

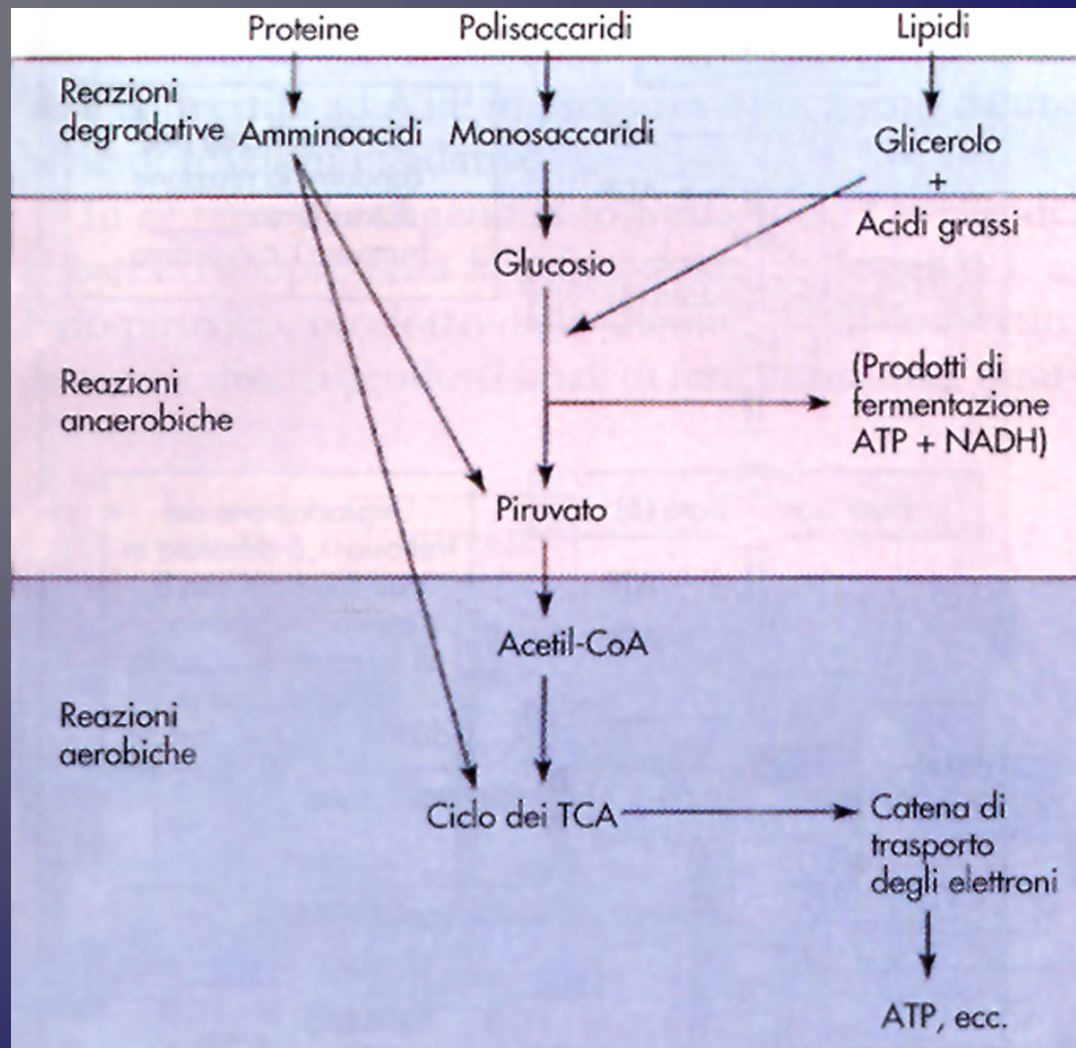
CRESCITA MICROBICA

Nutrizione microbica ed isolamento

Metabolismo e crescita batterica

•METABOLISMO-1

- I batteri per la crescita hanno bisogno di una sorgente di carbonio e azoto, una sorgente di energia, acqua e vari ioni
- I batteri patogeni ricavano energia dal metabolismo di zuccheri, grassi e proteine
- In base alla fonte di carbonio utilizzato per la crescita:
 - * **autotrofi**: utilizzano solo carbonio inorganico (CO_2)
 - * **eterotrofi**: utilizzano carbonio di composti organici



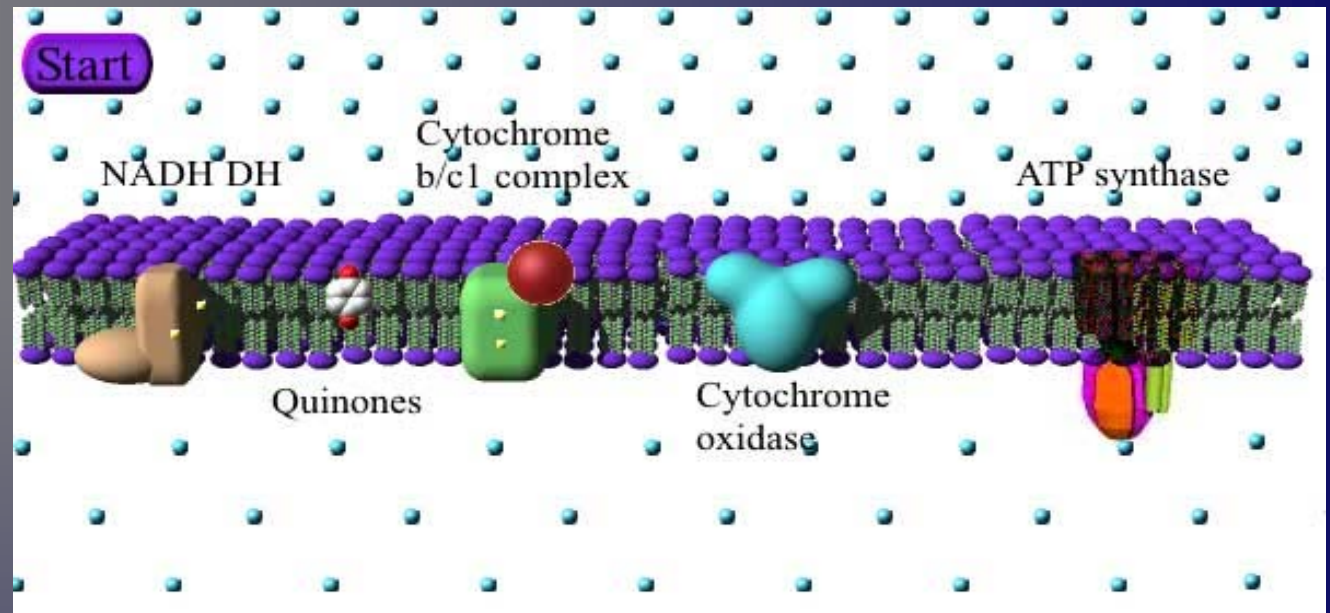
Catabolismo

Richieste batteriche per la crescita

- ossigeno (presente o assente)
- energia
- nutrienti
- temperatura ottimale
- pH ottimale

•METABOLISMO-2

- **Aerobi obbligati:** crescita solo in presenza di ossigeno, e.g.,
Mycobacterium tuberculosis
- **Anaerobi obbligati:** crescita solo in completa assenza di
ossigeno, e.g., *Clostridium tetani*
- **Anaerobi facoltativi:** la maggior parte dei batteri possono
crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno



- Metabolismo batterico

- La membrana cellulare e' sede di processi biosintetici (sintesi peptidoglicano), degli enzimi e dei vettori della catena respiratoria e dei processi di fosforilazione ossidativa

Obligate aerobes

- grow in presence of oxygen
- no fermentation
- oxidative phosphorylation

Obligate anaerobes

- no oxidative phosphorylation
- fermentation
- killed by oxygen
- lack certain enzymes

superoxide dismutase



catalase



peroxidase



Facultative anaerobes

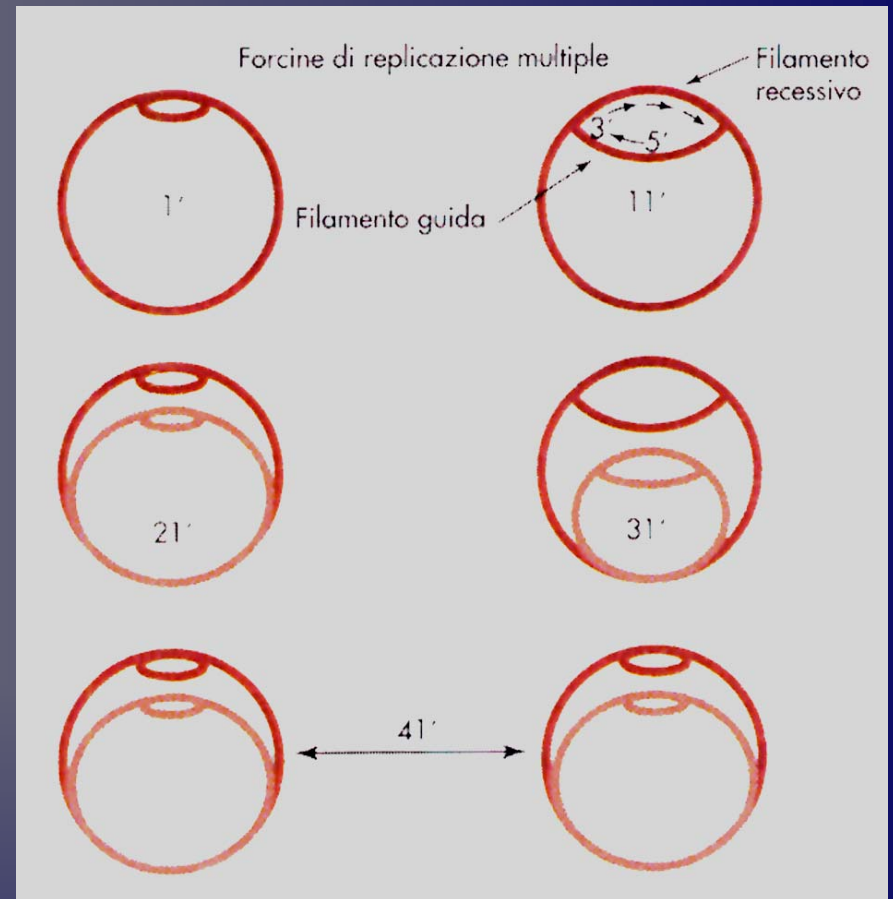
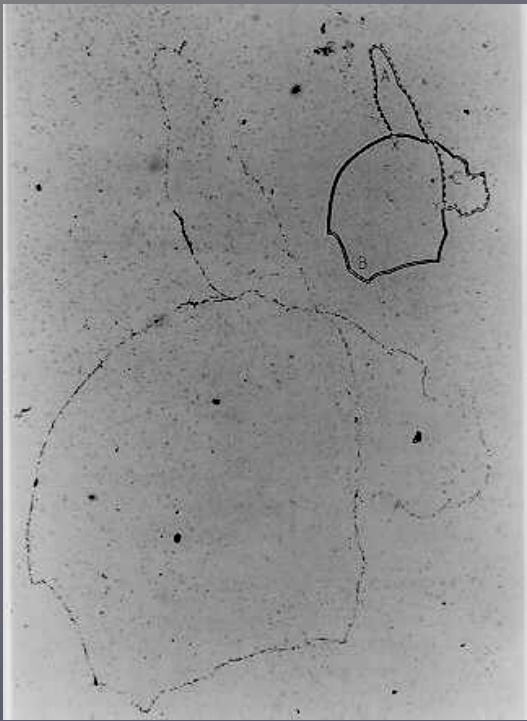
- fermentation
- aerobic respiration
- survive in oxygen

Nutrient Requirements

- Carbon
- Nitrogen
- Phosphorus
- Sulfur
- Metal ions (e.g. iron)

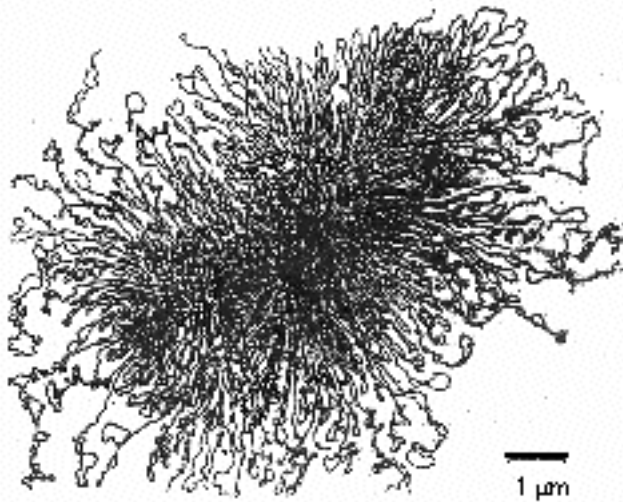
**Elementi
essenziali, loro
fonti e funzioni
nei procarioti**

ELEMENTO	FONTE	FUNZIONE NEL METABOLISMO
ELEMENTI ESSENZIALI PRINCIPALI		
C	Composti organici, CO ₂	} Principali componenti del materiale cellulare
O	O ₂ , H ₂ O, composti organici	
H	H ₂ , H ₂ O, composti organici	
N	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , composti organici	
S	SO ₄ ²⁻ , HS ⁻ , S ⁰ , composti organici sulfurei	Costituente di amminoacidi contenenti zolfo, cisteina, metionina, tiammina, pirofosfato, coenzima A, biotina e acido alfa-lipoico
P	HPO ₄ ²⁻	Costituente di acidi nucleici, fosfolipidi, nucleotidi
K	K ⁺	Principale catione inorganico, cofattore (per esempio, piruvato chinasi)
Mg	Mg ²⁺	Cofattore di molti enzimi (per esempio, chinasi); componente delle pareti cellulari, membrane, ribosomi ed esteri fosforilati
Ca	Ca ²⁺	Componente di esoenzimi (amilasi, proteasi) e di pareti cellulari: componente principale di endospore come dipicolinato di Ca
Fe	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Presente nei citocromi, ferredossine e altre proteine ferro-zolfo; cofattore (deidratasi)
Na	Na ⁺	Trasporto
Cl	Cl ⁻	Importante anione inorganico
ELEMENTI ESSENZIALI SECONDARI		
Zn	Zn ²⁺	Componente degli enzimi alcool deidrogenasi, fosfatasi alcalina, aldolasi, RNA e DNA polimerasi
Mn	Mn ²⁺	Presente nella superossido dismutasi; cofattore degli enzimi PEP carbossilasi, isocitrato sintasi
Mo	MoO ₄ ²⁻	Presente nella nitrato reductasi, nitrogenasi, xantina deidrogenasi e formiato deidrogenasi
Se	SeO ₃ ²⁻	Componente della glicina reductasi e formiato deidrogenasi
Co	Co ²⁺	Elemento richiesto in enzimi contenenti il coenzima B ₁₂ (glutammato mutasi, metilmalonil coenzima A mutasi)
Cu	Cu ²⁺	Presente in citocromo ossidasi e nitrito reductasi
Ni	Ni ²⁺	Presente in ureasi, idrogenasi e fattore F ₄₃₀
W	WO ₄ ²⁻	Presente in alcune formiato deidrogenasi

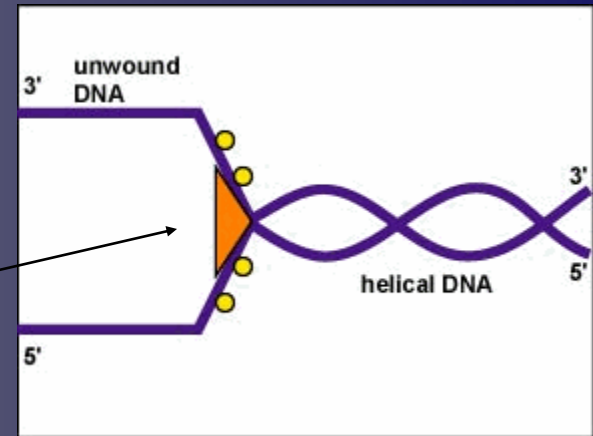


Duplicazione DNA
(semiconservativo)

- *OriC* = origine di replicazione; *elicasi* = apre la doppia catena; *primasi* = sintetizza i primers; *Dna polimerasi DNA dipendente*

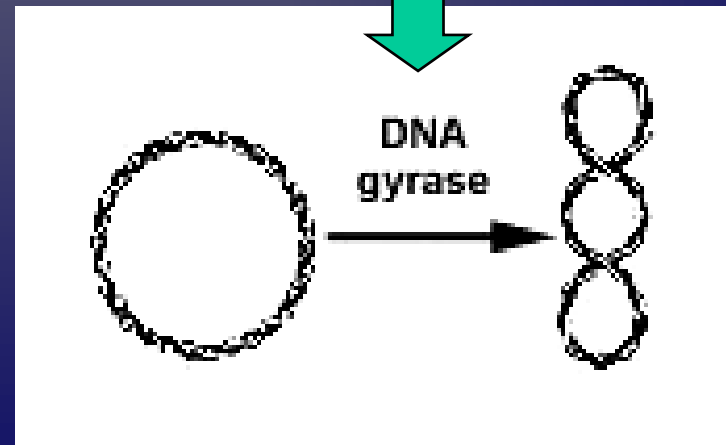


•topoisomerasi

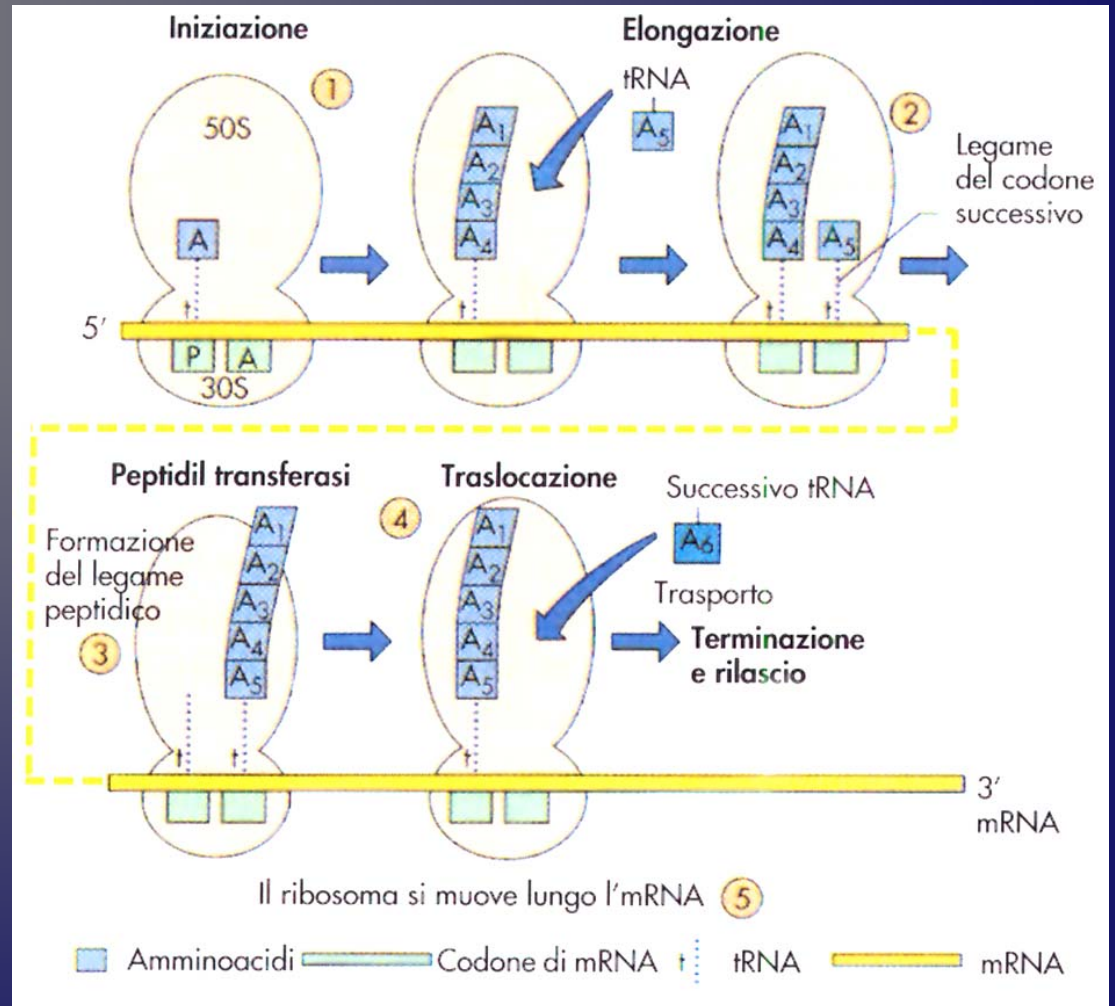


•Bersaglio dei fluorochinoloni
(ciprofloxacina, norfloxacina)

•DNA batterico



Sintesi proteica batterica

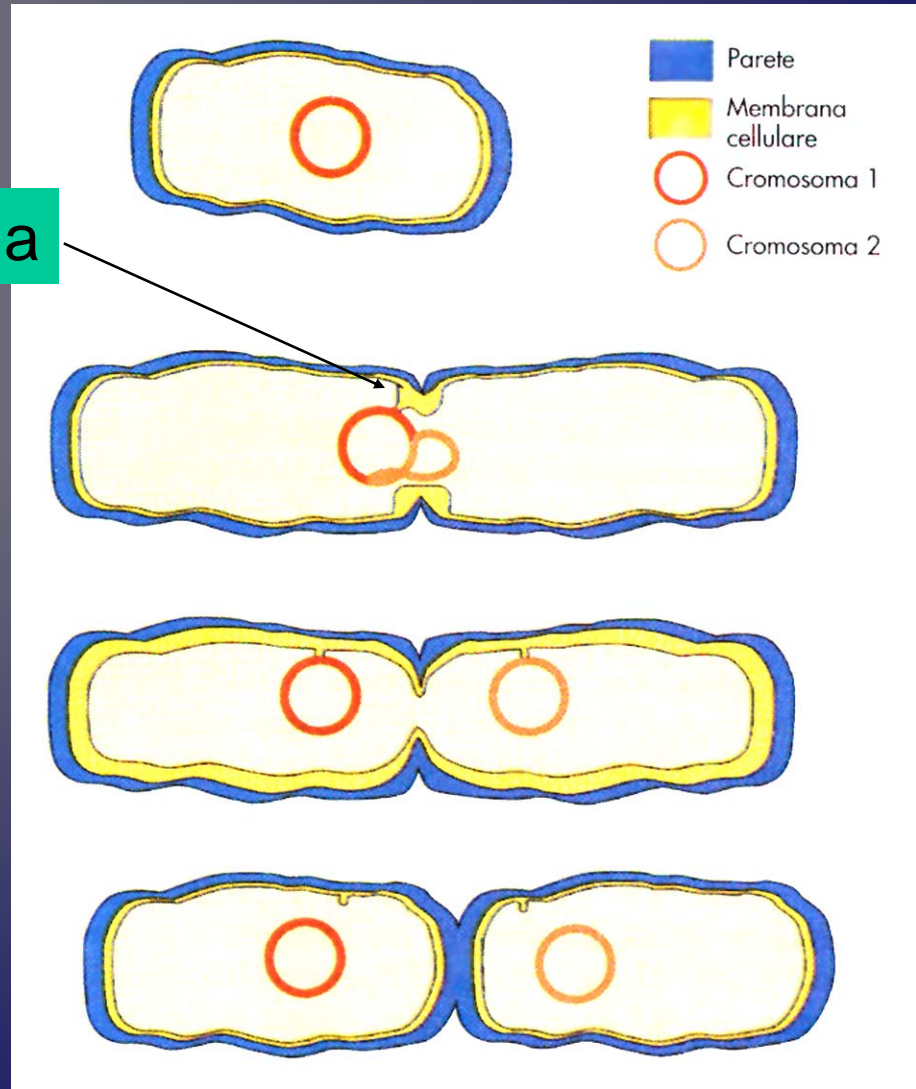


- **La sintesi proteica è il bersaglio della seconda più vasta classe di antibiotici**

- **Amminoglicosidi** (*streptomicina, gentamicina*) = legano le proteine del ribosoma 30S

- **Tetracicline** = impediscono l'elongazione del polipeptide a livello del ribosoma 30S

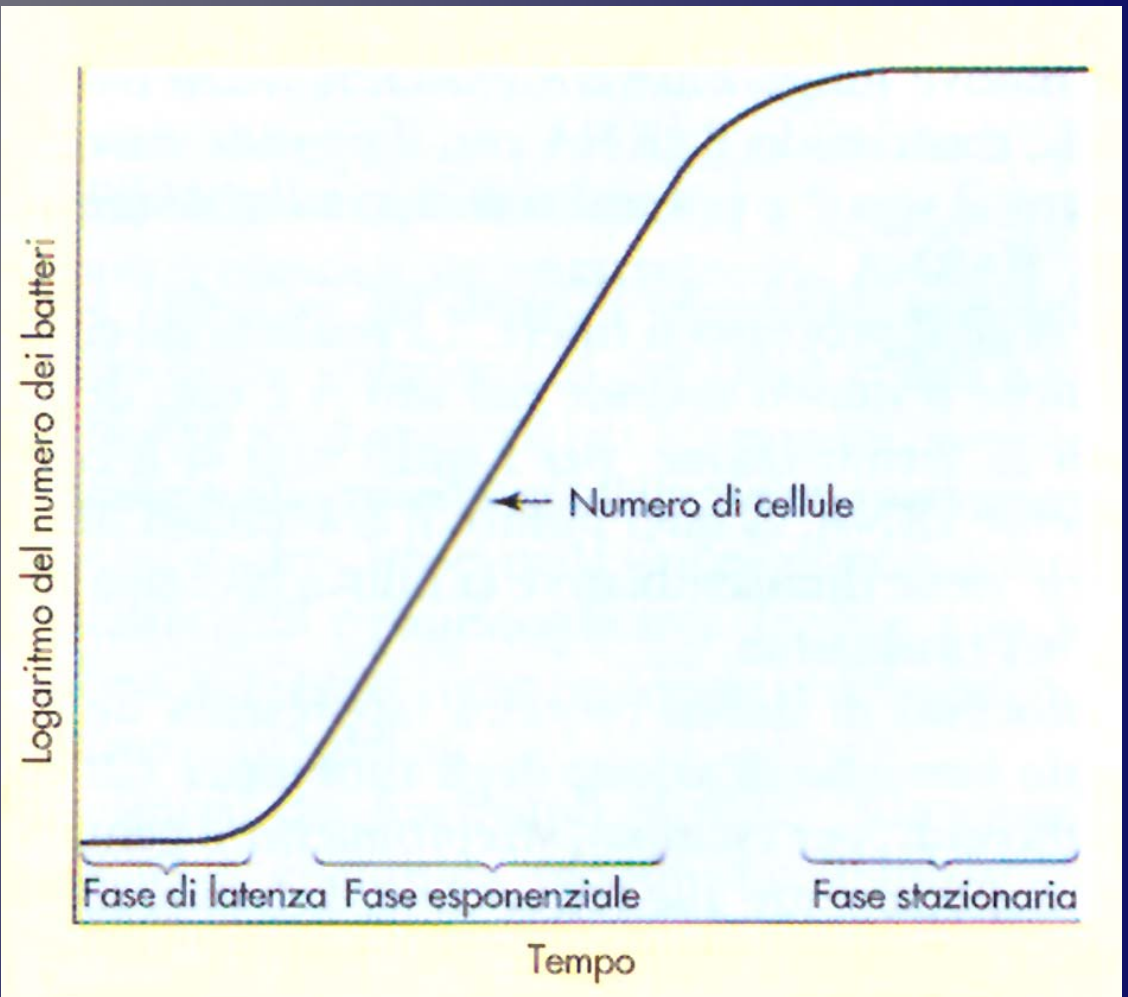
- **Macrolidi** (*eritromicina*) = impediscono l'elongazione del polipeptide a livello del ribosoma 50S



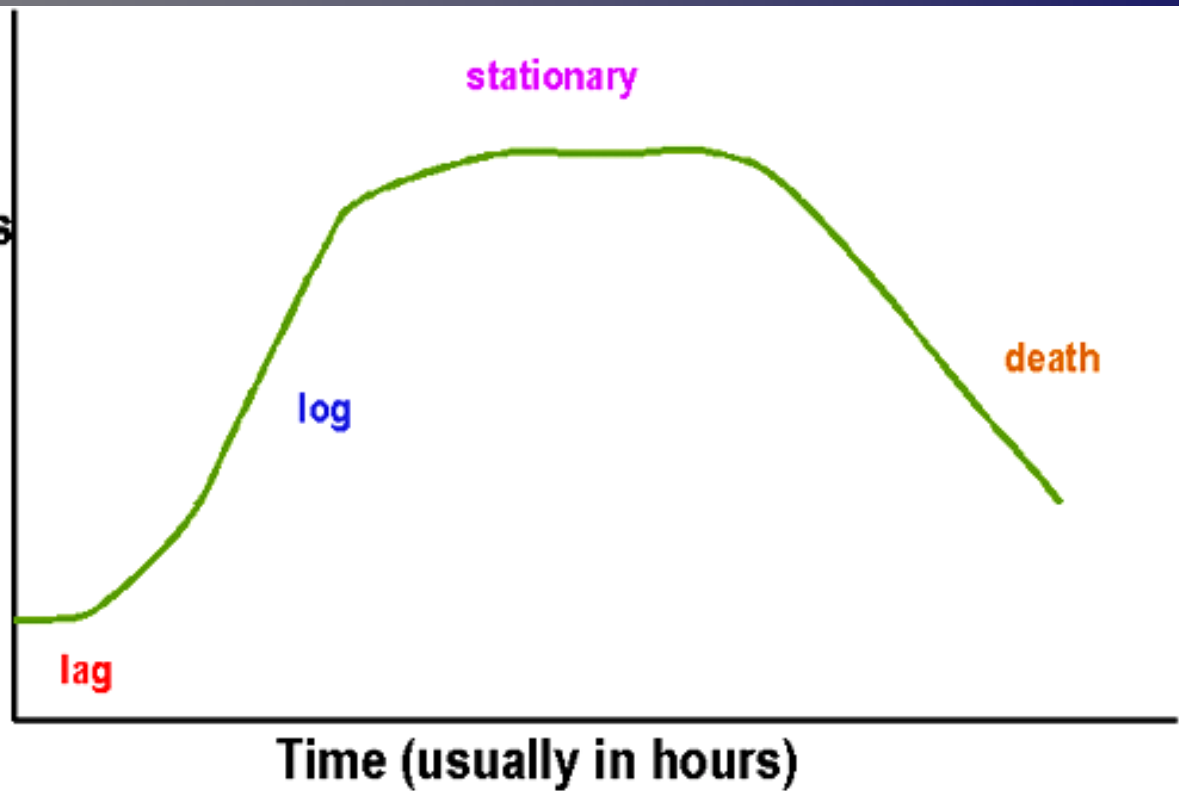
•mesosoma

Divisione della
cellula batterica

**Fasi della crescita
batterica**



Log number
of living cells
or turbidity



The Growth Curve

Metodi d'isolamento di colture pure

1. Tecnica dello striscio e della distribuzione su piastre.
2. Tecnica delle piastre disseminate.
3. Tecnica delle colture di arricchimento.
4. Tecnica delle diluizioni seriali.
5. Tecnica di isolamento di una singola cellula.

Colture pure e caratteri colturali

- I batteri o gli altri microrganismi, quando crescono su un terreno di laboratorio, sono chiamati coltura.

Colture pure e caratteri colturali: popolazioni microbiche naturali

Colture miste

- La popolazione microbica presente nel nostro ambiente è grande e complessa. Molte differenti specie microbiche abitano normalmente varie parti del nostro corpo (orale, intestinale, cutanea) ed in modo analogo il nostro ambiente (aria, suolo, acqua).

Colture pure e caratteri colturali: popolazioni microbiche naturali

Colture pure

- Una coltura pura è costituita da una popolazione di cellule derivate tutte da un'unica cellula madre. Essa rappresenta una condizione artificiale per l'accrescimento dei batteri ed è una condizione imposta da manipolazioni di laboratorio.

Caratteri colturali

- Uno dei principali caratteri dei batteri è l'aspetto (caratteri di accrescimento) che assumono dopo essere cresciuti su vari terreni.
- I caratteri colturali forniscono indizi utili per l'identificazione.

Coltivazione dei batteri

- Una condizione per poter studiare i microrganismi è poterli coltivare nelle condizioni di laboratorio.
- Per questo scopo si devono conoscere quali sostanze nutritive e quali condizioni fisiche essi richiedono.

Coltivazione dei batteri

- Tali informazioni hanno consentito di sviluppare numerosi terreni o mezzi per la loro coltura.

Esigenze nutrizionali

1. Sorgente di energia

- Organismi fototrofi
(Energia radiante).

- Organismi chemiotrofi
(Ossidazione dei composti chimici).

Esigenze nutrizionali

2. Sorgente di carbonio

- Organismi autotrofi (Fotoautotrofi e Chemioautotrofi)
(CO₂).
- Eterotrofi
(Composti organici).

Esigenze nutrizionali

3. Richiesta di azoto

- Azoto atmosferico.
- Composti inorganici dell'azoto.
- Azoto proteico.

Esigenze nutrizionali

4. Richiesta di zolfo e fosforo

- Composti organici dello zolfo.
- Composti inorganici dello zolfo.
- Zolfo elementare.
- Fosfati.

Esigenze nutrizionali

5. Elementi metallici

- Sodio – Ferro.
- Potassio – Zinco.
- Calcio – Rame.
- Magnesio – Fosforo.
- Manganese – Cobalto.

Esigenze nutrizionali

6. Vitamine e composti vitamino-simili

- Tiamina (B₁).
- Riboflavina.
- Niacina.
- Piridossina (B₆).
- Biotina.

Esigenze nutrizionali

6. Vitamine e composti vitamino-simili

- Acido pantotenico.
- Acido folico.
- Cobalamina (B₁₂).
- Vitamina K.

Esigenze nutrizionali

7. Bisogno di H₂O

- Tutte le sostanze nutritive devono essere in soluzione.

Esigenze gassose

1. Aerobi

- Si accrescono in presenza di ossigeno libero.

2. Anaerobi

- Si accrescono in assenza di ossigeno libero.

Esigenze gassose

3. Anaerobi facoltativi

- Si accrescono sia in presenza che in assenza di ossigeno libero.

4. Microaerofili

- Si accrescono in presenza di piccole quantità di ossigeno.

Tipi di coltura

1. COLONIE SU AGAR.
2. ACCRESCIMENTO SU AGAR A BECCO DI CLARINO.
3. ACCRESCIMENTO SU BRODO NUTRITIZIO.
4. ACCRESCIMENTO PER INFISSIONE IN GELATINA.

Colonie su piastra di Agar

- a) Dimensioni.
- b) Margine o bordo.
- c) Altezza.
- d) Cromogeni o pigmentazione
- e) Caratteri ottici.

Accrescimento di strisci su Agar a becco di clarino

- a) Quantità.
- b) Margine o bordo dell'accrescimento.
- c) Consistenza della massa di accrescimento.
- d) Cromogenesi o pigmentazione.

Accrescimento in brodo nutritizio

- a) Quantità di accrescimento.
- b) Distribuzione dell'accrescimento in tutto il brodo.
- c) Odore.

Caratteristiche visive dell'avvenuto accrescimento in brodo

1. Intorbidamento: formazione di una opacità più o meno densa.
2. Formazione di pellicola: una piccola quantità di cellule galleggia sulla superficie del terreno.
3. Sedimento: le cellule si depositano sul fondo del brodo, ma rientrano in soluzione se la provetta viene picchiettata.

Caratteristiche visive dell'avvenuto accrescimento in brodo

4. Mucosità: le cellule rimangono aggregate quando risalgono dal fondo della provetta in seguito a movimento.
5. Presenza di gas disciolto: si formano delle bolle quando il contenuto della provetta viene mescolato oppure quando viene inserita un'ansa calda.

Accrescimento in infissione in gelatina

- a) Accrescimento senza liquefazione.
- b) Accrescimento con liquefazione della gelatina.

Terreni batteriologici

- Terreni arricchiti (ad esempio con sangue, siero, emoglobina).
- Terreni selettivi.
- Terreni differenziali (ad esempio per emolisi, pH).
- Terreni di saggio (ad esempio per antibiotici, disinfettanti).

Terreni batteriologici

- Mezzi per il conteggio dei batteri.
- Mezzi per la caratterizzazione batterica (fermentazioni)
- Terreni di mantenimento.

Terreni batteriologici

Stato fisico:

- liquido;
- semisolido (+Agar 0,5%);
- solido (+Agar 2%).

Preparazione dei terreni colturali

1. Dissoluzione degli ingredienti in volume di H₂O.
2. Determinazione del pH ed eventuale correzione.
3. Distribuzione in contenitori idonei.
4. Sterilizzazione.

Agar

- L'Agar è sostanzialmente cellulosa e cioè estratto polisaccaridico (estere solforico di una molecola lineare di galattano) di alghe rosse marine della famiglia delle *Geliciaee*.

Agar

- Il potere di solidificazione varia a seconda del tipo di alga da cui deriva: *Gelidium*, *Gracilaria*, *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, *Pteroclada*.

Agar

Componenti principali:

- agarosio, al 70%;
- agaropectina, al 30%.

Agar

Componenti fisiche:

- punto di fusione 85°C ;
- stato di soprafusione fino a 42°C ;
- stato solido $<42^{\circ}\text{C}$.

Agar

- L'Agar non svolge altre funzioni nel terreno che non sia quella solidificante: non presenta perciò alcuna caratteristica nutritiva per i microbi.

Vita al di sopra dei 100°C

- Fino ad ora, la temperatura più elevata per la crescita batterica veniva considerata 105°C.
- Si riteneva che la temperatura massima di sopravvivenza fosse circa 100°C, vale a dire il punto di ebollizione dell'acqua.

Vita al di sopra dei 100°C

- In questi ultimi anni, tuttavia, sono stati individuati nuovi batteri termofili che crescono in fumarole di zolfo, localizzate lungo le spaccature ed i crinali del fondo dell'oceano, dalle cui bocche fuoriescono getti d'acqua ricca di zolfo con temperature superiori ai 350°C.

Vita al di sopra dei 100°C

- Si è osservato che questi batteri sono capaci di crescere e riprodursi a 115°C.
- Ciò conferma la possibilità di crescita batterica a temperature elevatissime.
- La pressione presente nel loro habitat è sufficiente a mantenere l'acqua allo stato liquido (a 265atm).

Vita al di sopra dei 100°C

- Le proteine, le membrane e gli acidi nucleici di questi batteri rimangono eccezionalmente stabili a queste temperature, tanto da rappresentare soggetti ideali per studiare le modalità necessarie alle macromolecole ed alle membrane per mantenersi stabili.

Vita al di sopra dei 100°C

- Si ritiene possibile, in un futuro prossimo, la progettazione di enzimi in grado di funzionare a temperature elevate.
- Alcuni enzimi termostabili, provenienti da questi batteri, possono risultare di estrema importanza nei vari campi industriali.

CRESCITA MICROBICA

Quantificazione dell'accrescimento

Misura quantitativa dell'accrescimento batterico

1. Numero delle cellule:
 - direttamente con il microscopio;
 - contatore di particelle;
 - conteggio delle colonie (UFC).

Misura quantitativa dell'accrescimento batterico

2. Massa delle cellule:

- mediante pesatura;
- misurazione dell'azoto cellulare;
- misurazione della torbidità.

Misura quantitativa dell'accrescimento batterico

3. Attività delle cellule:

- attività biochimica e dimensione della popolazione;
- contenuto di DNA, RNA e proteine.

CRESCITA MICROBICA

Riproduzione ed accrescimento

Riproduzione ed accrescimento

- Riproduzione → Divisione cellulare per scissione binaria.
- Accrescimento → Tasso di accrescimento espresso come tempo di generazione.

Moltiplicazione cellulare

- Nei batteri le cellule, come conseguenza di un coordinamento dei costituenti cellulari, raddoppiano tutte le strutture e, quindi, si dividono in due cellule figlie, che sono indistinguibili dalla cellula madre.

Ciclo cellulare

- Numerosi eventi chimici e fisici hanno luogo in una cellula batterica nel periodo compreso tra la sua generazione e la divisione in cellule figlie

Ciclo cellulare

Fasi:

- a) sintesi coordinata di macromolecole e di altri componenti cellulari (crescita);
- b) formazione del setto;
- c) divisione caratterizzata da una serie di reazioni che culminano nel trasferimento di una copia di DNA in ciascuna cellula delle cellule figlie.

Replicazione del DNA in *E.coli*

- Quando la velocità di crescita è elevata (20'-25', mentre il DNA si replica ogni 40'), prima della divisione cellulare, si avvia un nuovo ciclo di replicazione del DNA quando ancora non è stato completato il ciclo precedente.

Involucro e divisione cellulare

- Una volta raggiunto il valore di $2 \cdot L_u$, in corrispondenza di un punto mediano tra le due estremità cellulari, inizia a formarsi un setto e la sintesi della parete cellulare diviene bipolare.