'altra differenza tra i batteri e gli Archaea è la frequente assenza sia di una parete cellulare, sia di una membrana esterna, che vengono sostituiti da una grande varietà di diverse pareti cellulari, alcune delle quali hanno delle bio-componenti molto simili a quelle dei batteri, come polisaccaridi, proteine e glicoproteine. Alcuni archaea metanogeni (producono metano) hanno una parete costituita da pseudopeptidoglicano, costituita da NAG e, al posto di avere il NAM, ha l'acido N-acetiltalosaminuronico (NAT). Questo porta ad avere legami $\beta(1,3)$, che li rende insensibili al lisozima e alla penicillina, che invece nei batteri distruggerebbero il peptidoglicano o ne arresterebbero la sua biosintesi. Alcuni archaea possiedono ulteriori polisaccaridi diversi anche dallo pseudopeptidoglicano.

2.4 Flagelli

I flagelli sono lunghe e sottili strutture di forma elicoidale che si estendono oltre il corpo del microorganismo. La loro funzione principale è la locomozione: esercitano un movimento rotatorio e funzionano come organi propulsori. La distanza tra curve adiacenti dell'elica è costante ma differisce per ogni specie.

2.4.1 Tipologie di flagelli

Esistono diversi tipi di flagelli:

- Peritrico: comprende i microorganismi con moltissimi flagelli che ricoprono tutto il corpo.
- Polari: si trovano a un'estremità del microorganismo in numero variabile.
- Lofotrichi: gli organismi hanno più di un flagello in un'unica estremità. A differenza dei polari possiedono più di un flagello nell'estremità.

2.4.2 Struttura

I flagelli sporgono dalla cellula per una lunghezza fino a 3 volte del corpo che li contiene e sono divisi in:

- Filamento: struttura elicoidale formata da flagellina.
- Uncino: struttura incurvata a gancio che connette il filamento al corpo basale.
- Corpo basale: è formato da 15 proteine aggregate a fare un bastoncino a cui sono attaccati anelli che tengono ancorata la struttura e le permettono di ruotare.

Gli anelli dei corpi basali sono 2 nei Gram+ e 4 nei Gram-, 2 nella membrana plasmatica esterna e 2 nella parete cellulare.

2.4.2.1 Corpo basale - Gram–

Il corpo basale nei Gram– è formato da 4 anelli:

- Anello *C*: lega il citoplasma.
- Anello *MS*: si trova all'interno della membrana citoplasmatica.
- Anello *P*: ancora la parete cellulare.
- Anello *L*: lipopolisaccaride.

Attraverso questi anelli passa il bastoncino che completa il corpo basale. Due proteine di membrana circondano la struttura di base:

- *Mot*: le proteine motrici, pompano protoni nello spazio periplasmatico e utilizzano l'energia generata dal gradiente elettrochimico per creare una forza motrice con velocità molto elevate.
- *Fli*: funzionano da invertitore, ribaltano il senso di rotazione del flagello in risposta a segnali intracellulari.

2.4.3 Movimento flagellare

Il motore flagellare è composto da un rotore e uno statore. Il rotore è composto dagli anelli *C*, *MS* e *P*, mentre lo statore dalle proteine *Mot*. Il movimento del flagello viene impartito dal corpo basale e l'energia viene fornita dalla forza proton-motrice. Gli ioni H^+ attraversano *Mot* conferendo il moto rotatorio al flagello. Per compiere un giro sono necessari 1000 protoni.

2.4.4 Sintesi flagellare

Nei Gram– per la sintesi flagellare avviene in sequenza:

1. Formazione degli anelli *MS* e *C* nella membrana interna.
2. Formazione del bastoncino e sua chiusura.
3. Formazione anello *P*.
4. Formazione anello *L*.
5. Formazione Hook.
6. Formazione Cap.
7. 20 000 proteine di flagellina attraversano l'hook e formano il filamento.

2.4.4.1 Cap

Il cap controlla la sintesi del filamento che avviene dall'alto verso il basso aiutando l'organizzazione della flagellina.

2.4.4.2 Flagellina

La flagellina è la proteina monomerica che forma il filamento. Viene formata all'interno del microorganismo e trasportata all'esterno andando a formare il flagello disponendosi a forma di spirale. Il filamento rimane cavo all'interno. Ha inoltre proprietà antigeniche ed è rigida.

2.4.5 Tipologie di movimento flagellare

- Peritrico: alterna tumble e run in base se si vuole avvicinare ad un nutriente o allontanarsi da un repellente. La direzionalità della cellula è data dal fascio dei flagelli lungo lo stesso asse che ruota in senso orario. Affinchè avvengano tumble avviene una rotazione oraria.
- Polare: microorganismi dotati di un unico flagello hanno la possibilità di ruotarlo in entrambi i sensi: in uno vanno avanti nell'altro indietro. Altri possono muoversi in un unico senso con movimento aleatorio.

2.4.5.1 Velocità

I flagelli permettono spostamenti al secondo fino a 60 volte la lunghezza del corpo.

2.4.6 Spirocheti

Gli spirocheti sono una classe di microorganismi a forma di spirale e Gram—. I loro flagelli si trovano all'interno del corpo tra periplasma e membrana esterna. Vengono detti filamenti assiali e percorrono il corpo formando una spirale ancorata alla membrana interna. La rotazione sincrona dei filamenti fa muovere l'intero corpo. Gli spirocheti sono pertanto in grado di muoversi in ambienti viscosi come nei liquidi interni del corpo umano e molti di essi sono patogeni.

2.4.7 Motilità batterica

2.4.7.1 Motilità per scivolamento

I batteri possono muoversi anche in altri modi oltre a quello che utilizza i flagelli. Nei batteri bastoncellari o filamentosi la motilità per scivolamento non usa strutture esterne, ma la cellula si muove lungo il suo asse maggiore. Questo movimento è più lento rispetto a quello flagellare e richiede una superficie solida. Nei cianobatteri è accompagnato dalla secrezione di una sostanza mucosa o *slime*, un polisaccaride che fa aderire meglio il microorganismo alla superficie solida. In altri batteri si trovano proteine di membrana citoplasmatica che utilizzano l'energia rilasciata dalle pompe di ioni H^+ per subire cambiamenti conformazionali che vengono trasmessi alle proteine di membrana esterna e consentono lo scivolamento della cellula sulla superficie.

2.4.7.2 Chemiotassi

Si intende per chemiotassi il movimento dovuto alla presenza di un attrattante o repellente nell'ambiente segnalato grazie a chemiorecettori. In presenza di attrattante i moti di avanzamento sono orientati e il numero di run è maggiore rispetto a quello di tumble, mentre in presenza di repellente avviene l'inverso. Si possono scoprire nuove forme per combattere i patogeni analizzando i loro repellenti.

2.4.7.3 Fototassi

Si intende per fototassi il movimento di microorganismi verso la luce. È in risposta a uno stimolo che un batterio riceve se esposto a una specifica lunghezza d'onda. Si orientano per ottenere il livello di luce ottimale. Il responsabile di tale risposta è il fotorecettore.

2.4.7.4 Aerotassi

Si intende per aerotassi l'avvicinamento o allontanamento da fonti ricche di O_2 . Esistono batteri che necessitano di ossigeno per vivere, mentre altri che ne sono inerti o per cui è tossico.

2.4.7.5 Osmotassi

Si intende per osmotassi il movimento di allontanamento o avvicinamento ad alte concentrazioni ioniche.

2.5 Strutture esterne

2.5.1 Glicocalice

Il glicocalice è una struttura variabile costituita principalmente da polisaccaridi e polipeptidi. È un polisaccaride ad elevato peso molecolare, eteropolimerico od omopolimerico.

2.5.1.1 Capsula

La capsula è un tipo di glicocalice con struttura rigida, solida e forte. È presente nei patogeni grazie alla quale riescono ad aderire a molti substrati: circonda le difese immunologiche degli eucarioti in quanto gli zuccheri che la compongono sono simili a quelli presenti nelle cellule degli eucarioti. Può superare le dimensioni del batterio ed è la principale linea di difesa contro la fagocitosi.

2.5.1.2 Strato mucoso

Lo strato mucoso è un tipo di glicocalice con struttura più morbida e meno attaccata alla cellula. Può essere disciolto in acqua e la sua funzione fondamentale è di protezione dalla essiccazione oltre a conferire capacità adesive.

2.5.2 Fimbrie

Le fimbrie sono filamenti molto più corti e numerosi che non partecipano al processo di locomozione ma a quello di aderenza ad altre cellule o per la creazione di biofilm.

2.5.3 Pili

I pili sono costituiti da proteine diverse, sono più lunghi delle fimbrie e sono presenti in poche quantità. La loro funzione è quella di connettersi ad un altro microorganismo e scambiare materiale genetico attraverso coniugazione o per iniettare tossine attraverso i sistemi di secrezione. La capacità di adesione è mediata dalle adesine, proteine presenti alle estremità. Sono sintetizzati quando la cellula li necessita. Sono responsabili di un tipo di variazione genetica e sono più lunghi del corpo batterico. Permettono la motilità agganciandosi ad una cellula nelle vicinanze e depolimerizzandosi all'interno della cellula madre permettono l'avvicinamento con motilità contrattile. Crescono dall'interno verso l'esterno.

2.5.4 Biofilm

I biofilm sono masse viscosi di batteri raggruppati in un'unica zona. Le cellule hanno un comportamento diverso rispetto a quando sono isolate. La massa è circondata da fimbrie e polisaccaridi. Nei biofilm i batteri sono più resistenti ad antibiotici in quanto è presente una barriera supplementare.

2.5.4.1 Quorum sensing

Per produrre i biofilm i batteri devono essere in grado di comunicare tra loro per ottenere una struttura tridimensionale adatta. Questo avviene attraverso il rilascio di proteine captate da recettori specifici. Queste vie di segnale permettono ai microorganismi di capire quando il loro numero è sufficiente per creare un biofilm. I recettori saturi infatti indicano un numero ottimale per la creazione di un biofilm. Si smette di produrre le molecole di segnale si inizia a formare il biofilm.

2.6 Inclusioni cellulari

Le inclusioni cellulari sono strutture batteriche interne composte da lipidi, proteine, glicogeno e amido. Sono riserve di nutrienti e presenti in condizioni favorevoli come previsione. Arrivano a occupare i $\frac{3}{4}$ della cellula. Isolano il materiale di riserva dal citoplasma. Sono circondate da membrana lipidica.

2.6.1 Tipologie di inclusioni cellulari

2.6.1.1 Acido *poli- β -idrossibutirrico* *PBH*

Il *PBH* è formato da monomeri dell'acido che si legano tramite legami estere formando polimeri che si aggregano in granuli. Sono sintetizzati in eccesso di carbonio e utilizzati per produrre *ATP*.

2.6.1.2 Glicogeno

Il glicoceno è un polimero del glucosio, funge da riserva di energia e di carbonio.

2.6.1.3 Polifosfati

I polifosfati sono sorgenti di fosfati per sintesi di acidi nucleici e di fosfolipidi per la membrana citoplasmatica.

2.6.1.4 Globuli di zolfo elementare

I globuli di zolfo elementare si formano per ossidazione del solfuro di idrogeno accoppiate con reazioni di metabolismo energetico e fotosintesi. Quando lo zolfo si esaurisce si ossidano. Si trova nel periplasma.

2.6.1.5 Magnetosomi

I magnetosomi sono particelle cristalline costituite da magnetite Fe_3O_4 e creano un dipolo magnetico permanente. I batteri che li contengono svolgono magnetotassi.

2.6.1.6 Vescicole gassose

Le vescicole gassose sono strutture di natura proteica, vuote e rigide nel citoplasma. Conferiscono alla cellula la capacità di galleggiare diminuendone la densità. La membrana proteica è impermeabile all'acqua. Permettono al batterio di aggiustare la posizione verticale nella colonna d'acqua. Sono formate da *GvpA* e *GvpC*: la prima idrofobica ricca di β -foglietti, mentre la seconda ricca di α -eliche. *GvpA* si allinea in nastri paralleli formando una superficie impermeabile rafforzata da *GvpC* attraverso legami crociati.

2.7 Endospore

Le endospore sono strutture uniche che alcuni batteri sono in grado di produrre. Nella sporulazione una cellula trasforma sè stessa in un'endospora a causa di ambiente ostile. L'endospora è molto resistente a calore, agenti chimici e radiazioni.

2.7.1 Struttura

L'endospora è formata da:

- Esosporio: lo strato più esterno, sottile e delicato.
- Tunica: parete della spora, più strati proteici.
- Corteccia: peptidoglicano lasso.
- Core: parete cellulare, membrana citoplasmatica, nucleoidi e ribosomi.

Il metabolismo viene rallentato di molto.

2.7.1.1 Acido dipicolinico

Una sostanza chimica loro caratteristica è l'acido dipicolinico che forma un complesso con gli ioni calcio che riduce la presenza d'acqua all'interno dell'endospora. Si intercala inoltre con il DNA rendendolo più resistente alla denaturazione per riscaldamento.

2.7.1.2 Small acid-soluble spore protein *SASP*

Le *SASP* legano il DNA e lo proteggono da UV e sostanze chimiche. Sono fonte di carbonio e forniscono l'energia per la germinazione. Proteggono il DNA modificandolo nella forma *A*, resistente alla formazione di dimeri e pirimidina

2.7.1.3 Gram–

Nei pochi gram – che producono endospore si trova il core, la corteccia sostituisce il peptidoglicano e si trova dopo il coat. Nella corteccia viene contenuto l'acido dipicolinico che la protegge e conferisce rigidità. Compatta il DNA nel core per renderlo più resistente al caldo.

2.7.2 Formazione

Un segnale extracellulare interpretato dalla cellula attiva una serie di geni: il DNA si replica in due cromosomi identici in cui un'estremità rimane legata alla membrana cellulare. Si allungano lungo l'asse della cellula e inizia a formarsi una seconda membrana. Crea un'invaginazione all'interno del batterio fino a creare due compartimenti distinti. Un DNA viene digerito, mentre intorno all'altro si crea una seconda membrana. Si forma la corteccia e il coat. L'endospora viene rilasciata dalla cellula madre.

2.7.3 Riattivazione della cellula

L'endospora può rimanere inattiva per molti anni, ma può essere riconvertita a cellula vegetativa molto rapidamente. Questo processo avviene in tre stadi.

2.7. ENDOSPORE

2.7.3.1 Attivazione

L'attivazione è innescata dal riscaldamento di endospore appena formate o dalla presenza di nutrienti specifici.

2.7.3.2 Germinazione

Durante la germinazione l'endospora perde l'acido dipocolinico in complesso con il calcio e i componenti della corteccia.

2.7.3.3 Esocrescita

Durante l'esocrescita avviene un rigonfiamento dovuto all'assorbimento di acqua e alla sintesi di nuovi RNA, DNA e proteine.

Capitolo 3

Popolazione batterica

3.1 Crescita batterica

Per crescita batterica si intende il processo di duplicazione e moltiplicazione del numero di batteri. Questo processo è detto scissione binaria: da una cellula madre vengono generate due cellule figlie identiche. Il processo è di tipo mitotico e non si trova variabilità genetica.

3.1.1 Processo di scissione binaria

La scissione binaria inizia con la duplicazione del DNA che viene segregato in due cromosomi attaccati alla membrana. Il DNA rimane comunque diffuso nella cellula. Successivamente la cellula si allunga fino al doppio della sua lunghezza media e si replicano tutte le macromolecole contenute in essa. Avviene la formazione di un setto che consente la separazione dei due batteri. I due cromosomi rimangono attaccati alla membrana.

3.1.2 Divisoma

Nella formazione dell'apparato di divisione *divisoma* sono coinvolte molte proteine dette *Fts* (filamentose sensibili alla temperatura).

- *FtsZ*: forma l'anello del divisoma. Forma un polimero di 10 000 monomeri. Il processo di aggregazione e depolimerizzazione richiede idrolisi di *GTP*.
- *ZipA*: ancora l'anello di *FtsZ* alla membrana interna.
- *FtsA*: un'*ATPasi* sulla membrana citoplasmatica, fornisce l'energia per l'assemblaggio delle proteine del divisoma.
- *FtsI*: collega la membrana interna al peptidoglicano e media la sua biosintesi.
- *FtsK*: separa le due cellule figlie.

3.1.3 Sintesi della parete cellulare

Prima della divisione cellulare è necessaria la sintesi di nuovo materiale parietale. Questo deve essere aggiunto senza che vi sia perdita dell'integrità cellulare e delle molecole interne. *Wall band* dividono la membrana vecchia da quella nuova e la sintesi del peptidoglicano avviene da parte di autolisine, che causano piccole rotture nella parete cellulare del batterio, spezzando parzialmente il

peptidoglicano a partire dall'anello *FtsZ*. Il materiale viene aggiunto attraverso queste fessure a cui viene trasportato dal bactoprenolo, una molecola lipidica con funzioni di trasporto. Il bactoprenolo trasporta *NAM*, *NAG* e un pentapeptide. Attraverso flipping precursori attraversano la membrana e nel periplasma interagisce con enzimi che inseriscono i precursori attraverso transpeptidazione.

3.1.3.1 Transpeptidazione

La transpeptidazione forma legami crociati tra residui amminoacilici di *NAM*. Nei Gram- avviene tra *DAP* (acido diaminopimelico) e due residui di *D-alanina*, uno dei quali viene eliminato per fornire energia. Nei Gram+ i legami crociati avvengono attraverso ponti pentaglicinici tra una *L-lisina* e una *D-alanina*.

3.2 Crescita di una popolazione batterica

La crescita di una popolazione batterica avviene con andamento esponenziale di fattore 2.

3.2.1 Tempo di generazione

Si intende per tempo di generazione il tempo necessario per la duplicazione di una popolazione batterica. Il tempo medio di generazione per batteri in condizioni ottimali è di 30 minuti.

3.2.1.1 Rappresentazione

La crescita viene normalmente rappresentata in scala semilogaritmica, con il tempo rappresentato linearmente e il numero di batteri logicamente.

3.2.1.2 Calcolo dei dati

Si consideri:

- N il numero finale di cellule.
- N_0 il numero iniziale.
- n il numero di generazioni.

Allora:

$$N = N_0 2^n$$
$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

3.2.2 Fasi di crescita

Una coltura batterica presenta quattro fasi durante la sua crescita.

3.2.2.1 Fase di latenza

Nella fase di latenza o lag la cellula in condizione adatta non si divide per un certo periodo. Questo avviene in quanto si adatta all'ambiente, duplica le macromolecole. Non è presentata da cellule prelevate da una fase esponenziale. La si trova in cellule prelevate da una fase stazionaria, trasferite in un terreno più povero o batteri che hanno subito danni.

3.2.2.2 Fase esponenziale

3.2.2.3 Fase stazionaria

3.2.2.4 Fase di morte

3.3 Metodi di conta delle colonie batteriche

3.3.1 Conta totale

3.3.1.1 Limiti

- | | |
|---|---|
| • Non si distinguono cellule vive e morte. | sono presenti in bassa densità. |
| • Non possono essere osservati piccoli organismi. | • Difficile ottenere stime precise. |
| • Non è accurato per ambienti in cui i batteri | • Si devono immobilizzare le cellule prima della conta. |

3.3.2 Conta vitale

3.3.2.1 Diluizioni

3.3.2.2 Cause di errori

- Periodo di incubazione sbagliato.
- Presenza di colonie vicine e indistinguibili.
- Colonie piccole e poco visibili.
- Pipettamento non accurato.
- Terreno di coltura non adatto.

3.3.3 Filtrazione su membrana

Questa misura dà una stima di batteri presenti in ambienti dove la loro concentrazione è molto bassa. Si filtra il liquido attraverso una membrana che cattura i batteri. Dopo il filtraggio si incuba e contano le colonie che si formano. Si deve tener conto della quantità di liquido diluito.

3.3.4 Most Probable Number

Il most probable number *MPN* è un metodo statistico utilizzato per stimare cellule poco concentrate e difficili da far crescere in laboratorio. Essendo che maggiore il numero batteri maggiore il numero di diluizioni necessarie per ridurre il loro numero a zero si pongono in delle provette diluizioni seriali della coltura. Si fa incubare e si inserisce in ogni provetta un indicatore di *pH*: il *pH* acido è indicatore di metabolismo attivo e presenza microbica. I tubi positivi ordinati per grado di diluizione creano un codice che letto su una tabella di riferimento ritorna la densità batterica.

3.3.5 Misura della torbidità

La misura della torbidità avviene attraverso uno spettrofotometro: una fonte di luce attraversa un campione in una cuvetta con del terreno di coltura. Una fotocellula misura la quantità di luce che è riuscita ad attraversarlo. La misura calcolata è la densità ottica (*OD*) il logaritmo della luce incidente diviso il valore della luce non deviata. *OD* è un valore compreso tra 0 e 1, dove 0 indica assenza di cellule mentre 1 il massimo rilevabile. Può generare una sovrastima a basse concentrazioni in quanto non distingue tra cellule vive e cellule morte. In caso di alti valori di *OD* la misura tende a perdere di precisione in quanto i raggi di luce in alte concentrazioni possono rimbalzare più volte su cellule diverse e colpire lo stesso il sensore. Quando si raggiunge un *OD* di 0.6-0.7 si diluisce la coltura. Si dovrà tenere conto della diluizione moltiplicando il suo inverso al valore di *OD*.

3.4 Sistemi di coltivazione microbica

3.4.1 Spread-plate method

Nel piastramento in superficie si aggiunge un volume noto di una coltura su un terreno preparato, si mescola e si incuba.

3.4.2 Pour-plate method

Nel piastramento per inclusione viene prima aggiunta la colonia e poi l'agar e si mescola dolcemente. È possibile utilizzare un volume maggiore di batteri e si formano più colonie anche all'interno dell'agar.

3.4.3 Chemostato

Il chemostato è un sistema aperto utilizzato per volumi molto grandi (si dice in batch per una coltura in un sistema chiuso e rapidamente si arriva a saturazione). Consente di mantenere la coltura in crescita esponenziale per tempi indefiniti. Un rubinetto regola la sterilità e un altro elimina l'overflow. Viene pertanto continuamente introdotto terreno fresco e espulso terreno esausto insieme alle cellule. All'equilibrio il volume del chemostato, il numero di densità e la concentrazione dei nutrienti rimangono costanti. Questo viene detto steady state. La velocità di crescita è pertanto determinata dalla velocità di flusso e dalla concentrazione del nutriente limitante. La velocità di flusso deve essere abbastanza lenta da non dilavare la coltura ma abbastanza veloce da non impedire al nutriente limitante di sostenere i bisogni metabolici della popolazione.

3.5 Effetti ambientali sulla crescita microbica

3.5.1 Temperatura

La temperatura è il fattore che influenza maggiormente la crescita di un microorganismo. Per ciascuno di essi esiste una temperatura ottimale alla quale cresce. I grafici che mettono in relazione crescita batterica con temperatura presentano spesso lo stesso andamento, cambiando solo il range di temperatura relativo. La temperatura ottimale è sempre più vicina al massimo.

3.5.1.1 Motivazioni

3.5.1.1.1 Minimo Al minimo avviene una gelificazione della membrana: i processi di trasporto sono così lenti che non può avvenire crescita e non si forma un gradiente protonico.

3.5.1.1.2 Tra minimo e ottimo Con l'aumento della temperatura le reazioni enzimatiche avvengono a tassi sempre più veloci.

3.5.1.1.3 Ottimo Le reazioni enzimatiche avvengono al tasso maggiore possibile.

3.5.1.1.4 Massimo Al massimo avviene la denaturazione delle proteine, collassa la membrana citoplasmatica e la lisi termica.

3.5.1.2 Classificazione degli organismi

- Psicrofili: temperatura ottimale $\leq 15^\circ$. Enzimi con maggiore quantità di α -eliche e maggiori amminoacidi polari. Meno legami deboli e meno interazioni tra domini proteici. Acidi grassi insaturi nella frazione lipidica della membrana la rende più fluida. Glicerolo o dimetilsolfossido *DMSO* proteggono le cellule dalla formazione di cristalli di ghiaccio.
- Mesofili: vivono a temperature intermedie.
- Termofili: temperatura ottimale $\geq 45^\circ \leq 80^\circ$. La stabilità al calore è dovuta alla sostituzione di amminoacidi critici che determinano una struttura quaternaria più resistente. Contengono più amminoacidi polari e più legami ionici.
- Ipertermofili: si trovano solo negli archaea e hanno una temperatura ottimale $\geq 80^\circ$. Non contengono acidi grassi nelle membrane ma idrocarburi C_{40} . Le membrane sono fatte da un unico monostrato lipidico.

3.5.2 pH

Il pH o concentrazione di H_3O^+ influisce sulla crescita degli organismi. La maggior parte cresce in un pH compreso tra 6 e 8, ma esistono estremofili. La maggior parte dei microorganismi vive in un intervallo di 2-3 unità.

3.5.2.1 Acidofili

Gli acidofili possono sopportare concentrazioni di H^+ molto elevate. I funghi sono più acido-tolleranti dei batteri. Le membrane cellulari si lisano a pH vicini alla neutralità. Ricevono energia attraverso forza proton motrice derivata da pompe H^+ .

3.5.2.2 Alcalofili

Gli alcalofili sopportano concentrazioni di H^+ molto basse come nei laghi alcalini e sono per lo più archea. Si dividono in due classi rispetto al pH interno che può essere mantenuto vicino alla neutralità o no. Nel primo caso si crea un forte gradiente di ioni. Ricevono energia attraverso forza proton motrice derivata da pompe Na^+ .

3.5.3 Concentrazione $NaCl$

Nella maggior parte dei microorganismi il citoplasma ha una concentrazione di soluti più elevata dell'ambiente esterno in modo che l'acqua tenda a penetrare all'interno della cellula.

3.5.3.1 Non alofili

Gli organismi non alofili non sopportano valori anche bassi di $NaCl$.

3.5.3.2 Alotolleranti

Gli organismi alotolleranti crescono a valori medi di $NaCl$ (1-15%).

3.5.3.3 Alofili

Gli organismi alofili crescono a concentrazioni medio-alte di $NaCl$.

3.5.3.4 Alofili estremi

Gli organismi alofili estremi non possono crescere se nell'ambiente non è presente una certa concentrazione di $NaCl$ (15-30%).

3.5.4 Attività dell'acqua

Si intende per attività dell'acqua a_w la quantità di acqua disponibile per l'organismo. Ovvero un indice relativo alla quantità d'acqua che in un determinato prodotto è libera da legami con altri componenti

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Dove:

3.5. EFFETTI AMBIENTALI SULLA CRESCITA MICROBICA

- P è la pressione di vapore del prodotto.
- P_0 è la pressione di vapore dell'acqua pura per una stessa temperatura.

Non sono noti organismi in grado di crescere dove l'attività dell'acqua è ≤ 0.55 .

3.5.4.1 Osmoregolazione

In condizioni di bassa attività dell'acqua la può ottenere solo aumentando la concentrazione dei soluti al suo interno attraverso osmoregolazione. Questo viene ottenuto trasferendo ioni inorganici all'interno o sintetizzando un soluto organico. I più utilizzati o soluti compatibili sono amminoacidi, zuccheri o alcol. Una cellula che cresce in ambiente disidratato fa entrare e produce soluti in modo che l'acqua entri in essa per osmosi.

3.5.5 Ossigeno

3.5.5.1 Classificazione

Gli organismi possono essere divisi in base alla loro risposta in presenza di ossigeno.

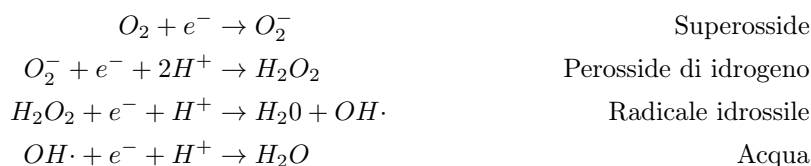
Gruppo		Relazione con O_2	Tipo di metabolismo
Aerobi	Obbligati	Richiesto	Respirazione aerobica
	Facoltativi	Non richiesto ma preferito	Respirazione aerobica anaerobica fermentazione
	Microaerofili	Richiesto ma a livelli inferiori rispetto a quelli atmosferici	Respirazione aerobica
Anaerobi	Aerotolleranti	Non richiesto non preferito	Fermentazione
	Obbligati	Non tollerata o letale	Respirazione anaerobica fermentazione

3.5.5.2 Determinazione dello stato di aerobiosi

Per determinare se un organismo è aerobio o anaerobio si pongono tubi di coltura con indicatore redox di colore rosa quando ossidato e incolore quando ridotto. L'aria entra nel tubo e arriva fino al terreno e se ne trova sempre meno aumentando la profondità. La posizione di crescita lungo il tubo determina lo stato di aerobiosi.

3.5.5.3 Forme tossiche dell'ossigeno

Esistono delle forme tossiche dell'ossigeno come superossido o perossido di idrogeno. Questi sono detti radicali liberi e si formano durante la reazione di creazione dell'acqua.



I batteri che riescono a vivere in aerobiosi possiedono enzimi che distruggono i composti tossici dell'ossigeno:

- Catalasi.
- Perossidasi.
- Superosside dismutasi.
- Superosside riduttasi.

3.5.6 Pressione

I barofili sono batteri in grado di resistere a forti pressioni atmosferiche.

Capitolo 4

Meccanismi di trasporto cellulare

La membrana citoplasmatica svolge numerose e fondamentali funzioni:

- **Barriera di permeabilità:** previene la dispersione di sostanze e funziona come una porta di controllo per il trasporto di nutrienti verso l'interno e di sostanze di scarto verso l'esterno della cellula;
- **Sito di ancoraggio:** sito di ancoraggio di molte proteine coinvolte nel trasporto, nella bioenergetica e nella chemiotassi;
- **Conservazione dell'energia:** sito di generazione e di utilizzazione della forza proton-motrice.

4.1 Tipologie di trasporto

4.1.1 Diffusione passiva

Nella diffusione passiva le molecole possono passare liberamente e secondo gradiente. Le molecole si muovono dalla regione a più alta concentrazione a quella a più bassa per agitazione termica.

Si possono diffondere liberamente molecole di H_2O , O_2 e CO_2 , pertanto molecole piccole e apolari. Più alto il gradiente più il flusso è evvicace e veloce.

4.1.2 Diffusione facilitata

Nella diffusione facilitata le molecole si muovono secondo gradiente ma necessitano di canali particolari che ne permettono il passaggio. Come nella diffusione passiva il movimento non richiede energia e il valore del gradiente incide sul tasso di assorbimento. Questo movimento richiede però uso di molecole trasportatrici come carrier o permeasi, che rendono necessario un minore gradiente di concentrazione affinché avvenga un assorbimento significativo della molecola. Questo processo viene utilizzato per il trasporto di glicerolo, zuccheri e amminoacidi.

4.1.2.1 Tipologie di diffusione facilitata

4.1.2.1.1 Non specifica La diffusione facilitata non specifica avviene tramite proteine che permettono il passaggio di molecole di una certa dimensione o carica elettrica.

4.1. TIPOLOGIE DI TRASPORTO

4.1.2.1.2 Specifica La diffusione facilitata specifica avviene tramite permeasi, proteine specifiche che possiedono un sito di legame per il substrato da trasportare.

4.1.2.1.3 Osmosi L'osmosi è la diffusione di acqua attraverso una membrana selettivamente permeabile. Nella cellula la maggior parte del trasporto dell'acqua viene svolto da porine, proteine che formano canali con molti amminoacidi idrofilici.

Il movimento avviene dal compartimento con minor concentrazione di soluti verso quello con la maggior concentrazione di soluti.

La membrana separa due soluzioni ed è permeabile all'acqua ma non ai soluti, pertanto questa si sposta verso il compartimento con maggiore concentrazione dei secondi. La pressione osmotica è in grado di contrastare la forza di gravità.

4.1.2.1.3.1 Ambiente isotonico Nell'ambiente isotonico la concentrazione di soluti nella cellula è uguale a quella dell'ambiente esterno, pertanto non avviene nessun movimento netto di acqua.

4.1.2.1.3.2 Ambiente ipertonico Nell'ambiente ipertonico la concentrazione di soluti nella cellula è minore rispetto a quella dell'ambiente esterno, pertanto l'acqua esce causando la diminuzione del volume cellulare.

4.1.2.1.3.3 Ambiente ipotonico Nell'ambiente ipotonico la concentrazione di soluti nella cellula è maggiore rispetto a quella dell'ambiente, pertanto l'acqua entra causando la lisi delle membrane non protette da una parete.

4.1.2.1.3.4 Resistenza dei batteri La parete cellulare dei batteri conferisce loro resistenza ai vari stress osmotici.

4.1.3 Trasporto attivo

Il trasporto attivo richiede energia per movimentare le sostanze contro il proprio gradiente di concentrazione.

Questa energia viene fornita dall'idrolisi dell'ATP o dalla forza proton-motrice.

4.1.3.1 Meccanismi di trasporto

4.1.3.1.1 Uniporto Durante l'uniporto un solo tipo di sostanza viene portato in una sola direzione.

4.1.3.1.2 Antiporto Durante l'antiporto due tipi di sostanza vengono trasportate in direzioni opposte. Una delle due molecole viaggia secondo gradiente e fornisce l'energia necessaria al trasporto dell'altra.

4.1.3.1.3 Simporto Durante il simporto due molecole vengono portate nella stessa direzione. Una delle due molecole viaggia secondo gradiente e fornisce l'energia necessaria al trasporto dell'altra.

4.1.3.1.4 Esempi

4.1.3.1.4.1 Assunzione del lattosio in E. coli La Lac permeasi è la molecola responsabile del trasporto di lattosio in E. coli. Il trasporto avviene attraverso un meccanismo di simporto: l'energia necessaria al trasporto del lattosio è fornita dal trasporto di protoni all'interno della cellula. Con il passare del tempo l'energia si riduce, rallentando il trasporto.

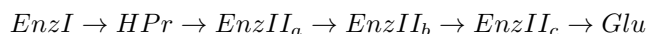
4.1.3.2 Tipologie di trasporto attivo

Le proteine che permettono il trasporto sono proteine transmembrana con struttura tubulare e costituite da molte α -eliche.

4.1.3.2.1 Trasporto semplice Il trasporto semplice è il trasporto di molecole guidato dall'energia associata alla forza proton-motrice.

4.1.3.2.2 Traslocazione di gruppo Nella traslocazione di gruppo avviene una modifica chimica della sostanza trasportata. In questo modo diventa impermeabile alla membrana della cellula e non ne può più uscire.

4.1.3.2.2.1 Trasporto del glucosio Il glucosio viene trasportato attraverso un canale e fosforilato. La sua fosforilazione in glucosio 6-P è il primo stadio della glicolisi: il sistema lo prepara in modo che possa essere immediatamente assunto in un pathway metabolico. La fosforilazione viene guidata dal sistema della fosfotransferasi: 5 proteine tra cui *EnzI* e *HPr* non specifiche e *ENZII_{a,b,c}* specifiche per ogni zucchero. Un fosfoenolpiruvato *PEP* cede un gruppo fosfato a un enzima *EnzI* che lo cede ad altri enzimi in una catena, mentre l'ultimo lo cede al glucosio mentre sta attraversando il doppio strato lipidico.



Ogni passaggio in questo pathway richiede energia.

4.1.3.2.3 Sistema ABC - ATP - binding cassette Il sistema ABC coinvolge proteine periplasmatiche di legame e energia proveniente dall'idrolisi di *ATP*. Questo sistema è spesso coinvolto nel trasporto di ioni K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ .

4.1.3.2.3.1 Componenti Le componenti coinvolte nel processo sono:

- Proteine di legame periplasmatiche: riconoscono e legano le molecole da trasportare in modo specifico.
- Proteine integrali di membrana: fungono da canale.
- Proteine per l'idrolisi del *ATP*: forniscono l'energia necessaria.

4.1.3.2.3.2 Procedimento Le proteine di legame periplasmatiche mostrano un'elevata affinità per il loro substrato e lo sequestrano. Si forma così un complesso che interagisce con una proteina integrale di membrana che causa il suo trasporto attraverso l'idrolisi di *ATP*.

4.1.3.2.4 Gram- I Gram- richiedono un sistema di trasporto complesso in quanto deve attraversare due membrane.

4.1.3.2.4.1 Trasporto del ferro Il trasporto del ferro nei Gram⁻ richiede un sistema *ABC* per l'attraversamento della membrana interna e forza proton-motrice per l'attraversamento della membrana esterna. Il passaggio nella membrana esterna avviene tramite un recettore *TonB*-dipendente. Si nota pertanto che viene utilizzato un sistema combinato di più tipologie di trasporto, dove:

1. *ABC* permette l'attraversamento della membrana interna;
2. *Enterochelina* riconosce il ferro e lo passa alla proteina sottostante permettendogli l'attraversamento della membrana interna.

4.2 Secrezione, traslocazione ed esportazione

In molti processi a livello microscopico la fuoriuscita di molecole è di fondamentale importanza.

4.2.1 Tipologie di trasporto

4.2.1.1 Traslocazione

La traslocazione è il trasferimento di una proteina da un compartimento ad un altro. Molte proteine necessitano di essere trasportate fuori dalla cellula o di essere inserite in modo specifico nella membrana. Nei procarioti l'esportazione delle proteine avviene attraverso l'attività di proteine chiamate traslocasi. Le traslocasi riconoscono sequenze specifiche sulle proteine che determinano il luogo di destinazione.

4.2.1.2 Secrezione

Nella secrezione la proteina viene secreta nell'ambiente esterno.

4.2.1.3 Esportazione

Nell'esportazione la proteina viene inserita e rimane attaccata alla membrana.

4.2.2 Il sistema *Sec*

4.2.2.1 Riconoscimento della sequenza leader

Il riconoscimento di una proteina da parte del sistema *Sec* avviene prima che venga ultimata la sintesi del ribosoma. La coda *N*-terminale infatti è un sito di riconoscimento detto sequenza segnale.

4.2.2.1.1 La sequenza segnale La sequenza segnale è formata da 15-30 aminoacidi:

- Porzione idrofila basica;
- Regione idrofoba;
- Porzione polare.

Dopo la traslocazione la sequenza segnale viene rimossa dopo un'alanina specifica.

4.2.2.2 Via di secrezione dipendente da *Sec*

4.2.2.2.1 Componenti La via di secrezione dipendente da *Sec* è composta da tre componenti:

- Complesso transmembrana;
- “Motore” citoplasmatico che fornisce l’energia;
- Sistema citoplasmatico che riconosce le proteine da trasportare.

4.2.2.2.2 Processo di traslocazione

1. Il ribosoma traduce l’mRNA per la proteina da trasportare.
2. *SecB* lega la proteina nascente e ne rallenta il ripiegamento aiutandola a raggiungere il complesso di membrana.
3. *SecA* lega *SecB* e porta la proteina a prossimità di *SecYEG*.
4. *SecB* rilascia la proteina; il legame dell’ATP a *SecA* ne cambia la conformazione, iniziando il processo di traslocazione;
5. L’idrolisi dell’ATP in $ADP + P_i$ fornisce l’energia necessaria alla traslocazione;
6. La sequenza segnale viene rimossa da una peptidasi segnale.

4.2.2.2.3 Inserimento in membrana - sistema *SRP* Alcune proteine non devono essere portate all’esterno, ma devono essere inserite nella membrana come canali o strutture per il riconoscimento. Per fare questo viene utilizzato il sistema *SRP*, che è costituito da una proteina e da una molecola di RNA.

1. *SRP* lega una specifica sequenza segnale della proteina nascente;
2. *FtsY* lega il complesso *SRP*-ribosoma e lo indirizza alla membrana, verso il complesso *SecY* o verso un’altra proteina di membrana, *YidC*;
3. La proteina si ripiega all’interno della membrana nella sua conformazione funzionale.

4.2.2.2.4 Sistema di secrezione di tipo II È un sistema altamente specifico e viene utilizzato per:

- Produzione di tossine, cellulasi, proteasi, lipasi in molti batteri patogeni;
- assemblaggio di strutture superficiali come i pili.

4.2.2.2.4.1 Processo

1. Attraversamento della membrana con il sistema *Sec*;
2. Taglio della sequenza segnale nel periplasma e ripiegamento della proteina;
3. Secrezione attraverso il complesso di Golgi che fornisce anche l’energia necessaria tramite l’idrolisi di ATP o GTP.

4.2.2.2.5 Sistema di secrezione a 2 partner (*TPS*, Two Partner Secretion) È un sistema costituito da una singola proteina di trasporto che funge da canale. Questo tipo di secrezione non ha un canale dedicato già presente. La proteina trasportata (*TpsA*) possiede, oltre alla sequenza segnale, un dominio *TPS*. Il dominio *TPS* riconosce la proteina canale *TpsB* che ne media il trasporto. Una volta secreta, la proteina può rimanere associata alla superficie del batterio o rilasciata nell’ambiente extracellulare.

4.2.2.2.6 Sistema dell'autotrasporto, tipo V Il dominio *C*-terminale della proteina stessa media la sua secrezione. La sequenza segnale N-terminale viene riconosciuta e traslocata attraverso *Sec* nel periplasma. Il dominio interno funzionale o passenger domain passa nel periplasma. Il dominio *C*-terminale va a formare il canale di trasporto. La proteina funzionale viene tagliata tramite autoproteolisi o proteolisi mediata da una proteasi specifica nella membrana esterna.

4.2.2.2.7 Secrezione attraverso la via “chaperon/usher” Questa via viene utilizzata per la secrezione e l'assemblaggio di strutture della superficie cellulare, come alcuni tipi di pili e strutture di adesione.

4.2.2.2.7.1 Componenti

- Chaperonina periplasmatica;
- Proteina di membrana esterna (usciera).

4.2.2.2.7.2 Processo Per prima cosa il sistema *Sec* trasporta le subunità di pilina nel periplasma. Dopo viene rimossa la sequenza segnale e si instaura un legame tra chaperonina *PapD* ad una regione C-terminale conservata. Questo evita l'aggregamento prematuro delle subunità di pilina. *PapD* porta le subunità alla proteina usher che procede con la secrezione e l'assemblaggio.

4.2.3 Vie delle secrezioni indipendenti da Sec

4.2.3.1 Il sistema Tat: Twin-arginine translocation system

Questo sistema è costituito da 3 proteine di membrana: *TatA*, *TatB*, *TatC*, con la presenza di arginina.

4.2.3.1.1 Processo

1. Viene riconosciuta la sequenza N-terminale;
2. Produzione e ripiegamento della proteina con l'intervento di chaperonine e aggiunta di eventuali co-fattori;

3. Indirizzamento al complesso di membrana TatBC;

4. Il canale di trasporto (*TatA*) si associa al complesso TatBC e ne consente il passaggio. La sequenza segnale viene rimossa nel periplasma.

L'energia viene fornita dalla forza proton-motrice.

4.2.3.2 I trasportatori ABC: ATP-Binding Cassette

In questa via non vi è un passaggio da un intermedio periplasmatico.

4.2.3.2.1 Componenti

- Proteina che si estende nel periplasma (*MFP*);
- Proteina associata alla membrana interna per idrolizzare ATP (dominio *ABC*);
- Proteina associata alla membrana esterna (*OMP*).

Non è presente la sequenza segnale N-terminale, ma una sequenza di riconoscimento C-terminale che alla fine non viene rimossa.

4.2.3.3 Il sistema di secrezione di tipo III

È un sistema che viene annoverato come fattore di virulenza. Deve attraversare 3 membrane: quella interna, quella esterna e quella della cellula bersaglio. Il batterio secerne proteine tossiche direttamente nel citoplasma di una cellula eucariote bersaglio e in questo modo ne causa la morte. Il sistema viene attivato dal contatto con la cellula ospite e presenta una struttura complessa composta di più di 20 proteine diverse. Questo sistema presenta una certa omologia con le proteine che costituiscono il corpo basale del flagello. La secrezione necessita di energia ed è assistita dalle chaperonine *Syc* che hanno il compito di portare la proteina alla base del canale di trasporto. La proteina *YopN* apre e chiude il canale. Il canale viene formato nella cellula bersaglio da *YopB* e *YopD*.

4.2.3.4 Il sistema di secrezione di tipo IV

Questo è un processo molto versatile che secreta DNA (coniugazione) o proteine. Avviene una traslocazione direttamente nelle cellule bersaglio. Sono presenti almeno 12 proteine diverse che formano una struttura che abbraccia gli involucri del batterio. Questo sistema porta all'assemblaggio di monomeri che formano il pilo *IV* a spirale.

Capitolo 5

Metabolismo dei microrganismi

5.1 Introduzione

Il metabolismo è un insieme di reazioni biochimiche controllate.

5.1.1 Elementi fondamentali

Alcuni degli elementi fondamentali sono:

- nutrienti: elementi chimici essenziali;
- energia: ricavata dalla luce o dalla degradazione dei nutrienti;
- enzimi: catabolizzano e anabolizzano i nutrienti;
- macromolecole: assemblaggio e polimerizzazione partendo da monomeri;
- struttura cellulare: assemblaggio di più macromolecole.

5.1.2 Tipi di metabolismo

Il metabolismo viene diviso in due principali tipi di reazioni: cataboliche e anaboliche.

5.1.2.1 Catabolismo

Il catabolismo è la parte del metabolismo che libera energia, grazie alla scomposizione di molecole organiche. Una parte dell'energia viene conservata sotto forma di legami nell'ATP, mentre altra viene dispersa come calore. È una via esoergonica.

5.1.2.2 Anabolismo

L'anabolismo utilizza l'energia che viene liberata dal catabolismo per creare molecole più grandi. Anche in questo tipo di processi viene persa dell'energia sotto forma di calore. È una via endoergonica. Una via metabolica non è costituita da una sola reazione, ma da una serie complessa di reazioni.

5.1.2.3 Energia libera

Durante una reazione chimica l'energia libera $\Delta G^{0'}$ è definita come energia rilasciata disponibile per compiere un lavoro utile. Se $\Delta G^{0'}$ è negativo significa che essa procederà con liberazione di energia libera. Se $\Delta G^{0'}$ è positivo la reazione per aver luogo richiede energia. L'energia libera non fornisce informazioni riguardo la velocità di reazione: determina unicamente se una reazione libera o richiede energia. Reazioni energeticamente favorevoli come la formazione di acqua ($\Delta G^{0'} = -237\text{kJ}$) non avvengono mescolando i reagenti: è necessario prima fornire energia per rompere i legami dei reagenti. Questa energia viene detta energia di attivazione e può essere abbassata da catalizzatori, che aumenteranno quindi la velocità di reazione.

5.2 Catalisi ed enzimi

5.2.1 Enzimi

Gli enzimi sono i catalizzatori biologici.

5.2.1.1 Composizione

Gli enzimi sono proteine, o raramente RNA, altamente specifici per la reazione da essi catalizzata. Sono tipicamente più grandi del substrato: il dominio che lo lega viene detto sito attivo. Possono contenere piccole molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Si nota pertanto come molti enzimi sono composti da più elementi organici e inorganici.

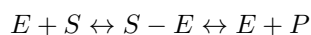
5.2.1.1.1 Apoenzima Si dice apoenzima la porzione proteica degli enzimi che viene attivata dal legame dei suoi cofattori.

5.2.1.1.2 Cofattori I cofattori possono essere molecole inorganiche come ioni metallici (ferro, zinco o rame) o molecole organiche (coenzimi). I coenzimi tipicamente sono vitamine o le contengono.

5.2.1.1.3 Oloenzima Si dice oloenzima la forma completa e attiva dell'enzima.

5.2.1.2 Reazioni catalizzate da enzimi

Ciascun enzima catalizza un solo tipo di reazione o una classe di reazioni strettamente affini. La specificità dipende dalla struttura tridimensionale particolare che assume l'enzima.



Dove:

- E : enzima.
- S : substrato.
- P : prodotto.

Si nota come l'enzima non viene consumato durante la reazione.

5.2.1.3 Tipologie di enzimi

Esistono diversi tipi di enzimi e la maggior parte dei loro nomi contiene il suffisso "-asi" e spesso fa riferimento al tipo di substrato e di reazione biochimica mediata:

- **Idrolasi:** catalizzano la rottura di un legame chimico con l'intervento di una molecola d'acqua (catabolismo);
- **Lsomerasi:** catalizzano l'interconversione tra due isomeri (nè catabolismo, nè anabolismo);
- **Ligasi e polimerasi:** assemblano molecole della stessa natura chimica (anabolismo);
- **Liasi:** catalizzano la rottura di diversi legami chimici attraverso processi differenti dall'idrolisi e dalla ossidazione (catabolismo);
- **Ossidoriduttasi:** catalizzano il trasferimento di elettroni da una molecola (donatrice di elettroni) ad un'altra (accettore di elettroni) (catabolismo o anabolismo);
- **Trasferasi:** spostano gruppi funzionali (amino, fosfato, acetile, etc.) da una molecola all'altra (anabolismo).

5.2.2 Parametri esterni che alterano l'azione degli enzimi

Elementi esterni possono avere effetto sulla capacità degli enzimi di svolgere reazioni.

5.2.2.1 Temperatura

L'alzarsi della temperatura tende ad incrementare la velocità delle reazioni biochimiche. Tuttavia, le reazioni enzimatiche hanno un range di temperatura in cui possono svolgersi. Sopra una determinata temperatura i legami non-covalenti dell'enzima si rompono ed esso si denatura, portando alla perdita della struttura tridimensionale e della funzionalità. La denaturazione può essere permanente o reversibile a seconda degli enzimi.

5.2.2.2 pH

Valori estremi di *pH* portano alla denaturazione. Gli ioni rilasciati da acidi o basi interferiscono con i legami idrogeno che assicurano la struttura tridimensionale dell'enzima.

5.2.2.3 Concentrazioni relative di substrato ed enzima

L'attività enzimatica aumenta in funzione della concentrazione di substrato. L'attività si stabilizza quando si raggiunge il punto di saturazione: tutti i siti attivi sono legati al substrato.

5.2.2.4 Inibitori

Gli inibitori regolano l'attività enzimatica.

5.2.2.4.1 Tipologie di inibitori

5.2.2.4.1.1 Competitivi Gli inibitori competitivi sono in grado di legare il sito attivo. Presentano una forma e struttura chimica simile a quella del substrato. Competono con il substrato per il sito attivo dell'enzima. In linea generale, la loro inibizione è reversibile e può essere superata con l'aumento della concentrazione del substrato. La sulfanilamide presenta una forte affinità per il sito attivo dell'enzima che catalizza la conversione del *PABA* in acido folico, un precursore dei nucleotidi fondamentale per la sintesi del DNA.

5.2.2.4.1.2 Non-competitivi Gli inibitori non-competitivi non legano il sito attivo ma un'altra regione detta sito allosterico. Portano ad un cambiamento conformazionale del sito attivo. Esistono due forme di inibitori non competitivi: inibitori ed eccitatori. Alcuni enzimi possiedono multipli siti allosterici per una fine regolazione.

5.2.2.4.1.3 Feedback-negativo Gli inibitori a feedback negativo regolano la quantità di una certa sostanza in base alla sua concentrazione. Il prodotto finale della via metabolica è un inibitore allosterico di un enzima che interviene più a monte nel pathway. Dato che il prodotto di ogni reazione è anche il substrato della successiva, l'intero pathway viene disattivato quando il prodotto finale è presente in concentrazione sufficiente. Nella via ramificata per la produzione di tirosina, fenilalanina e triptofano ciascuno dei tre prodotti finali inibisce uno dei tre enzimi sintetasi. Solo quando tutti i tre prodotti finali sono presenti in concentrazione adeguata la sintesi del loro precursore, *DHAP*, viene interrotta.

5.3 Redox

Molte reazioni metaboliche prevedono il trasferimento di un elettrone da una molecola e^- *donor* ad un'altra e^- *acceptor*.

5.3.1 Potenziale di riduzione standard

Con potenziale di riduzione standard E_0 si intende la costante di equilibrio per una reazione di ossido-riduzione. La capacità di una molecola di scambiare elettroni è espressa in Volt e prende come riferimento una sostanza standard H_2 . Più negativo il valore di E_0 più la molecola tende a donare elettroni. Più positivo il valore di E_0 più la molecola tende ad accettare elettroni.

5.3.2 Torre degli elettroni

La torre degli elettroni rappresenta il campo dei potenziali di riduzione possibili per le coppie redox in natura. Le reazioni con E_0^I più negativo si trovano in cima alla torre, mentre quelle con E_0^I più positivo alla sua base. La sostanza ridotta nella coppia posta in cima alla torre ha la massima tendenza a donare elettroni. La sostanza ossidata nella coppia posta in fondo alla torre ha la massima tendenza ad accettare elettroni.

5.4 Trasportatori di elettroni

Le reazioni redox sono mediate da piccole molecole.

5.4.1 *NADH* e *NADPH*

Un intermedio redox molto comune è il NAD^+ (nicotinammide adenina dinucleotide), ha la funzione di coenzima e trasportatore di elettroni. La sua forma ridotta è *NADH*. Sono coinvolti nelle reazioni cataboliche che generano energia. $NADP^+$ e *NADPH* sono assolutamente analoghi a NAD^+ e a *NADH*, l'unica differenza è il gruppo fosfato. Entrambe le forme ridotte sono buoni donatori di elettroni con $E_0' = -0.32$. Sono coinvolti nelle reazioni anaboliche di biosintesi.

5.4.2 Ciclo $NAD^+/NADH$

NAD^+ e $NADH$ sono coenzimi e attivano enzimi senza essere consumati. Gli enzimi si legano a NAD^+ e quando incontrano un substrato adatto lo legano in prossimità del coenzima non ridotto. NAD^+ a questo punto si riduce: riceve due elettroni e un protone H^+ e passa in forma $NADH$. So noti come in questo passaggio perde l'anello aromatico. In questo modo cambia la conformazione dell'enzima che svolge la sua funzione. Se invece all'enzima si lega $NADH$ avviene il contrario: si ossida e H^+ e passa in forma NAD^+ .

5.5 *ATP*

5.5.1 Struttura

L'adenosina trifosfato *ATP* è il più importante composto fosforilato. È costituito dal ribonucleoside adenosina a cui sono legati in serie tre molecole di fosfato. I suoi legami fosfoanidride sono molto energetici. Viene generato durante le reazioni esoergoniche e consumato nelle reazioni endoergoniche.

5.5.2 Funzione

Nel catabolismo l'energia rilasciata dalla degradazione dei nutrienti viene concentrata e stoccata nei legami ad alta energia tra i gruppi fosfato della molecola di *ATP*.

5.5.3 Sintesi

Il *ATP* si forma dalla fosforilazione dell'ADP.

5.5.3.1 Metodi di fosforilazione

5.5.3.1.1 Fosforilazione a livello di substrato La fosforilazione a livello di substrato prevede il trasferimento del fosfato da una molecola organica a *ADP* per formare *ATP*.

5.5.3.1.2 Fosforilazione ossidativa Nella fosforilazione ossidativa l'energia derivata da reazioni redox dalla respirazione cellulare viene utilizzata per aggiungere un fosfato inorganico P_i a *ADP*.

5.5.3.1.3 Fotofosforilazione Nella fotofosforilazione l'energia luminosa viene utilizzata per fosforilare *ADP* con fosfato inorganico.

5.6 Catabolismo dei carboidrati

Il glucosio ed altri zuccheri vengono catabolizzati dai microrganismi tramite due processi:

- Respirazione cellulare: completa demolizione del glucosio per formare anidride carbonica ed acqua;
- Fermentazione: produce molecole organiche di scarto.

Entrambi i processi iniziano con la glicolisi nel quale ogni molecola viene catabolizzata in due molecole di piruvato con la produzione netta di 2 molecole di *ATP*. La respirazione cellulare, poi,

prosegue con il ciclo di Krebs e la catena di trasporto elettronico con sostanziale produzione di *ATP*. La fermentazione invece converte l'acido piruvico in altre molecole organiche senza produzione di *ATP*. Nello stesso organismo è possibile utilizzare sia la respirazione cellulare che la fermentazione.

5.6.1 Glicolisi

La glicolisi, anche detta Via di Embden-Meyerhof-Parnas, è il primo passo per la metabolizzazione del glucosio. Questo processo scinde il glucosio (6 Carboni) in piruvato (3 Carboni).

5.6.1.1 Descrizione

La glicolisi si divide in tre parti fondamentali, per un totale di 10 reazioni enzimatiche.

1. Investimento energetico (1-3);
2. Rottura della molecola (4-5);
3. Conservazione dell'energia (6-10).

5.6.1.2 Prodotti

Nella glicolisi vengono formati 4 *ATP* e consumati 2 *ATP*, per un bilancio netto di 2 *ATP*. Due molecole di NAD^+ , invece, vengono ridotte a *NADH*.

5.6.1.3 Processo

I passaggi della glicolisi sono:

1. Fosforilazione del glucosio ($ATP \rightarrow ADP$) per formare *glucosio-6-fosfato*. L'enzima utilizzato è l'esochinasi.
2. Fosforilazione ($ATP \rightarrow ADP$). L'enzima utilizzato è l'isomerasi.
3. Isomerizzazione per formare fruttosio *1,6-bisfosfato*. L'enzima utilizzato è il fosfofruttachinasi.
4. Il fruttosio *1,6-bisfosfato* viene tagliato per formare *gliceraldeide 3-fosfato G3P* e *dihidrossiacetone fosfato DHAP*. Sono delle molecole con 3 Carboni. L'enzima utilizzato è l'aldolasi.
5. Il *DHAP* viene isomerizzato a *G3P*, grazie all'enzima triosofosfato isomerasi.
6. Dopo l'aggiunta di 2 fosfati c'è la formazione di 2 *NADH* da 2 NAD^+ . Si forma il *1,3-difosfoglicerico*. L'enzima impiegato è il *G3P deidrogenasi*.
7. Formazione di 2 *ATP* da 2 *ADP*.
- 8-9. Rilascio di 2 molecole di H_2O e isomerizzazione con conseguente produzione di *fosfoenolpiruvato PEP*.
10. Viene tolto l'ultimo fosfato dalle 2 *PEP* per formare 2 *ATP* e formazione di 2 piruvati. In questo step avviene un passaggio diretto di un fosfato dal *PEP* a una molecola di *ADP*. Questo è mediato da un enzima, con attaccato Mg^{2+} . Il complesso è quindi un coenzima.

5.6.2 Respirazione cellulare

Durante il processo della respirazione cellulare è prevista la degradazione completa della molecola, in seguito ad una serie di reazioni redox.

5.6.2.1 Fasi della respirazione cellulare

5.6.2.1.1 Sintesi acetilCoA L'enzima decarbossilasi rimuove un atomo di carbonio dall'acido piruvato sotto forma di CO_2 , poi media l'attacco con l'acetato al *coenzima-A* con un legame ad alta energia. In questo ultimo processo una molecola di NAD^+ è ridotta a $NADH$.

5.6.2.1.2 Ciclo di Krebs Il ciclo di Krebs o ciclo dell'acido citrico è composto da 8 reazioni enzimatiche che trasferiscono l'energia contenuta nei legami dell'*acetyl-CoA* ai coenzimi NAD e FAD , riducendoli.

5.6.2.1.2.1 Fasi del ciclo di Krebs Si può dividere nei seguenti passaggi:

1. *Acetyl-CoA* entra nel ciclo unendosi all'*acido ossaloacetico* per formare *acido citrico*.
- 2-4. due ossidazioni e decarbossilazioni e l'aggiunta di *CoA* formano il *succinyl-CoA*.
5. Fosforilazione a livello di substrato, rilascio di *CoA* e produzione di *ATP*.
- 6-8. Ulteriori ossidazioni rigenerano l'*acido ossaloacetico*. All'ultimo passaggio viene ridotto NAD^+ in $NADH$.

5.6.2.1.2.2 Generazione di energia Durante il passaggio 5, una piccola parte dell'energia del processo viene stoccata in 1 molecola di *ATP* grazie alla fosforilazione. Il *GTP* viene utilizzato come prodotto intermedio. La maggior parte dell'energia viene conservata sotto forma di elettroni in reazioni redox, nei trasportatori di elettroni $NADH$ (step 3, 4, 8) e $FADH$ (step 6). L'energia di questi elettroni servirà a valle per produrre *ATP*. Vengono inoltre prodotte anche 3 molecole di CO_2 .

5.6.2.1.2.3 Ruolo biosintetico Il ciclo di Krebs, come la glicolisi, ha anche un ruolo biosintetico: molti dei suoi intermedi possono essere usati come precursori per la costruzione di altre molecole come amminoacidi o *anelli porfirinici* dei *citocromi*.

5.6.2.1.3 Catena di trasporto degli elettroni La catena di trasporto degli elettroni è la fase in cui viene prodotta la maggior parte di *ATP*. Il processo avviene indirettamente: il movimento degli elettroni genera un gradiente che viene utilizzato per fosforilare *ADP*.

5.6.2.1.3.1 Composizione La catena di trasporto elettronico consiste in una serie di molecole associate alla membrana che a turno ricevono e cedono elettroni. Alla fine si trova un accettore finale di elettroni. Molecole carrier:

- *Flavoproteine*: proteine integrali di membrana che contengono il coenzima *flavina*, molecola derivata dalla vitamina B_2 . La *flavina mononucleotide (FMN)* è l'accettrice iniziale di elettroni. Accettano $2H^+$ e 2 elettroni, ma donano soltanto elettroni. Come tutti gli altri componenti della catena alternano tra stato ridotto e ossidato;
- Proteine ferro-zolfo: sono un gruppo di proteine di membrana che contengono ioni metallici (Fe e S) i quali si ossidano e riducono durante il passaggio di elettroni. Come i citocromi trasportano solamente elettroni. Il ferro è legato a cisteine. Possono alternare tra stato ridotto e ossidato.
- *Ubichinone*: carrier non proteici derivati dalla vitamina K . Sono altamente idrofobici e vengono chiamati *Coenzima Q*.

Accettano $2H^+$ e 2 elettroni.

- **Citocromi:** proteine integrali di membrana che legano un gruppo *eme*, formato da un *anello porfirinico* e un atomo di ferro. Il ferro alterna tra stato ridotto e ossidato: $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$. Il citocromo *c* serve da

intermedio fra il citocromo *bc* e il *aa*. Subiscono delle ossidazioni e riduzioni mediante la perdita o l'acquisto di un singolo elettrone da parte del ferro. Sono diversificati e possono formare complessi fra loro, come il citocromo bc_1 .

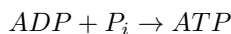
5.6.2.1.3.2 Utilizzo dell'energia L'energia prodotta viene utilizzata per pompare elettroni attraverso la membrana, creando la forza proton-motrice. Mentre gli elettroni si spostano lungo la catena il livello dell'energia si abbassa e vengono pompate ioni H^+ all'esterno. Gli ioni utilizzati derivano dai trasportatori *NADH* e *FADH* o dall'idrolisi dell'acqua nei citocromi. I protoni poi, passando attraverso *ATP sintasi* permettono la generazione di *ATP*. Ogni 2 H^+ viene, approssimativamente, generato un *ATP*.

5.6.2.1.3.3 Accettore finale Alla fine gli elettroni vengono accettati dall'ossigeno. La reazione tra elettroni, ossigeno e H^+ forma l'acqua. Questa funzione determina l'importanza dell'ossigeno per un organismo.

5.6.2.1.3.4 ATPsintasi L'ATPsintasi o ATPasi è un grande complesso enzimatico di membrana che serve da catalizzatore per la conversione della forza proton-motrice in *ATP*. È composto da due domini principali:

- Una testa con subunità multiple F_1 collocata nella faccia citoplasmatica della membrana.
- Un canale conduttore di protoni F_0 che attraversa la membrana.

Il complesso F_1/F_0 catalizza la reazione:



Il dominio F_0 è composto da due subunità principali:

- *a*: il canale attraverso il quale passano gli ioni H^+ , provoca il movimento delle subunità *c*.
- *c*: il rotore composto da 12 – 15 subunità singole. La sua torsione che provoca dei movimenti e dei cambiamenti conformazionali che permettono di generare *ATP*.

Il dominio F_1 è composto da sei subunità principali:

- ϵ e γ : connettono il rotore alla parte più massiccia di F_1 . La torsione della subunità *c* genera la rotazione accoppiata dalle due subunità;
 - α : con funzione strutturale. Sono 3.
 - β : con ruolo di sintesi, si trovano alternate alla subunità α . Sono 3. Si alterano in tre conformazioni:
 - Vuota.
 - Con $ADP+P$.
 - Con *ATP*.
- In ogni momento ogni subunità ha una conformazione diversa. *ATP* viene generato

5.6. CATABOLISMO DEI CARBOIDRATI

quando la subunità lo rilascia e torna vuota.

- Subunità b_2 e δ : connettono le subunità α e

β impedendo la rotazione di F_1 impartendo stabilità.

L'*ATPasi* può funzionare anche al contrario: idrolizza *ATP* per pompare all'esterno H^+ .

5.6.3 Bilancio globale

Processo	Elementi consumati	Elementi prodotti
Glicolisi	Glucosio, NAD^+ , $2ATP$	2 piruvato, 4 ATP , 2 $NADH$
Ciclo di Krebs	Piruvato, 4 NAD^+ , FAD	4 $NADH$, 1 $FADH$, 1 GTP , 3 CO_2

Durante la glicolisi inoltre essendo che ogni $NADH$ genera 3 ATP , vengono prodotti 2 ATP dalla fosforilazione a livello del substrato e 6 dalla respirazione cellulare del $NADH$. Durante il ciclo di Krebs inoltre essendo che ogni $FADH$ genera 2 ATP , vengono prodotti 1 ATP dalla fosforilazione a livello di substrato e 14 ATP dalla respirazione dei 4 $NADH$ e del $FADH$. Essendo che per ogni circolo entrano 2 molecole di piruvato si ottengono in totale 30 ATP . In totale:

1 molecola di glucosio	38 ATP
------------------------	----------

5.6.4 Le alternative cataboliche

I microrganismi anaerobi non utilizzano l'ossigeno come accettore finale di elettroni.

5.6.4.1 Alternative all'ossigeno

- $SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$.
- $CO_3^- \rightarrow CH_4$.
- $NO_3^- \rightarrow \{N_2, N_2\}$.

Si nota come questi accettori possiedono un E_0 meno positivo e pertanto il processo è meno efficiente.

5.6.4.2 Anaerobi e aerobi facoltativi

Anaerobi e aerobi facoltativi sono in grado di utilizzare sia ossigeno che altre sostanze come accettore finale di elettroni.

5.6.4.3 Organismi che non utilizzano ossigeno come accettore finale di elettroni

La diversità metabolica tra respirazione e fotosintesi si trova nei metodi di generazione della fotosintesi.

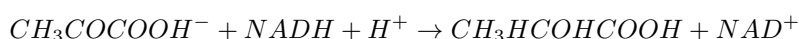
5.6.4.3.1 Chemiolitotrofia La chemiolitotrofia prevede l'utilizzo di sostanze inorganiche come donatori di elettroni (FAD o NAD). I chemioorganotrofi usano come unica fonte il carbonio per produrre energia e composti organici.

5.6.4.3.2 Fotoautotrofia La fotoautotrofia utilizza come fonte di energia la luce, mentre ATP viene generato tramite il processo di fosforilazione. I fotoautotrofi assimilano CO_2 come fonte di carbonio, mentre i fotoeterotrofi composti inorganici. Esiste una fotosintesi ossigenica che nei cianobatteri produce CO_2 e anossigenica.

5.6.4.4 La fermentazione

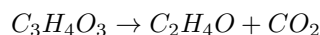
È una via metabolica alternativa in caso di mancanza di un accettore finale di elettroni nel processo di respirazione cellulare. Se manca un accettore finale di elettroni tutta la via respiratoria si blocca. La fosforilazione avviene solamente a livello del substrato e dipende unicamente dalla forza proton-motrice. Essendo che glicolisi e ciclo di Krebs richiedono NAD^+ non possono produrre ATP . Permette la produzione di ATP durante il ciclo di Krebs. Nonostante sia meno efficiente della respirazione cellulare, permette di produrre ATP senza un accettore di elettroni. Consiste nella parziale ossidazione di zuccheri o metaboliti per la produzione di energia utilizzando una molecola organica come accettore di elettroni. Ossidano $NADH$ riducendo molecole organiche endogene.

5.6.4.4.1 Fermentazione lattica Nel processo della fermentazione lattica due atomi di idrogeno vengono trasferiti sul carbonio in posizione 2 dell'acido piruvico, producendo l'acido lattico.

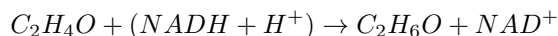


È un processo che viene attuato da alcuni batteri, come i lattobacilli, e dalle cellule del corpo umano in condizioni di anaerobiosi, come i muscoli.

5.6.4.4.2 Fermentazione alcolica Nella prima reazione l'acido piruvico forma acetaldeide e anidride carbonica:



Nella seconda reazione l'acetaldeide con $NADH$ e H^+ produce l'alcol etilico e NAD^+ .



5.6.4.4.3 Prodotti della glicolisi Dalla fermentazione del glucosio si possono avere vari prodotti. La glicolisi produce piruvato, che può essere convertito ad acido lattico attraverso la fermentazione lattica o etanolo attraverso la fermentazione alcolica. La fermentazione acido-mista produce una miscela di etanolo, acido lattico, succinico, formico e acetico.

5.6.4.4.4 Prodotti alimentari o industriali derivati da processi di fermentazione

5.6.4.4.4.1 Pane Durante la panificazione il lievito fermenta gli oligosaccaridi che si staccano dall'amido durante la fase di impasto e di riposo della massa in lavorazione. I prodotti della fermentazione alcolica (alcol etilico ed anidride carbonica) passano in fase gassosa formando le caratteristiche bolle durante la lievitazione e la cottura.

5.6.4.4.4.2 Vino Il vino viene prodotto a partire da soluzioni zuccherine ottenute dallo schiacciamento del grappolo d'uva lasciate a fermentare con i lieviti del genere *Saccharomyces* presenti sulla buccia dell'acino o provenienti da colture selezionate. A seconda delle condizioni di fermentazione, si differenziano le qualità organolettiche (colore, sapori, aromi) del vino.

5.6.4.4.4.3 Birra La birra si ottiene per l'azione di lieviti su un mosto contenente malto di orzo e quantità variabili di altri cereali. La lavorazione è tale da conservare nel prodotto anche l'anidride carbonica.

5.6.4.4.4 Yogurt Lo yogurt è il risultato della fermentazione lattica operata da ceppi selezionati di lattobacilli sul latte. L'abbassamento del pH dovuto all'accumulo dell'acido lattico determina la denaturazione della caseina che coagula conferendo al prodotto la caratteristica consistenza.

5.7 Altre vie cataboliche

Lipidi e proteine contengono una grande quantità di energia nei loro legami. Perché questa energia venga utilizzata dalla cellula, essi devono essere scomposti nei loro monomeri e entrare come substrati nella glicolisi e nel ciclo di Krebs.

5.7.1 Lipidi

I lipidi più utilizzati per la produzione di ATP sono i grassi composti da glicerolo e code di acidi grassi. Lipasi idrolizzano i lipidi producendo glicerolo e tre catene di acidi grassi. Il glicerolo viene convertito in $DHAP$ che integra la via metabolica della glicolisi.

5.7.1.1 β -ossidazione

Gli acidi grassi sono degradati in un processo chiamato β -ossidazione. Durante questo processo degli enzimi tagliano ripetutamente 2 carboni idrogenati nelle code di acidi grassi, e li uniscono ad una molecola di coenzima. Vengono prodotte così delle molecole di acetyl-CoA, che possono entrare all'interno del ciclo di Krebs. Il processo prosegue finché tutti gli acidi grassi non vengono convertiti in acetyl-CoA. Vengono generate delle grandi quantità di trasportatori di elettroni $NADH$ e $FADH_2$, usate per la catena di trasporto degli elettroni.

5.7.2 Proteine

Alcuni microbi catabolizzano **proteine** come un importante fonte di energia. La maggior parte delle cellule le catabolizza solo quando non ci sono a disposizione fonti di carbonio come il glucosio. Dato che le proteine sono troppo grosse per superare la membrana plasmatica, procarioti iniziano a catabolizzarle all'esterno. Gli enzimi proteasi degradano le proteine in amminoacidi idrolizzando i legami peptidici. Vengono quindi portati all'interno della cellula e subiscono modificazioni chimiche (deaminazione). La molecola risultante può entrare nel ciclo di Krebs.

5.8 La fotosintesi

Gli organismi fotosintetici catturano l'energia luminosa e l'utilizzano per la sintesi di carboidrati a partire da CO_2 e H_2O . I cianobatteri sono stati i primi organismi fotosintetici. Ora anche molte alghe, batteri verdi solfurei e non, piante e alcuni protozoi fanno parte di questo gruppo. Essi riescono a catturare l'energia della luce solare grazie a delle piccole molecole, la più importante delle quali è la clorofilla.

5.8.1 Classificazione degli organismi

5.8.1.1 Fotoautotrofi

I fotoautotrofi assimilano CO_2 come fonte di carbonio.

5.8.1.2 Fotoeterotrofi

I fotoeterotrofi utilizzano composti organici come fonte di carbonio.

5.8.2 Tipi di fotosintesi

5.8.2.1 Fotosintesi ossigenica

Nella fotosintesi ossigenica si produce ossigeno come materiale di scarto.

5.8.2.2 Fotosintesi anossigenica

Nella fotosintesi anossigenica non viene utilizzata acqua e non viene prodotto scarto.

5.8.3 Clorofilla

La clorofilla è un pigmento, una molecola organica formata da una coda idrocarburica idrofobica attaccata a un centro che assorbe luce composto anche da uno ione Mg^{2+} . La clorofilla assomiglia ai citocromi, ma al posto del magnesio contengono il ferro al centro dell'anello. Si nota una serie di legami con una delocalizzazione di elettroni. La coda si trova inserita nella membrana cellulare, mentre il sito attivo al di sopra.

5.8.3.1 Tipi di clorofilla

- Clorofille che si trovano nelle piante, nelle alghe e nei cianobatteri;
- Batterioclorofille che si trovano nei batteri verdi e porpora, e negli eliobatteri.

Le clorofille si differenziano per la lunghezza d'onda a cui assorbono. Questa determina anche diversi habitat di insediamento per gli organismi.

5.8.3.2 Sito di fotosintesi

La fotosintesi avviene nella membrana citoplasmatica ricca di clorofille raggruppate in tilacoidi. Quando la luce colpisce i fotosistemi le molecole di clorofilla attivano elettroni che si muovono fino ad arrivare al reaction center.

5.8.3.3 Ritorno allo stato iniziale

La clorofilla, dopo che è stata eccitata torna allo stato iniziale per:

- Decadimento per cessione di luce e calore.
- Decadimento per risonanza di trasferimento di energia: passaggio dell'energia alla molecola adiacente.
- Un elettrone passa da una molecola all'altra attraverso riduzione dell'accettore ed ossidazione del donatore.

5.8.4 Fotosistemi

I fotosistemi sono formati dalle proteine di membrana e dalle clorofille. I tilacoidi dei fotosistemi dei procarioti sono invaginazioni della membrana citoplasmatica. Le invaginazioni permettono una massimizzazione della superficie della membrana dove può avvenire la fotosintesi.

5.8.4.1 Tipologie di fotosistemi

5.8.4.1.1 Fotosistemi *PSI* I fotosistemi *PSI* svolgono le reazioni dipendenti dalla luce.

5.8.4.1.2 Fotosistemi *PSII* I fotosistemi *PSII* svolgono le reazioni indipendenti dalla luce.

5.8.4.2 Funzione dei fotosistemi

I fotosistemi assorbono la luce solare e conservano l'energia in molecole di *ATP* e *NADH* grazie a reazioni redox. Nelle reazioni indipendenti dalla luce viene sintetizzato il glucosio a partire da *CO*₂ e *H*₂*O*.

5.8.5 Reazioni dipendenti dalla luce

Nei fotosistemi dipendenti dalla luce le centinaia di clorofille in essi si passano l'energia da uno all'altro grazie all'eccitamento degli elettroni provocato dalla luce. I pigmenti del fotosistema assorbono l'energia della luce e la trasferiscono a molecole adiacenti per indirizzarla presso una molecola di clorofilla detta centro di reazione.

5.8.5.1 Fotofosforilazione ciclica

La fosforilazione ciclica avviene in tutti gli organismi fotosintetici. Gli elettroni vengono eccitati nel fotosistema, passano dal centro di reazione a una molecola di *Fe*, e da qui vanno ai citocromi. In questi il livello di energia scende e questo permette il passaggio degli ioni *H*⁺ contro gradiente. Gli elettroni che non sono più eccitati, tornano al fotosistema *I* che funge da accettore finale di elettroni e il ciclo ricomincia. Il gradiente di protoni creato viene utilizzato per la sintesi di *ATP*.

5.8.5.2 Fotofosforilazione non ciclica

Questo tipo di fosforilazione è utilizzata da alcuni batteri fotosintetici e da tutte le piante, alghe e protisti fotosintetici. Richiede l'utilizzo di due fotosistemi, *PSI* e *PSII*. Produce *ATP* e potere riducente sotto forma di *NADPH*. Gli elettroni vengono eccitati nel *PSII*, trasmessi in sequenza ad accettori di elettroni ed ulteriormente energizzati nel *PSI*. L'accettore finale di elettroni è il *NADP*⁺ che viene ridotto *NADPH* e viene ulteriormente utilizzato nelle reazioni luce-dipendenti. Il *PSII* deve essere continuamente rifornito di elettroni; nella fotosintesi ossigenica essi provengono dalla dissociazione di *H*₂*O*. Questa reazione produce 2 elettroni, 2 protoni ed ossigeno molecolare *O*₂ come prodotto di scarto. Nella fotosintesi anossigenica i batteri ottengono elettroni da altri donatori inorganici come *H*₂*S*.

5.8.6 Reazioni non dipendenti dalla luce

Questi sistemi utilizzano *ATP* ed *NADPH* prodotti dalle reazioni luce-dipendenti. La loro funzione principale è la fissazione del carbonio e la formazione di molecole di glucosio. Tutto questo avviene durante il ciclo di Calvin-Benson.

5.8.6.1 Ciclo di Calvin-Benson

Il ciclo di Calvin-Benson si compone di tre fasi principali.

5.8.6.1.1 Fissazione Durante la fissazione 3 molecole di CO_2 legano 3 molecole di $RuBP$ a 15 atomi di C , che vengono scisse per formare 6 molecole di *acido fosfoglicerico* a 18 atomi di C .

5.8.6.1.2 Riduzione Durante la riduzione 6 molecole di $NADH$ riducono 6 molecole di *acido fosfoglicerico* per formare 6 molecole di $G3P$. Questa fase consuma 6 molecole di ATP .

5.8.6.1.3 Rigenerazione di $RuBP$ Durante la rigenerazione di $RuBP$ 3 molecole di $RuBP$ vengono prodotte da 5 molecole di $G3P$. La molecola di $G3P$ rimanente è utilizzata per sintetizzare glucosio attraverso una serie di reazioni inverse a quelle della glicolisi.

5.8.6.1.4 Prodotti Due giri di ciclo producono 2 molecole di $G3P$. Queste vengono polimerizzate e defosforilate per produrre glucosio.

5.8.7 Confronto con respirazione aerobica

La fotosintesi processa gli elettroni in una direzione opposta rispetto alla respirazione aerobica. Gli elettroni vengono donati dall'acqua per produrre ossigeno, e ceduti (tramite $NADPH$) all'anidride carbonica per sintetizzare glucosio.

Processo	Consumo	Produzione
Fotosintesi ossigenica	H_2O, CO_2	Glucosio, O_2
Respirazione aerobica	Glucosio, O_2	H_2O, CO_2

Capitolo 6

Genetica batterica

6.1 Introduzione

La genetica batterica tratta:

- Mutazioni;
- Ricombinazione genetica;
- Scambio di materiale genetico;
- Clonaggio genico.

6.1.1 Dogma centrale della biologia

$$DNA \rightarrow RNA \rightarrow proteine$$

Il dogma centrale della biologia enuncia che: il DNA esprime le informazione racchiuse nei geni attraverso la trascrizione in mRNA. Il mRNA è composto da codoni, triplette di nucleotidi che codificano le proteine sintetizzate durante la traduzione. Nei procarioti traduzione e trascrizione sono meccanismi semplici non compartimentati che avvengono quasi simultaneamente. Negli eucarioti il processo è complesso: nei geni sono presenti zone non codificanti, gli introni che devono venire eliminate tramite splicing. Questa e altre modifiche nucleari producono un mRNA maturo in grado di spostarsi nel citoplasma per essere tradotto. Negli eucarioti pertanto i processi sono compartimentati e separati temporalmente. Inoltre gli mRNA dei procarioti sono policistronici: portano l'informazione per più geni.

6.2 Mutazioni

La mutazione è un cambiamento ereditabile nella sequenza delle basi nucleotidiche del genoma. Un ceppo che porta un cambiamento viene detto mutante, mentre quello non mutato viene detto selvatico o wild type.

6.2.1 Fenotipo

Le proprietà osservabili del mutante rappresentano il suo fenotipo. Viene indicato da tre lettere con un apice più o meno, che indica la presenza o meno di una certa proprietà. Per esempio *HisC*⁻ indica un ceppo che non è in grado di produrre istidina.

6.2.2 Genotipo

Il genotipo viene indicato con tre lettere minuscole seguite da una lettera maiuscola, tutte in corsivo. Per esempio il gene *hisC* di *E. coli* codifica una proteina denominata *HisC*, coinvolta nella sintesi dell'aminoacido istidina. Le mutazioni del gene *hisC* sono indicate come *hisC1*, *hisC2* e via dicendo.

6.2.3 Le basi molecolari delle mutazioni

6.2.3.1 Codice genetico degenerato

Si nota come ci sono più codoni (64) rispetto ad aminoacidi (20) da sintetizzare. Questo permette alla cellula un sistema di sicurezza contro le mutazioni, permettendo quelle silenti. Tipicamente è la terza base del codone la più flessibile: codoni codificanti per un particolare aminoacido presentano le prime due conservate e la terza variabile. Si notano in particolare i codoni *UAA*, *UAG* e *UGA* di stop e *AUG* di inizio. Si noti inoltre come non tutti gli aminoacidi sono critici per il funzionamento di una proteina, pertanto non tutte le mutazioni causano gravi danni ad essa. Gli aminoacidi critici si trovano tipicamente nel sito attivo o sono coinvolti nella determinazione della struttura.

6.2.3.2 Mutazione puntiforme

Si dice mutazione puntiforme la sostituzione di una coppia di basi. L'errore viene poi trascritto nel mRNA e nella proteina. Se questo errore avviene in una regione codificante la mutazione risulta nell'alterazione della sequenza degli aminoacidi.

- Mutazioni missenso: viene alterata la sequenza della proteina.
- Mutazioni nonsense: si forma un codone di stop prematuro e una proteina tronca.
- Mutazioni silenti: mutazioni di una singola base possono non causare cambi nella sequenza. Avvengono tipicamente nella terza base del codone.

6.2.3.3 Mutazioni frameshift

Nello scivolamento dello schema di lettura o mutazioni frameshift perdite o integrazioni di basi portano a uno scivolamento del frame e a una modifica dell'intera sequenza della proteina. Porta spesso alla sintesi di proteine non funzionanti, ma in caso di inserimento o delezione di sequenze lunghe 3nt o suoi multipli vengono unicamente acquisiti o persi aminoacidi.

6.2.4 Retromutazioni o reversioni

Le mutazioni puntiformi sono generalmente reversibili attraverso le reversioni. Un revertante viene definito come un ceppo in cui il fenotipo selvatico, che era stato perso nel mutante, viene ripristinato.

6.2.4.1 Revertanti dello stesso tipo

Nei revertanti dello stesso tipo la mutazione che ripristina l'attività si verifica nel medesimo sito in cui è avvenuta la mutazione originale.

6.2.4.2 Revertanti di secondo sito

Nei revertanti di secondo sito la mutazione avviene in un sito diverso del DNA. Queste mutazioni, dette soppressive, compensano l'effetto della mutazione originale ripristinando il fenotipo selvatico. Possono essere:

- Mutazioni nello stesso gene che ristabiliscono il frameshift originale;
- Mutazioni in altri geni che possono ripristinare la funzione del gene originale
- Mutazioni in altri geni che determinano la produzione di un enzima che può sostituire quello mutante.

6.2.5 Frequenza di mutazione

Gli errori nella replicazione del DNA ricorrono con una frequenza di circa 10^{-7} - 10^{-11} per coppia di basi durante un ciclo di replicazione. In quanto un gene tipo possiede circa 1000 paia di basi, la frequenza degli errori in esso è di 10^{-4} - 10^{-8} per generazione. Si nota pertanto come in una coltura batterica, avente circa $10^8 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$ esiste la probabilità che in ciascun ml di coltura, per un dato gene, ci sia almeno un mutante. Non tutte le mutazioni hanno la stessa probabilità di avvenire: si trovano nell'ordine *nonsense* < *silenti* < *missense*

6.2.5.1 Esempio

Si prenda in considerazione un codone *GGG* che codifica per la glicina. Le possibili mutazioni sono:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| • <i>GGU</i> : <i>Gly</i> (silent); | • <i>GUG</i> : <i>Val</i> (missense); | • <i>UGG</i> : <i>Trp</i> (missense); |
| • <i>GGC</i> : <i>Gly</i> (silent); | • <i>GCG</i> : <i>Ala</i> (missense); | • <i>CGG</i> : <i>Arg</i> (missense); |
| • <i>GGA</i> : <i>Gly</i> (silent); | • <i>GAG</i> : <i>Glu</i> (missense); | • <i>AGG</i> : <i>Arg</i> (missense). |

Se a cambiare è solo l'ultimo nucleotide di un codone otteniamo una mutazione silente. Se cambia il primo o il secondo nucleotide sicuramente abbiamo una mutazione missense. Le mutazioni nonsense avvengono per un raro caso di coincidenza.

6.2.6 Mutagenesi

La frequenza di mutazione può essere aumentata da vari agenti chimici, fisici o biologici.

6.2.6.1 Mutageni chimici

I mutageni chimici portano ad analoghi delle basi nucleotidiche. Questi sono simili nella struttura alle basi del DNA ma si dimostrano difettosi nell'appaiamento. Aumentano con gli errori nella replicazione del DNA con l'incorporazione di una base sbagliata nell'elica di DNA completa. Due esempi di analoghi dei nucleotidi che causano sostituzioni da *AT* e *GC* sono:

- *5-Bromouracil* si associa con *G* anziché *A*;
- *2-Aminopurine* si associa con *C* anziché *T*.

Per esempio la timina e il suo analogo *bU*: l'inserimento di *bU* al posto di *T* causa una prima mutazione (*G* anziché *A*) dopo il primo ciclo replicativo. Dopo il secondo ciclo replicativo avviene la sostituzione completa di un paio di basi *AT* in *GC*.

6.2.6.1.1 Tipologie di mutageni chimici

6.2.6.1.1.1 Agenti alchilanti Gli agenti alchilanti interagiscono con il DNA, creando legami crociati tra le sue eliche. Sono in grado di indurre cambiamenti anche in assenza di replicazione.

6.2.6.1.1.2 Agenti intecalanti Gli agenti intercalanti si inseriscono tra due coppie di basi del DNA separandole. Portano a microinserzioni o microdelezioni inducendo mutazioni frameshift. Un esempio di agente intercalante o frameshift mutagen è l'acridina, che si inserisce nella doppia elica del DNA, causando inserimento o delezione di un nucleotide da parte della DNA polimerasi. Queste sostanze vengono chiamate anche teratogene o cancerogene.

6.2.6.2 Agenti fisici

Le mutazioni possono essere indotte anche da agenti fisici come le radiazioni.

6.2.6.2.1 Radiazioni

6.2.6.2.1.1 Raggi UV I raggi UV inducono la formazione di dimeri di pirimidine (*C* o *T*), uno strato in cui le basi vengono legate covalentemente durante la replicazione del DNA. Questo legame impedisce la formazione di legami idrogeno con le basi del filamento complementare, aumentando la probabilità che la DNA polimerasi inserisca un nucleotide sbagliato.

6.2.6.2.1.2 Radiazioni ionizzanti Le radiazioni ionizzanti causano effetti mutageni indiretti tramite ionizzazione dell'acqua e formazione del radicale libero OH^\cdot , creando stress ossidativo in grado di danneggiare le molecole di DNA.

6.3 Isolamento dei mutanti

6.3.1 Mutazioni selezionabili

Si dice mutazione selezionabile un tipo di mutazione che permette l'isolamento del ceppo mutante in laboratorio. Le mutazioni non selezionabili possono comunque portare a un profondo cambiamento del fenotipo dell'organismo.

6.3.1.1 Resistenza agli antibiotici

Un esempio di mutazione selezionabile è la resistenza agli antibiotici: un mutante antibiotico può crescere in presenza di una concentrazione di farmaco in grado di inibire il tipo selvatico.

6.3.1.1.1 Isolare un mutante per resistenza agli antibiotici

1. Si consideri una piastra di coltura con tappeto uniforme di batteri.
2. Si posiziona in essa un disco contenente

antibiotico che diffonde radialmente. Più ci si allontana dall'anello, minore è la concentrazione del farmaco.

3. La distanza dal disco in cui si trovano colonie indica il grado di sensibilità di un batterio o la sua resistenza.

6.3. ISOLAMENTO DEI MUTANTI

La selezione è quindi uno strumento estremamente potente che permette l'isolamento di un singolo mutante all'interno di una popolazione.

6.3.2 Isolamento di mutanti nutrizionali per selezione indiretta

6.3.2.1 Replica plating

Con la tecnica di "replica plating" possono essere identificati mutanti nutrizionali direttivi.

6.3.2.1.1 Procedimento

1. Si crea una coltura con diluizione corretta in modo da far crescere colonie individuabili e non sovrapposte su un terreno di coltura ricco.
2. Si ottiene una stampa delle colonie attraverso stampa con velluto sterile dalla piastra madre.
3. Si passano le colonie su piastre mancanti nutrienti specifici.

6.3.2.1.2 Risultati

- L'incapacità di una colonia a crescere sulla piastra replicata la segnala come mutante: non è in grado di sintetizzare il nutriente mancante. Quella colonia si dice auxotrofa per quella richiesta nutrizionale.
- La capacità di una colonia di crescere sulla piastra replicata la segnala come wild type per il nutriente mancante. Si dice pertanto prototrofa per quella richiesta nutrizionale.

6.3.3 Saggi di laboratorio per l'identificazione dei mutageni

6.3.3.1 Identificazioni di mutazione per selezione positiva

Il test di identificazione di mutazione per selezione positiva consiste di prendere una coltura batterica e versarla su una piastra contenente un antibiotico come penicillina. Solo i batteri resistenti ad esso resistono e vengono pertanto eliminati i fenotipi wild-type. Come test di conferma si versa la stessa coltura batterica su piastra senza penicillina e si osserva quante colonie in più crescono.

6.3.3.1.1 Aggiunta di mutageno Dopo il test si aggiunge alla coltura la sostanza che si vuole testare come mutagena. Se la sostanza è mutagena si nota come dopo aver fatto crescere la coltura sulla piastra con penicillina il numero di colonie aumenta: è aumentata la frequenza di mutazione.

6.3.3.1.1.1 Calcolo della frequenza di mutazione

$$\frac{N_{\text{colonie con mutageno}}^o - N_{\text{colonie senza mutageno}}^o}{N_{\text{colonie senza mutageno}}^o} \times 100$$

6.3.3.2 Test di Ames

Il test di Ames utilizza mutanti del genere *Salmonella* con una mutazione puntiforme che impedisce la biosintesi dell'aminoacido istidina (His^-). Se il terreno non presenta istidina, allora la colonia non cresce per mancanza di questo aminoacido. Ad una sospensione di mutanti viene aggiunto estratto di fegato, che simula le condizioni fisiologiche nelle quali gli enzimi epatici possono trasformare sostanze in agenti mutageni. I batteri vengono piastrati su un terreno senza istidina: la comparsa di colonie revertanti (His^+) è indicativa della mutagenicità della sostanza testata. Se i revertanti compaiono sia nella piastra di controllo sia nella piastra di testa, con l'aggiunta della sostanza si ha un netto aumento del numero di revertanti attorno al disco. Questo dimostra la sua azione mutagena. In prossimità della sostanza non sono presenti batteri. Questo accade perché la concentrazione della sostanza mutagena è troppo alta e causa una quantità eccessiva di mutazioni all'interno del batterio che portano alla morte dell'individuo.

6.4 Ricombinazione genetica omologa

Si intende per ricombinazione genetica omologa uno scambio fisico di materiale genetico. Consiste nello scambio genetico tra sequenza omologhe di DNA. Le sequenze omologhe di DNA non sono complementari, ma presentano un alto tasso di identità che permette l'appaiamento.

6.4.1 Processo

6.4.1.1 Taglio

Il processo inizia con un taglio o nick prodotto da una endonucleasi (enzima che taglia il DNA) e che spesso presenta anche un'attività elicasica per srotolare il DNA. A questo taglio si legano le proteina **SSB** + **RecA** che formano un complesso che facilita il riappaiamento con la sequenza complementare del DNA recipiente e avviene la strand invasion. Lo spostamento del filamento residente avviene spontaneamente. Dopo l'appaiamento può avvenire uno scambio di molecole omologhe di DNA, che porta alla formazione di intermedi di ricombinazione. Questi contengono delle regioni eteroduplici (heteroduplex) dove ciascun frammento è originato da cromosomi differenti.

6.4.1.2 Risoluzione

Si intende per risoluzione la liberazione delle molecole dell'ibrido. Può avvenire in due modi.

6.4.1.2.1 Patches Nel metodo patches solo un filamento presenta lo scambio e diventa ibrido.

6.4.1.2.2 Splices Nel metodo splices entrambi i filamenti sono ibridi.

6.4.2 Identificazione dei ricombinanti

Per identificare i ricombinanti vengono utilizzati dei ceppi riceventi che mancano di alcune caratteristiche selezionabili che i ricombinanti dovranno possedere. Per la vera identificazione di un'avvenuta ricombinazione è importante che il tasso di retromutazione per il carattere studiato sia basso dato che oltre ai ricombinanti anche i revertanti potranno formare colonie. Vengono utilizzati spesso doppio mutanti, cioè ceppi che presentano mutazioni diverse, perché è poco probabile che possano avvenire retromutazioni nella stessa cellula.

6.4.2.1 Processo

Viene preso del DNA libero estratto da delle cellule Trp^+ e lo si mette nella stessa provetta della coltura batterica. Una volta che vengono rimesse sulla piastra, solo le cellule che hanno integrato il nuovo estratto sono in grado di crescere e formare delle colonie. Nei procarioti è possibile osservare la ricombinazione genetica quando i frammenti di DNA omologo vengono trasferiti da una cellula donatrice (donor) ad una cellula ricevente (recipient) tramite trasferimento genico orizzontale.

6.4.3 Trasferimento genico orizzontale

6.4.3.1 Trasformazione

Durante la trasformazione il DNA di una cellula viene assimilato da un'altra senza contatto diretto. È un processo mediante il quale una molecola di DNA libero viene incorporata in una cellula ricevente e determina un cambiamento genetico o ricombinazione.

6.4.3.1.1 Scoperta La trasformazione viene osservata da Griffith nel 1928. In questo esperimento viene preso in considerazione il batterio *Streptococcus pneumoniae*, che presenta due ceppi principali:

- *S* smooth patogeno con una capsula polisaccaride esterna.
- *R* rough non patogeno senza capsula e incapace di causare infezione.

6.4.3.1.1.1 Prove sperimentali

1. Il ceppo *S* vivo iniettato nel topo: questo muore e si trovano cellule vive del ceppo *S* nel cuore;
2. Il ceppo *R* vivo iniettato nel topo: questo è sano e non viene trovata nessuna cellula batterica nel cuore;
3. il ceppo *S* inattivato dal calore (lisi): il topo è sano e non viene trovata nessuna cellula batterica nel cuore;
4. Il ceppo *R* vivo insieme al ceppo *S* inattivato dal calore: il topo muore e vengono trovate delle cellule vive del ceppo *S* nel cuore.

6.4.3.1.1.2 Risultati Questo esperimento oltre a mettere in luce il ruolo centrale della capsula batterica, mostra come una cellula batterica è capace di acquisire determinate caratteristiche da un'altra. Questo avviene in quanto il materiale genetico che viene rilasciato nell'ambiente esterno mantiene la capacità di codificare informazioni. La trasformazione può avvenire anche in vitro.

6.4.3.1.2 Lunghezza delle molecole trasformate A causa della sua estrema lunghezza (ad esempio in 1700μm in *Bacillus*) la molecola di DNA si può rompere facilmente. Anche dopo un'estrazione delicata un cromosoma batterico si riduce in frammenti di circa 15kb. Questa dimensione rappresenta un tipico frammento trasformabile.

6.4.3.1.3 Competenza Si dicono competenti le cellule con l'abilità di acquisire DNA dall'ambiente. La competenza è il risultato delle alterazioni degli involucri cellulari (membrane e parete). Alcune cellule presentano competenza naturale, mentre ad altre deve essere indotta.

6.4.3.1.3.1 Competenza indotta La competenza viene indotta attraverso shock elettrici o esposizione a cloruro di calcio in modo da rendere la membrana più permeabile al DNA.

6.4.3.1.4 Trasformazione con DNA plasmidico Il DNA plasmidico è un ottimo vettore di trasformazione in quanto:

- I plasmidi si degradano meno facilmente dei frammenti lineari.
- Non richiedono necessariamente integrazione nel cromosoma batterico tramite ricombinazione omologa;
- possono replicarsi all'interno della cellula ospite.

6.4.3.1.5 Processo

6.4.3.1.5.1 Introduzione nella cellula e ricombinazione Il DNA trasformante (lineare) si lega alla superficie della cellula mediante una proteina legante il DNA. Successivamente può penetrare la membrana o l'intero doppio filamento. In alcuni casi un'endonucleasi degrada un filamento e ne viene acquisito solo uno. Questo si associa a una proteina specifica che lo protegge dalle nucleasi. Il frammento viene integrato nel genoma attraverso ricombinazione omologa non reciproca grazie alla proteina *RecA*. Durante la replicazione del DNA eteroduplice si forma una molecola parentale e una di DNA ricombinante.

6.4.3.1.5.2 Ricombinazione omologa non reciproca Si associano i segmenti omologhi e si apre la doppia elica del DNA del ricevente. Questo permette l'appaiamento con la sequenza omologa sul DNA donatore. L'endonucleasi taglia parte del filamento donatore e crea fratture sull'ospite in cui si posiziona il nuovo DNA. Vengono poi riparati i gap sul filamento. Il DNA ospite è eteroduplice.

6.4.3.1.6 Introduzione del DNA trasformante nella cellula

6.4.3.1.6.1 Gram negativi

- *PilQ*: causa il movimento attraverso la membrana esterna.
- *PilE*: trasferisce il DNA attraverso parete e spazio periplasmatico.
- *ComE*: proteina di legame al DNA.
- *N*: nucleasi che degrada un filamento di DNA.
- *ComA*: canale che consente il passaggio di DNA nel citoplasma.

6.4.3.1.6.2 Gram positivi

- $\text{ComGC} = \text{PilE}$;
- $\text{ComEA} = \text{ComE}$;
- Nucleasi (N);
- $\text{ComEC} = \text{ComA}$;
- *ComFA* è un DNA traslocasi in grado di trasferire il DNA nel citoplasma (nessun analogo nei Gram-).

6.4.3.2 Trasduzione

La trasduzione implica il trasferimento di DNA da una cellula donatrice ad una cellula ricevente tramite un virus. Può avvenire sia in cellule eucariote che in procariote, ed è limitata dalla specificità di infezione del virus stesso.

6.4.3.2.1 Fagi I virus che infettano i batteri vengono chiamati batteriofagi o fagi. I fagi che infettano un batterio possono compiere due cicli.

6.4.3.2.1.1 Struttura I fagi sono composti da una testa o capsida proteica che contiene RNA o DNA. La testa presenta un collo seguito da collare e guaina della coda. All'estremità si trova una piastra basale con attaccata la coda di filamenti proteici.

6.4.3.2.1.2 Ciclo litico

1. Il batteriofago si fissa alla superficie batterica e inietta il suo acido nucleico.
2. Il genoma del virus si chiude ad anello, si replica e sfruttando gli organuli dell'ospite presiede alla sintesi di nuove particelle virali.
3. Le nuove particelle virali si assemblano e formano nuovi virus che degradano la cellula ospite.

6.4.3.2.1.3 Ciclo lisogenico

Il ciclo lisogenico è un evento reversibile

1. Il batteriofago si fissa alla superficie batterica e inietta il suo acido nucleico.
2. Il genoma del virus si chiude ad anello e si integra con quello della cellula ospite. Diventa in questo modo un profago.
3. La cellula ospite si divide mantenendo il genoma virale integrato nel proprio DNA.

6.4.3.2.1.4 Classificazione dei fagi in base al ciclo La capacità di svolgere ciclo litico o lisogenico è caratteristica per una specie di fagi.

- I fagi temperati sono in grado di compiere a seconda delle condizioni uno dei due cicli.
- I fagi virulenti possono compiere solo il ciclo litico e per questo sono immediatamente patogeni.

6.4.3.2.2 Meccanismo della trasduzione

1. Il fago entra in contatto con la cellula ospite, inietta il proprio materiale genetico e devia il metabolismo cellulare verso la sintesi di nuove particelle virali o virioni.
2. Durante l'assemblaggio dei virioni, i frammenti di DNA della cellula ospite possono essere incapsulati e trasferiti a un'altra cellula ospite.

6.4.3.2.3 Trasferimento dei geni Il trasferimento dei geni dell'ospite utilizzando il virus come vettore può avvenire in due modi.

6.4.3.2.3.1 Trasduzione generalizzata Si intende per trasduzione generalizzata un processo in cui qualunque frammento di DNA derivante dal genoma dell'ospite può diventare la componente di DNA dei nuovi virus. Durante il ciclo litico gli enzimi responsabili per l'impacchettamento del DNA virale nella testa del fago impacchettano anche DNA dell'ospite. Queste particelle vengono rilasciate durante la lisi della cellula. Le particelle trasducenti non creano una normale infezione virale e vengono dette pertanto difettive. Questo avviene in quanto i geni batterici hanno sostituito alcuni geni virali indispensabili. Il lisato, formato da particelle e virioni normali viene usato per infettare una popolazione di cellule riceventi. Una parte di esse entrano in contatto con le particelle traducenti e acquisiscono il DNA del precedente batterio ospite. Il DNA di queste particelle non può replicarsi ma può subire una ricombinazione genetica con il DNA del nuovo ospite.

6.4.3.2.3.2 Trasduzione specializzata Si intende per trasduzione specializzata un processo in cui il DNA di una specifica regione cromosomica dell'ospite viene integrato con il genoma del virus. Permette un trasferimento efficiente e garantisce a una piccola regione del cromosoma batterico di venire trasdotta indipendentemente dal resto.

6.4.3.2.3.3 Esempio - trasduzione dei geni del galattosio La trasduzione dei geni del galattosio a opera del fago λ di *E. coli* è un esempio di trasduzione specializzata. La regione in cui λ si integra nel cromosoma è adiacente ai geni che controllano gli enzimi coinvolti nella catabolisi del galattosio. Durante la fase di induzione il DNA del profago viene escisso come un'unità e si riproduce. In casi rari il genoma fagico viene escisso in modo non corretto e alcuni geni del cromosoma batterico sono erroneamente escissi insieme al DNA fagico. Questa particella λ *dgal* è difettiva a causa della perdita dei geni fagici e non può generare fagi maturi in un'infezione successiva. Cellule coinfectate da λ *dgal* e da un fago helper (λ non difettivo) si ottiene un lisato con alcune particelle *dgal* e un gran numero di virioni normali. Se una coltura batterica auxotrofa per galattosio *Gal*⁻ viene infettata con il lisato misto si possono selezionare i batteri trasducenti *Gal*⁺. Inducendo i doppi lisogeni con λ *dgal* e fago helper si ottiene un lisato ricco di fagi *dgal* in modo da trasdurre con alta efficienza.

6.4.3.3 Coniugazione

La coniugazione è il principale meccanismo di trasferimento dei plasmidi da cellula a cellula. Questa funzione viene codificata dagli stessi plasmidi. Si tratta di un processo replicativo alla fine del quale entrambe le cellule conterranno una copia del plasmide. La trasmissibilità mediante coniugazione viene controllata da una serie di geni localizzati nella regione *tra* del plasmide. Alcuni plasmidi hanno la capacità di trasferirsi tra organismi molto diversi fra loro: tra gram-negativi e gram-positivi, tra batteri e cellule vegetali, tra batteri e funghi.

6.4.3.3.1 I plasmidi I plasmidi sono degli elementi genetici, solitamente di forma circolare, in grado di replicarsi indipendentemente dal cromosoma dell'ospite. Contengono geni non essenziali, ma che in certe condizioni possono diventare utili alla vita dell'ospite. La loro dimensione varia da 1Kb a 1Mb e sono presenti da 1 ad oltre 100 copie in una cellula ospite. Sono conosciuti migliaia di tipi differenti e sono presenti oltre 300 tipi in *E. coli*. Gli enzimi che vengono coinvolti nella replicazione dei plasmidi sono gli stessi utilizzati per la replicazione del genoma della cellula ospite.

6.4.3.3.1.1 Incompatibilità Due plasmidi incompatibili non possono essere mantenuti assieme nella cellula ospite in quanto competono l'un l'altro per l'inizio della replicazione. Si possono formare gruppi di incompatibilità: plasmidi appartenenti a un gruppo condividono un meccanismo

comune di regolazione della replicazione e sono correlati. Una coltura batterica può contenere diversi tipi di plasmidi se questi non sono geneticamente correlati: appartengono a diversi gruppi di incompatibilità.

6.4.3.3.1.2 Plasmidi episomi I plasmidi episomi sono in grado di integrarsi nel cromosoma. Quando lo fanno la loro replicazione procede sotto il controllo del cromosoma stesso.

6.4.3.3.1.3 Curing Si dice curing la perdita di un plasmide da parte di una cellula. Può avvenire spontaneamente in popolazioni in cui non vi è pressione selettiva per il mantenimento del plasmide.

6.4.3.3.2 Dimostrazione della coniugazione batterica Per dimostrare che avviene coniugazione batterica due ceppi con doppia o tripla auxotrofia vengono mescolati. Se avviene crescita su terreno minimo questo indica eventi di ricombinazione tra i 2 cromosomi batterici. Questo esperimento non dà alcuna informazione sulla direzione del trasferimento del materiale genetico.

6.4.3.3.2.1 Esperimento del tubo a U L'esperimento del tubo a *U* dimostra che la ricombinazione genetica nel processo di coniugazione avviene per contatto diretto tra cellule batteriche. Si prende un tubo di coltura e a una sua estremità viene collegata una pompa per far circolare il terreno di coltura liquido. Nel mezzo si pone un filtro di vetro poroso che consente il passaggio dei nutrienti ma non delle cellule batteriche. Entrambe le popolazioni possiedono due auxotrofie opposte. Se avvenisse coniugazione queste verrebbero trasformate in prototrofie. Piastrando poi le due colonie su terreno minimo non si osserva nessuna crescita in quanto il filtro ha impedito il contatto diretto e la ricombinazione delle popolazioni.

6.4.3.3.3 Plasmide *F* (fertility) di *E. coli* Il plasmide *F* di *E. coli* è formato da 99159bp.

- Una regione contiene geni coinvolti nella replicazione del plasmide.
- La regione *tra* contiene geni coinvolti nel trasferimento coniugativo come quelli per la sintesi del pilo *IV*.
- La regione *oriT* è l'origine del trasferimento durante la coniugazione.
- Due regioni trasponibili (mobili) consentono l'integrazione del plasmide nel cromosoma batterico.

6.4.3.3.4 Coniugazione tra una cellula F^+ e una F^-

6.4.3.3.4.1 Processo di coniugazione

1. Si crea la struttura coniugativa;
2. Il pilo si depolimerizza portando le due strutture in contatto.
3. Un filamento del DNA del fattore *F* viene tagliato da una endonucleasi e si muove attraverso il ponte coniugativo.
4. Il DNA complementare viene sintetizzato su entrambi i singoli filamenti.
5. Si completa il movimento attraverso il ponte di coniugazione e la sintesi del DNA.
6. La ligasi circolarizza la molecola di DNA.
7. I batteri coniugati si separano.

In questo modo il batterio exconjugante ha acquisito un plasmide e quello donatore non l'ha perso.

6.4.3.3.4.2 Replicazione a ciclo rotante La replicazione a ciclo rotante è una replicazione asimmetrica e procede in una sola direzione: solo una delle eliche parentali viene replicata. L'endonucleasi taglia il plasmide a *oriT*. Dopo un giro completo il filamento comincia il processo di trasferimento durante cui avviene la replicazione di un filamento del plasmide. In corrispondenza del poro coniugativo si trova un enzima bifunzionale *rilassosoma* o *Tra1*. Questo enzima è codificato dalla cellula donatrice e ha attività nucleasica ed elicastica. La sintesi del nuovo filamento avviene in maniera continua nella cellula donatrice e in maniera discontinua nella cellula ricevente.

6.4.3.3.4.3 Replicazione e trasferimento del plasmide

- L'enzima *Tra1* taglia il DNA in *oriT* e porta a un rilassamento della molecola stessa (srotolamento).
- L'estremità 5' del filamento che deve essere trasferito o external strand si lega covalentemente all'aminoacido tirosina dell'enzima. Il primo tratto del filamento codifica per le proteine *SSB* che proteggono il singolo filamento di DNA trasferito dall'azione delle nucleasi.
- Una volta avvenuto il legame dell'enzima al poro coniugativo inizia la replicazione del retained strand, filamento stampo che non viene trasferito.
- Si sintetizza il DNA donatore mediante il meccanismo a ciclo rotante.
- Il filamento di DNA viene spinto nel batterio ricevente dove viene convertito in DNA a doppio filamento.

La cellula ricevente presenta sulla superficie delle proteine che riconoscono il sito di attacco.

6.4.3.3.5 Formazione di ceppi *Hfr* e mobilizzazione del cromosoma Il plasmide F è un episoma e quindi può integrarsi nel cromosoma dell'ospite e trasferire il cromosoma alla cellula ricevente. Le cellule che possiedono questo plasmide non integrato si indicano F^+ , mentre quelle che hanno il plasmide integrato si indicano *Hfr* (High frequency of recombination). Entrambe agiscono come donatori ma non sono in grado di acquisire stabilmente una seconda copia del plasmide F o di plasmidi ad esso correlati.

6.4.3.3.5.1 Effetti del plasmide *F* nella cellula

Il plasmide *F* nella cellula:

- Conferisce la capacità di sintetizzare il pilo;
- Mobilizza il DNA cromosomico per il suo trasferimento in un'altra cellula quando integrato.
- Altera i recettori di superficie, in modo che la cellula non sia più in grado di comportarsi come un ricevente nella coniugazione.

6.4.3.3.5.2 Coniugazione di cellule *Hfr* Le cellule *Hfr* trasferiscono una porzione del loro DNA e del plasmide *F* ad una cellula ricevente. La cellula ricevente viene ricombinata ricombinata ma rimane F^- in quanto il plasmide non viene passato completamente. La struttura rimane instabile fino a che viene integrata nel genoma.

6.4.3.3.5.3 Integrazione del plasmide F L'inserzione può avvenire in varie regioni del cromosoma in corrispondenza di siti specifici *IS* (insertion sequence) che mostrano omologia con la sequenza del plasmide. Una volta che il plasmide è stato integrato, non è più in grado di controllare la propria replicazione ma rimane capace di sintetizzare il *pilus*. Il processo di coniugazione rimane analogo rispetto al *F* non integrato, con l'eccezione che vengono trasferiti anche geni cromosomali.

6.4.3.3.5.4 Uso dei ceppi *Hfr* negli incroci genetici Durante la coniugazione sia le cellule del donatore sia quelle del ricevente sono vitali. Si devono pertanto selezionare i ricombinanti desiderati in modo che possano crescere senza che i ceppi parentali formino colonie. Normalmente si utilizza:

- Un ricevente resistente a un antibiotico ma auxotrofo per qualche sostanza.
- Un donatore sensibile all'antibiotico ma prototrofo per la stessa sostanza.

Per esempio si ha:

- Donatore *Hfr* sensibile alla streptomicina e prototrofo per il lattosio.
- Ricevente F^- resistente alla streptomicina e auxotrofo per il lattosio.
- Un terreno selettivo con streptomicina e privo di lattosio.

Le colonie che crescono nel terreno sono quelle in cui è avvenuta coniugazione.

6.4.3.3.5.5 Processo di coniugazione tra *Hfr* e F^-

1. Il fattore *F* viene integrato nel cromosoma batterico e la cellula diventa una cellula *Hfr*;
2. Avviene la coniugazione tra una cellula *Hfr* e una F^- .
3. Il fattore *F* viene tagliato da un enzima creando l'origine di trasferimento del cromosoma;
4. Inizia il trasferimento del cromosoma attraverso il ponte di coniugazione;
5. Inizia la replicazione su entrambi i frammenti mentre continua il trasferimento del cromosoma. *F* si trova alla fine del cromosoma adiacente all'origine.

Tipicamente la coniugazione si interrompe prima del trasferimento completo del cromosoma: solo alcuni geni sono trasferiti e vengono ricombinati.

6.4.3.3.5.6 Coniugazione interrotta L'ordine in cui i geni sono presenti sul cromosoma donatore può essere determinato dalla cinetica di trasferimento dei geni individuali. Le due cellule possono essere separate per agitazione a un dato tempo per controllare i ricombinanti sul terreno selettivo. I geni più vicini all'origine di trasferimento (*oriT*) sono quelli che entrano per primi nelle cellule riceventi e sono quindi presenti in una percentuale più alta dei ricombinanti rispetto ai geni che poi entreranno.

6.4.3.3.5.7 Trasferimenti di geni cromosomali al plasmide F' I plasmidi F integrati possono occasionalmente separarsi dal cromosoma incorporando geni cromosomici. In questo caso vengono detti plasmidi F' . Contengono stabilmente dei geni cromosomali normalmente espressi che possono essere trasmessi ad altre cellule. Trasferendo un plasmide F' in una cellula ricevente si possono creare delle cellule diploidi che possono contenere due copie dello stesso gene. La coniugazione con F' deriva da un'escissione scorretta del fattore F nel cromosoma ospite. Alcuni geni dell'ospite vengono prelevati da F e possono essere trasferiti ad un'altra cellula mediante la coniugazione. Alle volte l'escissione avviene in modo impreciso e il plasmide F porterà con sé una sequenza adiacente del cromosoma batterico. Si ottiene un plasmide F' portatore del marcatore lac^+ . Se $F' lac^+$ viene trasferito per coniugazione in una cellula lac^- , si ottiene un diploide parziale (merodiploide) lac^+/lac^- . Questo processo viene anche detto di complementazione.

6.4.3.3.5.8 Formazione di un fattore F' e coniugazione con un ceppo F^-

1. Dopo l'escissione illegittima F può acquisire una porzione di cromosoma batterico e diventare F' .
2. La cellula portatrice di F' può coniugare e trasferire il plasmide a una cellula F^- .
3. Si forma la coppia coniugativa.
4. Il fattore F' replica mentre il filamento viene trasferito.
5. La cellula F' ricevente diventa parzialmente diploide ed è chiamata merozigote.

6.5 I trasposoni e la trasposizione

Alcuni geni o gruppi di geni hanno la capacità di muoversi da una posizione ad un'altra nel genoma e sono detti elementi trasponibili o trasposoni.

6.5.1 Introduzione

I trasposoni contengono i geni che codificano una trasposasi e brevi ripetizioni terminali invertite IR alle estremità del loro DNA. La trasposasi riconosce le proprie sequenze IR nel genoma, taglia il DNA del sito bersaglio ed inserisce il trasposone o una sua copia. Le sequenze di inserzione IS sono i tipi più semplici di elementi trasponibili e non trasportano informazioni geniche oltre a quelle necessaria per muoversi in nuovi siti. I trasposoni complessi contengono uno o più geni non coinvolti nel meccanismo di trasposizione stesso, come ad esempio geni di antibiotico-resistenza.

6.5.2 Trasposizione

La trasposizione è un evento di ricombinazione che avviene tra sequenze non omologhe. Non richiede l'uso del sistema di ricombinazione della cellula. Richiede il riconoscimento di una specifica sequenza di basi e viene pertanto detta ricombinazione sito specifica.

6.5.2.1 Meccanismo di trasposizione

La trasposasi riconosce, taglia e lega il DNA durante il processo di trasposizione. Una breve sequenza di basi del DNA bersaglio viene duplicata nel sito di integrazione.

6.5.2.2 Duplicazione delle sequenze bersaglio

La duplicazione avviene in quanto il taglio della trasposasi è asimmetrico e crea filamenti sfalsati. Dopo l'inserimento da parte della trasposasi enzimi coinvolti nella riparazione del DNA riempiono i buchi, sintetizzando una giunzione a livello della catena

6.5.3 Tipologie di meccanismi di trasposizione

Sono conosciuti due meccanismi di trasposizione. Entrambi iniziano allo stesso modo: la trasposasi riconosce i punti *IR*, taglia e inserisce il trasposone all'interno del DNA bersaglio.

6.5.3.1 Meccanismo conservativo

Nel meccanismo conservativo l'elemento viene escisso da un sito del cromosoma e reinserito in un secondo. Il numero di trasposoni rimane invariato. Vengono creati dei tagli in modo da espellere il trasposone dal DNA donatore e la riparazione duplica le sequenze target e completa l'evento. La trasposasi agisce come dimero o tetramero e l'operazione di taglio e riunione avvengono in contemporanea sul trasposone e sul sito bersaglio.

6.5.3.2 Meccanismo replicativo

Nel meccanismo replicativo viene prodotta e inserita in un nuovo sito una nuova copia del trasposone. La replicazione avviene senza il taglio completo dei trasposoni dal sito donatore. Si forma un co-integrato intermedio, dove le due molecole si fondono per un breve periodo. La replicazione del trasposone attraverso DNA polimerasi avviene mentre l'elemento mobile è ancora attaccato al sito originale e a quello bersaglio. Una resolvedi scompone il co-integrato in due strutture separate, ognuna con una coppia del trasposone.

6.5.4 Verifica di un evento di trasposizione

Si considerano due cellule batteriche: F^+ e F^- . Si vuole dimostrare la mobilità di un trasposone *Tn3* dal suo sito donatore sul plasmide *X* a quello ricevente sul plasmide *F*.

6.5.4.1 Ceppo F^+

Il ceppo F^+ possiede:

- Resistenza all'ampicillina codificata da *Tn3* sul plasmide *X*.
- Resistenza alla kanamicina codificata da un gene sul plasmide *F*.

Inoltre il fattore *F* viene modificato in modo che non si integri nel cromosoma.

6.5.4.2 Ceppo F^-

Il ceppo F^- presenta:

- Mutazione *polA1* che impedisce al plasmide di replicarsi;
- Resistenza a *Nal* (acido nalidixico).

6.5.4.3 Movimento del trasposone

Se il trasposone salta da X a F si forma una struttura F - $Tn3$ trasferibile per coniugazione al batterio F . Dopo l'incrocio i batteri vengono selezionati per piastramento su terreni che presentano i tre antibiotici. Nal serve per selezionare il ricevente, mentre gli altri due per verificare il corretto trasferimento di informazioni geniche.

6.5.4.4 Cointegrato

Il cointegrato, lo stadio intermedio di questo processo, è formato da due plasmidi F e X e due coppie di $Tn3$. In questo stadio si prevede la risoluzione del cointegrato in due plasmidi F e X ognuno portatore di $Tn3$. Si parla quindi di trasposizione replicativa che si svolge in due fasi principali:

- Produzione del cointegrato;
- Risoluzione del cointegrato.

6.5.5 Mutagenesi con elementi trasponibili

Se il sito di inserzione per un elemento trasponibile è all'interno di un gene l'inserzione del trasposone porterà alla disattivazione (disruption) del gene considerato. Si ha una variazione del ceppo e questa mutagenesi viene indotta con elementi trasponibili.

6.5.5.1 Random Mutagenesis Protocol

I batteri che contengono il trasposone possono essere selezionati attraverso l'isolamento di colonie su un terreno ricco contenente antibiotico kanamicina. Questo tipo di approccio viene utilizzato per identificare i geni essenziali di un certo batterio. Nella prima piastra viene utilizzato il DAP per permettere la crescita del batterio donatore (*E. coli*). In questo modo sia il donatore sia il ricevente possono crescere. Nella seconda piastra viene eliminato il DAP per isolare il batterio ricevente in quanto *E. coli* non è in grado di crescere senza DAP . Viene infine aggiunto l'antibiotico per selezionare il nuovo batterio che avrebbe dovuto ricevere la resistenza per esso.

6.5.6 Integroni

Gli integroni sono elementi genetici mobili di DNA con la capacità di catturare geni di varia origine e farli esprimere. Sovraesprimono un dato gene. Contengono gli elementi di ricombinazione sito-specifica e sono in grado di riconoscere e catturare cassette geniche e trasferirle orizzontalmente. Si possono trovare in trasposoni, plasmidi o cromosoma batterico. Non vengono inseriti casualmente ma contengono un gene che codifica un integrasi, richiesta nella ricombinazione sito specifica e una sequenza *attI* che determina il sito di inserzione. Il gene catturato si trova in cassette geniche insieme a un promotore.

6.6 Clonaggio genico

Il clonaggio ha lo scopo di isolare una grande quantità di geni specifici in forma pura. La strategia è quella di spostare il gene o la regione di interesse da un genoma grande e complesso a uno piccolo e più semplice.

6.6.1 Scopi del clonaggio genico

- Isolare un gene specifico e replicarlo, definire la struttura del gene clonato;
- Definire la modalità di espressione (spaziale, temporale, induzione ambientale);
- Esprimere il gene in altri organismi per studiarne la funzione;
- Produrre una grande quantità della proteina codificata.

6.6.2 Enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono enzimi specifici che riconoscono sequenze palindromiche sul DNA e le tagliano, permettendo l'isolamento di un gene specifico. Il taglio può essere simmetrico con formazione di blunt ends come avviene per *AluI*, *HaeIII* o asimmetrico con formazione di sticky ends come avviene per *BamHI*, *HindIII* e *EcoRI*.

6.6.3 Fasi del clonaggio genico

1. Isolamento e frammentazione del DNA originario, anche da specie diverse da quelle batteriche, con enzimi di restrizione che viene poi usato per la restrizione;
2. Giunzione dei frammenti ad un vettore di clonaggio, derivato da un plasmide o da un virus;
3. Introduzione, mantenimento e moltiplicazione del DNA clonato nell'organismo ospite.

I batteri ospite sono resi competenti e vengono indotti ad esprimere il gene.

6.6.4 I plasmidi come vettori di clonaggio

6.6.4.1 Caratteristiche fondamentali dei plasmidi

- Dimensione ridotta: facilita l'isolamento e la manipolazione del DNA.
- Numero elevato di copie: facilita l'amplificazione del DNA;
- Origine di replicazione: permette una replicazione indipendente del DNA batterico.
- Presenza di marcatori selezionabili: facilitano il riconoscimento e la selezione dei cloni.

I plasmidi utilizzati sono modificati in modo da prevenire il trasferimento coniugativo e sono F^- in modo da mantenere la loro integrità. L'inserzione avviene per trasformazione.

6.6.4.2 Vettori plasmidici di prima generazione

Nei vettori plasmidici di prima generazione l'inserimento di DNA provoca la disattivazione del gene di resistenza alla tetraciclina. Si ha una selezione pertanto indiretta dei plasmidi con DNA esogeno. Si ipotizza di avere un batterio con due resistenze agli antibiotici, tra cui la tetramicina. L'inserimento di DNA provoca la disattivazione del gene di resistenza per la tetramicina, rendendo il batterio sensibile ad essa all'inserimento del plasmide. Il DNA viene tagliato con gli stessi enzimi che poi vengono utilizzati per il taglio del plasmide in modo che le estremità del gene e del plasmide siano complementari mantenendo l'integrità del plasmide. Se non si riesce a inserire nulla nel plasmide, si aggiunge la ligasi per chiudere la struttura, quello che si ottiene è un plasmide vuoto (senza modifiche). Per distinguere i plasmidi modificati dagli altri devo usare la tecnica di replica planting,

quindi li sottopongo a entrambi gli antibiotici, in modo da eliminare una popolazione di batteri, quella in cui c'è stato l'inserimento nel gene, e poi ad uno solo. Se confronto le due piastre riesco a selezionare i primi che sono stati utilizzati.

6.6.4.3 Vettori plasmidici di seconda generazione

I vettori plasmidici di seconda generazione richiedono meno tempo rispetto a quello visto in precedenza. Con l'inserzione del DNA da clonare viene inattivato il gene *lacZ* che codifica la β -galattosidasi, che esegue la scissione del galattosio. L'*X-Gal*, un omologo del galattosio che produce un colore blu intenso quando viene scisso viene aggiunto al terreno di coltura. Le colonie blu hanno quindi un gene *lacZ* funzionale e non contengono un plasmide clonato. Se la β -galattosidasi non funziona *X-Gal* non viene scisso e non diventa blu. Se il gene è stato inserito in mezzo al sito della β -galattosidasi la colonia diventa bianca.

6.6.5 Regioni polilinker

Le regioni polilinker sono siti di restrizione riconosciuti da diversi enzimi e più facili da aprire. Si nota come un gene che viene selezionato non deve contenere sequenze interne riconosciute dall'enzima di restrizione altrimenti verrebbe tagliato.

6.6.6 Il batteriofago λ come vettore di clonaggio

Il fago lambda può essere usato come vettore di clonaggio. La regione tra i geni *J* e *N* del genoma virale non è essenziale e può essere sostituita con un DNA esogeno. Le regioni non essenziali permettono l'entrata del batterio nel ciclo lisogenico. Si possono usare come luoghi per inserire geni d'interesse rendendo λ capace di compiere solo il ciclo litico. Con questa tecnica è possibile fare clonaggio di frammenti anche piuttosto grandi.

6.6.6.1 Fasi di clonaggio con il vettore lambda

1. Isolamento del DNA del fago e digestione con un enzima di restrizione;
2. Ligazione dei due frammenti di lambda ai frammenti del DNA esogeno. Vengono selezionati frammenti di DNA esogeno della lunghezza appropriata, circa 20 kb);
3. Impacchettamento del DNA per aggiunta di estratti cellulari contenenti le proteine della testa e della coda con formazione spontanea di particelle fagiche (incapsulamento);
4. Infezione di *E. coli* con sospensione di fagi che contengono il gene preso come riferimento.
5. Si piastra il tutto e creano dei buchi trasparenti nel tappeto batterico.
6. Si procede con l'isolamento dei cloni fagici tramite analisi delle placche formatesi su una coltura del ceppo ospite;
7. Analisi dei fagi ricombinanti.

6.6.7 La mutagenesi sito-diretta

La mutagenesi sito-diretta consente di causare mutazioni all'interno di uno specifico gene. Viene utilizzata per studiare l'azione di proteine che contengono specifiche sostituzioni aminoacidiche. Il vettore contenente il DNA mutato viene inserito in un ceppo batterico mutante incapace di produrre la proteina in questione. Viene introdotto il gene di interesse in un vettore a singolo filamento. Un

frammento di DNA sintetico con le mutazioni (oligonucleotide sintetico) si può legare al vettore per complementarità e viene esteso attraverso la DNA polimerasi. Poi seguono le fasi di clonaggio e selezione.

6.6.8 Mutagenesi a cassetta e inattivazione genica

1. Un plasmide contenente il gene *X* viene tagliato con l'enzima di restrizione *EcoRI* per introdurre una cassetta di resistenza alla kanamicina.
2. Dopo la ligazione abbiamo un plasmide che contiene la cassetta di kanamicina come mutazione di inserzione nel gene *X*. Il plasmide viene linearizzato con un altro enzima di restrizione *BamHI*;
3. Vengono trasformate le cellule batteriche che contengono una versione wild type del gene *X*. Avviene ricombinazione omologa tra il gene *X* del vettore e quello wild type disattivandolo.
4. Dopo la ricombinazione si possono selezionare i batteri mutanti (gene *X* inattivato) su terreno contenente kanamicina.

Capitolo 7

Genomica microbica

Il termine genomica fa riferimento alla mappatura, al sequenziamento e all'analisi dei genomi. La conoscenza della sequenza di un genoma non rivela solamente i geni dell'organismo ma fornisce anche informazioni sulle sue funzionalità e sulla sua storia evolutiva.

7.1 Branche della genomica

7.1.1 Genomica strutturale

La genomica strutturale esamina la struttura fisica dei genomi con l'obiettivo di determinare e analizzare la sequenza di DNA del genoma annotando i geni.

7.1.2 Genomica funzionale

La genomica funzionale indaga i meccanismi di funzionamento del genoma, dei trascritti e delle proteine codificate da essi.

7.1.3 Genomica comparata

La genomica comparata pone a confronto diversi genomi per risalire alle affinità e alle differenze tra essi, identificando porzioni conservate che codificano per le proteine essenziali e determinano i modelli di funzione e regolazione. I dati servono anche per lo studio dell'evoluzione microbica e del trasferimento orizzontale di geni. Si nota come le differenze di genoma portano a differenze fenotipiche.

7.2 Genomi

7.2.1 Genoma procariote

I procarioti presentano un genoma compatto fatto quasi unicamente da geni. Si misura un elevato polimorfismo anche nella stessa specie. Sono molto variabili.

7.2.2 Componenti del genoma

7.2.2.1 Core genome

Il core genome è la parte in comune tra le componenti di una stessa specie.

7.2.2.2 Genoma accessorio

Il genoma accessorio è composto dai geni che distinguono un individuo da un altro. Sono sequenze specifiche che possono occupare fino al 26% di un genoma. In queste regioni si trova spesso fattori di patogenicità di un batterio.

7.2.2.3 Genoma minimo

Il genoma minimo è il numero di geni essenziali alla vita di uno specifico organismo.

7.2.2.3.1 Core genome Il core genome o *COG*, cluster of orthologous genes.

7.2.2.3.2 NOGD Non orthologous gene displacement *NODG* sono geni con stessa funzione e stessa sequenza con antenati diversi.

7.3 Sequenziamento genomico di prima generazione (1995)

Per sequenziare un genoma si deve prima dividerlo in frammenti per poi clonarli successivamente.

7.3.1 Clonaggio dei frammenti

Il primo passo per sequenziare un genoma è il clonaggio dei suoi frammenti.

7.3.1.1 Vettori di clonaggio

- Clonaggio con vettori plasmidici (tipo puC19), frammenti di circa 2kb.
- Clonaggio con batteriofagi λ , frammenti di circa 20kb.
- Clonaggio con vettori *BAC* (Bacterial Artificial Chromosome), frammenti di circa 300kb.
- Clonaggio con vettori *YAC* (Yeast Artificial Chromosome), frammenti di circa 800kb.

7.3.2 Processo

1. frammentando l'estratto di DNA (enzima di restrizione);
2. mescolando i frammenti con il plasmide;
3. introducendo i plasmidi nel batterio.

7.3.3 Cromosomi artificiali batterici *BAC*

I *BAC* sono derivati dai plasmidi *F*.

7.3.3.1 Composizione

- Closing region sequenze dove si inserisce il frammento che deve essere clonato.
- *sopA* e *sopB* mantengono il numero di copie/cellula basso.
- *oriS* e *repE* necessari per la replicazione.

I ceppi di batteri utilizzati per il clonaggio con vettori *BAC* sono difettivi dei normali sistemi di restrizione in modo prevenire la degradazione di *BAC* e dei sistemi di ricombinazione in modo da prevenire il riarrangiamento del DNA clonato nei *BAC* al cromosoma dell'ospite.

7.3.4 Cromosomi artificiali di lievito *YAC*

Gli *YAC* sono vettori che si replicano nel lievito come cromosomi normali ma presentano dei siti dove può essere inserito del DNA esogeno di grandi dimensioni (200-800 kb).

7.3.4.1 Composizione

- Origine di replicazione.
- Sito di clonaggio.
- Telomeri.
- Centromero.
- Gene di selezione.

Presentano problemi notevoli di ricombinazione e riarrangiamento del DNA clonato rispetto al DNA clonato nei batteri.

7.4 Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA può avvenire per mezzo di due tecniche principali: metodo Sanger o shotgun.

7.4.1 Metodo Sanger

Il metodo Sanger è il metodo di sequenziamento classico ed è stato inventato alla fine degli anni '70. Viene chiamato anche metodo dei "dideossinucleotidi terminali". Consente di generare frammenti di DNA che terminano in corrispondenza di ognuno delle 4 basi marcare con isotopi radioattivi o marcatori fluorescenti. Il principio è basato sulla sintesi di un filamento copia del DNA da studiare con la DNA polimerasi.

7.4.1.1 Miscela di incubazione

Per permettere la sintesi della DNA polimerasi marcata con isotopi radioattivi si mette nella miscela di incubazione analoghi dei deossiribonucleosidi trifosfati *dNTP*. 4 nel caso di isotopi radioattivi o 1 per i fluorescenti. Questi mancano del gruppo ossidrilico e impediscono pertanto alla DNA polimerasi di continuare con la sintesi dopo che ha aggiunto un monomero anormale.

7.4.1.2 Processo

7.4. SEQUENZIAMENTO DEL DNA

1. Fase di clonaggio, seguita dal taglio e l'isolamento di una specifica sequenza.
2. Denaturazione a 95°C, causa l'apertura della doppia elica.
3. Attacco di un singolo primer sul sito di taglio specifico.
4. La DNA polimerasi si attacca al filamento e comincia la sintesi di uno nuovo. Quando i dideossinucleotidi entrano nel meccanismo, la replicazione si ferma in corrispondenza della base modificata e opportunamente marcata con isotopi radioattivi.
5. Si procede con la loro separazione su gel di poliacrilamide, isotopi radioattivi, o in tubo capillare, con i marcatori fluorescenti.
6. Elettroforesi: i frammenti si spostano verso il polo positivo: i più piccoli in modo più veloce, mentre i più grandi più lentamente. Si ricava il sequenziamento andando in ordine e aggiungendo la base marcata con il fluoroforo o il radioattivo.

Se viene utilizzato l'isotopo radioattivo è necessario avere una piastra per ciascun nucleotide per capire quale dei quattro è stato aggiunto progressivamente. Se vengono utilizzati i marcatori fluorescenti, ogni base verrà marcata con un diverso colore e quindi sarà necessaria solamente una pista per frammento. In questo secondo caso il sequenziamento può essere fatto anche automaticamente.

7.4.2 Sequenziamento shotgun

La tecnica shotgun applicata al genoma prevede il clonaggio dell'intero genoma e il sequenziamento casuale dei cloni risultanti. Questa tecnica genera molti frammenti ridondanti o che si sovrappongono parzialmente. L'ordinamento dei frammenti è detto assemblaggio.

7.4.2.1 Assemblaggio

Durante l'assemblaggio si collocano tutti i frammenti nel corretto ordine, si eliminano le sovrapposizioni e si genera un genoma utilizzabile per l'annotazione.

7.4.2.2 Annotazione

Durante l'annotazione vengono riconosciuti gli *ORF* (Open Reading Frame), sequenze di DNA con schema di lettura aperto, attraverso identificazione di un codone di inizio (*AUG*) o terminazione (*UAA*, *UGA* o *UAG*). Queste sequenze appaiono anche casualmente ed è quindi necessario prendere in considerazione anche la dimensione degli *ORF*

7.4.2.2.1 *ORF*

- La maggior parte delle proteine contiene 100 aminoacidi;
- Tra start e stop deve avere multipli di tre;
- Si possono ricercare informazioni aggiuntive in geni non codificanti (promotori e terminazione di trascrizione) oppure sequenze di legame al ribosoma.

Nel DNA che viene annotato:

- Si considerano i 6 quadri possibili di lettura: 1 per ogni aminoacido delle sequenze ATG e sui due filamenti;
- la versione che presenta meno sequenze di stop è da preferire.

Si trovano poi delle regioni più o meno conservate nei vari individui. Un esempio sono le proteine di membrana che si trovano in tutti i batteri e che presentano particolari domini idrofobici per inserirsi nelle membrane.

7.5 Mappe genomiche

Le mappe genomiche forniscono informazioni riguardo:

- Ordine: i geni vengono espressi in pacchetti, solitamente 8-10 geni sono espressi insieme in proteine che lavorano nello stesso processo.
- Lunghezza.
- Orientamento: il gene trascritto è espresso solo su un filamento rispetto all'altro.
- Categorie funzionali: vengono presentate con lo stesso colore.

7.5.1 Genoma di *Haemophilus influenzae*

Nella mappa del genoma di *Haemophilus influenzae* si ha:

- cerchio esterno: regioni codificanti.
- primo cerchio interno: regioni ad elevato contenuto di *GC* o di *AT*.
- secondo cerchio interno: copertura dei cloni usati per il sequenziamento.
- terzo cerchio interno: profagi, tRNA, rRNA.
- quarto cerchio interno: sequenze ripetute (funzione regolatoria) e origine di replicazione.

Tuttavia la mappa genomica non dice quali e quanti geni sono espressi in un solo momento. L'analisi complessiva dell'insieme dei trascritti (RNA) viene chiamata trascrittomica; in alcuni casi questo porta ad avere genomi uguali ma trascrittomi diversi.

7.5.2 Contenuto genico e stile di vita

Il contenuto genico riflette lo stile di vita dell'organismo. Per esempio:

- un parassita obbligatorio come *Treponema pallidum* non possiede geni per la sintesi degli aminoacidi perchè vengono tutti forniti dal suo ospite;
- *E. coli* possiede 131 geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi;
- *Bacillus subtilis*, un organismo che vive nel suolo, ha 200 geni coinvolti.

7.5.3 Geni identificati

Il numero di geni identificati in un dato genoma, per confronto con altri genomi, corrisponde a circa il 50-60% delle ORFs individuate. Infatti, ci sono delle ORFs che non vengono identificate come proteine ipotetiche e che probabilmente esistono ma di cui non è nota la funzione. Per esempio, in *E. coli* le funzioni assegnate sono relative a 2700 geni su un totale di 4300 (63%). Si prevede che la maggior parte delle funzioni codificate dalle ORFs non identificate non siano essenziali e coinvolte in attività di regolazione, catabolismo di substrati inusuali, proteine ridondanti utilizzate come

sistemi di riserva o ridondanza Dall'analisi del genoma si possono derivare molte capacità metaboliche: trasportatori ABC per zuccheri, peptidi, fosfato, ferro, zinco; principali rami del metabolismo energetico; sintesi del flaggello; ATP sintasi.

7.5.4 Categorie geniche

La percentuale dei geni dedicata a una data funzione cellulare è in rapporto alle dimensioni del genoma. La percentuale dei geni dedicati alla replicazione del DNA e alla sintesi proteica è alta nei genomi di piccola dimensione, come i parassiti. La percentuale dei geni dedicata al metabolismo e alla regolazione è alta nei genomi di grandi dimensioni. Gli organismi con grandi genomi vivono per la maggior parte nel suolo (quelli con piccoli genomi sono normalmente dei parassiti). Il suolo è un habitat nel quale le fonti di carbonio e energia sono scarse, disponibili in una grande varietà di tipi differenti e spesso fruibili in maniera intermittente.

7.6 Genomica comparativa

7.6.1 Differenziazione nei genomi

- Genoma core è esterno alla membrana ed è uguale per tutti i ceppi;
- Buchi sono presenti nello strato del core e rappresentano il genoma accessorio, che varia in un ciascuno dei ceppi di un determinato batterio.

I vari ceppi hanno quindi un diverso aspetto clinico, in cui le regioni intersecanti, dato che comuni a tutti, hanno delle funzioni importanti.

7.6.2 Tipologie di mappatura

7.6.2.1 Genoma

Il genoma è la mappatura a livello dell'individuo.

7.6.2.2 Pangenoma

Il pangenoma è la mappatura a livello della specie.

7.6.2.3 Metagenoma

Il metagenoma è la mappatura a livello della comunità

7.6.3 Compattezza del genoma procariote

Nei procarioti all'aumento delle dimensioni del genoma corrisponde un conseguente aumento del numero dei geni: dimensioni del genoma e il totale di ORF sono quindi direttamente proporzionali. Questo è quello che testimonia la compattezza del genoma procariote. Il più piccolo genoma procariotico noto è quello di specie del genere *Mycoplasma*: 470 ORFs. Confrontando i genomi di due specie di *Mycoplasma*, *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, e portando avanti studi di mutagenesi con trasposoni, si è concluso che sono necessari circa 300 geni codificanti proteine per stabilire la minima funzionalità cellulare. I più grandi genomi procariotici sono di oltre 8 Mb, come ad esempio quello di *Bradyrhizobium japonicum*, responsabile della fissazione dell'azoto nei noduli delle radici delle piante di soia, e contiene 8846 ORFs (2800 in più rispetto a quello del lievito *S. cerevisiae*).

7.7 esempi di genomi batterici

Mycoplasma genitalium:

- patogeno umano (vie respiratorie, sistema immunitario), 580 Kb, corredo genico minimo di 517 geni;
- 90 coinvolti nella sintesi delle proteine;
- 29 nella replicazione del DNA;
- 140 codificano per proteine di membrana;
- 5 geni implicati nei meccanismi di regolazione.

Haemophilus influenzae:

- patogeno umano (vie respiratorie superiori), 1.8 Mb, 1743 geni;
- 40% con funzione sconosciuta;
- 64 geni di regolazione;
- sprovvisto di 3 geni del ciclo di Krebs;
- il genoma contiene 1465 copie della sequenza di riconoscimento usata nell'uptake di DNA durante la trasformazione.

Methanococcus jannaschii:

- Archaea, 1.6 Mb, 1738 geni;
- soltanto il 44% dei geni corrispondono a quelli degli altri organismi;
- geni per funzioni essenziali (replicazione, trascrizione, traduzione);
- simili a quelli degli eucarioti.

Escherichia coli:

- 4.6 Mb, 4288 geni; molto simile a *H. influenzae*;
- 5% dei geni per proteine di membrana, 13% trasporto, 10% metabolismo, 4% regolazione, 8% per replicazione, trascrizione, traduzione;
- 2500 geni dissimili da geni noti.

Deinococcus radiodurans:

- batteri del suolo. Sono in grado di ricongiungere frammenti di DNA generati dall'esposizione a forti radiazioni. 2 cromosomi, 2.6 Mb e 0.4 Mb;
- un megaplasmide 177 Kb, un plasmide 45 Kb;
- il batterio dispone di maggior quantità di geni impegnati in processi di riparazione del DNA. Esempio MmutT (eliminazione dei nucleotidi ossidati) è presente in 20 versioni (1 sola nella maggior parte dei microrganismi).

Rickettsia prowazekii:

- parassita endocellulare obbligato dei pidocchi e dell'uomo, agente del tifo epidemico;
- 1.1 Mb (25% non codificante), geni con affinità a quelli mitocondriali. Processo di sintesi dell'ATP simile a quello osservato dal mitocondrio. Mancanza di geni dedicati alla sintesi di diversi aa (come nel mitocondrio).

Chlamydia trachomatis:

- batteri privi di motilità, parassiti intracellulari. Privo di peptidoglicano, ma possiede tutti i geni per costruirlo;
- non ha il gene FtsZ (formazione del setto divisorio), meccanismo molecolare di divisione cellulare sconosciuto;
- contiene più di 20 geni di origine eucariotica di cui alcuni provenienti da piante.

Treponema pallidum:

- agente della sifilide. È metabolicamente deficitario: manca del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa e di diverse vie di biosintesi;
- 5% dei geni codificano per proteine di trasporto;
- funzione di 40% dei geni sconosciuta.

Mycobacterium tuberculosis:

- agente della tubercolosi, 4.4 Mb;
- 4000 geni, 60% sconosciuti. 250 geni per il metabolismo dei lipidi (50 in *E. coli*). Il batterio ottiene molta energia dalla degradazione dei lipidi dell'ospite;
- 10% del genoma formato da 2 famiglie di proteine che potrebbero conferire variabilità antigenica e quindi un meccanismo di difesa contro il sistema immunitario dell'ospite.

Mycobacterium leprae:

- agente della lebbra, genoma molto diverso di quello di *M. tuberculosis*;
- 50% del genoma da geni non funzionali. Privo di enzimi coinvolti nella produzione di energia e nella replicazione del DNA

(tempo di replicazione nel topo, circa 2 settimane).

Staphylococcus aureus:

- agente di varie infezioni come le intossicazioni alimentari o infezioni nosocomiali;
- 2.6 Mb, 2600 geni. Possiede molti geni di resistenza;
- agli antibiotici, alcuni collocati su plasmidi o trasposoni.

Streptococcus pyogenes:

- tre principali ceppi in grado di causare diversi tipi di infezioni;
- i tre ceppi differiscono principalmente per il contenuto dei profagi, in cui sono ospitati i geni che codificano per fattori di virulenza.

Capitolo 8

Virologia

8.1 Introduzione

Si intende per virus un elemento genetico che si replica indipendentemente dai cromosomi cellulari ma non dalle cellule stesse. Possiedono una forma extracellulare che ne permette la presenza al di fuori dell'ospite. Sono parassiti endosimbionti obbligati che non possono riprodursi indipendentemente dalle cellule viventi e che non possono duplicarsi in assenza di un organismo ospite.

8.1.1 Virioni

Si intende per virione una particella virale completa, funzionale e in grado di infettare nel suo stato extracellulare e metabolicamente inerte. Consiste di almeno una molecola di DNA o RNA racchiusa in un rivestimento proteico, detto capside. Può presentare anche degli strati aggiuntivi.

8.2 Struttura dei virus

La dimensione del virione è compresa fra 10 e 400nm in diametro, ma la maggior parte del virus è troppo piccola per essere visibile al microscopio ottico.

8.2.1 Composizione dei virioni

Tutti i virioni contengono:

- Un nucleocapside composto da acido nucleico (DNA o RNA);
- Componenti aggiuntivi, come per esempio l'envelope (rivestimento lipidico).
- Un rivestimento proteico (capside);

8.2.2 Tipologie di virus

- Nudi: presentano solo l'involucro proteico del capside.
- Rivestiti: comprendono un envelope o involucro pericapsidico, con una membrana formata da un doppio strato lipidico al quale sono associate delle proteine.

La componente lipidica dei virus rivestiti deriva dalla membrana dell'ospite, mentre la componente proteica è codificata dal virus.

8.2.3 Capside e simmetria

Una prima classificazione dei virus viene fatta sulla struttura base del capsido:

- Isocaedrico;
- Isocaedrico con envelope;
- Elicoidale senza envelope;
- Elicoidale con envelope.

La capside è una struttura macromolecolare che serve da rivestimento proteico del virus. Protegge il materiale genetico virale e aiuta il suo trasferimento fra le cellule ospiti. Le molecole di DNA o RNA si trovano pertanto all'interno della particella circondate dal capsido.

8.2.3.1 Capsomeri

I capsomeri sono le unità morfologiche del capsido. Sono formati da subunità strutturali proteiche dette protomeri.

8.2.3.1.1 Protomeri I protomeri sono proteine con la capacità di assemblarsi spontaneamente combinandosi in strutture elicoidali o icosaedriche. La mancanza della necessità di meccanismi di regolazione permette il loro assemblaggio anche in vitro.

8.2.3.2 Simmetrie del capsido

I capsidi si dispongono secondo due tipi principali di simmetrie.

8.2.3.2.1 Bastoncellari I virus bastoncellari hanno una simmetria elicoidale. Il capsido a elica forma un tubo vuoto con parete proteica. Un esempio è il Virus del Mosaico del Tabacco.

8.2.3.2.2 Sferoidali I virus sferoidali hanno una simmetria icosaedrica. Sono composti da 20 facce o capsomeri. La simmetria icosaedrica rappresenta la disposizione più efficiente delle subunità. Il capsido assomiglia ad una sfera solida e massimizza il volume minimizzando la superficie. La disposizione più semplice è di 3 protomeri per capsomero, per un totale di 60 protomeri per virione. Altre configurazioni sono a 180, 240, 360 e 420 unità. È tipicamente composto da:

- Pentoni P in corrispondenza dei vertici.
- Esoni H , formano i lati e le facce dell'icosaedro, circondano i pentoni.

Si ha pertanto un totale di 42 capsomeri.

8.2.3.2.2.1 Virus dell'influenza Il virus dell'influenza presenta un capsido sferoidale circondato da un nucleocapsido a elica. Il genoma è presente in più nucleocapsidi diversi e viene detto poli equivalente. Le proteine sono distribuite a intervalli regolari sulla sua superficie.

8.2.3.2.3 Virus con capsidi a simmetria complessa Alcuni virus non ricadono nella categoria con capsidi ad elica o isocaedrici.

8.2.3.2.3.1 Poxvirus I poxvirus sono formati da un core centrale biconcavo che contiene i genomi e numerosi enzimi virali, due corpi laterali e un doppio involucro di membrana.

8.2.3.2.3.2 Grandi batteriofagi Il batteriofago *T4* presenta una simmetria binaria: composta da simmetria icosaedrica per testa e capsidi ed elicoidale per la guaina. Presenta inoltre una piastra basale esagonale e fibre caudali con cui interagisce con la cellula ospite e inietta il genoma.

8.2.4 Envelope

Alcuni virus possiedono un envelope, un doppio strato fosfolipidico esterno. Questo viene acquisito durante il processo di gemmazione o budding e di uscita dalla cellula ospite. Questo processo non altera l'integrità cellulare.

8.2.4.1 Budding

- | | |
|---|--|
| 1. Il genoma viene replicato nella cellula ospite. | serisce sulla membrana della cellula ospite: le glicoproteine sulla membrana dell'ospite crescono di numero e dal nucleocapside intracellulare si forma un virione libero. |
| 2. Vengono create le proteine strutturali. | |
| 3. Le proteine virali con parte idrofobica vengono espresse. In questo modo il virus si in- | 4. La membrana si richiude intorno al nucleo del capsidi. |

8.2.5 Genomi virali

I genomi virali hanno dimensioni ridotte e codificano quelle funzioni che non possono essere fornite dai loro ospiti. Riprogrammano le funzioni metaboliche e biosintetiche dell'ospite finalizzandole alla sua replicazione e all'assemblaggio di nuovi virioni. Le particelle virali hanno dimensioni da 20 a 300nm. I genomi virali sono compresi tra 500 e 5000kb (a volte possono essere più grandi di alcuni batteri).

8.3 Tassonomia virale

La classificazione virale è resa difficile dalla mancanza di informazioni su origine e storia evolutiva. Non è possibile costruire un sistema tassonomico basato su specie, genere, famiglia, ordine, classe, fila, sinapomorfie e simplesiomorfie come per gli eucarioti. In quanto i virus non presentano autonomia replicativa devono essere emersi dopo le altre forme di vita. Non svolgono né replicazione sessuata né asessuata e pertanto non danno luogo a una linea evolutiva classica. Si nota quindi come non esista un albero filogenetico dei virus.

8.3.1 International Committee for Taxonomy for Viruses

Nel 1971 l'International Committee for Taxonomy of Viruses (*ICTV*) ha sviluppato un sistema di classificazione uniforme che descrive circa 2000 virus. Questa classificazione si basa sulla natura del genoma, sulla simmetria del capsidi, sulla presenza o assenza di envelope e sulle dimensioni del virione e del capsidi. Per la classificazione dei virus esiste un database chiamato *ICTVdB*.

8.3.2 Classificazione di Baltimore

La classificazione di Baltimore classifica i virus in base all'espressione della loro informazione genetica.

8.3.2.1 Classe I

La classe *I* è la classe di virus più convenzionale: le sue caratteristiche sono simili a quelle dell'ospite. Questi virus trasportano materiale genetico come DNA a doppio filamento. Viene trascritto il filamento negativo per produrre un mRNA positivo che viene tradotto grazie ai ribosomi e produce le proteine funzionali al virus. Essendo il DNA analogo a quello della cellula ospite può replicarsi grazie ai suoi meccanismi, anche se la trascrizione avviene a tassi più elevati.

8.3.2.1.1 Esempi

Esempi di virus di classe *I* sono:

- Adenoviridae.
- Papillomaviridae.
- Poxviridae.
- Herpesviridae.
- Polymaviridae.

8.3.2.2 Classe II

I virus di classe *II* trasportano le loro informazioni come DNA a filamento singolo. Prima della trascrizione si deve sintetizzare un intermedio di DNA a doppio filamento. Il primo passo dopo l'infezione è pertanto la sintesi di un filamento di DNA complementare da cui si ottiene un DNA a doppio filamento standard. Uno dei due filamenti viene usato come stampo per la produzione di mRNA che viene tradotto dai ribosomi in proteine. Per la generazione di nuove unità l'acido nucleico viene processato in modo da ottenere la separazione della doppia elica creando di nuovo DNA a filamento singolo.

8.3.2.2.1 Esempi

Esempi di virus di classe *II* sono:

- Circoviridae.
- Parvoviridae.

8.3.2.3 Classe III

I virus di classe *III* trasportano le loro informazioni come RNA a doppio filamento. Il filamento negativo viene trascritto e permette la sintesi delle proteine funzionali. Queste sono anche enzimi virali non presenti nella cellula ospite come RNA polimerasi RNA-dipendente o RNA replicasi che lega il filamento di RNA e ricostruisce il genoma originale.

8.3.2.3.1 Esempi

- Reoviridae.

8.3.2.4 Classe IV

I virus di classe *IV* trasportano le loro informazioni come RNA a singolo filamento positivo. Questo può essere usato direttamente come mRNA per la sintesi di proteine strutturali in quanto la cellula ospite lo riconosce. Per la codifica del nuovo genoma virale si necessita di RNA polimerasi RNA-dipendente o RNA replicasi. Si produce RNA positivo a partire da uno stampo a RNA negativo.

8.3.2.4.1 Esempi

- Picornaviridae.
- Togaviridae.
- Flaviviridae.
- Coronaviridae.

8.3.2.5 Classe V

I virus di classe *V* trasportano le loro informazioni come RNA a singolo filamento negativo. Si necessita pertanto di una RNA replicasi virale in modo da ottenere RNA con la giusta polarità da cui vengono tradotte le proteine. Lo RNA positivo viene anche usato per la replicazione.

8.3.2.5.1 Esempi

- Orthomyxoviridae.
- Paramyxoviridae.
- Rhabdoviridae.

8.3.2.6 Classe VI

I virus di classe *VI* sono retrovirus a RNA. Trasportano le loro informazioni come un singolo filamento di RNA Positivo simile alla classe *IV*. Una trascrittasi inversa viene codificata dal genoma virale. Dal RNA positivo si produce un intermedio a DNA a singolo filamento grazie alla trascrittasi inversa. Dal DNA a singolo filamento si produce un intermedio a filamento doppio. Viene trascritto il DNA negativo in modo da ottenere mRNA positivo per la sintesi delle proteine strutturali e per la replicazione del genoma virale per i virioni successivi.

8.3.2.6.1 Esempi

- HIV.
- Retroviridae.

8.3.2.7 Classe VII

I virus di classe *VII* trasportano le loro informazioni come DNA a doppio filamento. Viene costruito un intermedio a RNA positivo da cui attraverso la trascrittasi inversa si ottiene un filamento a DNA negativo. In questo modo viene generato il DNA a doppio filamento come genoma per le popolazioni successive.

8.4 Ciclo replicativo di un virus animale

In una cellula ospite animale il virus deve adottare delle strategie per produrre proteine e nuove copie del genoma.

8.4.1 Fasi

8.4.1.1 Assorbimento o attacco

Nella fase di assorbimento o attacco avviene il contatto tra il virione e la membrana; La specificità del contatto è mediata dai recettori della membrana citoplasmatica su cui il virus si attacca. L'assenza di questi recettori impedisce il ciclo replicativo.

8.4.1.2 Penetrazione e decapsidazione

L'attacco del virus alla cellula ospite causa modifiche in entrambi che portano alla penetrazione del primo. Il processo è simile a un'endocitosi. La cellula che permette lo svolgimento di un intero ciclo replicativo viene detta permissiva per quel virus. Avviene qua la spoilazione, il processo con cui i virioni perdono il rivestimento esterno ed espongono il genoma all'ambiente cellulare.

8.4.1.3 Espressione genica e sintesi delle proteine vitali

I virus una volta entrati nelle cellule devono produrre le proteine strutturali che formano il capsido consentendo la formazione di nuovi virioni e le proteine non strutturali, necessarie per la replicazione del genoma.

8.4.1.4 Replicazione del genoma virale

Durante la replicazione del genoma il virus ha prodotto le proteine funzionali necessarie per la sua replicazione o sfrutta quelle dell'ospite per replicare le proprie informazioni geniche.

8.4.1.5 Assemblaggio e maturazione dei virioni

In particolare nei virus con envelope la maturazione comprende il passaggio attraverso organuli come ER e Golgi per produrre glicoproteine che saranno presenti sull'envelope.

8.4.1.6 Rilascio e fuoriuscita dalla cellula

La fuoriuscita di un virus con envelope viene detta gemmazione in quanto al momento dell'uscita questo viene circondato da un doppio strato fosfolipidico che prima faceva parte della membrana della cellula ospite. In caso di virus senza envelope il rilascio avviene attraverso lisi dell'ambiente cellulare.

8.4.2 Conseguenze dell'infezione virale

8.4.2.1 Trasformazione

La trasformazione consiste nell'interferenza del virus con i circuiti di regolazione della cellula. Viene pertanto trasformato il fenotipo cellulare. Può causare tumori.

8.4.2.2 Infezione litica

L'infezione litica può causare la distruzione della cellula ospite.

8.4.2.3 Infezione persistente

L'infezione persistente può avvenire unicamente con virus con envelope: il rilascio del virus avviene per gemmazione senza rilascio della cellula.

8.4.2.4 Infezione latente

L'infezione latente avviene in caso di ritardo tra il momento di infezione e gli eventi di lisi: il virus si trova nel citoplasma e può riprendere la sua attività dopo anni.

8.4.3 Esempi

8.4.3.1 Herpes simplex, classe I

La replicazione del genoma virale avviene nel nucleo. Il genoma viene trascritto come vari mRNA che vengono poi esportati nel citoplasma per essere tradotti.

8.4.3.1.1 Espressione genica L'espressione dei geni del Herpes simplex avviene in tre fasi:

- | | |
|---|---|
| 1. Immediate-Early (Immediata precoce): porta alla regolazione delle fasi successive; | dotta nel citoplasma, ma rientra in seguito nel nucleo per controllare la trascrizione e la replicazione; |
| 2. Early (precoce): produzione degli enzimi necessari alla replicazione del genoma virale. Ciò implica che la proteina venga pro- | 3. Late (tardiva): sintesi delle proteine strutturali. |

Dopo queste fasi possono seguire dei processi di concatenamento in cui molte unità di genoma vengono messe insieme in un'unica molecola. La maturazione del virione continua con il passaggio nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, per portare all'aggiunta di numerosi altre proteine sulla superficie come l'envelope. Infine si arriva all'espulsione del virione dalla cellula ospite per gemmazione.

8.4.3.2 Poxvirus vaiolo, classe I

Il rilascio del nucleocapside e la replicazione del genoma virale avvengono nel citoplasma della cellula ospite. Il virus fornisce gli enzimi necessari per la replicazione del DNA e la trascrizione dell'RNA in quanto la cellula non ne è capace al di fuori del nucleo. Avviene un passaggio per il reticolo endoplasmatico e per l'apparato di Golgi che porta ad aggiungere nuovi strati endoplasmatici e proteine al virione maturo *MV*. Alla fine si arriva allo stato di virione extracellulare *EV* che si distingue dal precedente *MV* per la tipologia dell'involucro esterno che in questo caso deriva dalla membrana plasmatica.

8.4.3.3 Picornavirus poliovirus, classe IV

Questo virus presenta un genoma ad RNA positivo, che funge da mRNA e quindi può venire tradotto direttamente. Non è protetto da envelope e il suo nucleocapside non entra nella cellula durante la penetrazione. Viene prodotta una poliproteina che viene poi scissa da delle proteasi per la produzione delle proteine strutturali. La RNA polimerasi RNA-dipendente sintetizza l'RNA a polarità negativa che viene utilizzato da stampo per il nuovo RNA genomico positivo.

8.4.3.4 Virus dell'influenza umana di tipo A, classe V

Il virus dell'influenza umana presenta un genoma a RNA negativo e segmentato, ovvero è composto da un insieme di frammenti che contengono le informazioni necessarie per un ciclo replicativo.

8.4.3.4.1 Contatto con la membrana Il contatto con la membrana è mediato dalla proteina *HA* o emoagglutinina.

- Viene introdotto e rilasciato il nucleocapside. del nucleo.
- Si trascrive e replica il genoma all'interno
- La traduzione avviene nel citoplasma.

Alcune proteine tornano nel nucleo per l'assemblaggio del nucleocapside. Le proteine dell'envelope inserite in membrana di ER vengono trasportate nel Golgi. Il virus esce dalla cellula per gemmazione.

8.4.3.4.2 Vaccino Per il virus dell'influenza non esiste un vaccino che rimane attivo e valido per molti anni. Questo avviene:

- A causa del genoma segmentato muta molto velocemente.
- Non presenta una specificità particolarmente elevata per l'ospite.
- Subisce deriva antigenica, piccole variazioni (mutazioni puntiformi) che determinano
- epidemie influenzali ogni 2-3 anni;
- Avviene riassortimento antigenico o shift. Questo può essere alla base di pandemie, ogni 10-40 anni, per comparsa di nuovi tipi di *HA* e *NA*.
- Saltano da una specie all'altra.

Il riassortimento è dovuto all'infezione spontanea in un ospite permissivo di ceppi virali provenienti da ospiti diversi con la nascita di strutture ibride.

8.4.3.5 Retrovirus animale, classe VI

L'HIV è il retrovirus più conosciuto globalmente. Colpisce il sistema immunitario dell'ospite fino a portarlo alla morte. È composto da un genoma a RNA negativo a singolo filamento.

8.4.3.5.1 Enzimi coinvolti HIV necessita di enzimi propri per poter portare a compimento il ciclo replicativo:

- Proteasi *PR*;
- Integrasi *IN*;
- Trascrittasi inversa *RT*.

8.4.3.5.2 Genoma Il genoma del HIV è organizzato in tre regioni principali:

- *Gag*: codifica per proteine strutturali.
- *Pol*: codifica per enzimi virali.
- *Env*: codifica per le glicoproteine del capsido.

8.4.3.5.3 Ciclo replicativo Dopo l'attacco avviene la fusione dell'envelope con la membrana cellulare, che viene seguita dal rilascio immediato del nucleocapside. Viene sintetizzato DNA/RNA e si forma una doppia elica di DNA da parte della trascrittasi inversa. Una copia di questo doppio filamento viene integrato nel cromosoma dell'ospite e viene chiamato provirus. In questo modo il DNA virale diventa leggibile dall'apparato di lettura della cellula ospite. Avviene l'espressione del genoma virale e la sintesi delle proteine virali. Le proteine che vengono prodotte possono essere: dell'envelope, funzionali o strutturali. Grazie alla proteasi si ha la maturazione del genoma, l'assemblaggio dei virioni, la traslocazione della proteina di superficie del reticolo endoplasmatico al Golgi e per finire alla membrana plasmatica. Alla fine avviene la gemmazione.

8.5 I Batteriofagi

8.5.1 Genomi

I genomi dei batteriofagi hanno una struttura a mosaico e sono composti da blocchi di sequenze correlate che sono condivise in diverse combinazioni. Questo suggerisce come il trasferimento genico orizzontale e la ricombinazione non omologa abbiano avuto un ruolo importante nell'evoluzione fagica.

8.5.2 Quantificazione della crescita

- Una diluizione di una sospensione contenente materiale virale viene mescolato in una piccola mistura di agar con un ospite suscettibile.
- Piastrazione su agar.
- Il batterio ospite inizia a crescere sulla superficie della piastra di agar e, dopo un'incubazione overnight, forma un tappeto di crescita batterica.
- Allo strato precedente viene aggiunta la componente virale. Ogni particella virale che si attacca a una cellula e si riproduce, causa la lisi della cellula stessa e le particelle virali rilasciate possono diffondere alle cellule adiacenti, infettarle, portare di nuovo alla lisi con ciclo litico e venire rilasciate nuovamente.
- Si formano dei buchi nella piastra in corrispondenza delle colonie lisate, chiamate placche. La dimensione delle placche dipende dal virus, dall'ospite e dalle condizioni della coltura.

Contando il numero di placche si può calcolare il numero delle unità infettive virali presenti nel campione di partenza.

8.5.2.1 Titolo

Si intende per titolo la concentrazione del virus. Questo viene espresso in *PFU* (plaque forming unit) per millilitro.

8.5.2.1.1 Calcolo

$$\frac{n \text{ placche}}{\text{volume di diluizione}}$$

Nel ciclo replicativo dei batteriofagi si distinguono cinque fasi principali:

- #### 8.5.3.2 Tempo di replicazione

8.5.3.2.1 Grafici I grafici del ciclo litico riportano sull'asse delle ascisse il tempo e su quello delle ordinate le unità formanti placche e *OD* della popolazione batterica sottoposta ad attacco. Il numero di cellule virali dopo il contatto cala di un'ordine di grandezza: sono i fagi in grado di infettare le cellule batteriche. Questi grafici individuano nell'infezione due fasi.

8.5.3.2.1.1 Fase di latenza Nella fase di latenza i fagi entrano nelle cellule e le infettano ma non accade nulla. All'inizio di questa fase si ha il periodo di eclissi in cui diminuisce la popolazione virale. Durante questa fase il genoma è separato dal capsido proteico e il virione non viene considerato come particella invettiva.

8.5.3.2.1.2 Fase di Maturazione La fase di maturazione maturazione ha inizio appena i genomi neo-sintetizzati vengono impacchettati all'interno dei capsidi.

8.5.3.2.1.3 Fase di scoppio Nella fase di scoppio si ha un brusco aumento nel numero di batteriofagi associato con una drastica diminuzione dei batteri presenti. Avviene infatti la lisi delle cellule e vengono rilasciati i fagi nell'ambiente extracellulare.

8.5.4 Batteriofagi virulenti

8.5.4.1 Batteriofago *T4*

8.5.4.1.1 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo di T_4 è molto veloce:

- 1 minuto dopo l'attacco la sintesi del DNA e del RNA dell'ospite cessano e inizia la trascrizione di alcuni geni fagici.
- Dopo 2 minuti vengono sintetizzate le prime proteine virali.
- Dopo 4 minuti inizia la replicazione del DNA virale.
- L'assemblaggio di nuovi virioni inizia dopo 20 minuti.

8.5.4.1.2 RNA polimerasi *T4* utilizza la RNA polimerasi dell'ospite che riconosce preferenzialmente i promotori virali. La trascrizione nel batterio viene soppressa da una proteina virale che lega il fattore σ dell'ospite. Ulteriori modifiche della RNA polimerasi batterica portano alla trascrizione dei "middle" e "late" RNA. Le ultime proteine ad essere sintetizzate sono quelle strutturali. La fuoriuscita avviene grazie alla lisi della cellula provocata dalla produzione di un enzima virale che attacca il peptidoglicano dell'ospite.

8.5.4.1.3 Fase di assorbimento L'interazione virus-ospite è altamente specifica. Questa specificità viene data dall'interazione delle proteine di superficie del virus con componenti della membrana dell'ospite (recettori come proteine, carboidrati, lipidi). I recettori svolgono delle funzioni normali per la cellula. Per esempio il recettore per il batteriofago *T1* è una proteina per l'assorbimento del ferro. In assenza di uno specifico recettore, il virus non è in grado di assorbirsi. Questa condizione può essere rapidamente superata attraverso mutazioni.

8.5.4.1.4 Fase di iniezione Una cellula che permette la penetrazione e la replicazione di un virus viene detta permissiva. Le particelle virali si attaccano alla cellula attraverso le fibre caudali che interagiscono in maniera specifica con i polisaccaridi della membrana esterna. Queste fibre si contraggono e la parte centrale della coda entra in contatto con la parete del batterio attraverso una serie di spine situate all'estremità della coda. L'azione di un enzima virale determina la formazione di un poro di peptidoglicano. Dopo la contrazione della guaina caudale, il DNA virale viene spinto all'interno della cellula.

8.5.4.1.5 Restrizione e modificazione del virus da parte dell'ospite I procarioti si possono difendere dall'infezione virale con un meccanismo basato sulla distruzione del DNA genomico virale a doppio filamento, operata da endonucleasi di restrizione. Questo fenomeno, detto restrizione, non è efficiente contro i virus a RNA o a DNA a singolo filamento. Il DNA dell'ospite deve essere protetto dall'azione dei propri enzimi di restrizione attraverso un processo di modificazione che coinvolge la metilazione di basi specifiche sulla sequenza di riconoscimento. Alcuni virus a DNA possono superare i meccanismi di restrizione modificando il proprio genoma attraverso metilazioni e glicosilazioni, che lo rendono resistente all'attacco enzimatico.

8.5.4.1.6 Struttura Il DNA di *T4* presenta una base insolita, la *5-idrossimetilcitosina* al posto della citosina. I gruppi ossidrilici sono modificati dall'aggiunta di residui di glucosio rendendo il DNA resistente agli enzimi di restrizione della cellula ospite. Il batteriofago *T4* presenta:

- Testa isocadrca, $85 \times 110\text{nm}$.
- Coda con struttura tubolare elicoidale $25 \times 110\text{nm}$.
- Più di 25 tipi di proteine strutturali.
- DNA lineare a doppio filamento, 168903bp , che codifica più di 250 proteine diverse.
- DNA permutato circolarmente.
- DNA con ripetizioni terminali di $3-6\text{kb}$.

8.5.4.1.7 Permutazione circolare Il DNA di *T4* viene replicato come singole unità che vengono legate tra di loro per formare un'unica molecola detta concatenamero. L'impacchettamento del DNA necessita il taglio del concatenamero, che avviene indipendentemente dalla sequenza nucleotidica. La testa può alla fine ospitare una molecola leggermente più lunga con la comparsa di

terminazioni ridondanti. Questo avviene in quanto il DNA letto e replicato più volte contiene estremità che si possono combinare tra loro per omologia della basi. Dopo il taglio pertanto i frammenti possono presentare sequenze ripetute e diverse tra loro.

8.5.5 Batteriofagi temperati

Nel ciclo lisogenico un gene codificato dal profago gioca il ruolo di repressore dell'espressione del genoma virale. Questo repressore previene anche l'espressione di qualsiasi altro genoma virale introdotto nella stessa cellula: conferisce ai batteri lisogenizzati uno stato di immunità.

8.5.5.1 Il batteriofago λ

Il batteriofago λ può intraprendere sia la via litica che la via lisogenica. Non possiede fibre caudali e presenta un genoma di DNA lineare a doppio filamento con una coda di 12 nucleotidi a singola elica detta regione *cos*. All'interno della cellula batterica queste sequenze terminali complementari si associano e il DNA è rilegato in una forma circolare contenente 48502bp.

8.5.5.1.1 Genoma Il genoma del fago λ presenta regioni che codificano per le varie funzioni. Può essere inoltre letto in entrambe le direzioni.

- Lettura in senso orario (Right R) controlla le funzioni del ciclo litico.
- Lettura in senso antiorario (Left L) controlla le funzioni del ciclo lisogenico.

8.5.5.1.2 Proteine fondamentali

8.5.5.1.2.1 Repressore di λ Il repressore di λ viene prodotto dal gene *cI* e ha il compito di bloccare la trascrizione del gene *cro* e degli altri geni necessari al ciclo litico.

8.5.5.1.2.2 Proteina *Cro* La proteina *Cro* prodotta dal gene *cro* serve a inibire la trascrizione del gene del repressore λ .

8.5.5.1.3 Infezione del fago λ

1. Il virione di λ si attacca a uno specifico recettore della membrana esterna di *E. coli* e inietta il proprio DNA all'interno della cellula.
2. Il DNA circularizza e ha inizio l'espressione del genoma virale.
3. La RNA polimerasi dell'ospite comincia a trascrivere a partire da 2 promotori P_L e P_R , producendo *L1* e *R1*. Questo avviene in quanto le sequenze non sono palindromiche e permettono la trascrizione in una sola direzione su un filamento.
4. Vengono prodotte le proteine *Cro* e *N*. La prima determina l'entrata nella via litica o lisogenica. La seconda è un antiterminatore e consente alla RNA polimerasi di continuare la trascrizione oltre ai terminatori a partire di P_L e P_R , creando trascritti per i geni impegnati nella replicazione del DNA.
5. I geni tardivi vengono attivati dopo la sintesi di *Q*, che attiva il trascritto *R2* per le proteine strutturali.
6. La proteina *Cro* raggiunge una certa concentrazione e lega O_R e O_L , bloccando la trascrizione guidata da P_R e P_L .

8.5.5.1.4 Avvio della via litica o lisogenica, gli interruttori molecolari Se *cI* viene legato nei siti 1, 2, 3 questo attiva i geni *cII* e *cIII* causando la via lisogenica. Se invece *Cro* lega *cI* nei siti 3, 2, 1 questo disattiva i geni *CII* e *CIII* causando la via litica.

8.5.5.1.4.1 Via lisogenica Affinchè avvenga la via lisogenica:

- Deve essere inibita la traduzione di proteine tardive.
- Una copia del genoma virale deve essere inserita nel cromosoma dell'ospite.

L'inibizione delle proteine tardive avviene ad opera di *CI*, il repressore di λ . Viene trascritto da P_E , attivato da *cII*. La proteina sintetizzata è poco stabile e deve pertanto essere stabilizzata da *cIII*. *cI* e *Cro* controllano l'espressione del proprio gene reprimendo e attivando i promotori P_M e P_R rispettivamente. *Cro* inibisce la trascrizione di *cI* e stimola la trascrizione rightward, mentre *CI* inibisce la trascrizione di *cro* e stimola la trascrizione leftward.

8.5.5.1.5 Integrazione di λ L'integrazione di λ avviene in un singolo sito specifico del cromosoma batterico. Necessita l'attivazione dei geni *cI* e *int*, un integrasi, ovvero nucleasi sito-specifica, per catalizzare il taglio sito-specifico e la ricombinazione tra i siti *att* del virus e quello del batterio. In questo modo avviene un crossing over che permette la ricombinazione cromosomica e di conseguenza la duplicazione del genoma. Se il sistema di repressione di λ (controllato dal gene *cI*) viene interrotto, il virus riprende il ciclo litico, liberandosi del cromosoma batterico. Questa escissione richiede il prodotto del gene *xis* e *int*.

8.5.5.1.6 Crescita litica di λ Gli agenti attivatori del ciclo litico sono quelli che provocano un danno al DNA del genoma. Durante la risposta SOS, l'attività proteasi della proteina *RecA* distrugge il repressore di λ e possono avere inizio nuovi eventi litici.

8.6 Coltivazione dei virus animali

La coltivazione dei virus animali necessita dell'inoculo in un ospite permissivo. Un possibile ospite è l'uovo embrionato in quanto offre una varietà di tessuti differenziati o in via di differenziamento che fungono da ospite per la crescita virale. Il sistema più utilizzato sono comunque le colture cellulari. Normalmente si lavora in vitro con delle cellule suscettibili all'infezione dei virus.

8.6.1 Effetti citopatici

Gli effetti citopatici sono la manifestazione dello sviluppo della replicazione virale. Sono alterazioni morfologiche pronunciate:

- Aumento di rifrangenza e dimensioni,
- Distacco dalla superficie di crescita.
- Comparsa di vacuolizzazione.
- Necrosi.
- Comparsa di inclusioni cellulari.
- Fusione tra più cellule;

8.6.2 Saggio delle placche

Il saggio delle placche permette un'analisi quantitativa. Il titolo virale ($\frac{PFU}{mL}$) viene determinato. Questo fornisce informazioni riguardo l'infettività, ovvero la capacità di iniziare e concludere un ciclo replicativo. Vengono infettate colture cellulari in monostrato con diluizioni seriali della preparazione di particelle virali. Dopo l'assorbimento si rimuove l'inoculo virale e le cellule vengono ricoperte con terreno di coltura contenente agar. Si mantiene così la vitalità cellulare e si limita la diffusione delle particelle virali al resto della coltura. Si procede con diluizioni seriali fino a quando si producono effetti riconoscibili sulle colture cellulari. La stima quantitativa viene fatta attraverso iniezione di una diluizione seriale in un certo numero di animali e si determina una diluizione al punto in cui muore la metà degli animali inoculati o LD_{50} .

8.6.3 Conta delle particelle virali

La conta delle particelle virali è un tipo di conta diretta praticata attraverso microscopio elettronico. Il campione virale viene miscelato ad una concentrazione nota di "beads" (biglie). I volumi del campione virale e di beads sono uguali. Dal rapporto che si presenta tra beads e virus si ricava la concentrazione.

8.6.4 Purificazione di virus

Si intende per purificazione di virus il processo con cui si ottiene una soluzione contenente unicamente particelle virali senza colture cellulari in cui sono state inoculate.

8.6.4.1 Centrifugazione differenziale

Nella centrifugazione differenziale:

1. Si svolge una prima centrifugazione per separare le particelle virali e gli organelli cellulari dalle molecole più piccole.
2. Si toglie il surnatante.
3. Si risciacqua quello che si è ottenuto e lo si risospende.
4. Si svolge una centrifugazione più leggera che causa la sedimentazione di organelli.
5. Viene separato il surnatante contenente virus e i pellet di batteri.
6. Si svolge una seconda ultra centrifugazione per ottenere la precipitazione dei virus.

8.6.4.2 Centrifugazione in gradiente di densità

Nella centrifugazione in gradiente di densità si ottengono una migliore precisione e migliore purificazione. Viene preparata una provetta con un certo gradiente. Il gradiente viene determinato da concentrazioni diverse di zuccheri. Vengono aggiunti i componenti che si devono separare. I componenti vengono recuperati per frazioni.

8.6.4.2.1 Centrifugazione isopicnica Nella centrifugazione isopicnica il fondo del gradiente è più denso rispetto a qualsiasi particella: si posizionano nella porzione in cui la densità di gradiente è uguale alla loro.

8.6.4.2.2 Centrifugazione zonale Nella centrifugazione zonale il fondo del gradiente è meno denso delle particelle. Le particelle più pesanti andranno a depositarsi sul fondo secondo il coefficiente di sedimentazione. Il coefficiente di sedimentazione tiene conto di forma, densità e struttura della particella.

8.6.4.3 Precipitazione differenziale dei virus

Nella precipitazione differenziale dei virus vengono utilizzati il solfato di ammonio o glicol polietilenico, precipitazioni di proteine. Viene aggiunto il solfato di ammonio fino a portare la sua concentrazione a un livello appena inferiore al punto di precipitazione del virus. Dopo aver rimosso i contenuti precipitati si aumenta la concentrazione del solfato d'ammonio per precipitare i virus stessi.

8.6.4.4 Denaturazione dei contaminanti

Nella denaturazione dei contaminanti vengono utilizzati calore, *pH* e solventi organici. Questo viene fatto in quanto alcuni virus tollerano il trattamento con solventi organici come il cloroformio. Il trattamento con solventi viene usato per denaturare i contaminanti proteici e per estrarre i lipidi. Il virus rimane nella fase acquosa, i lipidi si dissolvono nella fase organica mentre le sostanze denaturate dai solventi si raccolgono in corrispondenza dell'interfaccia tra le due fasi.

8.6.4.5 Digestione enzimatica dei costituenti delle cellule ospiti

Si usano le proteasi come tripsina e nucleasi come ribonucleasi per rimuovere proteine e acidi nucleici cellulari.

8.7 Particelle sub-virali

Si dicono particelle sub-virali particelle con proprietà simili a virus e ad altri organismi patogeni.

8.7.1 Viroidi

I viroidi sono delle piccole molecole di RNA circolare a singolo filamento (250-400bp) e sono spesso causa di malattie delle piante. L'RNA non contiene geni che codificano proteine e dipendono totalmente dalle funzioni dell'ospite per la loro replicazione. Formano delle strutture secondarie che assomigliano a molecole a doppio filamento. I viroidi entrano nell'ospite attraverso una ferita e si replicano nel nucleo della cellula ospite con l'aiuto della RNA polimerasi dell'ospite. Hanno il ruolo di RNA regolatori che interferiscono con le normali funzioni dell'ospite.

8.7.2 Prioni

I prioni hanno una struttura interamente proteica. Un prione è responsabile della *BSE* (encefalopatia spongiforme bovina, anche chiamata mucca pazza). Questa malattia può infettare l'uomo e causa una variante della malattia di Kreutzfeldt-Jakob, caratterizzata da aggregati della proteina prionica del cervello causata alla perdita di solubilità delle proteine. La forma normale del prione *PrP^c* è repressa nelle cellule nervose e viene modificata nella forma anomala *PrP^{sc}*. Quest'ultima mostra una certa resistenza alla proteasi ed è insolubile, portando così alla formazione di aggregati. Il prione non si replica autonomamente. Infatti, converte la proteina normale cellulare in una forma patogena inducendo uno stato conformazionale auto-propagante.

Capitolo 9

Regolazione metabolica

9.1 Introduzione

Per poter sopravvivere in natura i microrganismi devono essere in grado di rispondere ai cambiamenti delle condizioni ambientali. Grazie all'aiuto delle mappe metaboliche si possono notare strutture complesse dove i punti e le linee rappresentano rispettivamente i composti e le reazioni enzimatiche che portano alla loro formazione. I due meccanismi centrali sono la glicolisi e il ciclo di Krebs. Per coordinare in modo efficiente le loro reazioni chimiche, le cellule devono regolare il tipo e la quantità di macromolecole che sintetizzano. La maggior parte dei microrganismi possiede geni che codificano molte più proteine di quante ne siano presenti all'interno della cellula in qualunque condizione di crescita.

9.1.1 Strategie di regolazione

9.1.1.1 Controllo dell'attività enzimatica

Il controllo dell'attività enzimatica è necessario per evitare di produrre proteine inutili. La regolazione avviene a livello post-traduzionale.

9.1.1.2 Controllo della quantità sintetizzata

9.1.1.2.1 Controllo a livello trascrizionale Il controllo a livello trascrizionale determina la trascrizione di un gene utilizzando fattori che interagiscono con il DNA favorendo o bloccando la trascrizione.

9.1.1.2.2 Controllo a livello traduzionale Il controllo a livello traduzionale determina la traduzione dei trascritti in proteine.

9.2 Regolazione dell'attività enzimatica

9.2.1 Inibizione da feedback

In questo tipo di regolazione il prodotto finale di una data via biosintetica a inibire l'attività di un enzima a monte di un pathway. L'inibizione è reversibile: non appena il prodotto finale si esaurisce

la sintesi può riprendere. L'inibizione avviene tramite il legame non covalente del prodotto in un sito allosterico dell'enzima. Viene pertanto detta non covalente. Il legame della molecola nel sito allosterico causa un cambio conformazionale dell'enzima impedendogli il legame nel sito attivo.

9.2.1.1 Esempi

9.2.1.1.1 Pathway ramificato In un pathway ramificato i prodotti finali possono controllare l'enzima specifico della loro sintesi. Quando tutti i prodotti finali sono presenti in concentrazione sufficiente il pathway viene disattivato.

9.2.1.1.2 Isoenzimi Gli isoenzimi sono enzimi isofunzionali che catabolizzano la stessa reazione ma sono soggetti a sistemi di regolazione indipendenti.

9.2.2 Modifica covalente degli enzimi

La modifica covalente degli enzimi generalmente per addizione o delezione di piccole molecole alla proteina come *cAMP*, *ADP*, PO_4^{2-} o CH_3 . Il legame covalente del gruppo modificante provoca un cambiamento conformazionale della proteina modificandone l'attività enzimatica. Viene detta covalente a causa della natura del legame che si forma tra enzima e molecola.

9.2.2.1 Esempi

9.2.2.1.1 Glutammina sintetasi L'enzima glutammina sintetasi viene modificato con l'aggiunta di gruppo *AMP*. Possiede 12 siti di legami per questa molecola e l'attività enzimatica diminuisce con l'aumentare dei gruppi legati.

9.2.3 Processamento delle proteine

Alcune proteine batteriche vengono attivate da dei meccanismi post-traduzionali come il "protein splicing". Queste proteine contengono segmenti simili agli introni detti inteine che devono essere eliminati per rendere la proteina funzionale.

9.2.3.1 Esempi

9.2.3.1.1 Girasi Le girasi sono attivate da un taglio proteolitico.

9.2.3.1.2 Proteasi per la degradazione dei peptidi Le proteasi per la degradazione dei peptidi sono attivate solo quando escono dalla cellula.

9.3 Regolazione a livello trascrizionale

9.3.1 DNA binding proteins *DBP*

Le DNA binding proteins sono proteine che legano il DNA. Sono tipicamente fattori di trascrizione positivi e negativi che possono attivare o inattivare la trascrizione. Sono composte da dimeri o tetrameri che si legano al DNA in determinati punti specifici. Il riconoscimento della basi avviene tramite interazioni non covalenti.

9.3.1.1 Domini di *DBP*

9.3.1.1.1 Elica-giro-elica Il dominio elica-giro-elica è costituito da amminoacidi in grado di creare una struttura ad α -elica composta da un'elica di riconoscimento del DNA e una stabilizzante.

9.3.1.1.2 Zing finger Il dominio zinc finger lega uno ione zinco e presenta due strutture a dito che riconoscono il DNA. Lo zinco è legato a due cisteine e due istidine.

9.3.1.1.3 Leucine zipper Il dominio leucine zipper contiene regioni con residui di leucina regolarmente ripetuti che formano una cerniera. Non interagisce con il DNA direttamente ma tiene unite due α -eliche nella posizione corretta. Le α -eliche interagiscono con il DNA riconoscendolo.

9.3.2 Controllo negativo della trascrizione

Si intende per controllo negativo un controllo effettuato tramite l'azione di un repressore. Induttori e repressori agiscono in modo indiretto: si combinano con le *DBP* che influenzano la sintesi del mRNA.

9.3.2.1 Repressione

Nella repressione gli enzimi che catalizzano la sintesi di uno specifico prodotto non vengono sintetizzati se questo è presente nel mezzo in quantità sufficiente. Un esempio è la produzione di arginina.

9.3.2.1.1 Meccanismo di repressione Il meccanismo di repressione utilizza una molecola co-repressore, tipicamente il prodotto del pathway che si vuole controllare. Quando questo è presente in quantità sufficiente la sintesi del mRNA viene bloccata per risparmiare energia. Il repressore viene pertanto attivato in presenza del co-repressore: il suo legame con il repressore causa un suo cambio conformazionale che porta a un forte aumento di affinità per il DNA. Il repressore si attacca al filamento e causa un ingombro sterico che impedisce alla RNA polimerasi di associarsi al DNA per cominciare la trascrizione. Queste reazioni sono reversibili: in mancanza del co-repressore la cellula deve essere in grado di ricominciare la traduzione.

9.3.2.2 Induzione

Nell'induzione la sintesi ha luogo solo quando è presente il substrato del pathway regolato. Un esempio è la catabolisi del lattosio.

9.3.2.2.1 Meccanismo di induzione Il meccanismo di induzione utilizza anch'esso una molecola secondaria detta induttore. Il repressore si trova legato stabilmente al DNA. L'induttore, quando presente, si lega al repressore causando ad esso un cambio conformazionale che riduce la sua affinità per il DNA: il repressore si stacca da esso. In questo modo la RNA polimerasi può trascrivere l'operone necessario.

9.3.3 Controllo positivo della trascrizione

Il controllo positivo della trascrizione coinvolge proteine che promuovono il legame della RNA polimerasi al promotore ed all'aumento della sintesi di mRNA. Un esempio è la proteina attivatrice del pathway del maltosio, che non può legarsi al DNA se questo non è presente. I promotori degli

operoni controllati positivamente hanno una sequenza che non assomiglia fedelmente alla sequenza consenso per la RNA polimerasi: anche in presenza del fattore σ corretto ha difficoltà a riconoscerli. La proteina attivatrice aiuta la RNA polimerasi a riconoscere il promotore. La RNA polimerasi viene infatti scortata dalla proteina attivatrice attivata verso il DNA. Se il sito di legame dell'attivatore e il promotore non sono vicini si formano nel DNA strutture a loop che li avvicinano.

9.3.4 Sistemi di controllo globale

I sistemi di controllo globale sono meccanismi di regolazione che rispondono a dei segnali ambientali regolando l'espressione di molti geni diversi.

9.3.4.1 Effetto glucosio

Questo sistema viene chiamato anche repressione da catabolita. In queste condizioni si può osservare una curva di crescita con 2 fasi esponenziali. Questo tipo di crescita è detta crescita diauxica. Quando *E. coli* si trova in presenza di varie fonti di carbonio, il glucosio viene sempre utilizzato per primo dato che è quello più facilmente metabolizzabile. Così facendo gli enzimi che catabolizzano altri substrati vengono repressi. Quando non è più presente abbastanza glucosio la crescita si ferma per poi ricominciare utilizzando il lattosio o un'altra fonte di carbonio. Questa curva è meno veloce perché il processamento è meno veloce.

9.3.4.1.1 Attivatore proteico del catabolismo L'attivatore proteico del catabolismo *CAP* è una proteina che permette il legame della RNA polimerasi al DNA per gli enzimi reprimibili da catabolita. È una proteina allosterica che si può legare al DNA solo se prima viene legata da *cAMP*. In presenza di glucosio la sintesi di *cAMP* da parte dell'adenilato ciclasi viene inibita, causando una diminuzione dei livelli di *cAMP*. La RNA polimerasi non è in grado di legarsi ai promotori dei geni regolati da catabolita.

9.3.4.1.2 Assenza di glucosio e lattosio In assenza di glucosio e lattosio i livelli di *cAMP* sono molto alti. *CAP* si lega sul sito a monte del promotore. Il lattosio non presente attiva il repressore dell'operone *lac*. Nonostante le alte concentrazioni di *cAMP* la trascrizione viene repressa.

9.3.4.1.3 Presenza di glucosio ma assenza di lattosio In presenza di glucosio e assenza di lattosio è presente il repressore che inattiva *lac*. Inoltre i livelli di *cAMP* sono bassi e *CAP* non si lega al sito sul DNA. Viene repressa la trascrizione dei geni.

9.3.4.1.4 Presenza di glucosio e lattosio In presenza di glucosio e lattosio la presenza del lattosio provoca la rimozione del repressore, ma la trascrizione sarà a livelli basali a causa dei bassi livelli di *cAMP* dovuti agli alti livelli di glucosio.

9.3.4.1.5 Assenza di glucosio ma presenza di lattosio In presenza di lattosio ma assenza di glucosio la cellula rimuove il repressore su *lac*, *CAP* si lega al sito di attacco grazie agli alti livelli di *cAMP* e la trascrizione viene attivata in modo efficiente.

9.3.4.2 Risposta stringente

La carenza di amminoacidi causa un blocco della sintesi degli rRNA e dei tRNA. In questo modo non vengono più assemblati nuovi ribosomi.

9.3.4.2.1 Induzione della risposta stringente La risposta stringente viene indotta da 2 nucleotidi di guanina modificati con gruppi fosfato:

- *ppGpp*.
- *pppGpp*.

In carenza di aminoacidi un tRNA scarico può legarsi al ribosoma. Questo attiva la proteina *RelA* che idrolizza gruppi fosfato da *GTP* e *ATP* producendo *ppGpp* e *pppGpp*.

9.3.4.2.1.1 Effetto dei nucleotidi modificati *ppGpp* e *pppGpp* inibiscono la sintesi di rRNA e tRNA interferendo con la RNA polimerasi per l'inizio della trascrizione in corrispondenza dei geni corrispondenti e attiva operoni deputati alla sintesi degli amminoacidi mancanti integrando cofattori di trascrizione.

9.4 Altri sistemi di controllo globale

9.4.1 Fattori σ alternativi

Il fattore σ è una proteina che si attacca alla RNA polimerasi per facilitare l'attacco al DNA dato che riconosce particolare sequenze specifiche. Molti dei geni impegnati nei processi di controllo globale utilizzano fattori σ alternativi. La regolazione è determinata dalla concentrazione o dall'attività di fattori antagonisti *ant* σ dei diversi fattori σ in quanto ogni fattore riconosce nel genoma soltanto un certo gruppo di promotori. Ci sono 7 fattori σ in *E. coli*, 14 in *B. subtilis* dei quali 4 sono specifici per i geni necessari alla formazione dell'endospora. Il fattore σ^{70} è il fattore più diffuso.

9.4.2 Risposta allo shock termico

Nel caso di uno shock termico viene inibita la degradazione del fattore σ^{32} . Questo dà luogo a una massiccia sintesi di proteine codificate da geni sotto il controllo di σ^{32} , in particolare le proteine heat shock *Hsp*.

- La proteina *Hsp70 DnaK* previene l'aggregazione delle proteine neosintetizzate e stabilizza quelle ancora non ripiegate.
- Le proteine *Hsp60 GroEL* e *Hsp10 GroEs* catalizzano il corretto ripiegamento di proteine ripiegate erroneamente.

9.4.3 Quorum sensing

Il quorum sensing è un sistema di regolazione dipendente dalla percezione della densità delle cellule della stessa specie presenti nella popolazione. Permette alle cellule di attivare una particolare risposta biologica soltanto quando un numero sufficiente di cellule sono presenti nell'ambiente circostante.

9.4.3.1 Omoserina lactone

L'omoserina lactone *AHL* viene sintetizzata dalle specie dotate di quorum sensing e diffonde all'esterno della cellula. È un induttore che quando raggiunge una data concentrazione, si combina ad una proteina attivatrice permettendo l'avvio della trascrizione di geni specifici.

9.4.3.1.1 esempi

9.4.3.1.1.1 Regolazione della luminescenza in *Vibrio fischeri* La luminescenza in *Vibrio fischeri* è sotto il controllo dell'operone *lux* che viene indotto dalla proteina *LuxR* in complesso con *AHL*.

9.4.3.1.1.2 Formazione di biofilms di *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas aeruginosa* crea biofilm in presenza di *AHL*.

9.4.3.1.1.3 Produzione di fattori di virulenza in *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus* produce fattori di virulenza in presenza di *AHL*.

9.4.4 Sistema per la sintesi di triptofano - attenuazione

Il sistema per la sintesi di triptofano si basa sulla presenza di un peptide leader (L) a monte dell'operone deputato alla biosintesi di uno specifico aminoacido. Il peptide leader è ricco di triptofano. Questo fenomeno avviene nei procarioti in quanto trascrizione e traduzione avvengono simultaneamente. Il processo dipende dalla velocità con cui traducono i ribosomi.

9.4.4.1 Triptofano abbondante

In condizioni di triptofano abbondante il ribosoma riesce a tradurre rapidamente la sequenza del peptide leader, in questo modo la regione 2 non si può appaiare con la regione 3. Si forma pertanto una struttura a loop nelle regioni 3 e 4 che blocca l'attività della RNA polimerasi.

9.4.4.2 Carenza di triptofano

In caso di carenza di triptofano il peptide leader viene sintetizzato lentamente e nasce una struttura ansa-stelo alternativa nella regione 2-3 che impedisce la formazione dell'ansa nel sito di terminazione 3-4: la trascrizione e traduzione procedono normalmente portando alla sintesi di triptofano.

9.4.5 Trasduzione di segnale e sistemi di regolazione a due componenti

9.4.5.1 Componenti

9.4.5.1.1 Proteina di membrana La proteina di membrana, con il ruolo di sensore ha un'attività chinasi ed è in grado di autofosforilarsi. Il gruppo fosfato viene trasmesso alla proteina regolatrice della risposta.

9.4.5.1.2 Proteina regolatrice della risposta La proteina regolatrice della risposta è una proteina che lega il DNA e regola la trascrizione. La sua attività è regolata da gruppi fosfato.

9.4.5.1.3 Fosfatasi Le fosfatasi sono enzimi che rimuovono il gruppo fosfato dalla proteina regolatrice. Riportano pertanto il sistema allo stato di riposo.

9.4.5.2 Pressione osmotica

Le porine *OmpC* e *OmpF* sono porine che permettono ai metaboliti di attraversare la membrana esterna dei Gram⁻. La loro produzione è regolata da *OmpR*. Se la pressione osmotica è alta viene sintetizzato *OmpC* in quanto ha un poro più stretto, altrimenti *OmpF*.

9.4.5.3 Assimilazione dell'azoto

L'assimilazione dell'azoto coinvolge *NR1* che attiva la RNA polimerasi su promotori che richiedono il fattore σ^{54} .

9.4.5.4 Regolazione anaerobica di nitrati e nitriti

La regolazione anaerobica di nitrati e nitriti coinvolge 2 chinasi sensore e diversi regolatori.

9.4.5.5 Chemiotassi

La chemiotassi è un esempio di sistema di regolazione a due componenti. *MCP* rileva una varietà di composti attraenti o repellenti e svolge il ruolo di sensore. Possono legare direttamente le sostanze attraenti o repellenti o interagire con proteine di legame periplasmatiche. *CheW* e *CheA* sono chinasi sensore che si autofosforilano quando *MCP* si lega a una sostanza. *CheY* e *CheB* sono regolatori della risposta a cui viene ceduto il gruppo fosfato di *CheA*.

9.4.5.5.1 Controllo della regolazione del flagello La rotazione del flagello viene controllata da *CheY-P*. Questa proteina induce al motore del flagello di ruotare in senso orario. *CheY* non fosforilato o defosforilato da *CheZ* non può legarsi al motore del flagello che continua a ruotare in senso antiorario.

9.4.5.5.2 Attraenti Gli attraenti diminuiscono la frequenza di autofosforilazione e consentono alla cellula di proseguire nel suo moto di avanzamento regolare.

9.4.5.5.3 Repellenti I repellenti aumentano la frequenza di autofosforilazione permettendo al flagello di cambiare frequentemente la direzione della corsa per allontanarsi dalla sostanza.

9.4.5.5.4 Il processo di adattamento Il processo di adattamento consente alla cellula di ripristinare il sistema di regolazione. *CherR* aggiunge gruppi metilici a *MCP*, mentre *CheB-P* li rimuove. Il livello di metilazione di *MCP* influenza la conformazione e controlla l'adattamento a un dato segnale: concentrazioni persistenti di una sostanza causano una riduzione della risposta. Il fattore decisivo per questo tipo di regolazione è pertanto il cambiamento di concentrazione di attrattante o repellente nel tempo.

9.4.6 La regolazione mediata da RNA e i riboswitches

I *sncRNA*, small non coding RNA sono lunghi tra i 40 e i 400nt e non codificano proteine. Regolano l'espressione genica e mostrano regioni di complementarità con alcuni mRNA.

9.4.6.1 RNA antisense

Gli sncRNA antisense hanno una sequenza nucleotidica complementare a quella di alcuni mRNA. Si legano ad esso mediante appaiamento delle basi bloccando la sua traduzione formando una doppia elica di RNA che viene rapidamente degradata da ribonucleasi.

9.4.6.2 Riboswitches

I riboswitches sono mRNA che contengono a monte delle regioni codificanti sequenze in grado di legare piccole molecole. La molecola che si lega a un ribo-interruttore è quella sintetizzata dal mRNA che lo contiene.

9.4.6.2.1 Conformazioni

9.4.6.2.1.1 Assenza del metabolita In assenza del metabolita la sequenza di Shine-Dalgarno può legarsi e avviare la traduzione.

9.4.6.2.1.2 Presenza del metabolita In presenza del metabolita il riboswitch assume una struttura secondaria rendendo inaccessibile la sequenza di Shine-Dalgarno e bloccando pertanto la traduzione.

Capitolo 10

Controllo della crescita microbica

10.1 Introduzione

Il controllo della crescita microbica tiene conto delle caratteristiche biologiche dei microrganismi da selezionare e non dell'ambiente in cui vivono.

10.1.1 Metodi di controllo

10.1.1.1 Sterilizzazione

La sterilizzazione consiste nell'uccisione o rimozione di tutti gli organismi vivi all'interno di un terreno di crescita.

10.1.1.2 Inibizione

L'inibizione consiste nella riduzione della crescita microbica causata da diminuzione del numero di organismi presenti o da alterazioni nell'ambiente microbico.

10.1.1.3 Decontaminazione

La decontaminazione consiste nel trattamento di oggetti o superfici che permette il loro utilizzo senza rischio di contaminazione.

10.1.1.4 Disinfezione

La disinfezione è un processo che colpisce direttamente i microrganismi, uccidendone o inibendone la crescita.

10.1.1.5 Pastorizzazione

La pastorizzazione consiste nella riduzione della carica microbica nei liquidi sensibili al calore con lo scopo di distruggere tutti i microrganismi patogeni e ridurre il numero dei microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti.

10.1.2 Categorizzazione di agenti o trattamenti antimicrobici in base al loro effetto sul batterio

Si possono dividere gli agenti o i trattamenti antimicrobici in base all'effetto che hanno sul batterio.

10.1.2.1 Battericida

Un agente battericida è un agente antimicrobico che uccide i microrganismi. La conta vitale subisce una deflessione, mentre la conta totale rimane costante. Le cellule morte non perdono integrità.

10.1.2.2 Batteriolitico

Un agente batteriolitico è un agente antimicrobico che uccide i microrganismi provocandone la lisi. Avviene una totale distruzione della cellula: si nota sia un calo della conta vitale sia nella conta totale.

10.1.2.3 Batteriostatico

Un agente batteriostatico è un agente antimicrobico che inibisce la crescita dei microrganismi. Dopo la sua aggiunta, la conta totale e la conta vitale rimangono costanti.

10.2 Metodi fisici

È possibile controllare la crescita microbica attraverso trattamenti fisici solo se vengono applicati a oggetti o terreni di coltura. Non si può applicare a sistemi in vivo in quanto portano alla morte dell'organismo.

10.2.1 Calore

10.2.1.1 Caldo umido

Esempi di controllo della crescita attraverso caldo umido sono bollitura, autoclave, pastorizzazione e sterilizzazione.

10.2.1.1.1 Sterilizzazione mediante calore La letalità dovuta all'incremento della temperatura è una funzione esponenziale: il tempo necessario per uccidere una determinata frazione di cellule è indipendente dal numero di cellule iniziale.

10.2.1.1.1.1 Tempo di riduzione decimale Viene definito il tempo di riduzione decimale come il tempo necessario per ridurre di dieci volte a una data temperatura la densità della popolazione.

10.2.1.1.1.2 Grafici Nei grafici viene utilizzato sull'asse delle ascisse il tempo in scala lineare. Sull'asse delle ordinate si trova il numero di microbi in scala logaritmica. Si nota come le sostanze e i trattamenti battericidi uccidono una percentuale costante di cellule per ogni intervallo di tempo. Questo si nota tracciando una retta che rappresenta la decrescita esponenziale e indica un tasso di morte costante. Una diminuzione di un ordine di grandezza corrisponde a una diminuzione del 90%. Si nota come gli organismi che resistono meglio al calore sono quelli che formano endospore.

10.2.1.1.1.3 Tempo di inattivazione termica Il tempo di inattivazione termica indica il tempo necessario affinché tutte le cellule di una coltura siano morte a causa del calore. Dipende dal numero di cellule iniziale.

10.2.1.1.2 Autoclave

10.2.1.1.2.1 Composizione L'autoclave è un macchinario composto da una camera a chiusura ermetica che permette l'immissione di vapore sotto pressione. È presente inoltre un tubo per l'immissione del vapore e un tappo ermetico. Un sistema di raffreddamento velocizza il processo a 20 minuti.

10.2.1.1.2.2 Procedura La procedura di utilizzo di un'autoclave prevede il riscaldamento a pressione di $1.1 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$ che consente di raggiungere una temperatura di 121° . La morte dei microrganismi viene provocata dall'alta temperatura che viene raggiunta in condizioni di vapore. Se non venisse aumentata la pressione la temperatura di ebollizione sarebbe 100° , che non permetterebbe l'uccisione delle endospore. La temperatura dell'oggetto aumenta più lentamente rispetto a quella dell'autoclave. Per verificare la sterilizzazione si può utilizzare un nastro che diventa di colore nero se la sterilizzazione è avvenuta nel modo corretto. Un altro metodo è un'ampolla con un terreno di crescita con indicatore di pH . Durante l'autoclavaggio si rompe l'ampolla e l'indicatore viene esposto al terreno di coltura. Se dopo il ciclo l'indicatore resta rosso le endospore sono morte.

10.2.1.1.3 Pastorizzazione La pastorizzazione è un processo che utilizza una temperatura controllata per ridurre la carica microbica nel latte e in altri alimenti particolarmente sensibili al calore. Lo scopo di questo processo è prevenire la diffusione di patogeni e procrastinare della crescita di microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti.

10.2.1.1.3.1 Batteri uccisi dalla pastorizzazione

- *Listeria monocytogenes*.
- Specie di *Campylobacter*.
- *Escherichia Coli* O15:H7.
- *Salmonella*.

10.2.1.1.3.2 Pastorizzazione istantanea Nella pastorizzazione istantanea piccoli volumi vengono riscaldati a 72° per 15 secondi.

10.2.1.1.3.3 Pastorizzazione di massa Nella pastorizzazione di massa grandi volumi vengono riscaldati a $63-66^\circ$ per 30 minuti.

10.2.1.1.3.4 Pastorizzazione *UHT* Nella pastorizzazione *UHT* o flash heating i volumi vengono colpiti da un getto di vapore a 134° per 1 secondo.

10.2.1.1.3.5 Sterilizzazione *UHT* Nella sterilizzazione *UHT* i volumi vengono colpiti da un getto di vapore a 140° per 1-3 secondi. Il processo viene seguito da un rapido raffreddamento.

10.2.1.2 Caldo secco

Esempi di controllo della crescita attraverso caldo secco sono aria calda o incenerizzazione. È meno efficace rispetto al caldo umido in quanto l'acqua ha una capacità calorifica dell'acqua ed è pertanto un veicolo più efficiente per trasmettere la temperatura. Viene utilizzato per sostanze che tollerano umidità come le polveri. Avviene tipicamente a 170° per un'ora.

10.2.1.3 Refrigerazione e congelamento

Il freddo rallenta o ferma il metabolismo microbico.

10.2.1.3.1 Refrigerazione La refrigerazione $0-8^{\circ}$ inibisce la crescita della maggioranza dei patogeni umani.

10.2.1.3.2 Congelamento Il congelamento $< 0^{\circ}$ lento consente la formazione di cristalli di ghiaccio che danneggiano le membrane dei microorganismi. È per questo motivo migliore rispetto ad un congelamento rapido.

10.2.1.4 Essiccazione e liofilizzazione

I processi di liofilizzazione ed essiccazione inibiscono la crescita microbica in quanto le reazioni metaboliche si svolgono in soluzione acquosa. La liofilizzazione combina il congelamento rapido con azoto liquido seguito dalla rimozione dell'acqua tramite sublimazione.

10.2.2 Trattamenti fisici alternativi

10.2.2.1 Sterilizzazione con radiazioni

10.2.2.1.1 Sterilizzazione mediante radiazioni non ionizzanti Le radiazioni non-ionizzanti hanno una lunghezza d'onda maggiore di $1nm$. Vengono utilizzati raggi *UV* in quanto sufficientemente energetici. Inducono la formazione di dimeri di pirimidina nel DNA. Non penetrano nella materia e sono usate per sterilizzare le superfici, acqua e liquidi trasparenti.

10.2.2.1.2 Sterilizzazione mediante radiazioni ionizzanti Le radiazioni ionizzanti hanno una lunghezza d'onda minore di $1nm$, possono produrre ioni che interagiscono con le macromolecole biologiche rompendo legami idrogeno o producendo ioni OH^+ . L'irradiazione con fascio di elettroni è molto efficace ma non penetra nella materia. Lo standard per la sterilizzazione è dato dalla dose di radiazione assorbita. Viene espressa in rad o in Gy (Gray). La relazione tra frazione di sopravvivenza microbica su scala logaritmica e dose di radiazioni è lineare. La dose letale standard per una sterilizzazione completa è 12 volte *D10* ed è:

- $39600Gy$ per *Clostridium botulinum*.
- $10Gy$ per l'uomo.
- $2400Gy$ per *Salmonella typhimurium*.

10.2.2.2 Sterilizzazione per filtrazione

La sterilizzazione per filtrazione viene utilizzata per sterilizzare soluzioni sensibili al calore. Necessita di usare un dispositivo in grado di trattenere microorganismi di dimensioni comprese tra 0.3 e $10\mu m$.

10.2.2.2.1 Filtri a spessore I filtri a spessore sono costituiti da strati fibrosi di carta, amianto o lana di vetro. Vengono usati come pre-filtri per la rimozione delle particelle di maggiore dimensione che potrebbero intasare quelli utilizzati nel processo di sterilizzazione. Viene usata nei sistemi di condizionamento, filtri *HEPA* delle cappe biologiche.

10.2.2.2.1.1 Cappe biologiche Nelle cappe biologiche si crea un flusso di aria laminare che evita che l'aria contaminata e quella di laboratorio si mescolino. Il flusso passa attraverso i filtri *HEPA* che trattengono i microbi permettendo un sistema di ricircolo dell'aria.

10.2.2.2.2 Membrane filtranti Le membrane filtranti vengono usate per la sterilizzazione di liquidi. Sono costituite da dischetti di acetato di cellulosa o nitrocellulosa. Modificando le condizioni di polimerizzazione può essere controllata la dimensione dei pori, che va da 0.1 a 10µm. Esistono diverse membrane filtranti in base a se si vogliono filtrare batteri di grandi dimensioni o tutti i batteri e i virus più grandi.

10.2.2.2.3 Filtro nucleopore Il filtro nucleopore viene prodotto trattando un sottile strato di policarbonato con un componente chimico corrosivo. Vengono usati per la preparazione di campioni per la microscopia elettronica in quanto l'organismo viene facilmente rimosso dalla fase liquida e viene distribuito su un unico piano della superficie del filtro.

10.3 Metodi chimici

10.3.1 Agenti antimicrobici

Un agente antimicrobico è un composto chimico che uccide i microbi o ne inibisce la crescita. Il suffisso “-cida” indica un agente antimicrobico che uccide i microorganismi, mentre il suffisso “-statico” indica un agente che inibisce la crescita dei microorganismi.

10.3.1.1 Fenolo

Il fenolo e i derivati fenolici hanno attività antisettica di medio-basso livello: denaturano le proteine e distruggono la membrana.

10.3.1.2 Alcol

Gli alcol sono battericidi, fungicidi e virucidi. Non hanno effetto contro le endospore. Sono disinfettanti di livello intermedio come isopropanolo e etanolo. Distruggono le membrane cellulari e denaturano le proteine.

10.3.1.3 Alogeni

Gli alogeni sono disinfettanti di livello intermedio e sono attivi contro batteri vegetali, funghi, loro spore, alcune endospore, cisti dei protozoi e molti virus. Denaturano le proteine.

10.3.1.4 Agenti ossidanti

I perossidi, ozono e peracidi uccidono i microbi ossidando i loro enzimi e rendendoli indisponibili per il metabolismo.

10.3.1.5 Surfattanti

I surfattanti sono prodotti chimici che riducono la tensione superficiale dell'acqua riducendo l'attrazione tra le molecole. Si possono aggregare in micelle come saponi e detergenti. Risciacquano i batteri ma non li uccidono.

10.3.1.6 Metalli pesanti

Gli ioni di metalli pesanti sono antimicrobici in quanto si combinano con lo zolfo nella cisteina alterando la tridimensionalità della proteina e la sua funzione.

10.3.1.7 Aldeidi

Le aldeidi sono composti organici che denaturano le proteine e inattivano gli acidi nucleici.

10.3.1.8 Agenti gassosi

Alcuni gas che denaturano le proteine e DNA sono ossido di etilene, ossido di propilene e il β -propiolattone.

10.3.2 Controllo della crescita in vivo

10.3.2.1 Scoperta della penicillina

Nel 1929 Alexander Fleming riporta per la prima volta l'azione antibatterica della penicillina, prodotta da *Penicillium chrysogenum* un fungo.

10.3.2.2 Antibiotici

Gli agenti che vengono utilizzati per controllare la crescita batterica in vivo, che sia per uso clinico o veterinario, sono detti antibiotici. Esistono antibiotici naturali, semisintetici e sintetici. Gli antibiotici agiscono solamente contro i batteri. Vengono prodotti da funghi o batteri.

10.3.2.2.1 Caratteristiche degli antibiotici

1. Sono farmaci salva-vita.
2. Trattano solamente infezioni batteriche.
3. Ci sono molti rischi se vengono assunti senza prescrizione medica.

10.3.2.2.2 Terapia antimicrobica in vivo La terapia antimicrobica in vivo è molto complessa: è difficile trovare delle molecole che rispettino tutte le caratteristiche necessarie.

10.3.2.2.2.1 Caratteristiche

- Tossicità selettiva: uccisione di microbi e preservazione dell'organismo ospite.
- Drug delivery: deve raggiungere la regione bersaglio senza essere alterata.
- Deve arrivare al sito target con la giusta concentrazione.

10.3.2.2.2.2 Complicazioni

- Ritezione del farmaco: l'ospite può degradare o disattivare l'antibiotico.
- Utilizzo di un farmaco errato: bisogna conoscere lo spettro di resistenza prima di
- Problemi di delivery.
- Tossicità sull'ospite, reazioni allergiche, alterazioni del microbioma interno.

10.3.2.2.2.3 Problematiche

- Pericolo di sviluppo di resistenza.
- Pericolo di rilascio di tossine dopo la lisi. Esotossine e endotossine provenienti dalla parte lipidica che portano ad un peggioramento nell'ospite dopo il trattamento. In particolare da Gram—.

10.3.2.2.2.4 Accorgimenti

- Uso corretto e per il giusto periodo.
- Possibilità di utilizzare varie tipologie di antibiotici in cicli sequenziali.

10.3.2.2.2.5 Caratteristiche dell'antibiotico ideale

- Disponibilità.
- Basso costo: deve essere facile da preparare, poco dispendioso e molto vendibile.
- Chimicamente stabile per trasporto e stoccaggio.
- Semplice da somministrare.
- Non allergenico.
- Tossicità selettiva.

Nessuna molecola possiede contemporaneamente queste caratteristiche.

10.3.2.2.2.6 Super infections Si intende per super infections infezioni dovute a microbi alterati in modo da essere resistenti agli antibiotici o che possono causare infezioni secondarie.

10.4 Misurazione dell'attività antimicrobica**10.4.1 Test di Kirby-Bauer**

Il test di Kirby-Bauer viene utilizzato per determinare la suscettibilità o la resistenza di un determinato batterio a una cura con un certo antibiotico. Viene formato un tappeto uniforme di batteri in cui vengono posti dei dischetti imbevuti di antibiotici diversi. Poi si misurano gli aloni di inibizione, che sono le zone che si trovano intorno al disco in cui i batteri non sono stati in grado di crescere. Va comunque indagata anche la sopportazione dell'organismo all'agente usato.

10.4.2 Test di Minimum Inhibitory Concentration *MIC*

Si intende per *MIC* la minore concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita batterica. Vengono poste uguali quantità di batteri in una serie di tubi in cui vengono aggiunte delle soluzioni con differenti concentrazioni di antibiotici diversi. Una volta avvenuta l'incubazione, la torbidità indica la crescita batterica e quindi la sua assenza individua i tubi dove i batteri o sono stati uccisi o la replicazione è stata bloccata. Per misurare la *MIC* viene utilizzato il metodo dell'assorbanza.

10.4.3 Etest

L'Etest associa le caratteristiche del test di Kirby-Bauer con il test *MIC*. Si basa su una coltura in terreno solido dove viene applicato uno striscio che contiene concentrazioni differenti di antibiotico. Data la concentrazione diversa si ottiene un alone di inibizione a forma di goccia. Questo permette di avere una lettura immediata per trovare il *MIC* dove comincia la goccia di inibizione.

10.4.4 Minimum bactericidal concentration (MBC)

Il test *MBC* è un'estensione del test *MIC* e determina la concentrazione minima necessaria di antibiotico per uccidere i batteri presenti. Si prendono le provette utilizzate per *MIC* e le si piastra su terreni di coltura senza antibiotico. Questo assicura di trovarsi in presenza di antibiotici battericidi che portano alla morte di tutti i batteri e non solo di quello batteriostatici, che vanno ad inibire la crescita dei microrganismi.

10.5 Meccanismi di azione degli antibiotici

10.5.1 Tipologie di meccanismi di azione

- Inibizione della sintesi della parete cellulare: β lattamici e glicopeptidi.
- Inibizione della sintesi delle proteine: amminoglicosidi.
- Inibizione delle vie metaboliche.
- Inibizione della sintesi di acidi nucleici.
- Inibizione del riconoscimento o attacco del patogeno al suo ospite, colpiscono fattori di virulenza e le patogenicità frequenti.

10.5.2 Classificazione degli antibiotici

- Aminoglicosidi e tetracicline: inibiscono la sintesi proteica legando la subunità 30S dei ribosomi batterici.
- β -lattamici e glicopeptidi: interferiscono con la sintesi della parete batterica.
- Fluoroquinolones: inibiscono l'attività della DNA girasi o topoisomerasi coinvolti nella replicazione del DNA.
- Macrolidi: inibiscono la sintesi proteica legando la subunità 50S dei ribosomi batterici.
- Sulfonamidi: inibiscono la biosintesi dell'acido folico.

10.5.3 Inibizione della sintesi della parete cellulare

La parete cellulare dei batteri è composta da macromolecole di peptidoglicano formato a sua volta da catene di *NAM-NAG* che sono legate da ponti peptidici tra le subunità di *NAM*. Al processo di inibizione della sintesi della parete prendono parte due classi di antibiotici.

10.5.3.1 β lattamici

Gli antibiotici β -lattamici come cefalosporine e penicillina rappresentano quasi la metà delle 500 tonnellate di antibiotici che vengono utilizzati ogni anno. Agiscono solamente sui batteri in fase di divisione. Sono presenti dei composti con gruppi funzionali differenti tra loro. Tutti presentano l'anello β -lattamico che impedisce la formazione dei legami crociati peptidici tra subunità di *NAM* del peptidoglicano. Si legano con gli enzimi transpeptidasi indebolendo progressivamente la parete in quanto le catene di peptidoglicano non sono più unite tra loro. La cellula non è in grado di resistere alla pressione osmotica e va incontro alla lisi.

10.5.3.1.1 Tipologie

10.5.3.1.1.1 Penicilline naturali Un esempio di penicillina naturale è la benzilpenicillina.

10.5.3.1.1.2 Penicilline semisintetiche Le penicilline semisintetiche non sono presenti in natura e hanno un'attività più efficiente rispetto alla penicillina naturale. Esempi sono Meticillina, l'Oxacillina, l'Ampicillina e la Carbenicillina. Vantaggi:

- Sono attive anche contro i Gram $-$. stomaco.
- Sono resistenti alla β -lattamasi.
- Sono più stabili in ambiente acido, come lo • Vengono assorbite più facilmente dall'epitelio intestinale.

10.5.3.2 Glicopeptide

I glicopeptidi hanno il compito di legare il ponte peptidico in corrispondenza di ogni filamento prima che la transpeptidasi possa agire. Questa classe di antibiotici riconosce i ponti peptidici e si legano ad essi prima che gli enzimi deputati alla loro fusione possano essere in grado di assemblarli. Si ottiene una cellula debole, che non ha la capacità di far fronte alla forza osmotica.

10.5.3.2.1 Esempi

10.5.3.2.1.1 Vancomicina La vancomicina interferisce con la formazione dei ponti *Ala-Ala* dei legami crociati nei Gram $+$.

10.5.3.2.1.2 Bacitracina La bacitracina blocca la defosforilazione del bacitroprenolo, inibendo la secrezione delle subunità *NAM* e *NAG* del citoplasma.

10.5.3.2.2 Efficacia Questi antibiotici hanno efficacia solo nei confronti di cellule in divisione attiva. Un batterio ha la possibilità di diventare resistente a questa classe modificando l'ultimo aminoacido della sequenza del ponte. In questo modo l'antibiotico non è capace di riconoscere più le catene visto che si viene a creare un legame imperfetto.

10.5.3.3 Isoniziade ed etambutolo

I batteri del genere *Mycobacterium*, agenti del morbo di Hansen o lebbra e della tubercolosi, presentano una parete cellulare peculiare contenente uno strato di acidi micolici e arabinogalactan. L'isoniziade e l'etambutolo inibiscono la formazione di questo involucro.

10.5.4 Inibizione della sintesi proteica

La tossicità selettiva di alcuni antibiotici si basa sulle lievi differenze strutturali tra ribosomi procariotici ed eucariotici. Metodi innovativi sono acidi nucleici antisenso, DNA o RNA complementari a mRNA codificanti per proteine essenziali.

10.5.4.1 Aminoglicosidi

Gli aminoglicosidi alterano la struttura della subunità 30S portando alla lettura erronea dei codoni e all'incorporazione di aminoacidi scorretti.

10.5.4.2 Tetracicline

Le tetracicline bloccano il sito di legame del tRNA impedendo l'allungamento della proteina.

10.5.4.3 Cloramfenicolo

Il cloramfenicolo blocca l'attività enzimatica della subunità 50S impedendo la formazione dei legami peptidici.

10.5.4.4 Macrolidi

Le macrolidi come l'eritromicina legano la subunità 50S interferendo con il movimento del ribosoma lungo la molecola di mRNA.

10.5.5 Distruzione della membrana citoplasmatica

Alcuni antibiotici agiscono sulla membrana citoplasmatica danneggiandola o distruggendola. Sono detti polieni.

10.5.5.1 Anfotericina

L'anfotericina è un poliene fungicida: si lega a steroidi specifici dei funghi come l'ergosterolo formando pori e causando la lisi cellulare.

10.5.5.2 Azoli e allilamine

Azoli e allilamine sono due classi di antibiotici fungicidi. Agiscono inibendo la sintesi dell'ergosterolo. La membrana cellulare non rimane intatta e la cellula muore.

10.5.5.3 Polioxina

La polioxina è un antibiotico che si attacca agli *LPS* dei Gram⁻, ma ha effetti tossici sulle cellule dell'ospite.

10.5.6 Inibizione delle vie metaboliche

Se esistono differenze metaboliche tra un patogeno e l'ospite possono essere usati antibiotici per colpirle.

10.5.6.1 Sulfamidici

I sulfamidici agiscono come antibiotici antimetabolici in quanto sono analoghi strutturalmente al *PABA*, un acido cruciale per la sintesi dei nucleotidi di DNA ed RNA. Questo viene trasformato in acido diidrofolico e in acido tetraidrofolico usato per la sintesi dei nucleotidi. La sulfanilammide e i suoi derivati competono con il *PABA* per il sito attivo dell'enzima coinvolto e diminuisce il numero di nucleotidi disponibili fino alla morte della cellula.

10.5.7 Inibizione degli acidi nucleici

Alcuni antibiotici bloccano la replicazione del DNA o la sua trascrizione. Esistendo poche differenze in questo processo sono colpite sia le cellule del batterio che quelle dell'ospite.

10.5.7.1 Nucleotidi analoghi

I nucleotidi analoghi sono simili ai nucleotidi dei patogeni, ma quando assemblati causano mutazioni e disagi.

10.5.7.2 Chinoloni e fluorochinoloni

I chinoloni e i fluorochinoloni colpiscono la DNA girasi che aiuta la replicazione del DNA nei procarioti.

10.5.7.3 Rifampina

La rifampina agisce legandosi alla subunità β della polimerasi legandosi più specificatamente a quella dei procarioti.

10.6 Farmaci antivirali

La maggior parte dei farmaci attivi sui virus agiscono anche sulle strutture cellulari dell'ospite risultando tossici.

10.6.1 Nucleoside reverse transcriptase

Quelli più utilizzati sono gli analoghi dei nucleotidi o *NRTI*, nucleoside reverse transcriptase inhibitors, che inibiscono l'allungamento nucleico virale controllato da una polimerasi.

10.6.2 Non-*NRTI*

Altri agenti non-*NRTI* inibiscono direttamente la trascrittasi inversa dei retrovirus.

10.6.3 Inibitori di proteasi

Gli inibitori di proteasi inibiscono la replicazione virale inibendo il processamento dei polipeptidi virali.

10.6.4 Inibitori di fusione

Gli inibitori di fusione legano proteine di membrana e prevengono le modifiche conformazionali necessarie per la fusione della membrana virale con quella delle cellule ospite.

10.6.5 Interferoni

Gli interferoni sono glicoproteine prodotte dal sistema immunitario in risposta all'infezione di alcuni virus. Si legano alla membrana delle cellule e ne stimolano la produzione di enzimi antivirali.

10.7 Progettazione di nuovi farmaci

10.7.1 Progettazione computerizzata di farmaci virali

Nuove tecnologie hanno permesso scoperte importanti nello studio di macromolecole: Modelli 3D fedeli permettono lo studio e creazione di farmaci in base a predizioni computazionali, creando molecole che possono interagire specificatamente con il target. Esempi sono il saquinavir e l'indinavir. Una proteasi del HIV è capace di smagliare una proteina precursore inibendo la lavorazione dei precursori e la maturazione del HIV.

10.7.2 Chimica combinatoriale

La chimica combinatoriale è utile per la ricerca di nuovi farmaci antimicrobici: si modifica in maniera sistematica nuovi prodotti antimicrobici per generarne analoghi.

Capitolo 11

Antibiotico resistenza

11.1 Introduzione

Si intende per resistenza la capacità intrinseca o acquisita di un microorganismo di resistere agli effetti di un agente chemioterapico.

11.1.1 Esperimento della Harvard Medical School

L'esperimento consiste in una piastra divisa in 9 bande con all'interno un antibiotico in gradiente di concentrazione. Alle estremità, con concentrazione minore si sviluppano le prime colonie. I batteri si devono spostare nella piastra. Basta un solo batterio mutato per far sopravvivere in 11 giorni la colonia nella zona della piastra dove la concentrazione dell'antibiotico è mille volte superiore a quella inizialmente tollerata. Si può tracciare inoltre un albero delle mutazioni.

11.1.2 Resistenza intrinseca

Diverse cause concorrono alla resistenza intrinseca.

11.1.2.1 Assenza del bersaglio

La resistenza intrinseca può essere dovuta all'assenza del bersaglio su cui agisce l'antibiotico: i micoplasmi non sono dotati di parete e sono resistenti alle penicilline.

11.1.2.2 Impermeabilità all'antibiotico

La resistenza intrinseca può essere dovuta all'impermeabilità dell'organismo all'antibiotico: la membrana esterna dei Gram- è impermeabile alla penicillina *G*.

11.1.2.3 Alterazione chimica dell'antibiotico

La resistenza intrinseca può essere dovuta all'alterazione chimica dell'antibiotico: le β -lattamasi tagliano l'anello β -lattamico delle penicilline.

11.2. SVILUPPO E DIFFUSIONE DELLA RESISTENZA NELLE POPOLAZIONI MICROBICHE

11.1.2.4 Modifica del bersaglio

La resistenza intrinseca può essere dovuta alla modifica del bersaglio dell'antibiotico come una subunità ribosomiale.

11.1.2.5 Sviluppo di una via biochimica di resistenza

La resistenza intrinseca può essere dovuta allo sviluppo di una via biochimica di resistenza, come l'assorbimento diretto dell'acido folico dall'ambiente che rende inefficienti i sulfonamidici che ne inibiscono la sintesi da parte del microorganismo.

11.1.2.6 Trasporto dell'antibiotico

La resistenza intrinseca può essere dovuta al trasporto dell'antibiotico all'esterno della cellula batterica attraverso sistemi di efflusso.

11.2 Sviluppo e diffusione della resistenza nelle popolazioni microbiche

L'antibiotico resistenza viene trasmessa attraverso trasmissione orizzontale: come trasformazione, trasduzione o coniugazione. In assenza di pressione selettiva le cellule resistenti sono meno efficienti rispetto a quelle sensibili in quanto devono sostenere costi maggiori per la produzione e mantenimento delle funzioni di resistenza. L'antibiotico pertanto favorisce la diffusione della resistenza delle popolazioni aumentando il fitness dei ceppi batterici. Si nota come esiste una relazione tra antibiotici più utilizzati e resistenza ad essi.

11.2.1 Resistenza multipla e cross-resistenza

Un microorganismo è detto multiresistente quando è in grado di resistere all'azione di 3 o più classi diverse di antibiotici. La cross-resistenza è la resistenza acquisita contro diversi antibiotici della stessa classe.

11.2.2 Ritardare la comparsa della resistenza

Per ritardare la comparsa della resistenza si può:

- Programmare trattamenti con concentrazioni e tempi adeguati.
- Limitare l'utilizzo ai casi necessari.
- Utilizzare di agenti microbici in combinazione per sfruttare eventuali sinergie.
- Sviluppare antibiotici semisintetici.

11.3 Metagenomica dell'antibiotico resistenza in batteri ambientali

Si intende per metagenomica lo studio delle comunità microbiche complesse che si trovano nell'ambiente in cui le funzioni di resistenza sono presenti. La resistenza clinica è associata a meccanismi

11.4. FUTURE TERAPIE ANTIVIRALI

che si trovano in modo ambientale. Si devono pertanto considerare gli organismi non patogeni nella ricerca degli antibiotici.

11.3.1 Resistoma

Si intende per resistoma un collezione dei geni che codificano per resistenze antibiotiche e i loro precursori in batteri patogeni e non. Esistono geni di resistenza criptici in uquanto compresi in un cromosoma batterico, ma che non si possono associare con l'antibiotico resistenza.

11.3.2 Batteri nel suolo

I batteri che vivono nel suolo vivono in continua competizione per le risorse e sono spesso in grado di sviluppare resistenze. Questo in quanto la guerra chimica tra i microorganismi ha richiesto la coevoluzione di meccanismi di autoprotezione dai produttori di antibiotici sia l'acquisizione della resistenza in altri procarioti. Questo suggerisce un'origine ambientale della maggior parte dei determinanti della resistenza clonica.

11.3.3 Trasferimento genico dei determinanti della resistenza

I geni che codificano le proteine che mediano il trasferimento genico orizzontale fiancheggiano molti dei geni di resistenza. Tuttavia molti geni di resistenza non sono collegati a tali elementi e i ruoli delle proteine associate sono generalmente sconosciuti. La capacità dei batteri di mobilitare i geni e la pressione selettiva facilitano la distribuzione dei geni di resistenza agli antibiotici a tutte le popolazioni microbiche: il resistoma si espande anche in assenza di selezione continua.

11.3.4 Modello per l'evoluzione dell'antibiotico resistenza

Un modello di consenso è che le proteine di resistenza si evolvono da proteine con funzioni biochimiche alternative che funzionano come precursori di elementi di resistenza. Alcune di queste possono avere modeste funzioni di resistenza e di fronte alla pressione selettiva si evolve in un robusto meccanismo di resistenza.

11.4 Future terapie antivirali

Le future terapie antivirali nascono con lo scopo di avere come obiettivo la virulenza batterica invece di ricorrere a una terapia antimicrobica.

11.4.1 Virulenza

Si intende per virulenza quanto un batterio è aggressivo nei confronti del suo ospite.

11.4.2 Inibire la patogenesi

Questo approccio sembra inibire la patogenesi e le sue conseguenze senza porre un'immediata pressione di vita o morte sul batterio. Strappare ai microorganismi le proprietà virulente senza sottoporle a stress selettivo può essere un modo di controllare la loro crescita senza che si sentano minacciati e sviluppino resistenze.

11.4.3 Elementi di patogenesi

- Adesione del batterio: per esempio in *E. coli* i pili di tipo *I*.
- Tossine batteriche: le tossine sono fattori di virulenza che infettano i tessuti.
- Sistema di secrezione III: spinge le tossine batteriche nella matrice extracellulare.
- Biofilm: ingombro fisico agli antibiotici.
- Quorum sensing.

Capitolo 12

Patogenicità batterica

Capitolo 13

Laboratorio

13.1 Prima esperienza - preparazione del terreno di coltura sterile

13.1.1 Introduzione

13.1.1.1 Categorie di terreni batterici

13.1.1.1.1 Determinazione in base allo stato fisico In base allo stato fisico i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni liquidi o brodi: usati per la coltivazione batterica.
- Terreni solidi o gel: usati sia che per la coltivazione batterica che per l'isolamento. Sono terreni liquidi gelificati tramite *AGAR*, sostanza polisaccaride isolata da un'alga rossa in Giappone. Gelifica a temperature inferiori ai 45%.

13.1.1.1.2 Determinazione in base alla quantità di sostanze In base alla quantità di sostanze presenti i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni minimi: sono utilizzati per la crescita dei soli batteri autotrofi. Contengono solo gli elementi essenziali *N*, *C*, *S*, *P* come sali inorganici in composizione e quantità note.
- Terreni sintetici o definiti: vengono preparati *ad hoc* a seconda delle esigenze nutrizionali del microorganismo. Se ne conosce l'esatta composizione.
- Terreni complessi: permettono la crescita di più organismi con esigenze nutrizionali diverse. Non se ne conosce l'esatta composizione.

13.1.1.1.3 Determinazione in base alla qualità delle sostanze In base alla qualità delle sostanze presenti i terreni batterici si distinguono in:

- Terreni nutritivi: favoriscono la crescita di microorganismi particolari dal punto di vista nutritivo: al terreno vengono aggiunte sostanze nutritive come siero, latte o sangue per favorire una specie specifica.

13.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPO BATTERICO (E. COLI)

- Terreni selettivi: favoriscono la crescita di particolari specie batteriche grazie alla presenza di fattori che inibiscono lo sviluppo di altre specie. I fattori vengono detti sostanze inibenti e possono essere antibiotici, coloranti o sali.
- Terreni differenziali: permettono l'identificazione batterica in relazione all'attività metabolica o aspetti morfologici delle colonie. Questo avviene grazie a particolari substrati o indicatori in grado di dimostrare con una variazione cromatica l'azione metabolica del microorganismo ricercato.

13.1.2 Primo giorno

Per la preparazione di un terreno si utilizza un preparato in polvere pesato accuratamente tramite bilancia digitale.

13.1.2.1 Coltura liquida

Per la preparazione di una coltura liquida si misura una specifica quantità di acqua distillata tramite cilindro e la si aggiunge alla polvere all'interno del contenitore in cui si vuole ottenere il terreno. Una volta mescolata la polvere si posiziona il contenitore all'interno dell'autoclave per la sterilizzazione del terreno mediante pressioni elevate 1.5atm senza bollire il terreno e rovinare il nutriente per 20 minuti. Non bisognerà poi più aprire il contenitore se non sotto cappa, quando viene steso il terreno sulle piastre.

13.1.2.2 Terreni preparati

Vengono preparati 4 terreni di coltura sterili:

- | | |
|---|---|
| • <i>LB agar</i> : terreno di base. | ceppi non capaci di sintetizzare i nutrienti. |
| • <i>LB agar-ampicillina</i> : terreno di coltura selettivo per i terreni ampicillina-resistenti. | • <i>Mueller-Hinton agar</i> : terreno di coltura che non contiene sostanze che interferiscono con antibiotici e si usa per il test per determinare l'antibiotico-resistenza. |
| • <i>Nutrient agar</i> : terreno nutritivo adatto a | |

13.2 Seconda esperienza - Determinazione della curva di crescita di un ceppo batterico (E. coli)

13.2.1 Introduzione

13.2.1.1 Fattori che influenzano la crescita batterica

I fattori che influenzano la crescita batterica sono:

- | | |
|---|--|
| • Nutrienti: fonti di carbonio, energia, acqua, vitamine, azoto e oligoelementi. | aerotolleranti e anaerobi obbligati. |
| • Concentrazioni di sale: divide i batteri in alofili, alotolleranti o alofili estremi. | • <i>pH</i> : divide i batteri in alcalinofili, basofili e neutrofil. |
| • Ossigeno: divide i batteri in aerobi obbligati, aerobi facoltativi, microaerofili, anaerobi | • Temperatura: divide i batteri in psicrofili ($-10-30^{\circ}$), mesofili ($10-50^{\circ}$), termofili ($40-90^{\circ}$) e termofili estremi. |

13.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPO BATTERICO (E. COLI)

13.2.1.2 Quantificazione

13.2.1.2.1 Fasi della crescita microbica

1. Lag: adattamento del batterio alle nuove condizioni.
2. Esponenziale: crescita continua grazie alla presenza di nutrienti. Il tempo di replicazione specifico del batterio influisce sulla velocità: *Mycobacterium tuberculosis* impiega 16 ore, *E. coli* 20 minuti.
3. Stazionaria: ci sono troppi batteri sul terreno e i nutrienti iniziano ad esaurirsi. Gli eventi di replicazione e morte sono in equilibrio tra di loro.
4. Morte: avviene progressivamente la morte per mancanza di nutrienti.

13.2.2 Primo giorno

13.2.2.1 Micropipetta

La micropipetta è uno strumento in grado di prelevare volumi diversi. Possiede una scala graduata.

13.2.2.1.1 Tipologie

- *p20*: da 2µl a 20µl, i numeri letti vanno divisi per 10.
- *p200* da 20µl a 200µl.
- *p1000* da 200µl a 1000µl, i numeri letti vanno moltiplicati per 10.

13.2.2.1.2 Utilizzo

1. Si inserisce un nuovo puntale ogni volta che si cambia sostanza.
2. Si schiaccia lo stantuffo fino al primo scatto per verificare il volume da prelevare.
3. Si inserisce nella sostanza da prelevare e si rilascia lo stantuffo superiore per prelevare
- il volume.
4. Si inserisce nella sostanza il cui volume deve essere rilasciato e si preme lo stantuffo fino in fondo.
5. Si rilascia il puntale tramite un pulsante vicino allo stantuffo.

13.2.2.2 Tempo di generazione

Si intende per tempo di generazione il tempo di duplicazione della massa di una colonia batterica. Questo valore è specifico per ogni specie:

- *E. coli*: 20 minuti.
- *Staphylococcus aureus*: 30 minuti.

13.2. SECONDA ESPERIENZA - DETERMINAZIONE DELLA CURVA DI CRESCITA DI UN CEPPO BATTERICO (E. COLI)

13.2.2.3 Procedimento

1. Inoculo: si prelevano 100 μ l di E. coli da una provetta preparata dagli esercitatori overnight tramite la *p200* e la si inserisce in una beuta con 100mL di brodo. Si ottiene una diluizione 1 : 100 e si mescola.
2. Si preleva 1mL di coltura con una *p1000* e la si pone nella cuvetta in modo da inserirla poi nello spettrofotometro per monitorare la crescita batterica. Si misura la densità ottica e la si annota. Si è ora a $t = 0$. Ci si deve assicurare che lo spettrofotometro sia a $OD = 600\text{nm}$ e che sia stato tarato secondo il brodo sterile o bianco in modo da eliminarne il rumore.
3. Si trasferisce la beuta in uno shaker o incubatore termostato orbitale che la mescola uniformemente e peremette una corretta areazione.
4. Si puliscono micropipetta e cuvetta per mantenerli sterile. Per la cuvetta si getta il brodo nei contenitori e la si risciacqua con acqua distillata. La si fa asciugare a testa in giù su carta assorbente.
5. Si procede allo stesso modo ogni 20 minuti per ottenere un totale di 12 misurazioni.
6. Quando si nota una $OD = 0.8$ si procede con diluizioni 1 : 2 per rimanere nel range di sensibilità dello spettrofotometro: si prelevano 500 μ l di coltura e 500 μ l di terreno. Quando necessario si fa una diluizione 1 : 5 con 200 μ l di coltura e 800 μ l di terreno.
7. Una volta terminate le misurazioni si versa la sospensione nella cuvetta nei rifiuti biologici liquidi e si cestina la cuvetta nei rifiuti biologici solidi. Si versa la sospensione nella bottigliata in vetro da 100ml nei rifiuti biologici liquidi e la si pone nel contenitore con la vetreria da lavare.

13.2.2.4 Analisi dei dati

1. Si effettua un grafico a punti con la curva di crescita microbica tramite i dati ottenuti. Sull'asse delle x si pone il tempo, mentre su quello delle y la densità ottica a 600nm.
2. Si individuano le fasi di crescita osservate durante la crescita microbica.
3. Si calcolano il numero di generazioni e al tempo di generazione della coltura.

Per calcolare il numero di generazioni n dopo un intervallo si usa la formula:

$$N_{t_f} = N_0 \cdot 2^n$$
$$\log N_{t_f} = \log N_0 + n \log 2$$

Dove:

- N_0 è il numero di batteri a $t = 0$.
- N_{t_f} è il numero di batteri a t_f .
- t_f è $\Delta t = t_i - t_0$.

Da cui deriva che il numero di generazioni n è:

$$n = \frac{\log N_{t_f} - \log N_0}{\log 2}$$

Si può anche calcolare il tempo di generazione g avvenute in un $\Delta t = t_2 - t_1$:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{n}$$

13.2.2.4.1 Dati raccolti

N_0	60 000
N_{t_f}	38 000 000
t	300min
n	12.6 generazioni
g	23.8min

13.3 Terza esperienza - Caratterizzazione dei batteri del cavo orale

13.3.1 Introduzione

Nel caso orale si trovano numerosi batteri anche simbiotici in un pattern specifico alla persona in quanto dipende da:

- pH .
- Umidità.
- Nutrienti della dieta.

13.3.1.1 Piastra su agar-sangue

Il risultato del tampone viene seminato su una piastra di agar-sangue con il 5% di sangue di montone. Questo in quanto alcuni batteri come lo Streptococco sono in grado di attuare emolisi, ovvero di degradare i globuli rossi.

13.3.1.1.1 Emolisi Ci sono tre tipi di emolisi:

- Emolisi β o emolisi completa: il sangue viene completamente degradato e il terreno appare giallo.
- Emolisi α o emolisi incompleta: il sangue viene degradato parzialmente e il terreno appare verdognolo.
- Emolisi γ o non-emolisi: il sangue non viene degradato e il terreno rimane rosso.

13.3.1.1.2 Semina sulla piastra

1. Prima patch: si striscia il tampone in modo da occupare la parte superiore della piastra.
2. Seconda patch: si ruota la piastra di 90° e si striscia il tampone in modo che solo qualche strisciata si sovrapponga alla prima patch.
3. Terza patch: si ruota ancora la piastra di 90° e si ripete il procedimento.

13.3.1.2 Morfologia dei batteri del cavo orale

Per identificare le colonie le si distinguono in base a colore, forma, spessore e margini.

13.3.1.2.1 Aspetto

13.3. TERZA ESPERIENZA - CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI DEL CAVO ORALE

- Puntiforme.
- Circolare.
- Filamentoso.
- Irregolare.
- Rizoide.
- Lenticolare.
- Raggiato.

13.3.1.2.2 Rilievo

- Rasato.
- Poco convesso.
- Convesso.
- Pulvinato.
- Umbonato.
- Diffuso.
- Rilevato.
- Cupuliforme.
- Mammellonato.
- Con o senza margine smussato.

13.3.1.2.3 Superficie

- Liscia.
- Rugosa.
- Raggiata.
- Opaca o luccicante.
- Inglobata.
- Asciutta o umida.

13.3.1.2.4 Margini

- Continui
- Interi.
- Ondulati.
- Lobati.
- Erosi.
- Filamentosi.
- Stratificati.
- Diffusi.
- Seghettati.

13.3.1.2.5 Struttura

- Amorfa.
- Granulare.
- Filamentosa.
- Ondulata.

13.3.1.2.6 Altri fattori

- Dimensione.
- Colore.
- Opacità.
- Consistenza
- sa, mucosa, friabile, membranosa).
- (cremo-

13.3.2 Secondo giorno

All'interno della bocca sono contenuti diversi tessuti a cui sono associati diversi ceppi batterici. Alla nascita la cavità orale è sterile: la prima colonizzazione avviene tra le 6 e le 10 ore dopo la nascita.

13.3.2.1 Equilibrio plastico

Le popolazioni microbiche si dicono in equilibrio plastico in quanto si trovano in una condizione di equilibrio dinamico, con cambiamenti dovuti ad abitudini alimentari sbalzi ormonali e altri cambiamenti che si subiscono durante la vita.

13.3.2.2 Ecosistema orale

L'ecosistema orale è formato da microorganismi orali e dalla cavità orale che li ospita. La popolazione batterica è estremamente diversificata e abbondante: si contano più di 300 specie in grado di colonizzarla. Questa convivenza, per lo più pacifica, si dice di simbiosi o commensalismo. Con l'insorgenza di fenomeni patologici si passa a rapporti opportunistici. Oltre ai batteri sono anche presenti virus e funghi.

13.3.2.2.1 Esempi Lo *Streptococcus pyogenes* del gruppo A è un fungo che può essere presente nella cavità orale e patogeno: produce tossine, fattori di virulenza ed emolisine. Se raggiunge il cuore può produrre endocarditi gravi.

13.3.3 Procedimento

1. Si prepara una piastra Petri agar-sangue e la si contrassegna sul bordo con data, nome gruppo, protocollo e piastra *A*.
2. Con spatola e tampone sterile si preleva del materiale dalla parte superiore della lingua.
3. Si usa il tampone su una porzione della piastra (un quinto) e si striscia con un'ansa sterile la popolazione microbica prelevata tramite la tecnica del quadrante. Grazie all'ansa si notano quattro strisciate complessive. L'ultima permette di isolare le colonie.
4. Si pone la piastra capovolta nell'incubatore statico termostato a 37° per 24 ore.
5. Il giorno successivo si notano diverse colonie batteriche che vengono distinte per fenotipo.
6. Si selezionano due colonie con morfologia e/o emolisi diversa sulla piastra e si contrassegna una nuova piastra agar-sangue con data, nome gruppo e protocollo e piastra *B*.
7. Attraverso lo striscio continuo si piastrano sulla piastra *B* le colonie batteriche che si vogliono isolare e si pone la piastra capovolta nell'incubatore come la prima.
8. Il giorno successivo si effettua un'analisi dettagliata del fenotipo batterico in riferimento alle colonie isolate.
9. Si confrontano i risultati con la piastra *A*.
10. Si gettano nei biobox entrambe le piastre.

13.4 Quarta esperienza - Conta standard su piastra

13.4.1 Introduzione

13.4.1.1 Conta microbica indiretta

La conta microbica indiretta avviene tramite spettrofotometro: la densità ottica nella cuvetta è proporzionale alla quantità di batteri presenti. Non permette però di distinguere tra cellule vive e morte.

13.4.1.2 Conta vitale

La conta vitale su piastra permette di contare unicamente le cellule vive.

13.4.1.2.1 Processo

1. Si prende la provetta contenente le colonie batteriche.
2. Si fanno diluizioni seriali su piastra in brodo di coltura o soluzione salina.
3. Si prelevano 0.1mL dalla diluizione e si distribuiscono uniformemente su piastra tramite ansa a l.
4. Si incuba ogni diluizione.
5. Si conta la piastra in cui le colonie si distinguono correttamente e non sono ammassate (tipicamente tra le 10 e le 200).

13.4.2 Secondo giorno

13.4.2.1 Metodi della conta batterica

13.4.2.1.1 Conta diretta La conta diretta avviene al microscopio o allo spettrofotometro e non si distinguono cellule vive e morte.

13.4.2.1.2 Conta indiretta La conta indiretta avviene in coltura e si contano solo le cellule vive, le uniche in grado di riprodursi e formare una colonia nel terreno. Per attuare una conta batterica indiretta si procede per diluizioni seriali provenienti da un unico brodo di coltura *LB* sterile standard. Si attuano diluizioni seriali 1 : 10. Avviene poi piastratura di 1mL di ogni soluzione e si incubano le piastre.

13.4.2.1.3 Conta vitale La conta vitale consente di contare solo cellule vive presenti in una sospensione batterica. Si dice anche conta su piastra o conta delle colonie.

13.4.2.2 Colonia

Si definisce colonia un gruppo di cellule batteriche appartenenti allo stesso ceppo o specie che ha origine da una sola cellula vitale. Una cellula in grado di formare una colonia è detta unità formante colonia o *UFC* o *CFU*. Il numero di colonie contate sulla piastra corrisponde al numero di *UFC* dell'inoculo.

13.4. QUARTA ESPERIENZA - CONTA STANDARD SU PIASTRA

13.4.2.3 Procedimento

1. Si contrassegna ognuna delle 9 provette con 900 μ l di brodo *LB* sterile con la diluizione rispettiva: 10^{-1} ; 10^{-9} .
2. Si contrassegna il bordo del fondo delle 9 piastre di *LB-agar* da 90mm di diametro con nome gruppo, nome protocollo, diluizione della provetta corrispondente e volume piastrato.
3. Si contrassegna la piastra rimanente con nome gruppo e non diluita, è dedicata alla sospensione batterica non diluita.
4. Si agita la provetta con la coltura batterica non diluita con il vortex e si prelevano 100 μ l e la si trasferisce nella provetta 10^{-1} . Questa è la prima diluizione seriale.
5. Dopo aver agitato con il vortex si prelevano 100 μ l dalla diluizione e si trasferiscono nella provetta 10^{-2} e si mescola. Questa è la seconda diluizione seriale.
6. Si ripete la procedura fino ad arrivare all'ultima diluizione.
7. Si prelevano 100 μ l della sospensione batterica di partenza, si trasferiscono al centro della piastra corrispondente e si piastra con ansa sterile.
8. Si prelevano 100 μ l dalla sospensione diluita e si trasferiscono al centro della piastra corrispondente e si piastra con ansa sterile.
9. Si uniscono le piastre con nastro adesivo su cui si scrive il gruppo. Si pongono capovolte nell'incubatore a 37° per 18-24 ore.
10. Una volta concluso si versa il contenuto delle provette in plastica nei rifiuti biologici liquidi e si buttano le provette in plastica nei rifiuti biologici solidi.
11. Si conta e annota il numero di colonie presenti in ogni piastra.
12. Per la conta si inizia dalla piastra con il maggior contenuto di colonie contabili. Si escludono le piastre con numero di colonie minore di 10.

13.4.2.4 Analisi dei risultati

Si calcola la concentrazione della sospensione batterica tramite il calcolo della media delle *CFU* ottenute nelle piastre contate.

$$\text{Concentrazione} = \frac{n \cdot f}{v} \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$$

Dove:

- n è il numero di colonie contate su una piastra.
- f è il fattore di diluizione (inverso della diluizione operata).
- v è il volume di sospensione batterica piastrata.

13.5 Quinta esperienza - test di aerobiosi/anaerobiosi su terreno solido

13.5.1 Introduzione

13.5.1.1 Distinguere i batteri in base alla richiesta di ossigeno

In base alla loro richiesta di ossigeno i batteri si dividono in:

- Anaerobi obbligati: non tollerano l'ossigeno.
- Anaerobi facoltativi: crescono con la respirazione cellulare in presenza di ossigeno ma se è assente con altri metabolismi.
- Microaerofili: batteri che richiedono una quantità di ossigeno inferiore a quella presente nell'aria: 5-10%.
- Aerotolleranti: sono indifferenti alla presenza di ossigeno, effettuano la fermentazione, preferiscono una quantità di ossigeno inferiore al 20%.
- Aerobi obbligati: richiedono ossigeno.

13.5.1.2 Batteri modello

Per verificare l'aerobiosi o anaerobiosi di una colonia si utilizzano:

- *Citrobacter freundii*: anaerobio facoltativo, Gram—.
- *Micrococcus luteus*: aerobio obbligato, Gram+.

13.5.1.3 Processo

1. Si prendono due piastre di terreno solido e le si divide a metà.
2. In ogni piastra si semina su una metà *Citrobacter freundii* e sull'altra *Micrococcus luteus*.
3. Una piastra viene posta in condizioni di aerobiosi mentre l'altra viene posta all'interno di una giara in cui si produce una condizione di anerobiosi.
4. Si verifica che *Citrobacter freundii* cresce in entrambe le piastre mentre *Micrococcus luteus* solo nella piastra con ossigeno.

Nella giara vengono inseriti dei filtri in grado di eliminare l'ossigeno presente grazie a reazioni attuate all'interno della giara stessa.

13.5.2 Seconda giornata

Si verifica su terreno solido l'aerobiosi o anaerobiosi di due ceppi batterici:

- *Citrobacter freundii*: bacillo anaerobio facoltativo Gram—, in piastra di agar-sangue.
- *Micrococcus luteus*: cocco aerobio obbligato Gram+, in piastra *TLC*.

I due ceppi rimangono ignoti e detti ceppo 1 e ceppo 2.

13.5.2.1 Creazione di condizione di anaerobiosi

Per creare una condizione di anaerobiosi si utilizzano giare, contenitori a chiusura ermetica in cui vengono inseriti sistemi *GAS-PACK*, sacchetti contenenti reagenti chimici con la capacità di eseguire una reazione chimica che elimina l'ossigeno nell'ambiente. Si aggiungono pochi mL di acqua al gas-pack in modo da attivare la reazione con liberazione di $CO_{2(g)}$ e $H_{2(g)}$. Sul tappo della giara è presente un catalizzatore al palladio sulla quale si forma acqua.

13.5.2.1.1 Verificare l'assenza di ossigeno Per verificare l'assenza di ossigeno si usano indicatori come:

- Resazurina: azzurra in presenza di ossigeno e rosa in sua assenza.
- Blu di metilene: blu in presenza e incolore in assenza di ossigeno.

13.5.2.2 Procedimento

1. Si disegnano due quadranti sul fondo di due piastre di Nutrient-agar con un pennarello. Si marca ogni quadrante con una cifra e si scrive su una piastra aerobiosi e sull'altra anaerobiosi.
2. Si preleva 1 colonia dalla piastra del ceppo 1 e la si deposita sul quadrante corrispondente di entrambe le piastre con ansa.
3. Si distribuisce la colonia con lo striscio continuativo non uscendo dal quadrante.
4. Si ripete l'operazione con l'altro ceppo.
5. Si dispone la piastra anaerobiosi vicino alla giara in cui gli esercitatori inseriscono blu di metilene, bustina del catalizzatore. Avviene incubazione a 37° . Si attendono 24 ore.
6. Il giorno successivo si paragona il fenotipo di crescita di ogni ceppo batterico in condizioni aerobiche e anaerobiche e si annotano le osservazioni.
7. Si classificano i 2 ceppi in base al risultato del test.

13.6 Sesta esperienza - test Kirby-Bauer

13.6.1 Introduzione

L'abuso di antibiotici ha causato lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte dei batteri per alcuni antibiotici. Si tratta della minaccia mondiale più pericolosa dal punto di vista sanitario vista la facilità del trasferimento genico orizzontale.

13.6.1.1 Test di Kirby-Bauer

Durante il test di Kirby-Bayer per la verifica dell'antibiotico-resistenza:

13.6.1.1.1 Procedimento

1. Si prende una piastra con agar solido Mueller-Hinton e si semina uniformemente una certa specie batterica.
2. Si applicano dischetti imbevuti ognuno da un antibiotico specifico
3. Si incubano le piastre.

13.6.1.1.2 lettura dei risultati La sensibilità a un antibiotico viene determinata come alone di inibizione: il diametro dell'alone indica il grado di sensibilità. L'assenza di alone indica un antibiotico-resistenza.

13.6.2 Secondo giorno

13.6.2.1 Resistenza

Si definisce resistenza lo sviluppo della capacità di un microorganismo di sopravvivere a farmaci che dovrebbero ucciderlo o indebolirlo. Se la resistenza diventa a diversi farmaci, trattare l'infezione può diventare difficile. I microorganismi resistenti tendono a essere trasmessi da persona a persona. In questo modo infezioni difficili da trattare possono diffondersi con conseguenze serie fino alla morte.

13.6.2.1.1 Sviluppo della resistenza Se la cura antibiotica non si protrae per il giusto periodo di cura, alcuni batteri che stanno sviluppando la resistenza non vengono uccisi e insorgono.

13.6.2.1.2 Superbatteri Si definiscono superbatteri batteri resistenti a più antibiotici contemporaneamente, a volte a tutti gli antibiotici conosciuti.

13.6.2.1.3 Identificazione della resistenza La suscettibilità batterica ai farmaci può essere individuata in due modi:

- Test Kirby-Bauer su terreno solido. concentrazione inibente *MIC* su terreno liquido.
- Test di determinazione della minima

13.6.2.2 Procedimento

1. Si marca la piastra di *MH-agar* con nome gruppo e protocollo, data e tipo di Gram.
2. Si disegnano sul fondo della piastra le due diagonali e quattro linee aggiuntive.
3. Si prelevano 1-2 colonie con un diametro maggiore di 1.5mm dalla piastra Petri con un bastoncino cotonato sterile e si stemperano nella fiala di soluzione fisiologica sterile.
4. Si rimuove l'eccesso di liquido dal bastoncino cotonato premendo e ruotandolo vigorosamente sulle pareti interne della fiala.
5. Si distribuiscono i batteri su ogni millimetro della piastra Petri di *MH-agar* con lo stesso bastoncino. Per garantire una distribuzione uniforme si ruota la piastra di 45° e la si striscia nuovamente con lo stesso bastoncino.
6. Si lascia asciugare la superficie dell'agar sul bancone per 3-5 minuti.

13.7. SETTIMA ESPERIENZA - TEST BIOCHIMICO *API 20E*

7. Si sterilizza una pinzetta in etanolo al 70% e lo si lascia evaporare.
8. Si depone con la pinzetta sulla superficie di agar il dischetto *CAZ/CLA* al centro della piastra e si preme delicatamente per assicurarsi il contatto completo.
9. Si dispongono gli altri dischetti da almeno 15mm dalla piastra. In senso orario *E*, *AM*, *VA* e *GM*.
10. Si dispongono le piastre capovolte all'interno dell'incubatore statico termostato a 37° per 16-18 ore.
11. A fine protocollo si svuota il contenuto della fiala in vetro nei rifiuti biologici liquidi e si cestina quella in vetro nei rifiuti biologici taglienti.
12. Il giorno successivo si verifica la presenza degli aloni di inibizione: in caso positivo si misurano i diametri e si annota il diametro per ogni antibiotico e il tipo di Gram a disposizione.
13. Si consultano i breakpoint *EUCAST* per determinare a quali antibiotici il microorganismo è sensibile, intermedio o resistente. Si annota il profilo di resistenza del ceppo batterico.

13.6.2.3 Breakpoint *EUCAST*

Antibiotico	Diametro di alone di inibizione (mm)		
	Resistente	Intermedio	Sensibile
Ampicillina Gram–	≤ 13	14-16	≥ 16
Ampicillina Gram+	≤ 28		≥ 29
Eritromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Ceftazidime/Acido clavulanico	≤ 13	14-17	≥ 18
Vancomicina Gram–	≤ 3		> 3
Vancomicina Gram+	≤ 14		≥ 15

13.7 Settima esperienza - test biochimico *API 20E*

13.7.1 Introduzione

Esistono molti metodi biochimici per determinare la specie di una coltura batterica. Uno dei più utilizzati è il test *API 20E*.

13.7.1.1 Test *API 20E*

Il test *API 20E* si compone di 21 reazioni metaboliche e 6 test biochimici supplementari. Verrà utilizzato per identificare *Enterobacteriaceae* e altri Gram–.

13.7.1.1.1 Processo

1. Si preleva una colonia.
2. Si stempera la colonia in acqua sterile.
3. Si riempiono i microtubuli o microgallerie con la colonia stemperata. I microtubuli sono alti 1cm e larghi 0.5cm e contengono terreno liofilizzato.
4. Si incubano a 37° per una notte.

13.7.1.1.2 Lettura dei risultati In base alla reazione chimica metabolica che avviene in ogni pozzetto o microtubulo o galleria si nota una colorazione diversa. Il colore denota l'avvenimento o meno della reazione. Moduli identificano la specie.

13.7.1.1.2.1 Lettura dei moduli A ogni pozzetto corrisponde un numero. Se la reazione è avvenuta nel pozzetto considero il numero, altrimenti no. I pozzetti sono divisi in tritici: sommando i numeri da considerare per ogni tritico si ottiene un codice univoco per la specie.

13.7.2 Secondo giorno

13.7.2.1 Caratteristiche individuate

Il test biochimico *API 20E* permette di identificare il profilo biochimico di una data specie batterica individuando:

- | | | |
|--|----------------------------|-------------------------------------|
| • Richiesta di ossigeno per la crescita. | • fonte di carbonio. | • Produzione di enzimi. |
| | • Produzione di substrati. | |
| • Utilizzo di zuccheri come | • Utilizzo del citrato. | • Decarbossilazione di amminoacidi. |

13.7.2.2 Procedimento

1. Si contrassegna il bordo del contenitore di incubazione e il suo coperchio con nome gruppo, data e nome microorganismo.
2. Si distribuisce con la spruzzetta acqua distillata sul fondo del contenitore di incubazione fino a riempire tutti i pozzetti per creare un ambiente umido ed evitare il disseccamento dei test durante l'incubazione in termostato.
3. Si rimuove l'eventuale eccesso di acqua con la micropipetta *p1000* inclinando il fondo del contenitore.
4. Si blocca con il nastro di carta il contenitore di incubazione al bancone e si blocca il coperchio verso il basso al bancone in modo da creare una corsia tra contenitore e coperchio per disporre la galleria.
5. Si pone la galleria *API 20E* inclinata verso l'alto nella corsia tra il contenitore e il coperchio come supporto.
6. Si apre una fiala con 3mL di soluzione salina sterile 0.85% applicando pressione verso l'esterno sulla zona zigrinata del coperchio in modo da rompere la punta in vetro.
7. Si preleva sterilmente con un bastoncino cotonato sterile 4 coline dalla piastra di *LB-agar*.
8. Si stemperano le colonie nella soluzione salina ruotando il bastoncino cotonato sulle pareti interne della fiala.
9. Si risospendono le cellule batteriche pipettando più volte con la *p1000*.
10. Si prelevano 300µl di sospensione batterica e si riempiono cambiando puntale per ogni test le microprovette e le cupole corrispondenti ai test *|CIT|*, *|VP|*, *|GEL|*. Si appoggia la punta del puntale sul bordo laterale della cupola per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno della microprovetta.

13.7. SETTIMA ESPERIENZA - TEST BIOCHIMICO *API 20E*

11. Si prelevano con la *p200* 100µl di sospensione batterica e si riempiono, cambiando puntale le microprovette di *ADH*, *LDC*, *ODC*, *H₂S* e *URE*. Si appoggia la punta del puntale sul bordo laterale della cupola per evitare la formazione di bolle d'aria all'interno della microprovetta.
12. Si aggiungono nei 5 test gocce d'olio di paraffina fino a riempire la cupola per far avvenire le reazioni in anaerobiosi.
13. Si prelevano con la *p200* 120µl di sospensione batterica e si riempiono le microprovette dei test rimasti.
14. Si dispone la galleria *API 20E* orizzontalmente all'interno del contenitore di incubazione e si chiude con il coperchio. Si mette la galleria nell'incubatore statico termostato a 37°.
15. Si svuota il contenuto della fiala in vetro con la sospensione microbica nei rifiuti biologici liquidi vicino al lavandino e la fiala in vetro nei rifiuti taglienti.
16. Si determinano quali test sono positivi e quali negativi tranne *TDA*, *VP*, *IND*:
 - Se *GLU* è negativo (blu, blu-verde) e ci sono meno di 3 reazioni positivi ci si ferma in quanto l'organismo non è un enterobatterio e necessita di un tempo di incubazione più lungo.
 - Se il test *GLU* è positivo (giallo) o ci sono più di 3 reazioni positive si procede con il sistema.
17. Si aggiunge il reagente *TDA* (cloruro di ferro 10%) al test *TDA* della galleria. La reazione, se positiva è istantanea ed è rosso mattone.
18. Si aggiunge una goccia di reattivo di James al test *IND* della galleria. Una reazione positiva di colore rosa intenso o rossa avviene nell'arco di due minuti. L'acido nel reagente può reagire con la cupola di plastica e produrre un viraggio verso il rosso marrone che non indica positività.
19. Si aggiunge una goccia di reattivo *VP1* e *VP2* nel test *VP*. Il colore rosa chiaro immediato non è indice di positività: la reazione impiega 10 minuti e risulta rosa intenso o rosso.
20. Si annota sulla scheda di lettura il risultato di ogni test della galleria. Si annota la cifra data dalla somma dei valori dei test positivi e il codice a 7 cifre ottenuto.
21. Si individua nell'indice di profilo analitico il codice ottenuto. Si annota e le reazioni di dubbia interpretazione.
22. Si annotano i codici alternativi possibili e le specie corrispondenti.
23. Si utilizza il codice per l'identificazione.
24. Si cestina la galleria nei rifiuti biologici solidi, si svuota la fiala con la sospensione batterica nei rifiuti biologici liquidi e la fiala nel contenitore per materiale acuminato infetto.

13.8 Ottava esperienza - Colorazione di Gram

13.8.1 Introduzione

La colorazione di Gram differenzia batteri Gram+ che appaiono di color violetto e batteri Gram− che appaiono rosa. Questo avviene in quanto viene usata la sostanza Crystal Violet che colora di violetto lo strato di peptidoglicano: essendoci nei Gram+ uno strato più spesso mentre nei Gram− uno strato più sottile contenuto tra le membrane.

13.8.1.1 Procedimento

1. Si applicano i batteri sulla piastra e si applica il Crystal Violet.
2. Si applica iodio che funge da mordente: attacca al peptidoglicano il Crystal Violet.
3. Si decolora tramite alcol: solo i batteri su cui il Crystal Violet ha attaccato grazie al mordente rimangono colorati (Gram+).
4. Si utilizza la safranina per colorare i Gram− di rosa.

13.8.1.2 Identificare i Gram+

I batteri vengono anche raggruppati in base alla forma che appare al microscopio come:

- I cocci Gram+ sono stafilococchi (in gruppi) o streptococchi (in catene).
- I bastoncelli Gram+ includono *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Listeria*.

13.8.1.3 Identificare i Gram−

I Gram− vengono classificati in tre gruppi:

- Cocchi, dalla forma sferica sono più comunemente *Neisseria*.
- Bastoncelli, allungati e sottili sono *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e altri. Il *Vibrio cholerae* può essere a forma di normale bastoncello o ricurvo.
- Coccoidi o coccobacilli, di forma intermedia tra cocci e bacilli sono *Bordetella*, *Brucella*, *Haemophilus* e *Pasteurella*.

13.8.2 Terzo giorno

13.8.2.1 Procedimento

13.8.2.1.1 Preparazione del vetrino La preparazione avviene al bancone e sotto cappa biologica:

1. Si marca una provetta da microcentrifuga da 2mL sterile con id campione.
2. Si trasferisce con la *p200* 100µl di acqua distillata sterile nella provetta da 2mL.
3. Si preleva una colonia batterica sterilmente con un'ansa da inoculazione sterile e la si trasferisce nei 100µl di acqua distillata sterile.

13.8. OTTAVA ESPERIENZA - COLORAZIONE DI GRAM

4. Si risposende pipettando su e giù.
5. Si pulisce e sgrassa con alcol 70% il vetrino portaoggetti e lo si asciuga con carta assorbente.
6. Si scrive a matita sullo spazio laterale satinato del vetrino portaoggetti nome gruppo e nome campione.
7. Si trasferisce 20µl di sospensione batterica al centro del vetrino portaoggetti.
8. Si striscia delicatamente la sospensione batterica con l'ausilio di un'ansa sterile fino ad occupare 1-2cm al centro del vetrino.
9. Si lascia asciugare completamente il vetrino per evaporazione sul bancone o sotto cappa biologica.

13.8.2.1.2 Fissazione del preparato La fissazione del preparato avviene sotto cappa chimica.

1. Si copre la parte centrale del vetrino con lo striscio con 1-2 gocce di etanolo o acido acetico con la pipetta Pasteur, lavorando sopra il becker per i rifiuti chimici.
2. Si rimuove l'eccesso di etanolo o acido acetico su carta assorbente e si fa asciugare all'aria sotto cappa chimica fino a completa evaporazione.

13.8.2.1.3 Colorazione del preparato La colorazione del preparato avviene sotto cappa chimica.

1. Si pipetta sul vetrino la soluzione di crystal violet fino a coprire lo striscio e la si lascia agire per 1 minuto.
2. Si rimuove il colorante in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici fino a che il preparato non rilascia più colore.
3. Si pipetta sul vetrino il reattivo di Lugol e si lascia agire per 1 minuto.
4. Si rimuove il reattivo di Lugol in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici.
5. Si versa con il contagocce la soluzione decolorante per Gram sul preparato. Una decolorazione troppo prolungata può rimuovere il colorante anche dai Gram+, si procede per al massimo 30 secondi.
6. Si rimuove il decolorante sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici.
7. Si pipetta sul vetrino la soluzione di safranina e la si lascia agire per 1 minuto.
8. Si rimuove il colorante in eccesso sciacquando con acqua distillata sopra il becker per i rifiuti chimici fino a che il preparato non rilascia più colore.
9. Si sgocciola il vetrino su carta assorbente e lo si lascia asciugare all'aria.
10. Si pone il vetrino sul tavolino portaoggetti del microscopio.
11. Si osserva al microscopio dimensione, forma e colore dei batteri, si annota il tipo di colorazione e la disposizione delle cellule prevalente.

13.9 Nona esperienza - Trasformazione di batteri

13.9.1 Introduzione

Per produrre batteri ricombinanti si utilizza la tecnologia del DNA ricombinante tramite inserimento di un gene in un battere per mezzo dei plasmidi.

13.9.1.1 Trasformazione batterica

La trasformazione batterica è un processo di trasferimento genico orizzontale con cui batteri competenti acquisiscono frammenti di DNA dall'ambiente. Questa proprietà viene usata per il clonaggio genico, tecniche di mutagenesi e per la produzione di proteine ricombinanti. Esistono procedure per trasformare batteri naturalmente non competenti.

13.9.1.1.1 Trasformazione chimica Non richiede strumenti dedicati e consiste nel pre-trattamento delle cellule con alte concentrazioni di cloruro di calcio per renderle competenti. Un trattamento termico rapido o heat-shock in presenza delle molecole di DNA permette l'internalizzazione del DNA.

13.9.1.1.2 Trasformazione elettrica È più efficiente di quella chimica ma richiede l'elettroporatore. Gli impulsi elettrici permeabilizzano la membrana cellulare permettendo al DNA di entrare nella cellula.

13.9.1.2 Plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA extracromosomico in grado di replicarsi indipendentemente dal cromosoma della cellula. Contengono tipicamente un marcatore di selezione, un sito di restrizione enzimatica multipla e un marcatore per la visualizzazione di plasmide. Si utilizzerà un plasmide contenente:

- *GFP*: green fluorescent protein.
- Gene per la resistenza all'ampicillina: creazione di un terreno selettivo.

Questo verrà inserito in *E. coli*.

13.9.1.3 Processo di trasformazione

Si trasformano i batteri tramite shock termico, abbassando la temperatura da 43° a 3° per facilitare l'entrata nel plasmide. Si semina su un terreno contenente ampicillina *Amp* e si incuba. In questo modo si eliminano le cellule non trasformate (non resistenti ad ampicillina). Le cellule trasformate contengono fluorescenza e resistenza ad *Amp*.

13.9.2 Terzo giorno

13.9.2.1 Procedimento

1. Si marca una provetta da 1.5mL con *TR-NEG* e la si raffredda in ghiaccio.
2. Marcare la provetta con il DNA con *TR* e la si mantiene in ghiaccio.
3. Si aliquotano 48µl di cellule competenti in *TR-NEG* e la si mantiene in ghiaccio.

13.10. DECIMA ESPERIENZA - OSSERVAZIONE DELLA MOTILITÀ BATTERICA DI TIPO “SWIMMING” AL MICROSCOPIO OTTICO

4. Si aliquotano 48µl di cellule competenti in *TR* e si pipetta per mescolare e la si mantiene in ghiaccio.
5. Si incubano le due provette con cellule competenti in ghiaccio per 30 minuti.
6. Si marcano le piastre con:
 - Piastra Petri di *LB-agar*: nome gruppo, nome protocollo *DH5α*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-NEG*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-100µl*.
 - Piastra Petri di *LB-agar* e ampicillina: nome gruppo, nome protocollo *TR-resto*.
7. Si preleva il volume restante di cellule competenti dal tubo di partenza e li si pipetta nella piastra Petri *LB-agar DH5α*.
8. Si distribuisce con ansa sterile per inoculazione la sospensione batterica.
9. Si pone la piastra capovolta nell'incubatore termostato a 37°.
10. Si esegue lo shock termico incubando le due provette in un termoblocco a 42° per 90 secondi.
11. Si raffredda in ghiaccio per 2 minuti.
12. Si aggiunge 750µl di brodo *LB* a ciascuna provetta.
13. Si incuba nell'incubatore ad agitazione orbitale per 37° per 1 ora.
14. Si risospendono le cellule batteriche con il vortex.
15. Si prelevano 100µl a *TR-NEG* e li si piastra in *TR-NEG*. I restanti vengono scartati.
16. Si prelevano 100µl da *TR* e li si piastra sulla piastra *TR-100µl*.
17. Si centrifuga la provetta da 1.5mL con la restante coltura batterica a $4000 \times g$ per 3 minuti.
18. Si verifica che sia avvenuta la separazione tra i batteri e brodo di coltura.
19. Si rimuovono 600µl di surnatante da *TR* con la *p1000*.
20. Si risospende il pellet nei 100µl di surnatante rimasti con la *p200*.
21. Si piastra con un'ansa a *L* sterile i 10µl rimanenti sulla piastra *TR-resto*.
22. Si incubano le 3 piastre di *LB-agar* e ampicillina e la piastra con lo striscio a quadrante di *E. coli* competenti unite da un pezzo di nastro adesivo a 37° per 18-24 ore.

13.10 Decima esperienza - Osservazione della motilità batterica di tipo “swimming” al microscopio ottico

13.10.1 Introduzione

I Batteri si distinguono anche grazie alla loro motilità, che può avvenire attraverso flagelli o pili.

13.10. DECIMA ESPERIENZA - OSSERVAZIONE DELLA MOTILITÀ BATTERICA DI TIPO “SWIMMING” AL MICROSCOPIO OTTICO

13.10.1.1 Flagelli

I flagelli sono lunghe appendici proteiche che servono al moto della cellula batterica.

13.10.1.1.1 Tipi di movimento Il movimento può essere:

- Tumbling: casuale, con continui cambi di direzione.
- Swimming: in una sola direzione.

13.10.1.1.2 Distinzione in base a numero e posizione dei flagelli

- Monotrofico: un solo flagello all'estremità.
- Anfotrico: flagelli a estremità opposte.
- Lofotrico: un gruppo di flagelli all'estremità.
- Peritrico: flagelli distribuiti su tutta la superficie.

13.10.2 Terza giornata

In piastra si possono osservare le motilità tramite un alone trasparente attorno alla colonia inoculata. Si attua un'analisi tramite microscopio ottico su terreno liquido in modo da poter distinguere i moti browniani da moti di swimming.

13.10.2.1 Procedimento

1. Si pulisce e sgrassa il vetrino con alcol 70%.
2. Si agita la sospensione batterica e si prelevano 10µl con la p20.
3. Si depone la goccia al centro del vetrino portaoggetti.
4. Si pone il vetrino coprioggetti sopra la goccia.
5. Si rimuove l'eccesso di liquido tamponando con della carta.
6. Si pone il preparato a fresco sul tavolino portaoggetti del microscopio ottico.
7. Si osserva la motilità batterica e si annotano le osservazioni come il tipo di movimenti e la quantità di cellule motili.
8. Si cestina il vetrino nell'apposito contenitore per rifiuti taglienti e acuminati.