

Microbiologia generale

Giacomo Fantoni

Elisa Pettinà

Telegram: @GiacomoFantoni

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

11 marzo 2020

Indice

1 Introduzione	2
1.1 Albero della vita	2
1.1.1 Batteri e archei	2
1.1.2 Virus	2
1.1.3 Caratterizzazione dei microbi	3
1.2 La macchina cellulare	3
1.2.1 Impatto dei microbi sulle attività umane	4
1.2.2 Ricombinazione del DNA	4
1.3 Microrganismi come modello	4
1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea	5
1.3.2 Postulati di Koch	5
1.4 Differenze tra batteri, archei ed eucarioti	6
1.5 I batteri	7
1.5.1 Composizione elementare	7
1.5.2 Strutture e loro funzioni	8
2 La struttura della cellula	10
2.1 La parete cellulare	10
2.1.1 Peptidoglicano	10
2.1.2 Parete cellulare nei gram-positivi e gram-negativi	11
2.1.3 Lisozima	13
2.2 La membrana citoplasmatica	14
2.2.1 La struttura	14
2.3 Membrana e parete degli archaea	15
2.4 Locomozione microbica	17
2.4.1 Il flagello	17
2.4.2 Il movimento flagellare	19
2.4.3 La sintesi flagellare	19
2.4.4 I flagelli negli spirochetti	20
3 Popolazione batterica	21
3.0.1 Conta vitale	21
3.0.2 Misura della torbidità	21
3.0.3 Most Probable Number	22
3.1 Sistemi di coltivazione microbica	22
3.1.1 Chemostato	22

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 estremamente 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

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 Batteri e archei

Batteri e archei sono organismi procarioti, ovvero non hanno nucleo cellulare, possiedono una parete cellulare polisaccarida di peptidoglicano. Svolgono una riproduzione asessuata e sono tipicamente dalle 10 alle 100 volte più piccoli delle cellule eucariote, nell'ordine dei micrometri.

1.1.2 Virus

I virus sono acellulari e costituiti da un materiale genetico a DNA o RNA, di un capsido proteico e eventualmente di un ulteriore strato lipidico. Dipendono dalla cellula ospite per la loro riproduzione.

1.2. LA MACCHINA CELLULARE

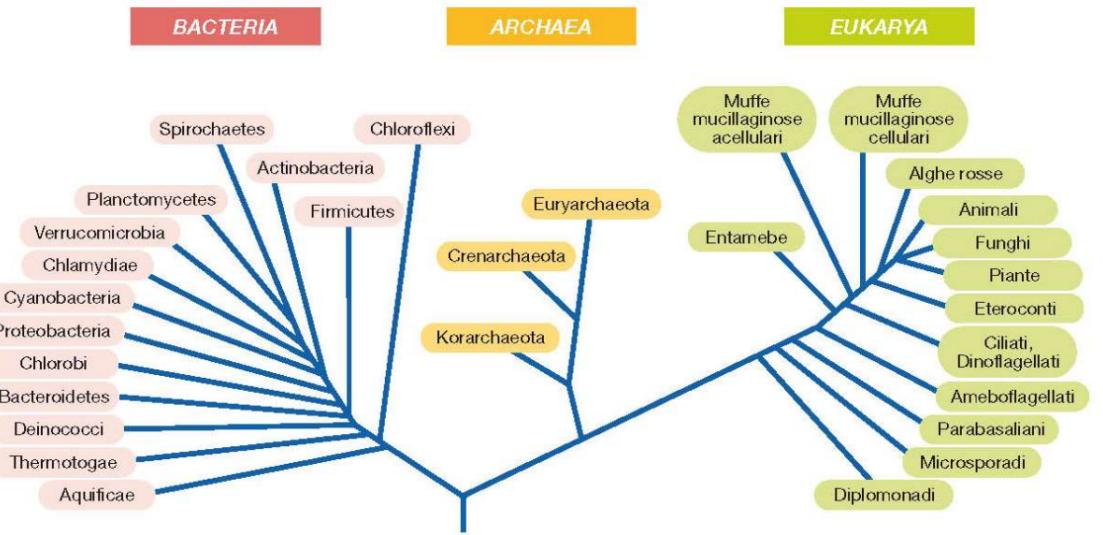


Figura 1.1: Albero della vita

1.1.3 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.

1.3. MICRORGANISMI COME MODELLO

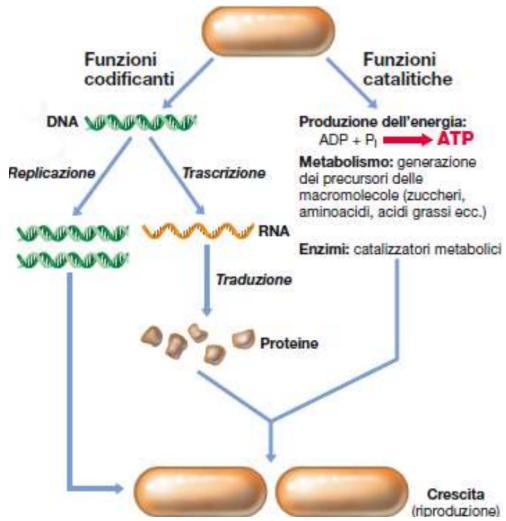


Figura 1.2: Funzioni codificanti della macchina cellulare

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 al 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. MICRORGANISMI COME MODELLO

1.3.1 Il conflitto sulla generazione spontanea

Fino all'esperimento di Redi si credeva che gli organismi viventi potessero svilupparsi da matrice 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).

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.

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. DIFFERENZE TRA BATTERI, ARCHEI ED EUCA RIOTI

1.4 Differenze tra batteri, archei ed eucarioti

CARATTERISTICA	BACTERIA	ARCHAEA	EUKARYA
Struttura cellulare procariota	+	+	-
Membrana nucleare	-	-	+
DNA cromosomale circolare	+	+	-
Operoni	+	+	-
RNA polimerasi	1	> 1	3
Mureina nella parete cellulare	+	-	-
Sensibilità ad antibiotici β -lattamici	+	-	-
Lipidi di membrana: legame	Estere	Etere	Estere
Ribosomi	70S	70S	80S
t-RNA di inizio traduzione	fMet	Met	Met
Sensibilità alla tossina difterica	-	+	+
Sensibilità a cloramfenicolo, streptomicina, kanamicina	+	-	-
Chemiolitotrofia	+	+	-
con produzione di metano	-	+	-
con ossidazione di ammonio	+	-	-
Respirazione con ossigeno	+	+	+
Respirazione con altri accettori di elettroni	+	+	-
Fissazione di azoto elementare	+	+	-
Fotosintesi senza produzione di O_2	+	+	-
Fotosintesi con produzione di O_2	+	-	+
Crescita a $T > 80^\circ C$	+	+	-
Crescita a $T > 100^\circ C$	-	+	-

a) + indica presenza della caratteristica in una parte o nella totalità dei componenti del raggruppamento; - indica che di norma la caratteristica è assente.

Figura 1.3: Differenze tra batteri, archei ed eucarioti

1.5. I BATTERI

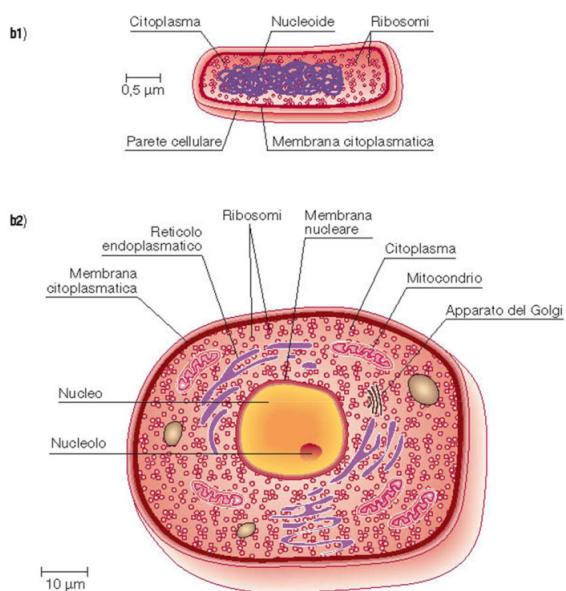


Figura 1.4: Cellula procariote ed eucariote

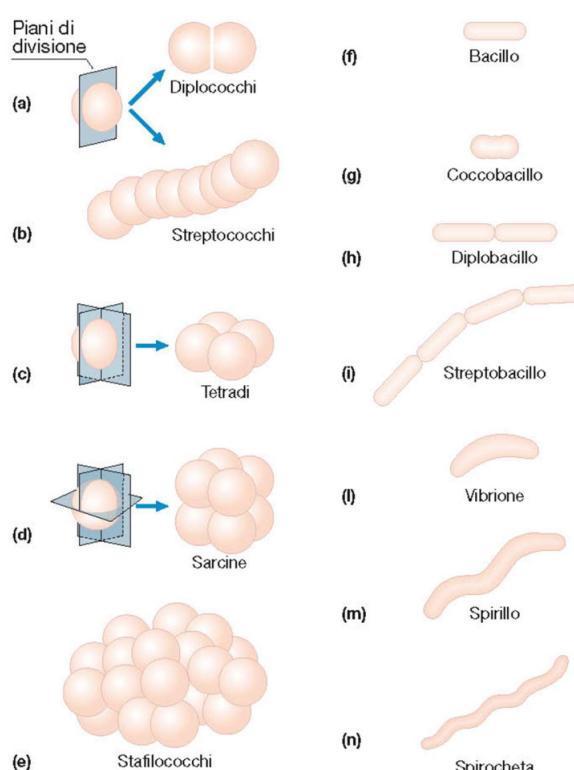


Figura 1.5: Tipiche forme di aggregati batterici

Si nota come nei procarioti manchi la compartizione cellulare.

Si noti come alcuni batteri possiedono steli o peduncoli e ife per l'acoramento al substrato.

1.5 I batteri

1.5.1 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 marcomolecole che formano la cellula che sono:

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

1.5. I BATTERI

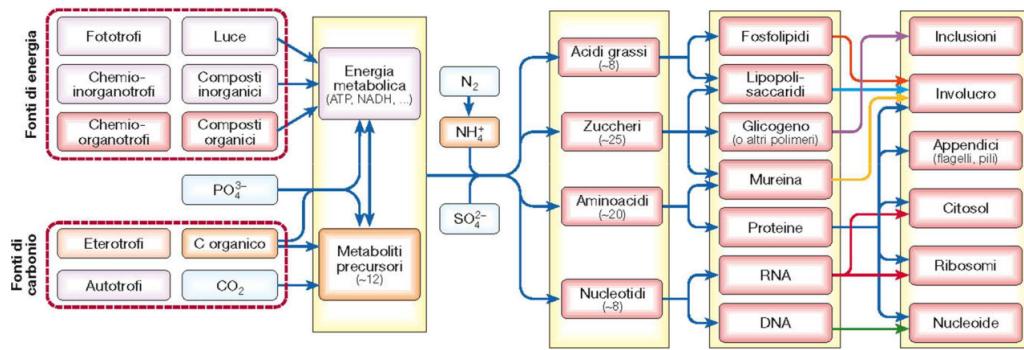


Figura 1.6: Costruzione di una cellula batterica

1.5.2 Strutture e loro funzioni

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.

Vacuolo gassoso

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

Ribosomi

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

Corpi d'inclusione

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

Nucleoide

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

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.

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).

1.5. I BATTERI

Capsule e strati mucosi

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

Fimbrie e pili

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

Flagelli

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

Endospora

Le endospore consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali molto avverse.

Capitolo 2

La struttura della cellula

2.1 La parete cellulare

Tutti i batteri dispongono di una parete cellulare, la quale assume un ruolo strutturale, conferendo la forma specifica della specie e rigidità, e protettivo, ad esempio contro la lisi. Il citoplasma dei batteri infatti contiene un'alta concentrazione di soluti, creando una pressione osmotica significativa dell'ordine di 2atm. Lo studio della parete cellulare è stato importante non solo per capire ulteriormente i processi vitali di una cellula procariote, ma anche per la sintesi di antibiotici. Questi ultimi infatti distruggono la parete cellulare causando la morte dell'agente patogeno senza causare effetti secondari sul paziente in quanto le cellule umane sono prive di essa.

2.1.1 Peptidoglicano

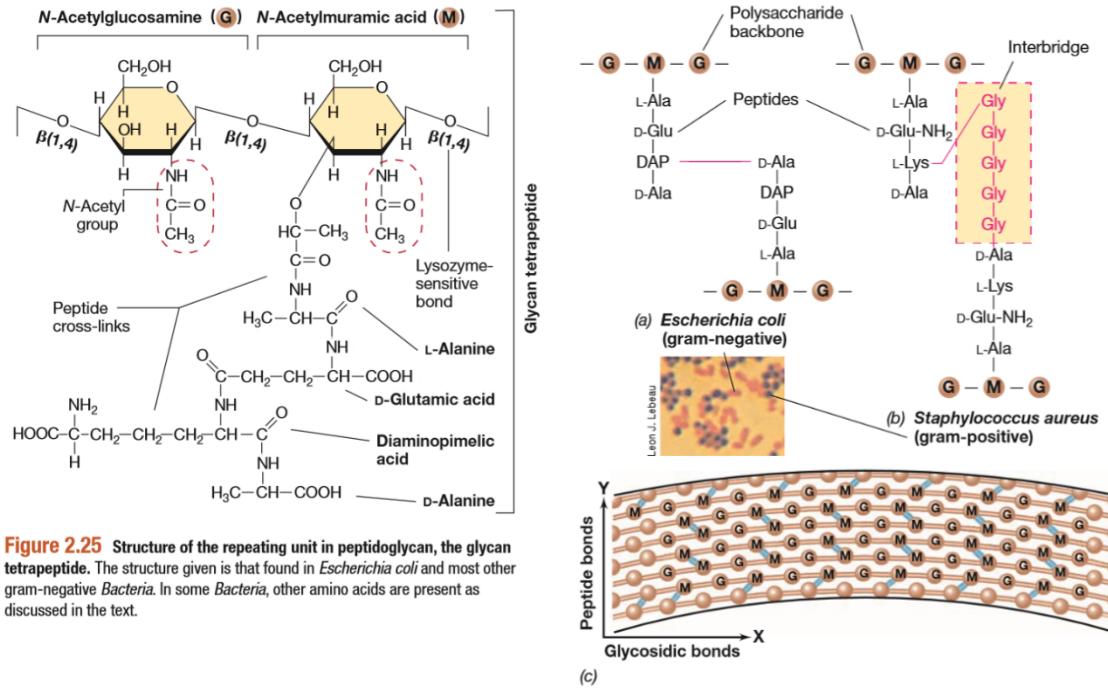
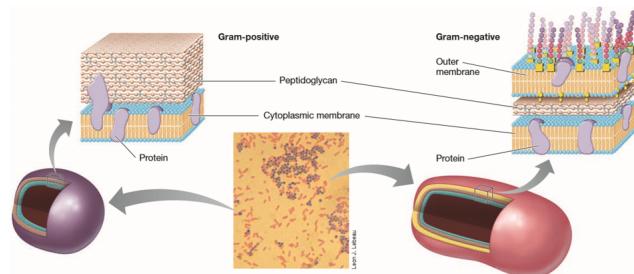


Figure 2.25 Structure of the repeating unit in peptidoglycan, the glycan tetrapeptide. The structure given is that found in *Escherichia coli* and most other gram-negative Bacteria. In some Bacteria, other amino acids are present as discussed in the text.

2.1. LA PARETE CELLULARE

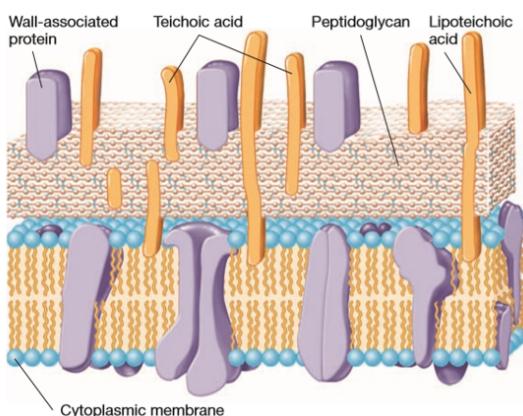
La parete cellulare dei batteri possiede uno strato di peptidoglicano (mureina) che conferisce rigidità. È un polisaccaride composto principalmente da due derivati dello zucchero, N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), entrambi strutturalmente simili al glucosio. Lunghe catene di peptidoglicano (formate da NAM e NAG covalentemente associate) vengono sintetizzate vicine tra di loro, creando un foglio che circonda la cellula. Sono connesse da quattro amminoacidi (solitamente L-Alanina, D-Alanina D-Acido glutammico e Acido diamino-pimelico (DAP)) che formano legami crociati diretti o indiretti (con ponte peptidico) a seconda della natura della cellula. Nei batteri gram-negativi il legame crociato è formato da un legame peptidico dal gruppo amminico di DAP di una catena con il gruppo carbossile dell'ultimo D-Alanina dell'altra catena. Nei batteri gram-positivi invece, il legame spesso avviene tramite un corto ponte peptidico il cui numero e tipo di amminoacidi varia da specie a specie.

2.1.2 Parete cellulare nei gram-positivi e gram-negativi



viene estratto dall'alcol dai batteri gram-negativi ma non dai gram-positivi. Come si è visto i batteri gram-positivi hanno una parete cellulare molto spessa che consiste principalmente di peptidoglicano. Durante il Gram-staining tale parete è disidratata dall'alcol causando la chiusura dei pori della parete e impedendo al complesso cristallino di uscire. In contrasto nei batteri gram-negativi l'alcol penetra facilmente la membrana esterna ricca di lipidi ed estrae il complesso cristallino dalla cellula. Dopo il trattamento con l'alcol le cellule gram-negative sono quasi invisibili a meno che siano contro-macchiate da un secondo colorante, parte della procedura standard durante il Gram stain.

Parete cellulare nei gram+



Le pareti cellulari nel mondo dei batteri assumono principalmente due strutture diverse, che hanno portato ad una classificazione che consiste nel suddividere i microrganismi in gram-positivi e gram-negativi. Le differenze strutturali tra le pareti cellulari dei batteri gram-positivi e gram-negativi sono responsabili della reazione diversa alla reazione di gram-staining. Durante il Gram staining un complesso cristallino insolubile e violetto si forma nella cellula. Questo complesso

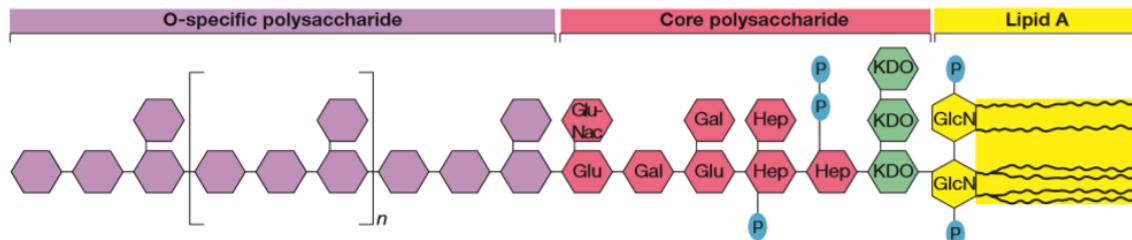
La prima differenza che si nota tra le due classificazioni di batteri è la quantità di peptidoglicano che possiedono: i gram-positivi sono infatti ricoperti da un solido strato di peptidoglicano che è anche 50 volte più spesso di quello dei gram-negativi, che invece ne possiedono solo un piccolo strato chiuso tra due membrane cellulari. Nei gram-positivi il 90% della parete cellulare è formato da diversi "fogli" di peptidoglicano sovrapposti (alcuni presentano un solo strato). Si pensa che il peptidoglicano sia sinte-

2.1. LA PARETE CELLULARE

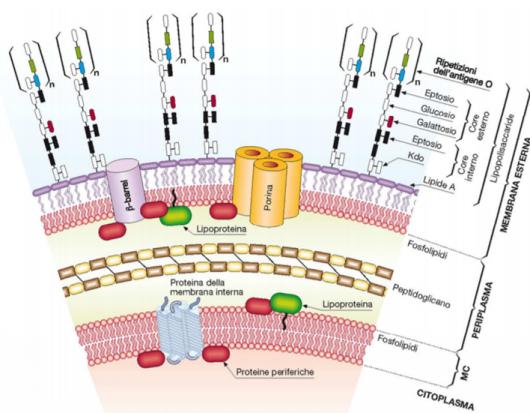
tizzato in "tupi" di 50nm di dimensione, i quali contengono al loro interno legami crociati di fili di glicano. Mentre questi tubi vengono sintetizzati, formano legami tra di loro aumentando la stabilità della struttura. Oltre alle proteine che svolgono la funzione di trasporto e strutturale i

gram-positivi presentano sulla parete cellulare anche acidi teicoici e lipoteicoici. Il termine "acidi teichoici" comprende tutte le pareti cellulari, la membrana citoplasmica e i polimeri capsulari composti da fosfato glicerol o fosfato di ribitololo (pag73 pdf?????). Gli acidi teichoici sono legati covalentemente all'acido muramico nella parete. Poiché i fosfati sono caricati negativamente, gli acidi teichoici sono in parte responsabili della carica elettrica negativa complessiva della superficie cellulare. Hanno anche la funzione di legare Ca_2^+ e Mg_2^+ per l'eventuale trasporto nella cellula. Alcuni di essi sono legati covalentemente ai lipidi della membrana, e questi sono chiamati acidi lipoteichoici. Gli acidi lipoteicoici assumono quindi la funzione di ancoraggio della parete alla membrana citoplasmatica. Microplasma, batteri patogeni legati ai batteri gram-positivi che causano diverse malattie infettive degli esseri umani e di altri animali, thermoplasma e simili, specie di Archaea riescono a vivere anche se non possiedono una parete cellulare. Questi organismi sono in grado di sopravvivere senza parete cellulare perché contengono membrane citoplasmiche insolitamente forti o perché vivono in habitat osmoticamente protetti come il corpo animale. La maggior parte dei microplasma hanno steroli nelle loro membrane citoplasmiche, e queste molecole conferiscono forza e rigidità alla membrana, come fanno nelle membrane citoplasmiche delle cellule eucariotiche. Anche le membrane dei termoplasma contengono molecole chiamate lipolicani che svolgono una funzione di rafforzamento simile.

Parete cellulare nei gram-



2.1. LA PARETE CELLULARE

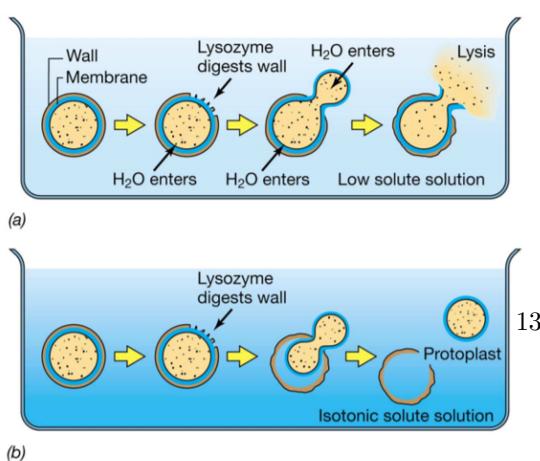


smatica si diffondono all'esterno dalla cellula. Queste proteine sono presenti in una regione chiamata periplasma. Questo spazio, situato tra la superficie esterna della membrana citoplasmica e la superficie interna della membrana esterna, è largo circa 15nm. Il periplasma ha una consistenza simile a quella di un gel, dovuta all'alta concentrazione di proteine. A seconda dell'organismo, il periplasma può contenere diverse classi di proteine:

- Enzimi idrolitici: svolgono un ruolo nella degradazione iniziale delle molecole alimentari.
- Proteine leganti: iniziano il processo di trasporto dei substrati.
- chemiorecettori: proteine che governano la risposta chemiotattica.

La maggior parte di esse raggiunge il periplasma tramite un sistema di esportazione di proteine presente nella membrana citoplasmatica. La membrana esterna è solo in parte impermeabile alle piccole molecole per la presenza di porine, proteine che fungono da canali per l'entrata e l'uscita di soluti. Sono note diverse porine, tra cui classi specifiche e non specifiche. Le porine non specifiche formano canali pieni d'acqua attraverso i quali può passare qualsiasi piccola sostanza, mentre quelle specifiche contengono un sito di legame per solo una o un piccolo gruppo di sostanze strutturalmente correlate. Strutturalmente, le porine sono proteine transmembrana composte da tre sotto unità identiche. Oltre ai tre canali principali che si vengono a formare, nel centro della porina si trova un piccolo foro di circa 1nm di diametro attraverso il quale possono viaggiare molecole estremamente piccole.

2.1.3 Lisozima



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

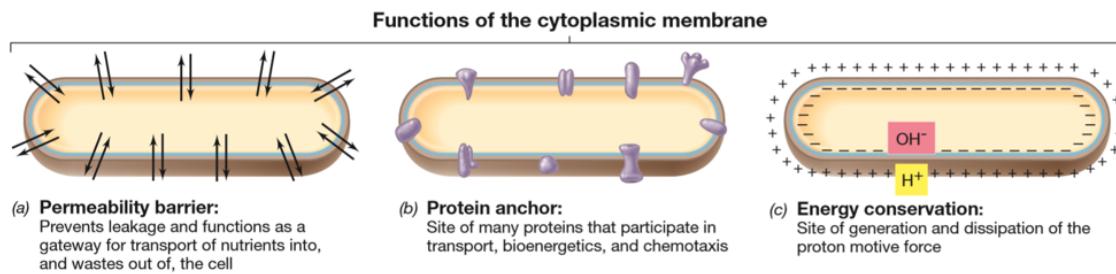
2.2. LA MEMBRANA CITOPLASMATICA

NAG.

seguito all'ingresso di acqua nella cellula

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

2.2 La membrana citoplasmatica

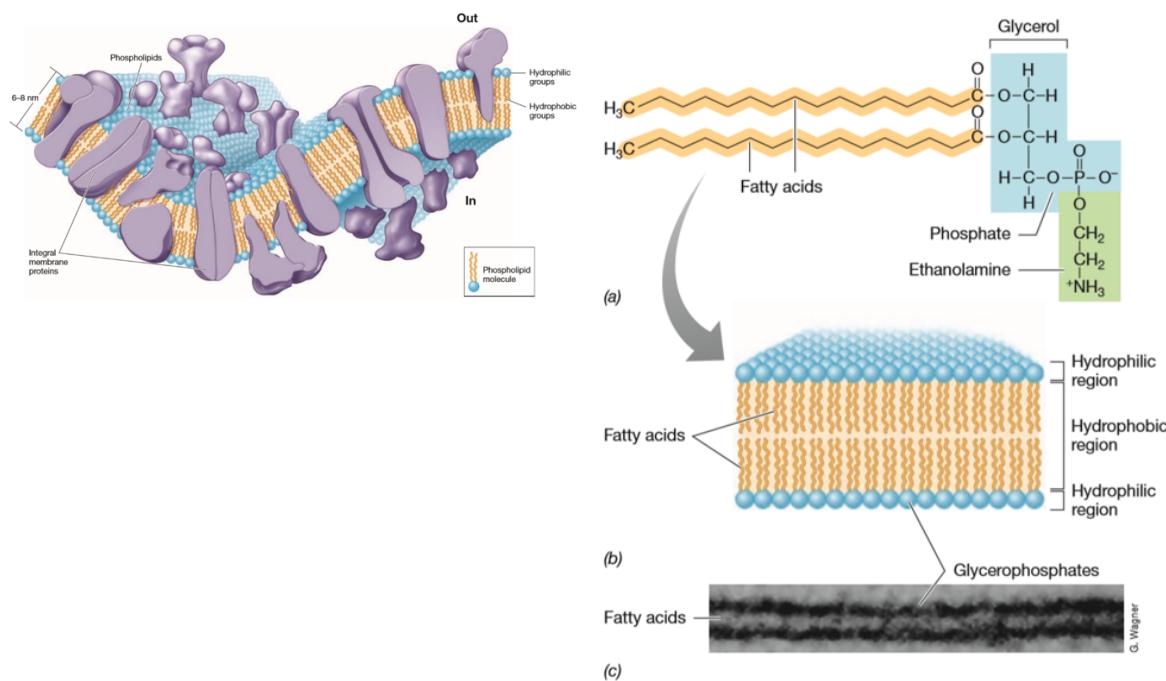


La membrana citoplasmatica circonda il citoplasma e lo separa dall'ambiente. Nel caso in cui la membrana citoplasmatica sia compromessa, l'integrità della cellula viene distrutta, il citoplasma si disperde e di conseguenza il batterio muore. La membrana non è così rigida da conferire un'adeguata protezione contro la lisi, ma la sua mobilità le permette di svolgere la sua funzione principale: la permeabilità selettiva. Non solo, la membrana funge anche da sito di ancoraggio per proteine che sono coinvolte in alcuna attività e da conservatrice di energia.

2.2.1 La struttura

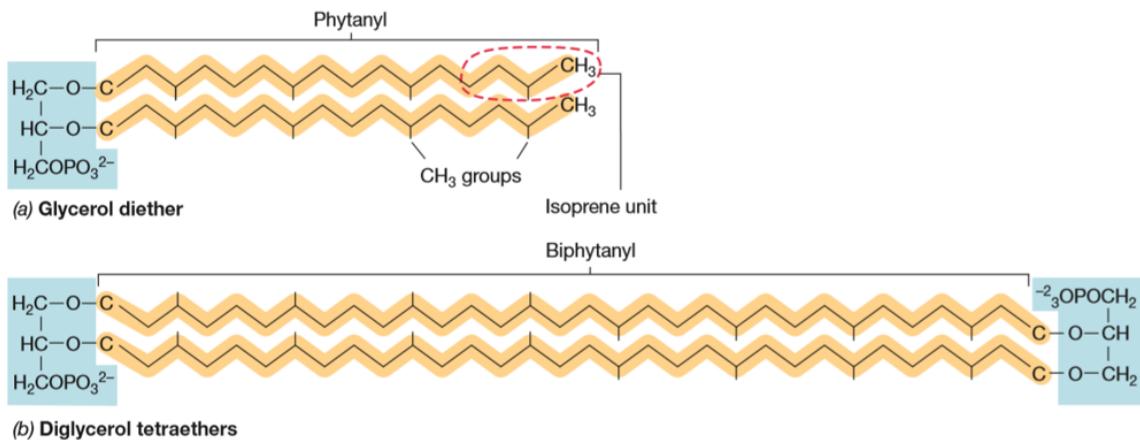
La struttura generale della membrana è quella di un doppio strato fosfolipidico. I fosfolipidi sono molecole composte da una coda idrofobica (acidi grassi) e una testa idrofila (glicerolo-fosfato) (Figura 2.14). Quando i fosfolipidi si aggregano in una soluzione acquosa, formano naturalmente bistrati. 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

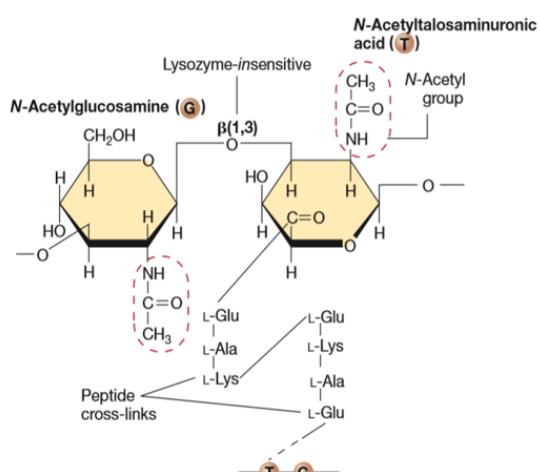
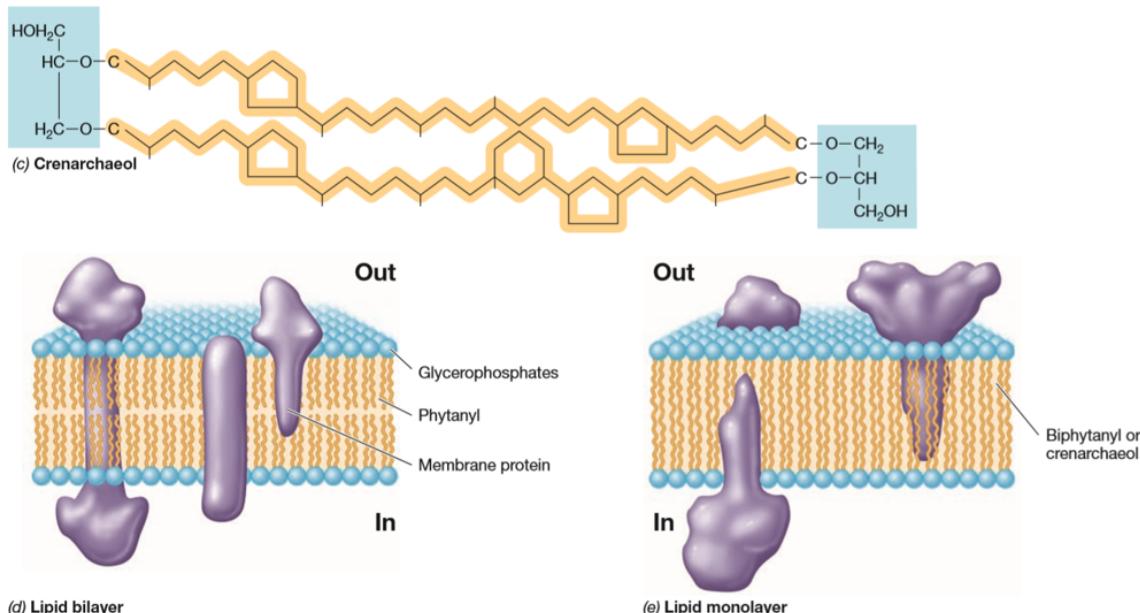


2.3 Membrana e parete degli archaea

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.



2.3. MEMBRANA E PARETE DEGLI ARCHAEA



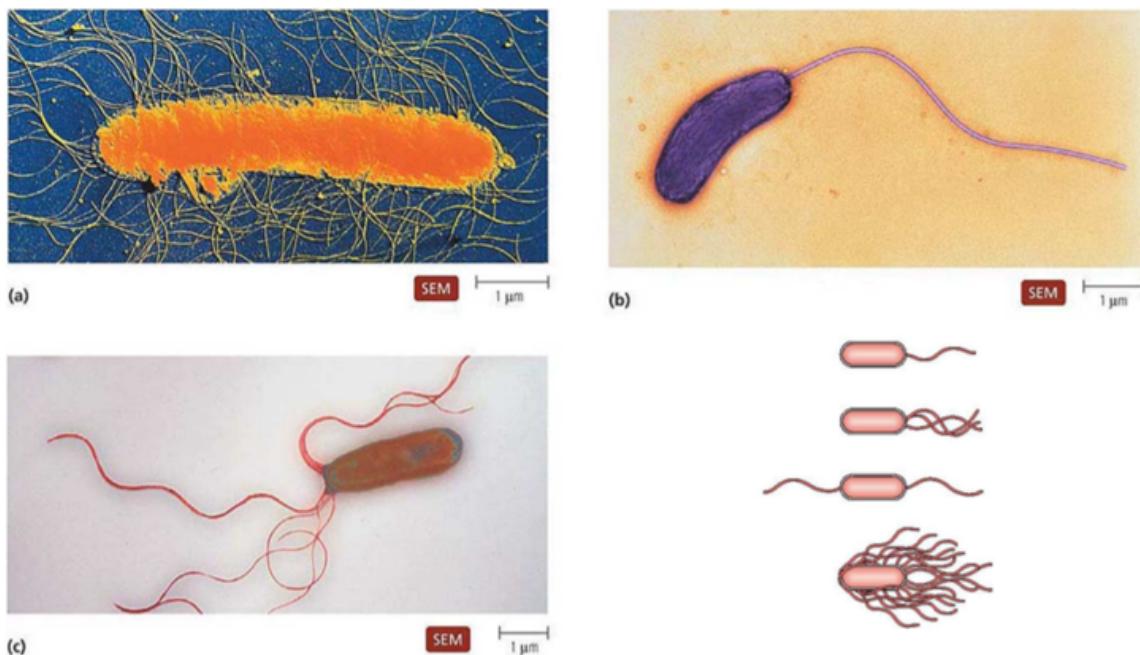
Le principali differenze sono le catene isopreniche e il fatto che alcune sono a monostrato invece che bistrato. A differenza dei bistrati lipidici, le membrane monostrato lipidiche sono estremamente resistenti al calore e sono quindi ampiamente distribuite tra Archaea ipertermofili, organismi che crescono 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 pseudopeptidoglico, costituita da NAG e, al posto di avere il NAM, ha l'acido N-acetyltaulosaminuronic (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.

tuita da NAG e, al posto di avere il NAM, ha l'acido N-acetyltaulosaminuronic (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 Locomozione microbica

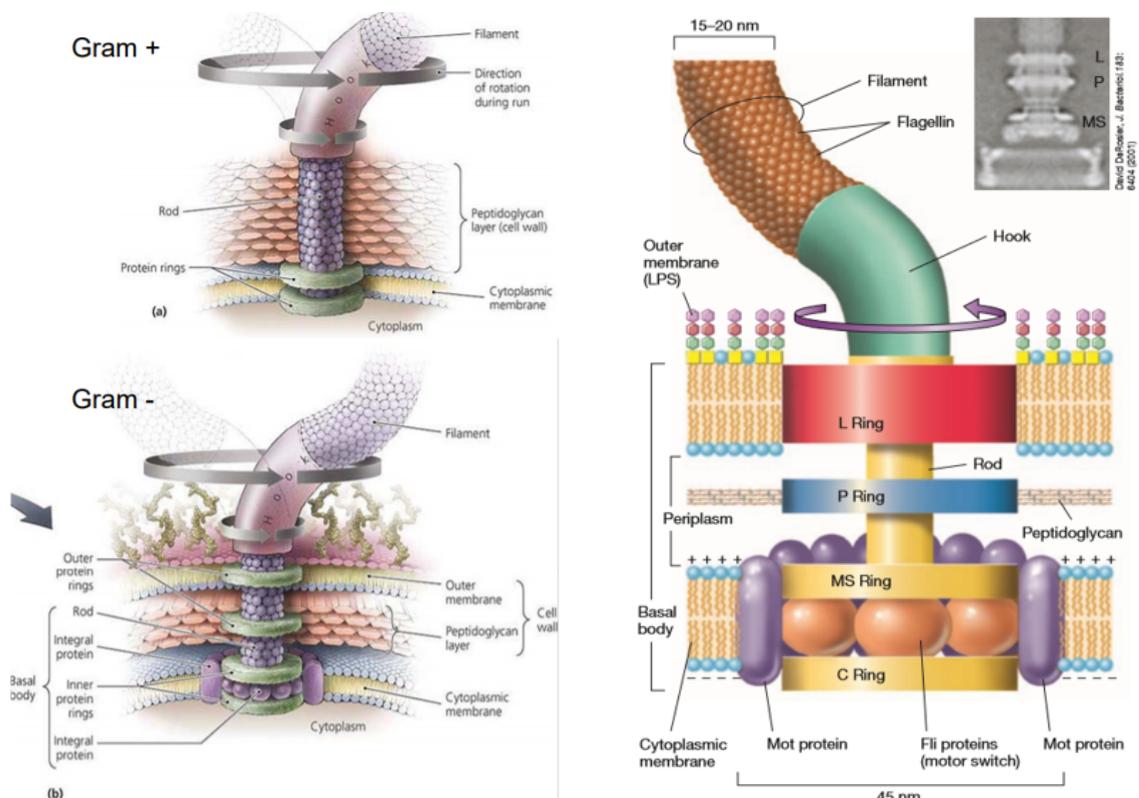
Molti batteri hanno la capacità di potersi muovere sotto il loro controllo, spesso con l'aiuto di strutture chiamate flagelli che permettono loro di rispondere a degli stimoli ambientali, detti tassi. I due principali tipi di movimento sono nuotare e moto a scorrimento (gliding).

2.4.1 Il flagello



I flagelli batterici sono lunghe e sottili appendici libere da un'estremità e attaccate alla cellula all'altra estremità. I flagelli batterici sono così sottili (15-20nm, a seconda della specie) che un singolo flagello non può essere visto dalla microscopia ottica a meno che non sia macchiato per aumentarne il diametro. Tuttavia, i flagelli sono facilmente visibili con il microscopio elettronico. I flagelli differiscono per numero e posizione a seconda della specie. Possono assumere un'organizzazione peritrica (peritrichous) (a) quando numerosi flagelli sono distribuiti su tutta la superficie cellulare. Flagelli polari si trovano soltanto alle estremità della cellula (b). L'organizzazione lofotrica (lophotrichous) (c) indica la presenza di più di un flagello polare.

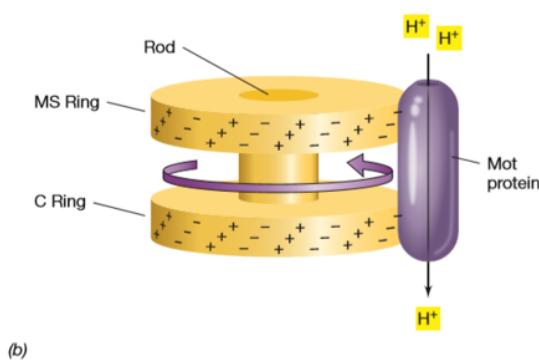
2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA



Il flagello è un'elica la cui la distanza tra curve adiacenti è costante. Questa lunghezza d'onda è una caratteristica che differisce da specie a specie. È composto principalmente da tre parti: il filamento, l'uncino (hook) e la base. Mentre le prime due hanno una composizione chimica e una struttura molto simile tra i vari batteri, il modo in cui il batterio sia gram-positivo o gram-negativo. Il filamento è composto da molte copie della proteina flagellina. La forma e la lunghezza d'onda del flagello sono in parte determinate dalla struttura della proteina flagellina e in dalla direzione di rotazione del filamento. La sequenza di amminoacidi della flagellina è altamente conservata in specie di batteri, suggerendo che la motilità dei flagelli si è evoluta presto e ha radici profonde all'interno di questo dominio. L'uncino è chimicamente diverso dal filamento ed è costituito da un solo tipo di proteina. La base è ancorata alla membrana citoplasmatica e alla parete cellulare e ha una funzione meccanica, con un funzionamento analogo a quello di un motore a propellenza. Il motore consiste in un'asta centrale, chiamata bastoncello, che attraversa diversi anelli. Nei batteri gram-positivi, che non hanno una membrana esterna, possiedono solo la coppia di anelli più interna. Intorno all'anello interno e ancorato nella membrana citoplasmatica c'è una serie di proteine chiamate proteine Mot. Un insieme finale di proteine, chiamate proteine Fli, funzionano come l'interruttore del motore, invertendo la direzione di rotazione del flagello in risposta ai segnali intracellulari. Nei batteri gram-negativi, un anello esterno, chiamato anello L, è ancorato nello strato di lipopolissaccaride. Un secondo anello, chiamato anello P, è ancorato nello strato di peptidoglicano della parete cellulare. Una terza serie di anelli, chiamati anelli MS e C, si trovano rispettivamente all'interno della membrana citoplasmatica e del citoplasma.

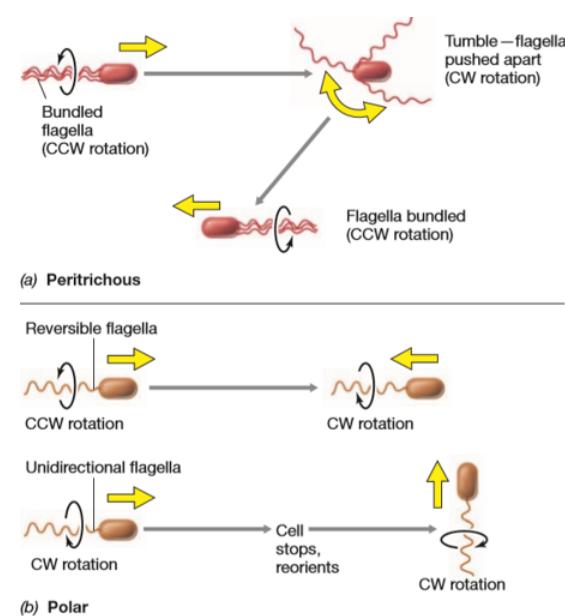
2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA

2.4.2 Il movimento flagellare



verso i canali delle proteine Mot esercitano forze elettrostatiche su cariche disposte ad elica sulle proteine del rotore. Le attrazioni tra cariche positive e negative causano quindi la rotazione del corpo basale man mano che i protoni scorrono attraverso le proteine Mot.

Il movimento flagellare nelle diverse categorie



Il flagello è un piccolo motore rotativo. Questi motori contengono due componenti principali: il rotore e lo statore. Nel motore del flagello, il rotore è costituito dall'asta centrale e dagli anelli L, P, C e MS. Collettivamente, queste strutture costituiscono il corpo basale. Lo statore è costituito dalle proteine Mot che circondano il corpo basale e generano momento. La rotazione del flagello è impartita dal corpo basale. L'energia necessaria per la rotazione del flagello proviene dalla forza protomotrice. Il movimento dei protoni attraverso la membrana citoplasmica attraverso il complesso Mot aziona la rotazione del flagello. Circa 1000 protoni sono traslocati ad ogni rotazione del flagello. In questo modello di turbina protonica, i protoni che scorrono attraverso i canali delle proteine Mot esercitano forze elettrostatiche su cariche disposte ad elica sulle proteine del rotore. Le attrazioni tra cariche positive e negative causano quindi la rotazione del corpo basale man mano che i protoni scorrono attraverso le proteine Mot.

Viene descritto il movimento in procarioti peritrichous e polarizzati.

(a) Peritrichous: il movimento in avanti è causato da tutti i flagelli che rotano in senso antiorario (CCW) in un fascio. La rotazione oraria (CW) causa un “ruzzolamento” (tumble) della cellula, che le permette di modificare la direzione all'inizio di una nuova rotazione dei flagelli in senso antiorario.

(b) Polare: la cellula cambia direzione invertendo la rotazione flagellare passando dal tirare allo spingere la cellula o, con flagelli unidirezionali, fermandosi periodicamente per riorientarsi e successivamente muovendosi in avanti attraverso una rotazione in senso orario.

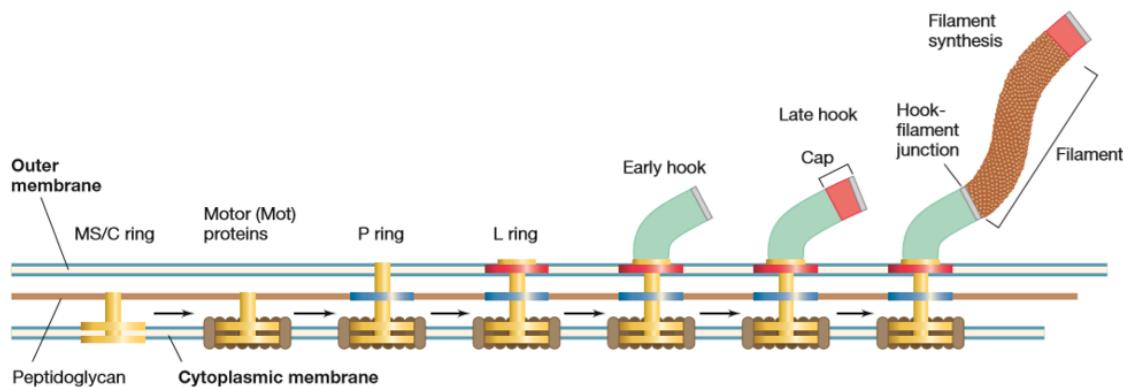
La freccia gialla mostra la direzione in cui la cellula si sta muovendo.

2.4.3 La sintesi flagellare

La sintesi del flagello non avviene alla base, come ad esempio i capelli umani, ma dalla pun-

2.4. LOCOMOZIONE MICROBICA

ta. Per primo viene sintetizzato l'anello MS ed inserito nella membrana citoplasmatica. Successivamente altre proteine di ancoraggio vengono sintetizzate insieme all'uncino, prima che il filamento cominci a formarsi. Le subunità di flagellina, sintetizzate nel citoplasma, vengono estruse attraverso un canale di 3nm all'interno del filamento e si aggiungono alla fine per formare il flagello maturo. Un "cap" proteico è presente alla fine del flagello in crescita, che aiuta le molecole di flagellina che si sono diffuse attraverso il canale del filamento ad assemblarsi in modo corretto.



2.4.4 I flagelli negli spirochetti

Nei batteri "spirochetti", ossia che assumono una forma a spirale, i flagelli sono assiali e si trovano tra la membrana citoplasmatica e quella esterna (sono gram-negativi). La rotazione dell'endoflagello porta l'intera cellula a ruotare su se stessa in un movimento elicoidale che consente lo spostamento anche in ambienti molto viscosi.



Capitolo 3

Popolazione batterica

Il grafico a slide 29 mostra le scale logaritmiche (andamento in moltiplicazioni di 10) e aritmetiche per mostrare l'andamento della popolazione batterica. Il tempo di generazione può essere calcolato come:

- N il numero finale di cellule.
- N_0 il numero iniziale di cellule.
- n il numero di generazioni.
- $N = N_0 2^n$.
- $n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$.

La popolazione ha un andamento in quattro fasi: latenza (assenza di crescita significativa, le cellule costituiscono tutte le operazioni necessarie alla crescita), esponenziale (crescita massima), stazionaria (la popolazione si stabilizza per mancanza di spazio e nutrienti, il numero di cellule che si dividono è uguale a quello di quelle che muoiono), morte (esponenziale ma più lenta della fase di crescita, causata da assenza di nutrienti e l'accumulo di materiale di scarto tossico).

3.0.1 Conta vitale

Piastre con lo spread-plate method con terreno solido con un volume di colura ($100\mu l$), dopo una notte si osserva il numero di colonie. Nel pour-plate method si aggiunge il terreno successivamente alla coltura. Per determinare quante colonie sono presenti si fa una diluizione seriale: si prende un ml di coltura e lo si aggiunge a $9ml$ di terreno, ripetendo l'operazione fino a che si riesce a stimare la popolazione micròbica (tra le 30 e le 300 colonie per avere una conta affidabile). Alla conta si moltiplica per l'inverso della diluizione. È importante ovviamente segnare i tempi in quanto la popolazione varia nel tempo. Misura solo le cellule vive.

3.0.2 Misura della torbidità

Avviene attraverso uno spettrofotometro: una fonte di luce è presente e attraversa un campione in una cuvetta con del terreno di coltura. Una fotocellula misura la quantità di luce che è riuscita ad attraversare la cuvetta. La misura calcolata è la densità ottica (OD) il logaritmo della luce incidente diviso il valore della luce non deviata. Valore compreso tra 0 e 1. Può generare una sovrastima in

3.1. SISTEMI DI COLTIVAZIONE MICROBICA

quanto non distingue tra cellule vive e cellule morte. A differenza della conta vitale 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 e colpire lo stesso il sensore. Quando si raggiunge un OD di 0.6-0.7 si diluisce la coltura. Quando si lavora con campioni ambientali bisogna concentrare il campione, pertanto si filtra a vuoto con filtro di membrana che trattiene le cellule batteriche in quanto più grandi dei pori e le rende osservabili e vengono messe su un terreno di coltura.

3.0.3 Most Probable Number

Utilizzata per stimare la popolazione microbica all'interno di un campione. Un metodo statistico basato sul fatto che maggiore la concentrazione della popolazione, maggiori le diluizioni necessarie per portare questo numero a 0. Prendo un campione, lo diluisco serialmente e partendo da ciascuna diluizione si incuba in 5 tubi un millilitro con un indicatore di pH che ritorna giallo quando il pH si abbassa, indicamento di metabolismo attivo e di presenza microbica. Si contano quanti tubi hanno cambiato colore. Nel campione più concentrato ci sono più campioni positivi. E si ottiene un codice, il numero di tubi positivi per ciascuna diluizione. Che può essere letto attraverso una tabella di riferimento.

3.1 Sistemi di coltivazione microbica

3.1.1 Chemostato

Utilizzati per volumi molto grandi (si dice in batch per una coltura in un sistema chiuso e rapidamente si arriva a saturazione), questo è un sistema che consente di mantenere la coltura in crescita esponenziale per tempi indefiniti. C'è la necessità di un rubinetto che regola la sterilità e un altro che elimina l'overflow. C'è sempre terreno fresco che entra e esausto che esce insieme alle cellule. All'equilibrio il volume del chemostato, il numero di densità e la concentrazione dei nutrienti rimangono costanti. La velocità di crescita è pertanto determinata dalla velocità di flusso, ovvero la concentrazione del nutriente limitante. INSERIRE GRAFO BATCH INSERIRE GRAFO CHEMOSTATO