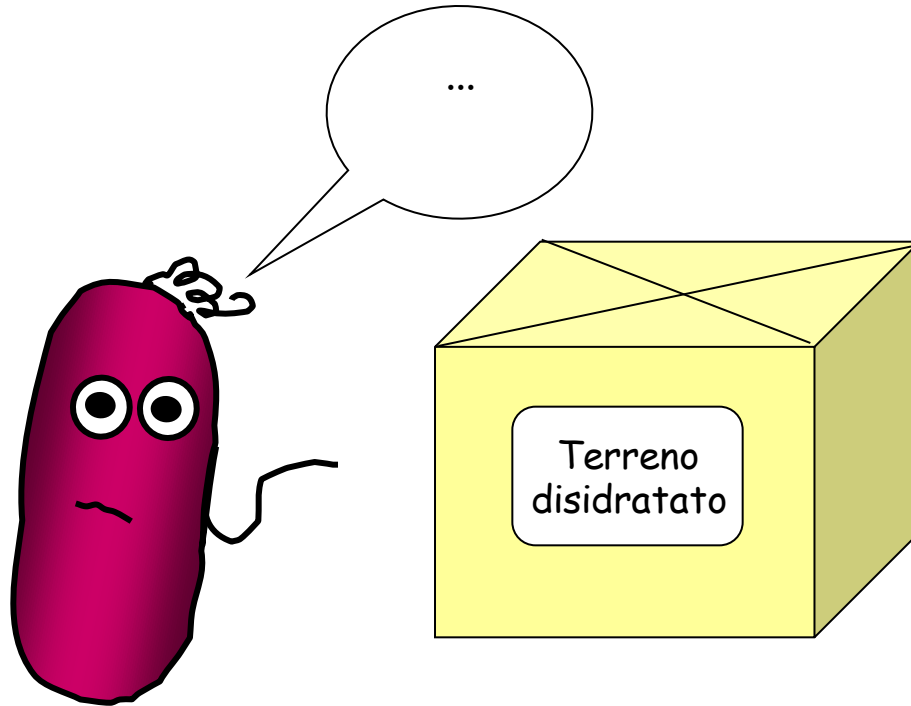


La velocità di crescita è influenzata anche dai fattori abiotici

Ci vogliono anche le condizioni fisiche
o chimiche adatte

Anche per i microrganismi il cibo
non è tutto...



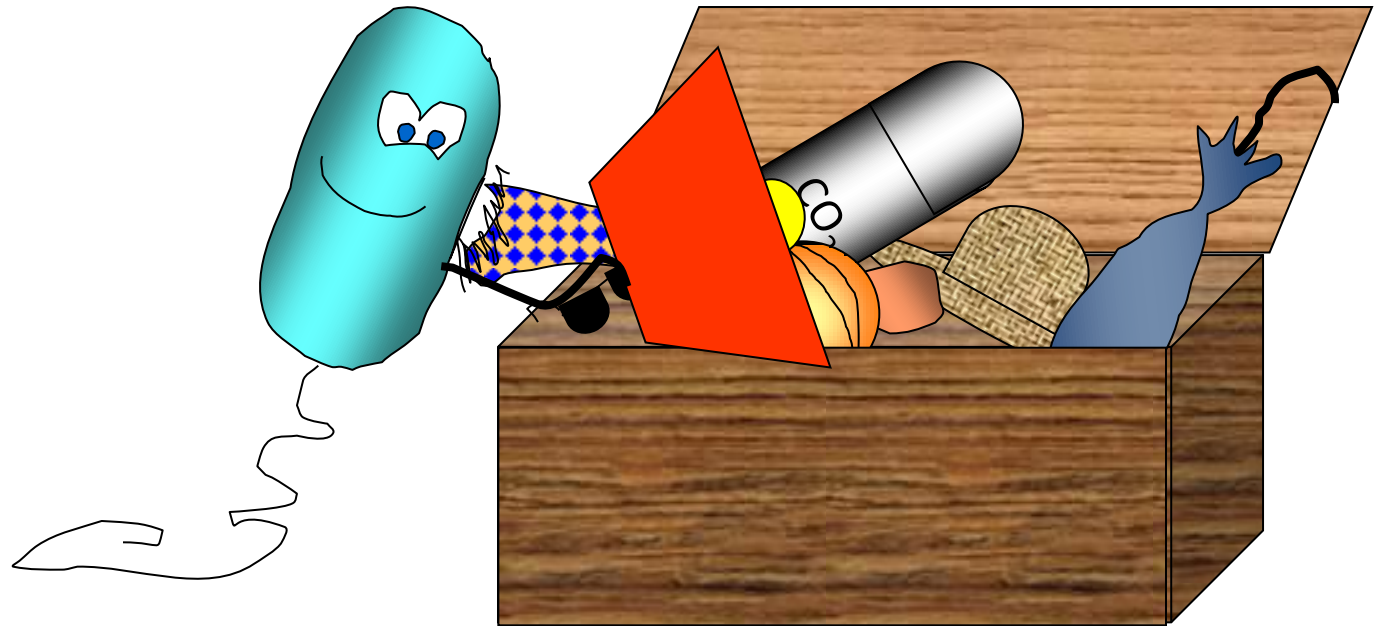
temperatura

pH

Pressione
osmotica

Idrostatica..

**i microrganismi tollerano
variazioni molto ampie di questi
fattori**

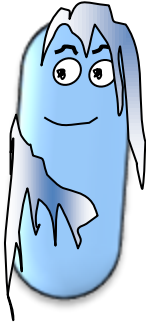


**Adottando strategie che permettono la vita anche in
ambienti caratterizzati da condizioni estreme**

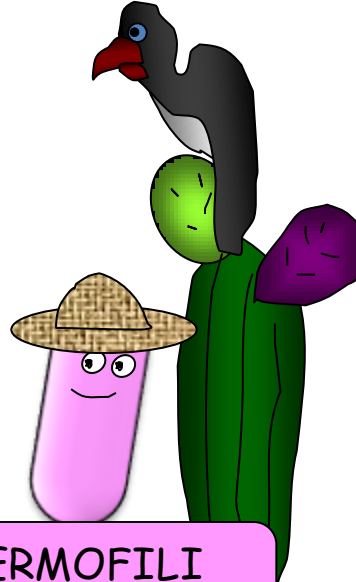
TEMPERATURA

Dove c'è acqua possono esserci microbi

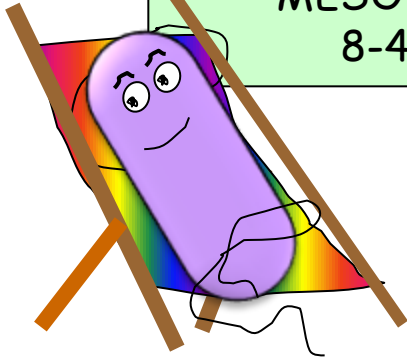
PSICROFILI
0-20



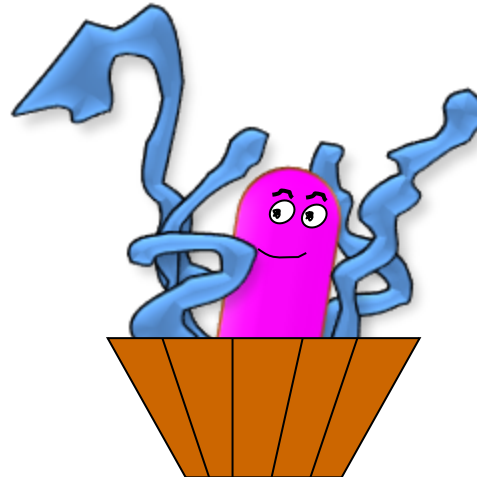
TERMOFILI
40-70



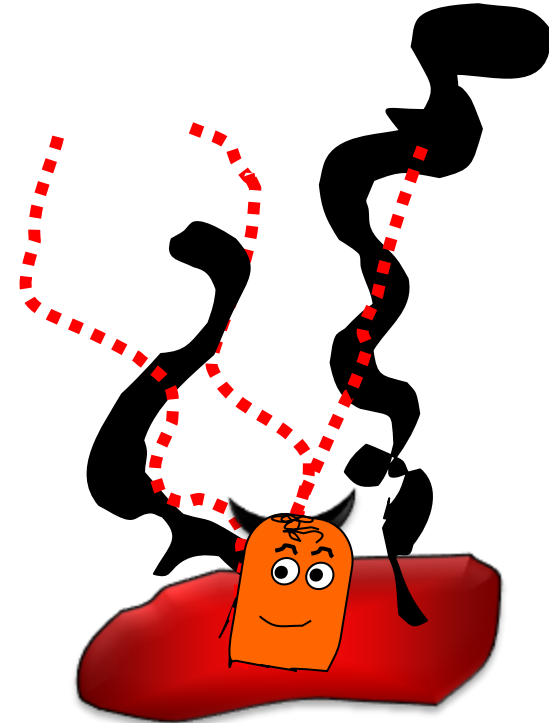
MESOFILI
8-46



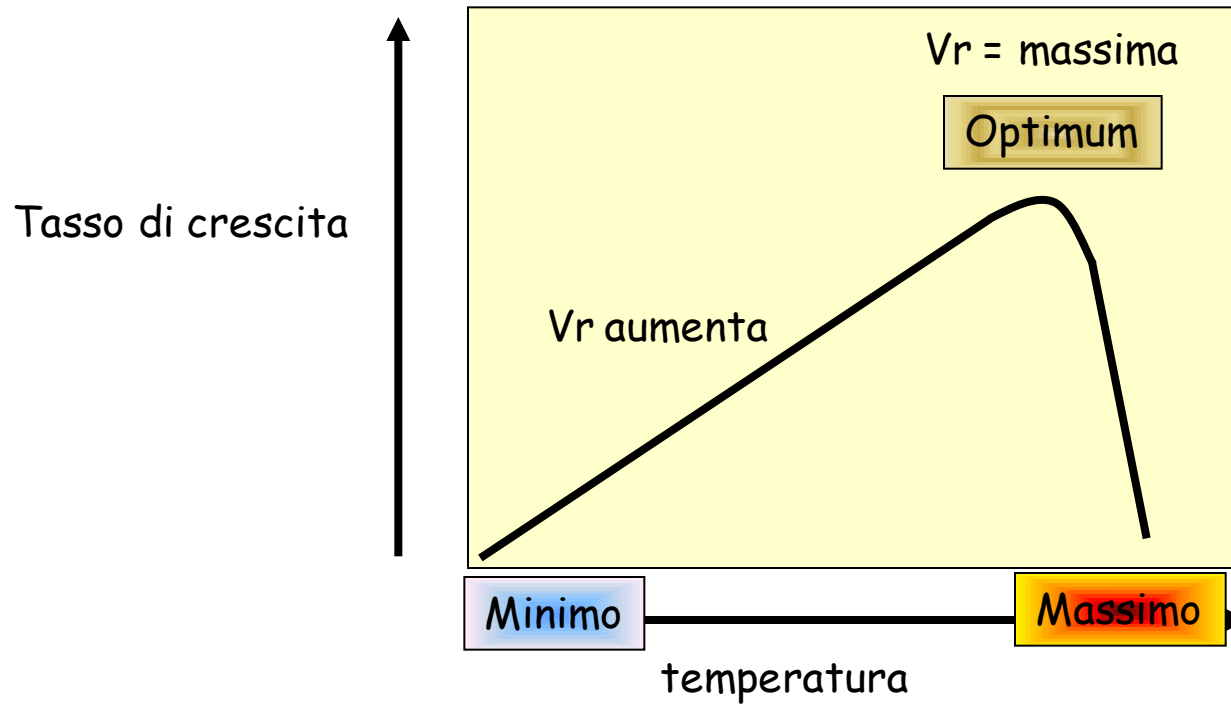
IPERTERMOFILI
65-95



IPERTERMOFILI
ESTREMI
90-115



TEMPERATURA



OPTIMUM

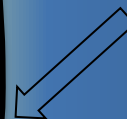
MASSIMA



ALTA

NORMALE

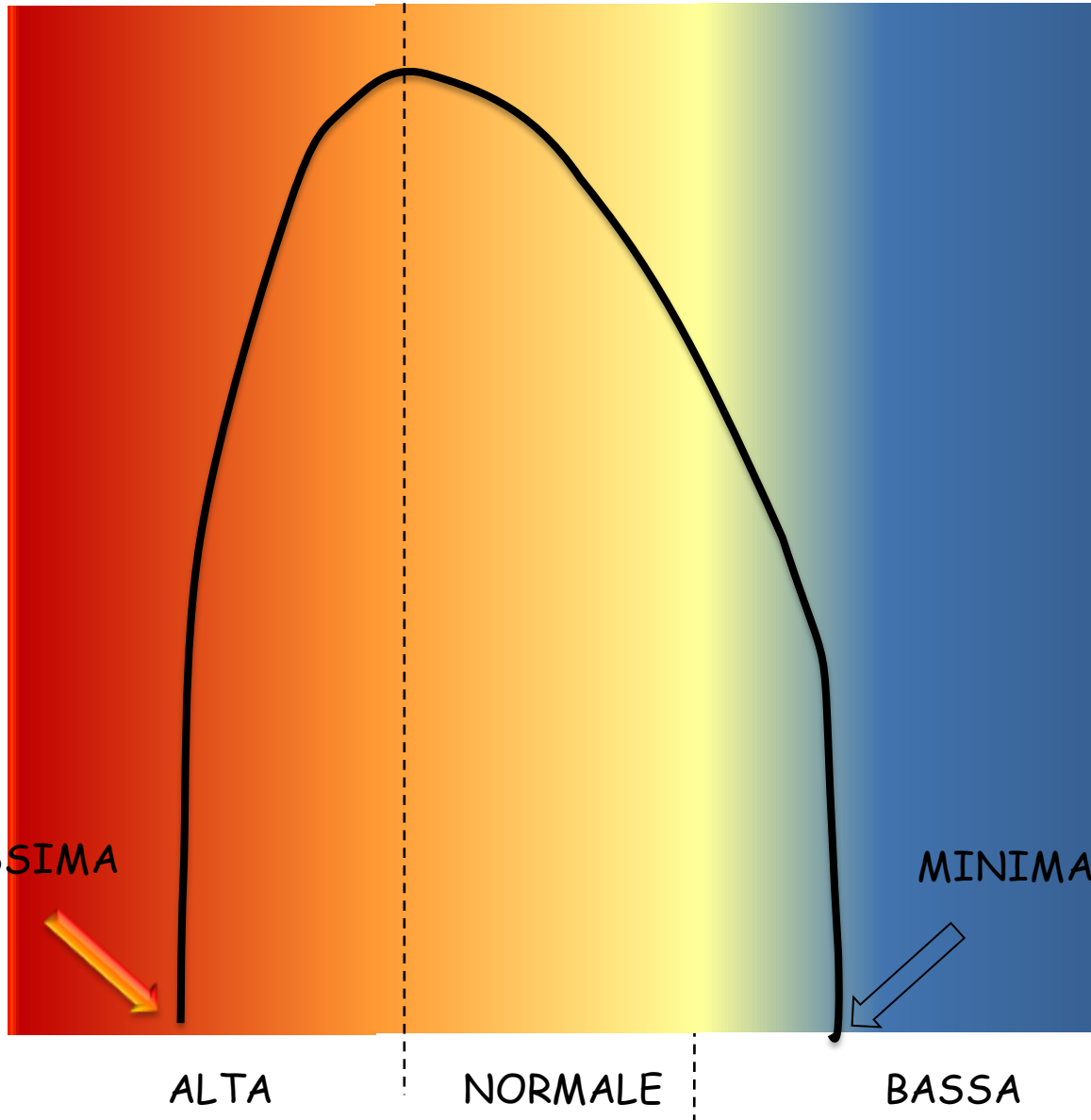
MINIMA



BASSA

Gelificazione della M.I.
I trasporti rallentano
la crescita si ferma

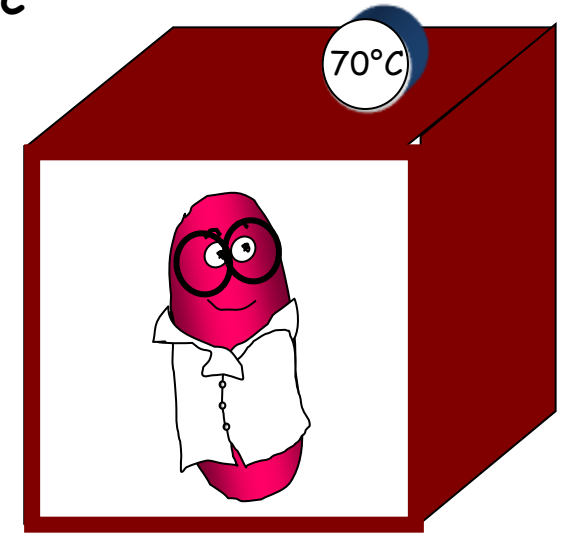
Denaturazione delle proteine
Collasso della M.I.
termolisi



Thermus aquaticus

comune negli ambienti idrotermali: optimum di temperatura attorno a 70 °C

Gli enzimi termoresistenti di *Thermus aquaticus* sono utilizzati per applicazioni biotecnologiche



Proteine strutturali termostabili

enzimi attivi a temperatura alta

Lipidi termostabili (archibatteri)

Termofili estremi: topoisomerasi inversa
Introduce giri **positivi**

Chaperonine particolari e abbondanti

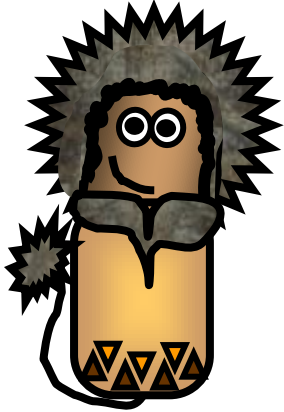
Proteine protettive per il DNA

Magnesio (stabilizza il DNA neutralizzando i fosfati)

Il limite minimo è correlato alle
modificazioni della capacità di
solvatazione dell'acqua



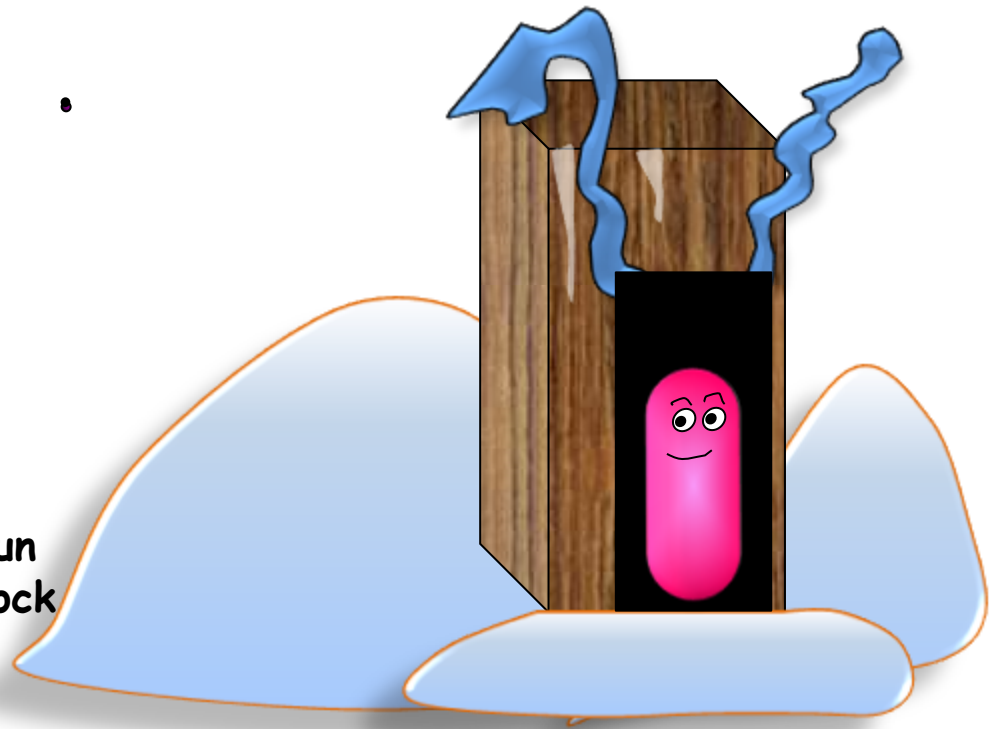
Altera le interazioni
idrofobiche



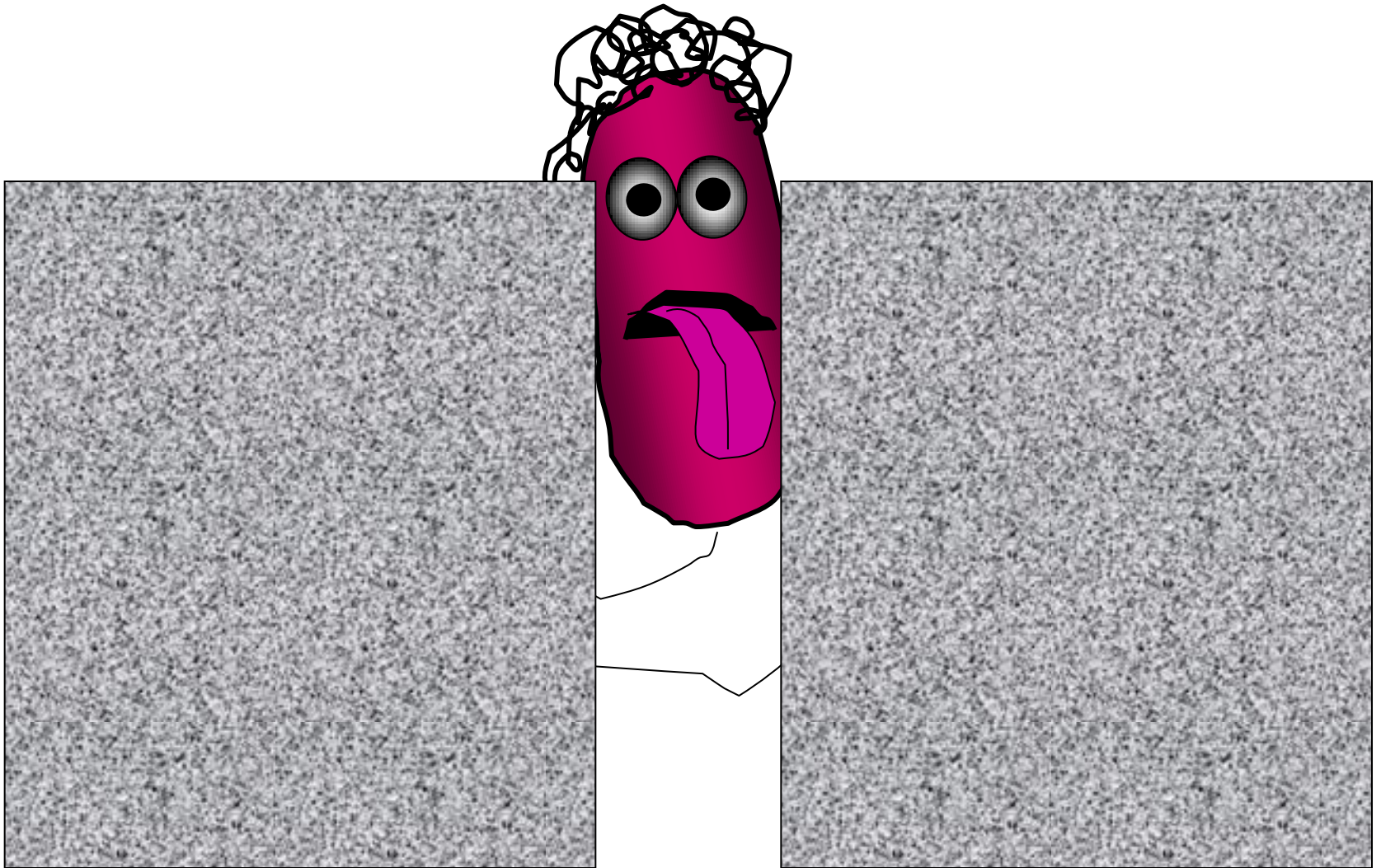
Psychromonas ingrahamii (-12 °C)

Le alte temperature uccidono le
cellule batteriche

Le basse temperature non uccidono ma un
passaggio brusco dal caldo al freddo (shock
termico) può uccidere i batteri



PRESSIONE

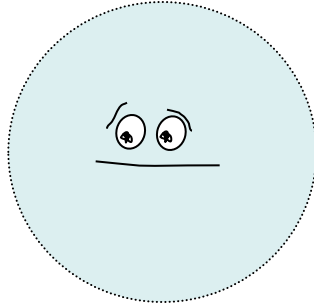


PRESSIONE

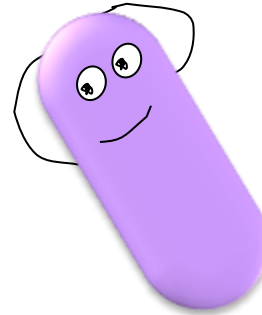
Pressione

1

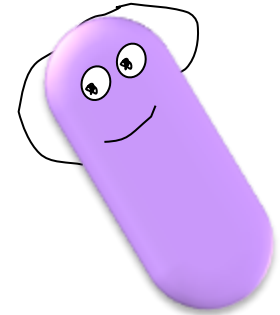
Barofili estremi



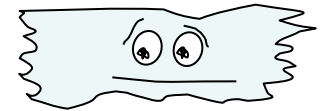
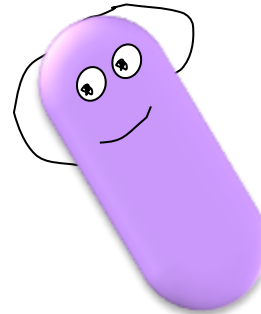
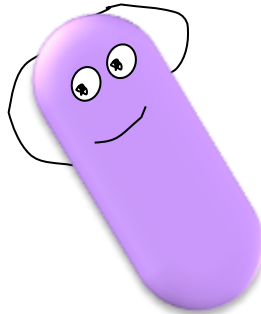
Barofili moderati



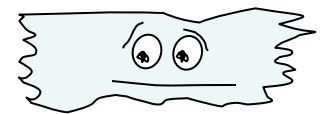
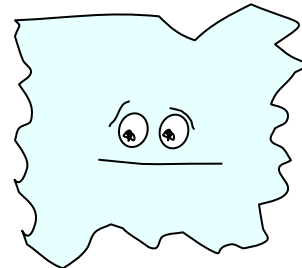
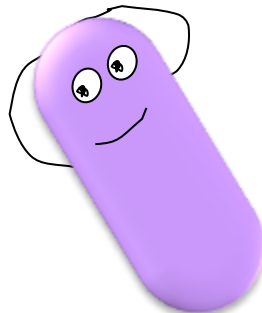
Non barofili



400



500



Gli involucri esterni e la membrana, permeabili all'acqua proteggono i batteri dallo schiacciamento

La pressione agisce impedendo che il volume molecolare aumenti

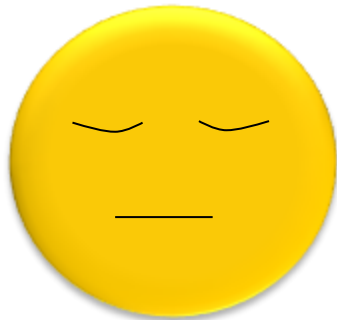


Forma base



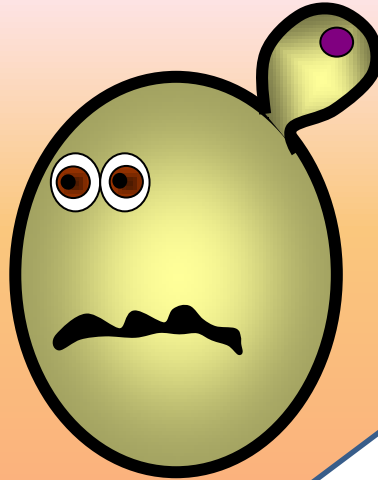
Forma attivata

Se la forma attivata ha un volume **MAGGIORE** di quella base l'enzima è **INIBITO** dalla pressione



Se la forma attivata ha un volume **MINORE** di quella base l'enzima è **FAVORITO** dalla pressione

Saccharomyces non cresce oltre le 8
atmosfera (quelle dello champagne)



I barofili estremi non crescono
sopra le 400 atmosfera

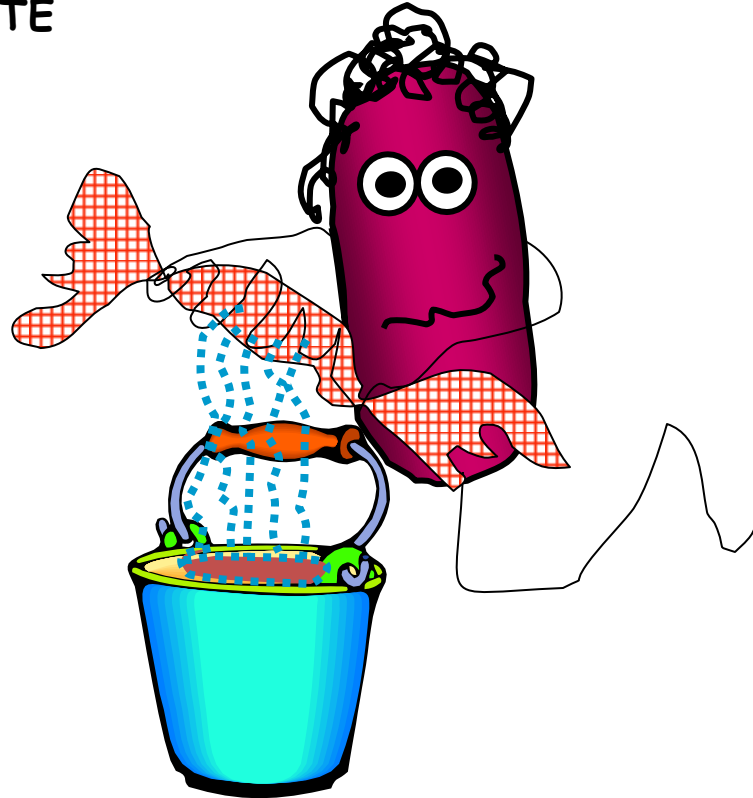
hanno una membrana particolarmente
ricca di acidi grassi insaturi

più fluida e meno soggetta a variazioni di
conformazione sotto pressioni elevate

Pressione osmotica

La quantità di acqua EFFETTIVAMENTE
disponibile in un substrato

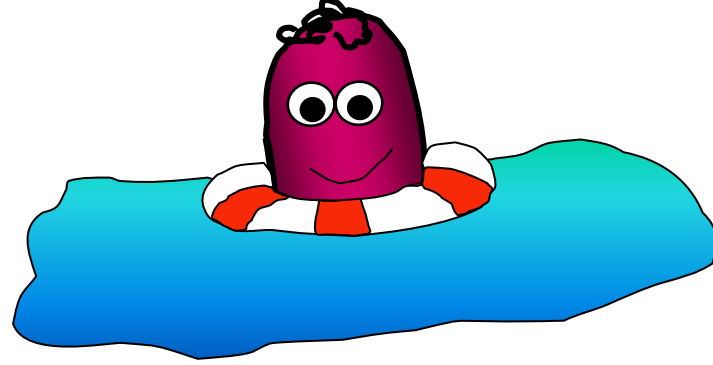
Viene detta water-activity (A_w)



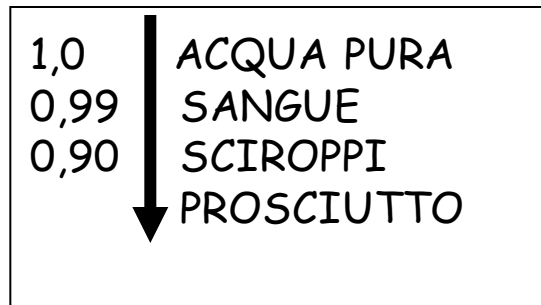
Ed è definita dal rapporto
pressione di vapore della sostanza/pressione di vapore dell'acqua pura
$$A_w = P/P_0$$

I valori di A_w sono compresi tra 0 e 1

La maggior parte dei microrganismi
Necessita di $A_w \geq 0,98$
(valore dell'acqua marina)



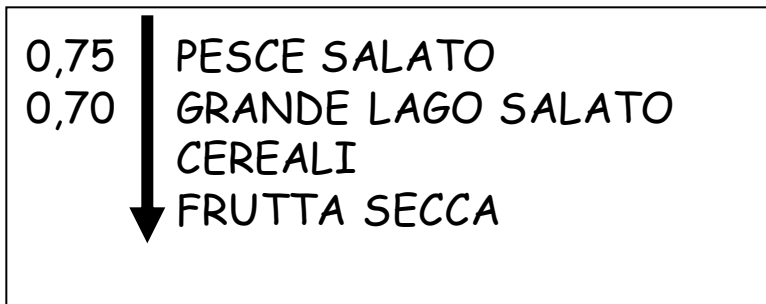
Microrganismi alofili estremi riescono a
vivere fino a 0,75



BATTERI



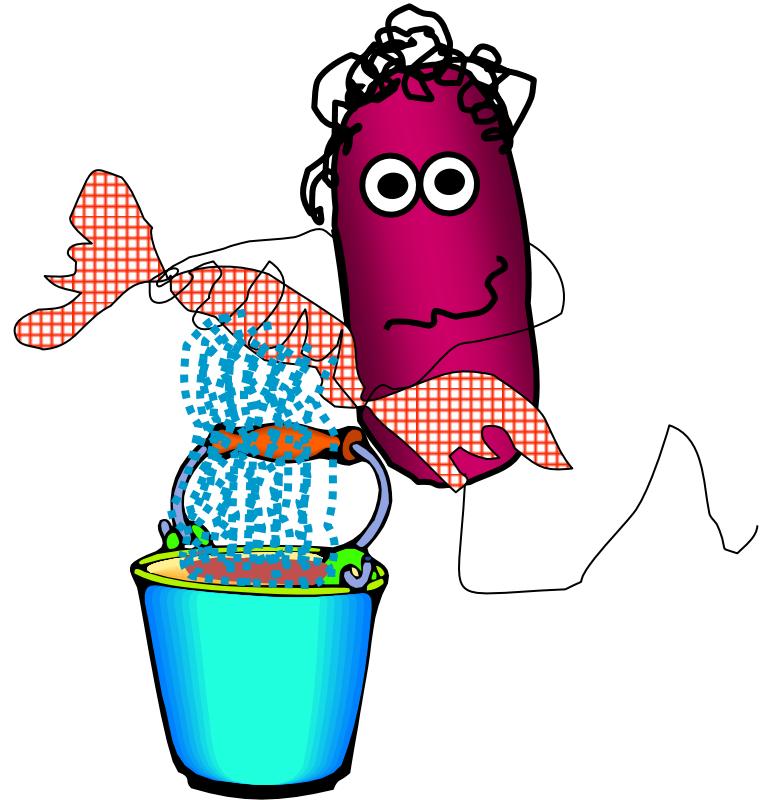
FUNGHI



Procarioti
ALOFILI
Soprattutto
archibatteri

I microrganismi che vivono in ambienti con bassa A_w "estraggono" acqua dal mezzo circostante mantenendo inalterata la concentrazione salina interna

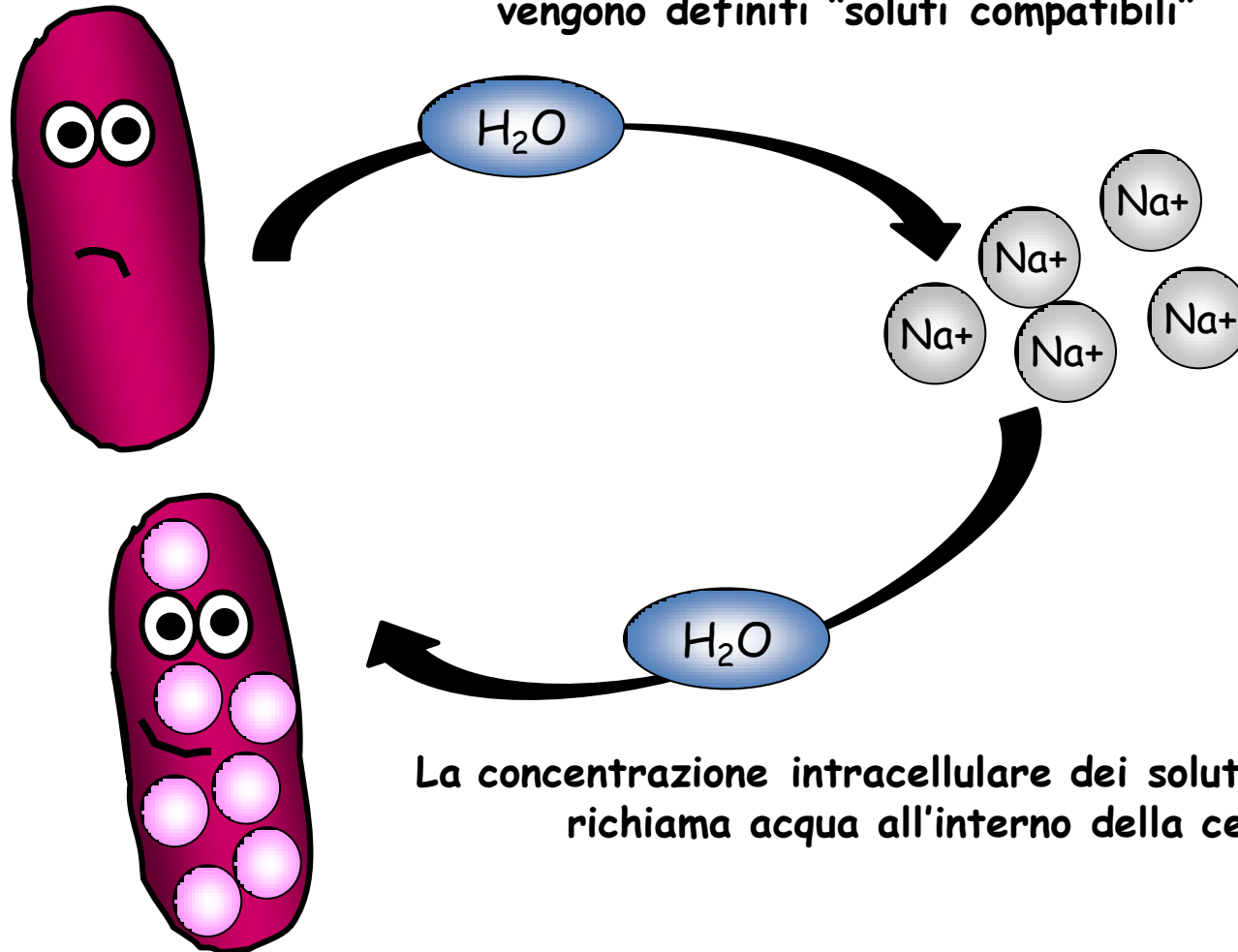
L'acqua non può essere trasportata, deve entrare nella cellula per diffusione



Lo scopo quindi deve essere raggiunto giocando con la concentrazione e il trasporto di ioni e soluti

I microrganismi alotolleranti sintetizzano o concentrano soluti organici che non danneggino i processi biochimici interni

si tratta in genere di zuccheri (saccarosio, mannitolo, glicerolo) o aminoacidi (prolina) e derivati (betaina) e vengono definiti "soluti compatibili"



La concentrazione intracellulare dei soluti compatibili richiama acqua all'interno della cellula

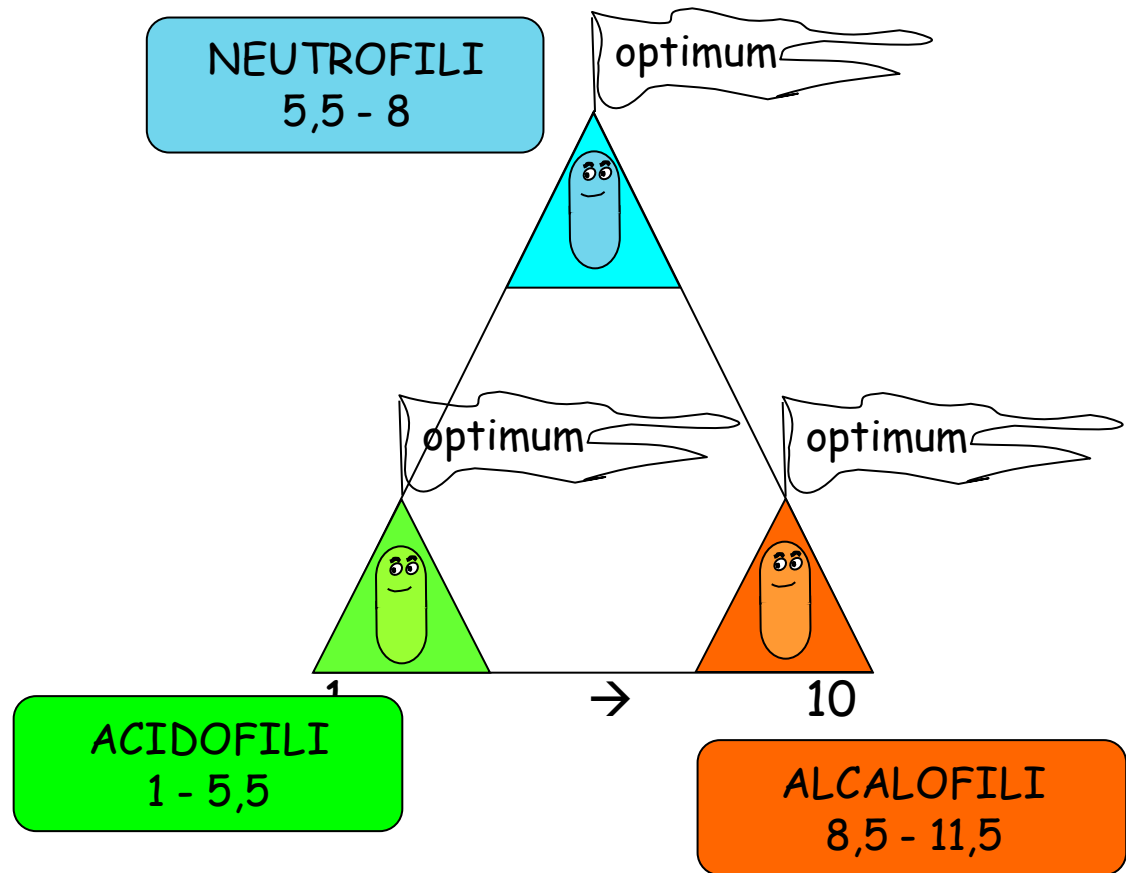
La maggior parte degli ambienti naturali hanno un pH compreso tra 5 e 9

I batteri crescono in un intervallo di 2-3 punti di pH in cui è compreso il valore ottimale per la crescita

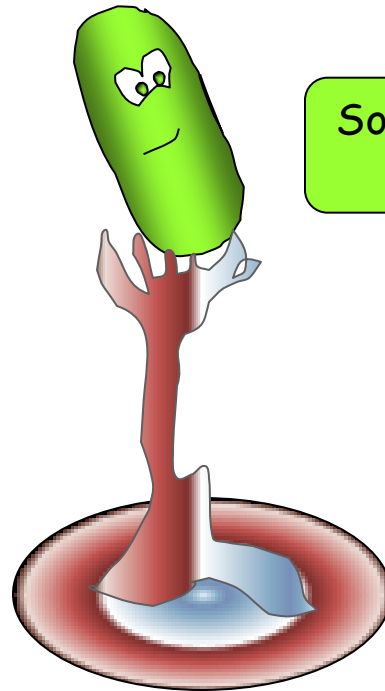
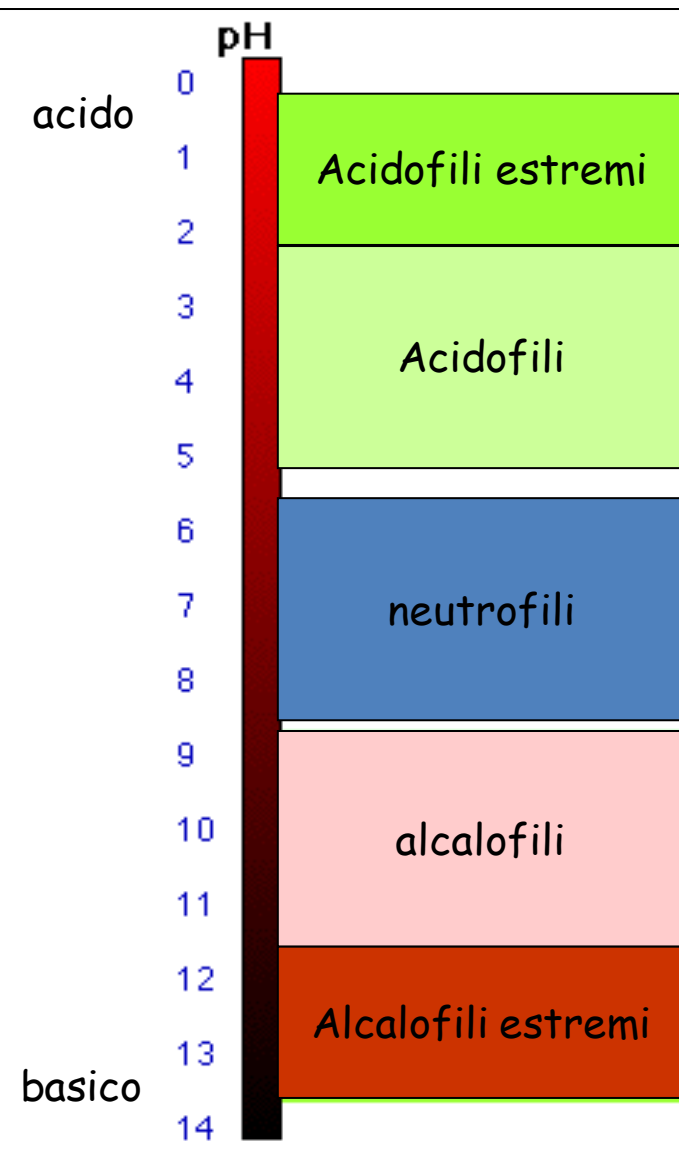
Il pH intracellulare deve essere vicino alla neutralità

Limite minimo conosciuto: 4,6
(acidofili estremi)

Limite massimo conosciuto: 9,5
(basofili estremi)

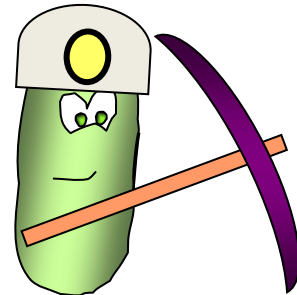


Ambienti caratterizzati da pH estremi

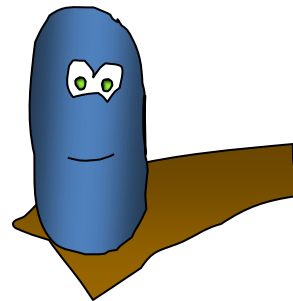
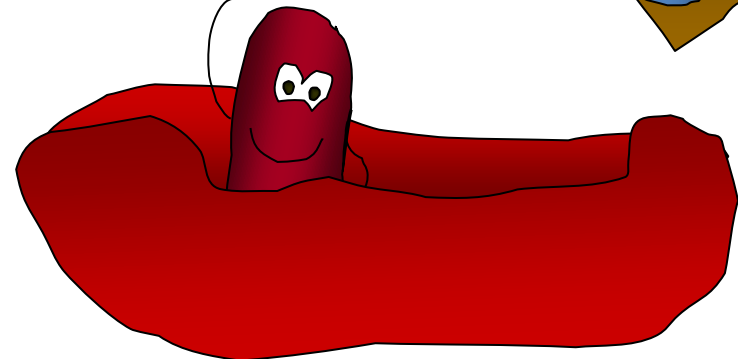


Sorgenti acide

Acque acide di miniera



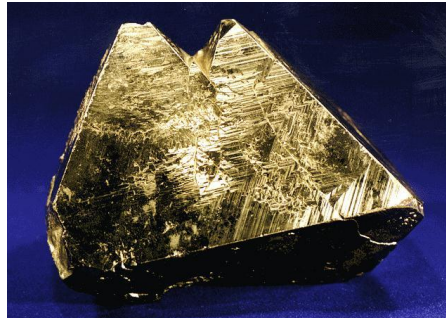
Laghi alcalini



I batteri acidofili si trovano soprattutto nelle
ACQUE ACIDE DI MINIERA
pH fortemente acido



Quando giacimenti di carbon fossile vengono aperti, la pirite
che si trova nel carbone e nelle rocce circostanti



A contatto con l'aria si ossida $\text{FeS}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$

LAGHI ALCALINI (soda-lakes)

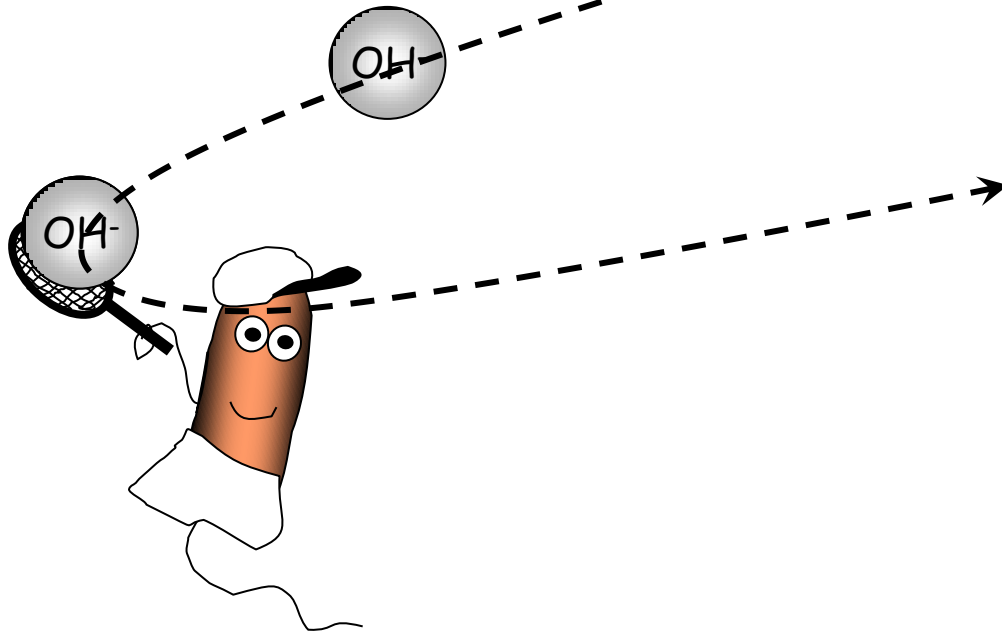
Fortemente basici > pH 9

elevate concentrazioni di bicarbonato e soda caustica

I microrganismi alcalofili sono tutti procarioti
(soprattutto archibatteri, ma anche *Bacillus* e cianobatteri)

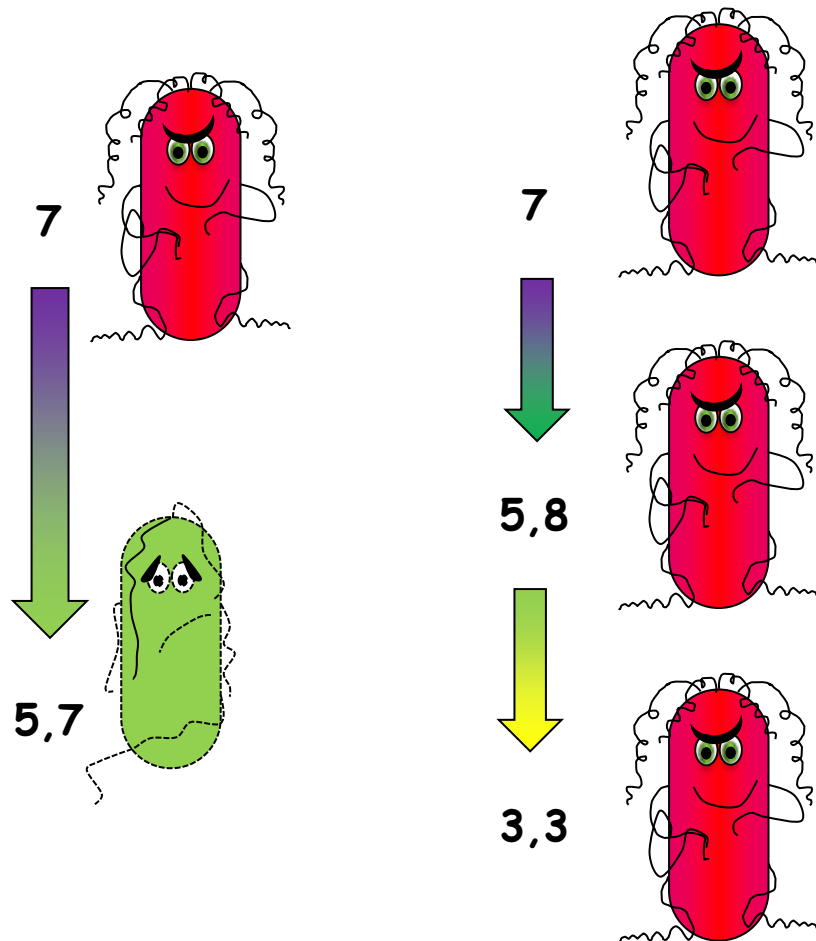
Devono pompare via gli ioni idrossile (OH^-) che neutralizzerebbero i protoni interni distruggendo il normale metabolismo che dipende dai gradienti protonici

le membrane di questi microrganismi sono modificate, per combattere l'azione degli alcali che saponificano i grassi

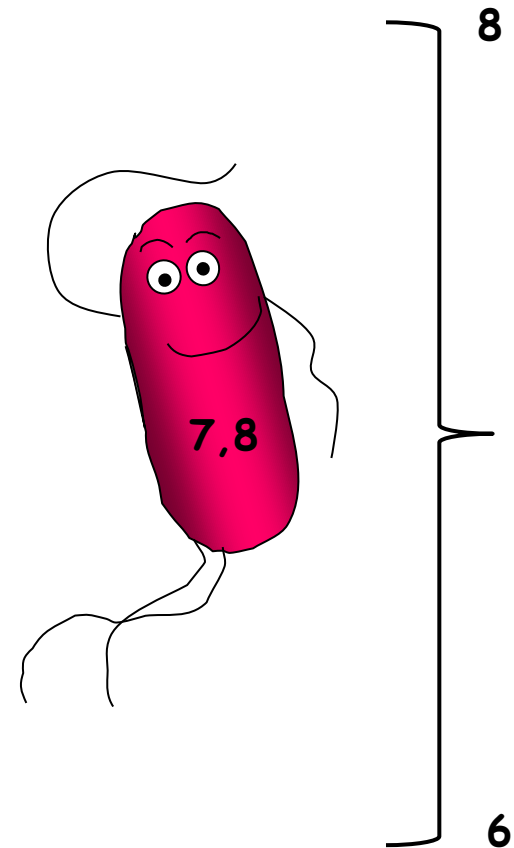


I batteri possono vivere in un intervallo di pH più vasto di quello tollerato dalle loro proteine

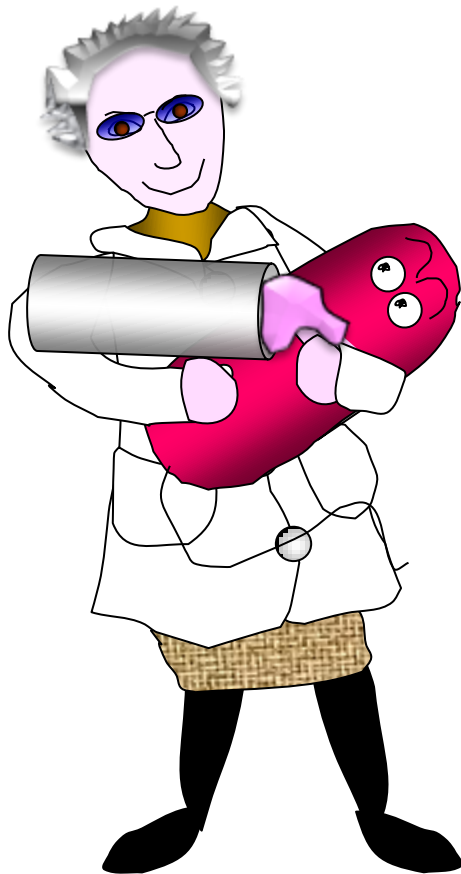
I meccanismi di efflusso ionico sono molto efficienti per mantenere il pH interno



E. coli cresce tra pH



LA CONOSCENZA DELLE ESIGENZE NUTRIZIONALI DEI MICRORGANISMI



**E' indispensabile per la coltivazione
in laboratorio**

**Che fornisce informazioni sulla
fisiologia**

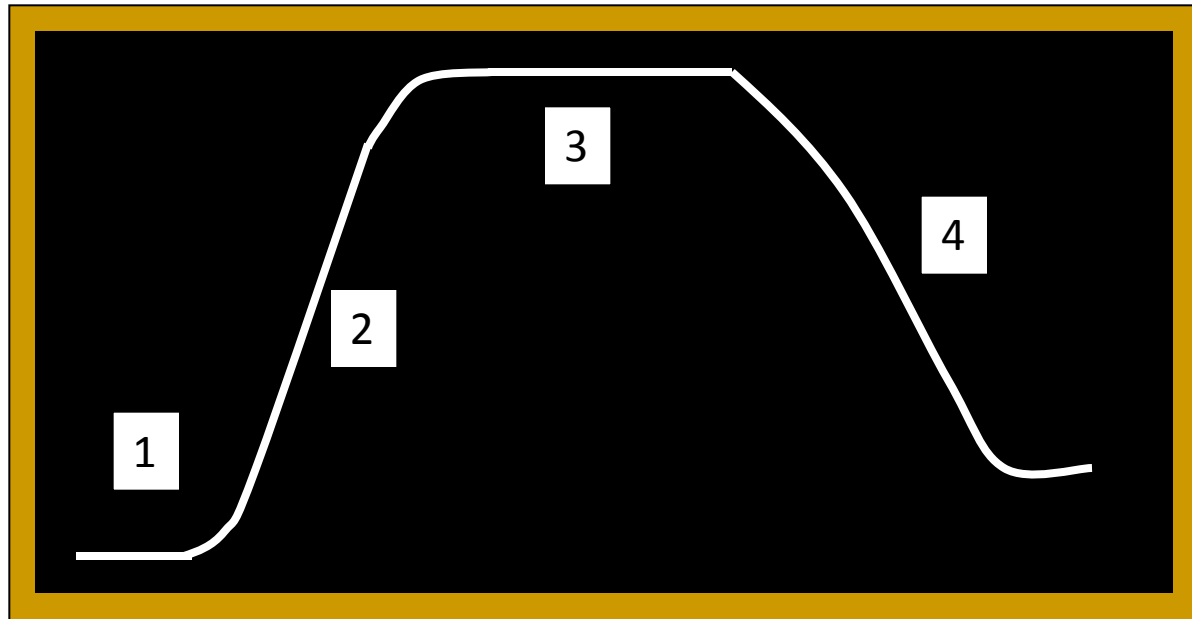
E permette di ottenere biomassa

La crescita di una coltura è rappresentata
dall'aumento del numero delle cellule

Una curva di crescita "standard"
(sistema chiuso) prevede diverse fasi, correlate

al consumo dei
nutrienti

all'accumulo dei
prodotti di scarto



la curva di crescita è riferita alla
POPOLAZIONE

E si segue attraverso la variazione
dell'assorbanza della coltura

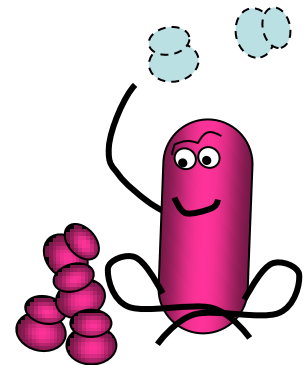
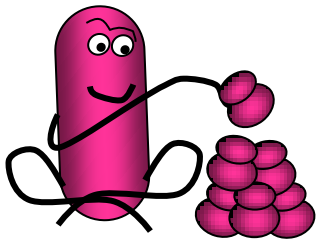
1-Fase di latenza (lag)

Corrisponde al tempo necessario alle cellule batteriche per adeguarsi alle condizioni del terreno

La sua durata dipende

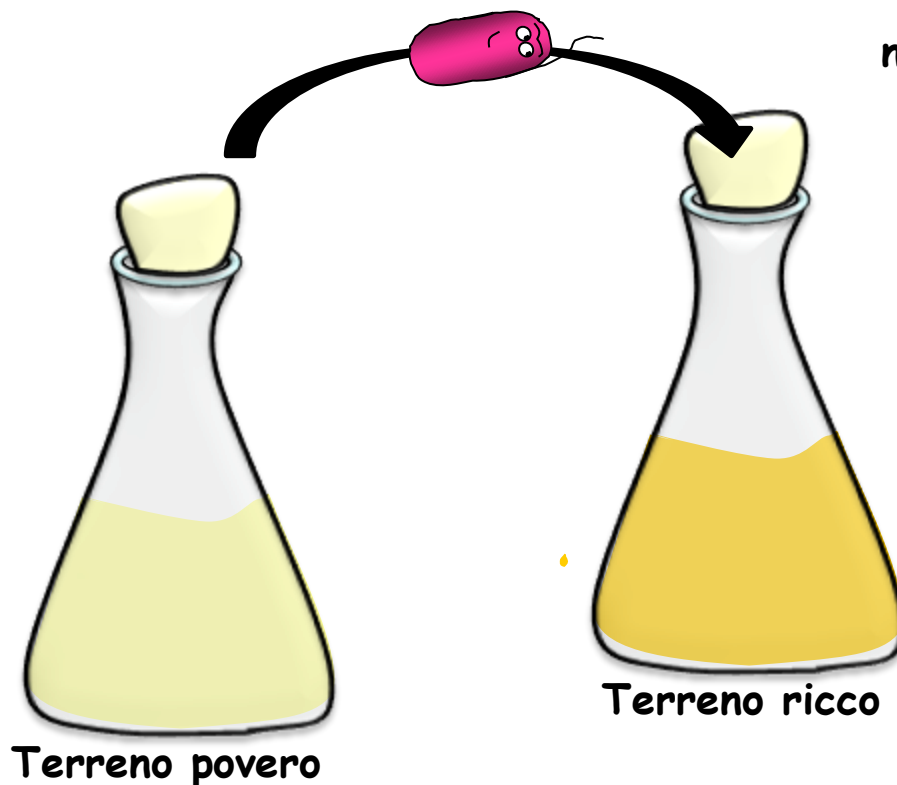
dal tipo di inoculo
(età, entità)

dalla natura del terreno

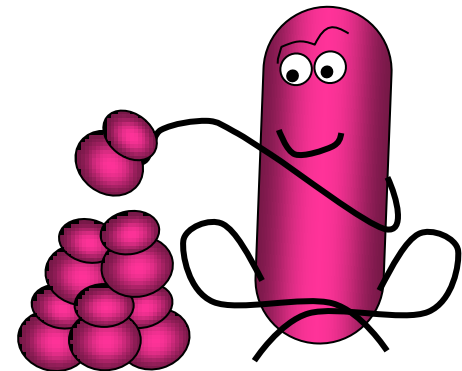


La Fase di latenza è un esempio di crescita sbilanciata
alcuni componenti sono sintetizzati e altri no

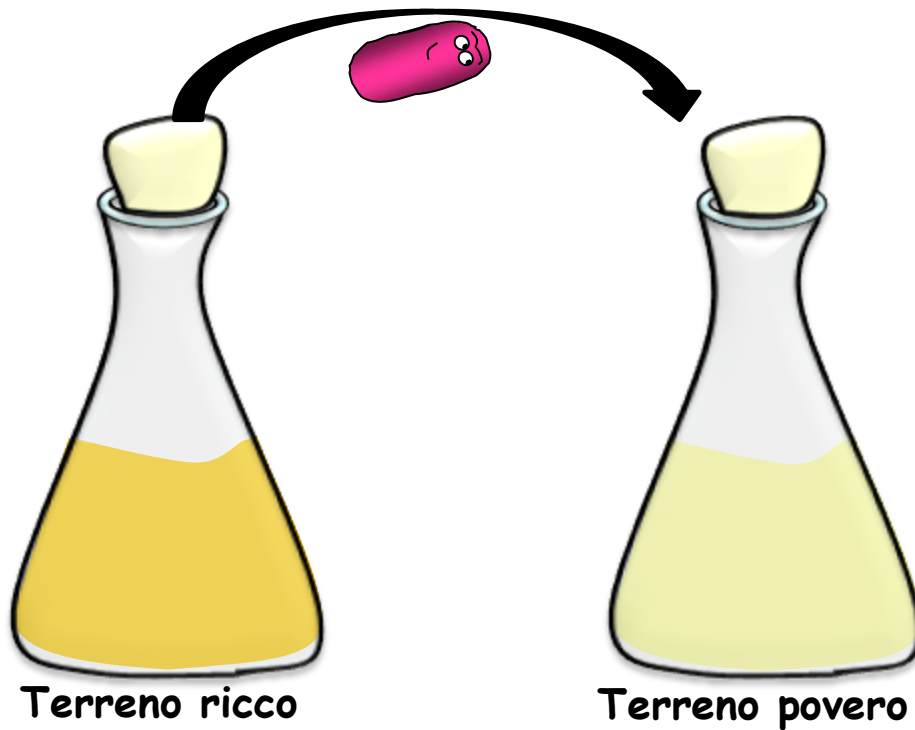
Passando a un ambiente PIU' ricco



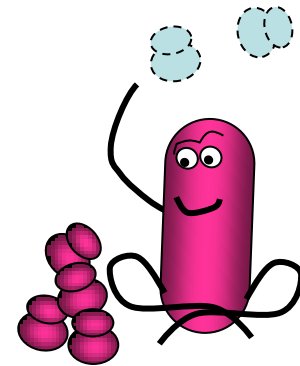
prima di moltiplicarsi vanno sintetizzati
nuovi ribosomi per adeguare il ritmo della
sintesi proteica alle nuove disponibilità



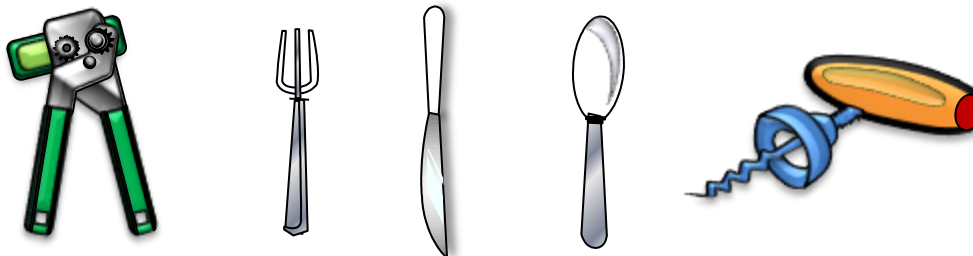
Passando a un ambiente **MENO** ricco



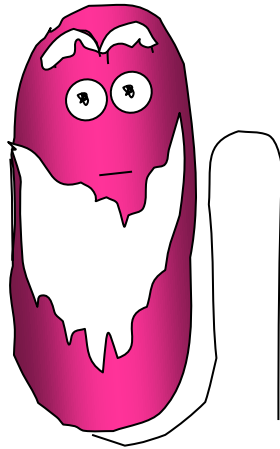
le cellule si adeguano al nuovo stato



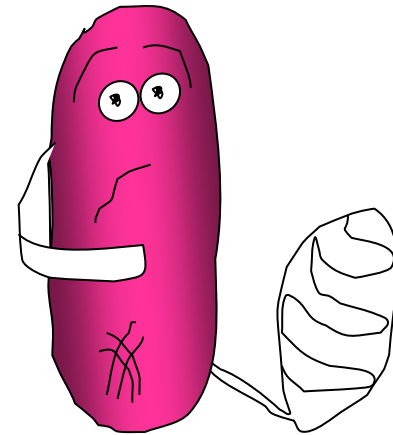
Sopprimono le attività non necessarie e non si moltiplicano finchè non siano stati prodotti gli enzimi biosintetici necessari a sopravvivere



Se la coltura è invecchiata

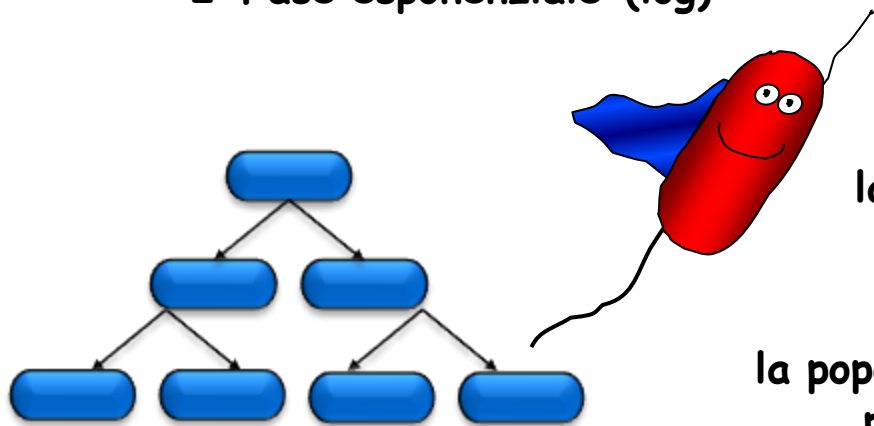


o danneggiata



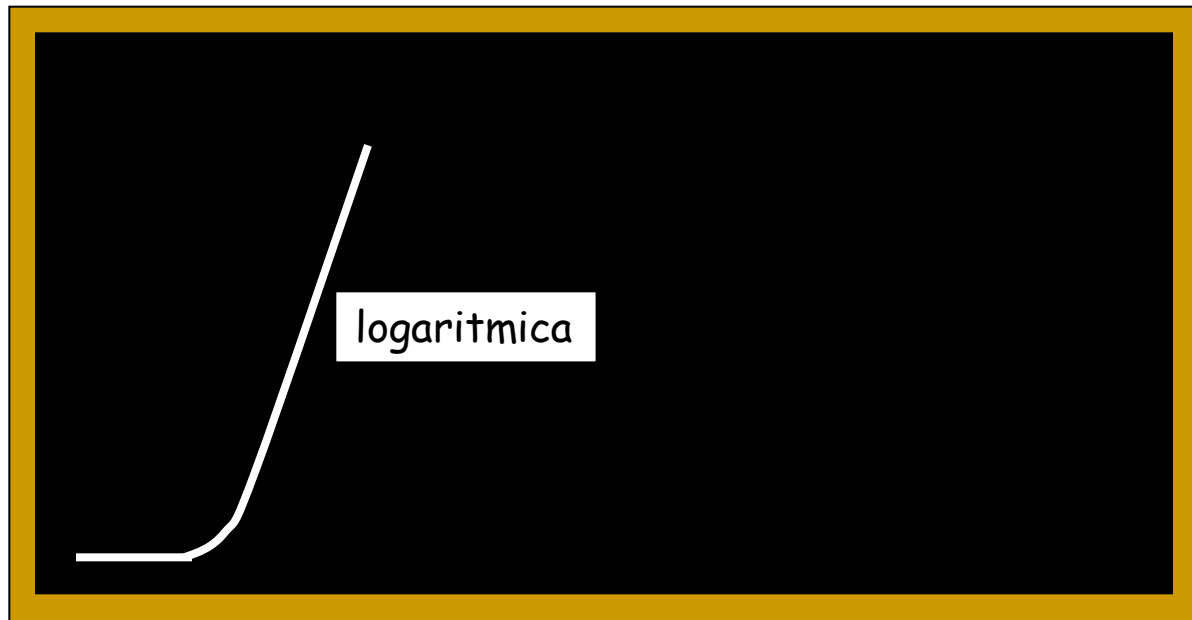
**È necessario riparare i danni prima che possa
iniziare la moltiplicazione**

2-Fase esponenziale (log)



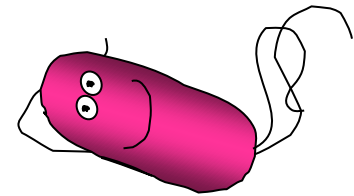
la crescita raggiunge la massima
velocità possibile

la popolazione cellulare è uniforme (adatta
per studi biochimici e fisiologici)



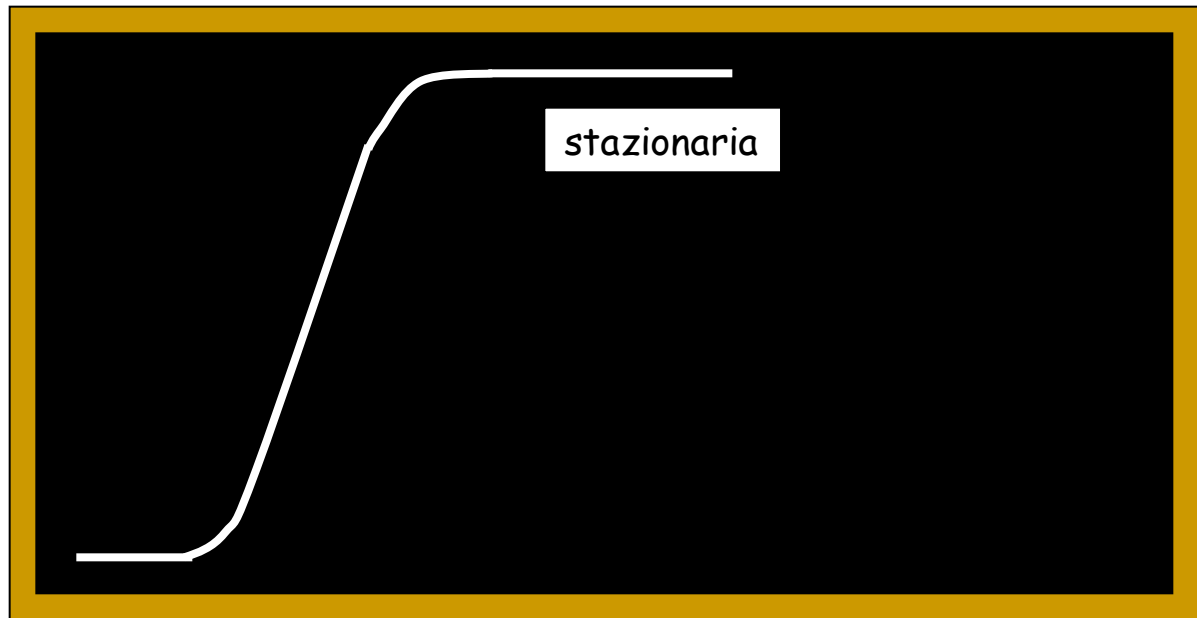
la fase esponenziale è un esempio di CRESCITA BILANCIATA in cui tutti i
componenti cellulari sono sintetizzati a velocità costanti e coordinate

3-Fase stazionaria



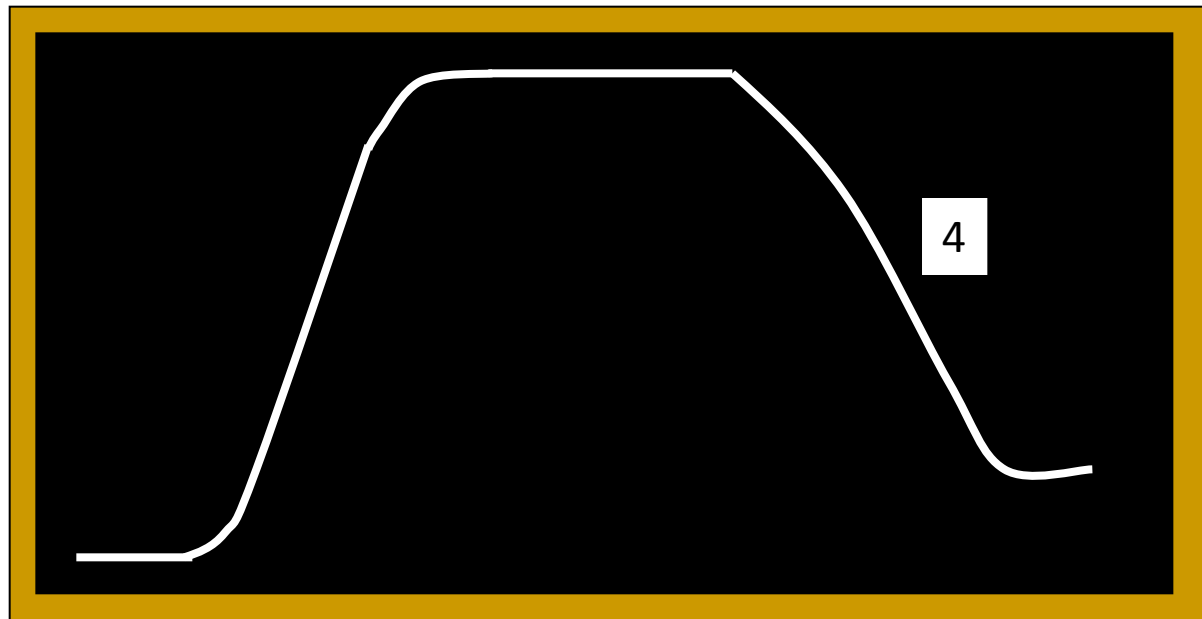
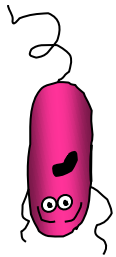
i batteri arrivano a densità di popolazione di circa 10^9 cellule/ml, alghe, miceti e protozoi a circa 10^6

una coltura entra in fase stazionaria
a causa della deplezione in nutrienti (o in O_2)
o dell'accumulo di metaboliti tossici (es ac lattico)



4-Fase di morte accelerata

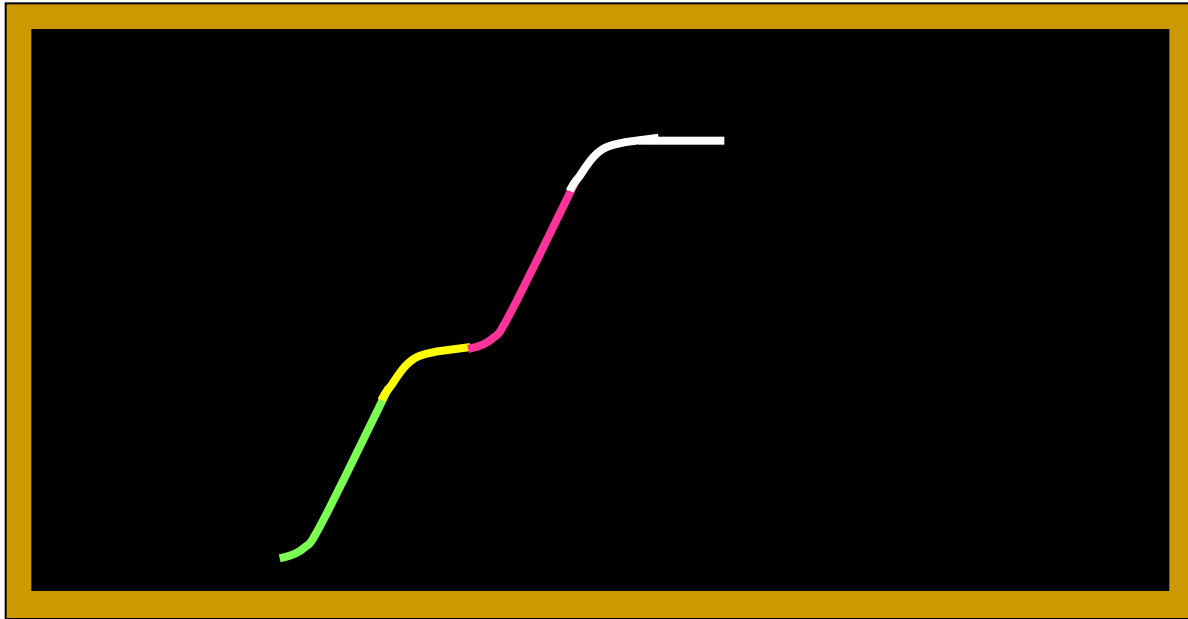
Questa fase è evidente solo se si contano le cellule: l'assorbanza della coltura non scende se le cellule morte non lisano



A volte può esserci una fase di sopravvivenza



Una curva particolare è la diauxia



la popolazione batterica
esaurisce un primo
nutriente

Entra in una seconda
fase lag

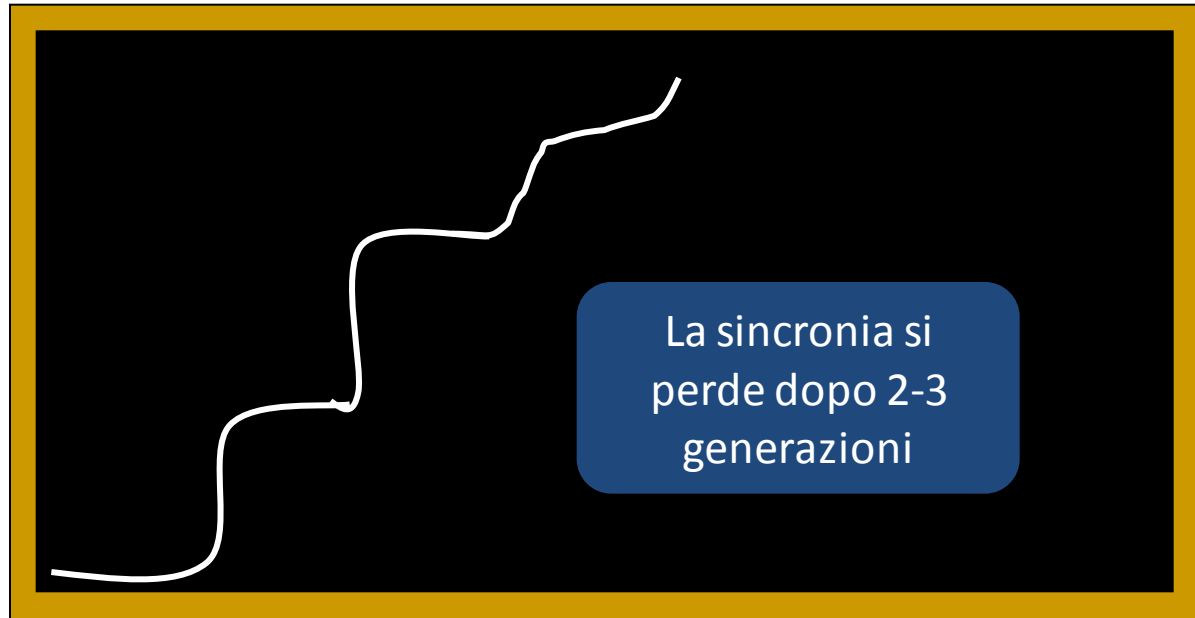
Sintetizza gli enzimi necessari a utilizzare
un'altra fonte di carbonio (inducibili)

riprende a crescere
secondo la normale curva

COLTURE SINCRONE

La sequenza di quel che accade durante la crescita di una popolazione batterica

Si può seguire con precisione in una coltura sincrona



che può essere avviata con mezzi fisici
(filtrando per selezionare le cellule più piccole)

O limitando i nutrienti

La velocità di crescita può essere calcolata con l'equazione

$$n = \log N - \log N_0 / 0,301$$

n = numero di generazioni

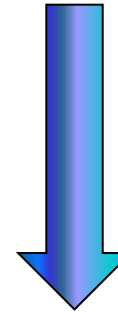
N = numero di cellule

valore di n in un intervallo
di tempo definito



Tempo generazionale

$$\frac{\log 2 \times \text{intervallo tempo}}{\log OD(2) - \log OD(1)}$$



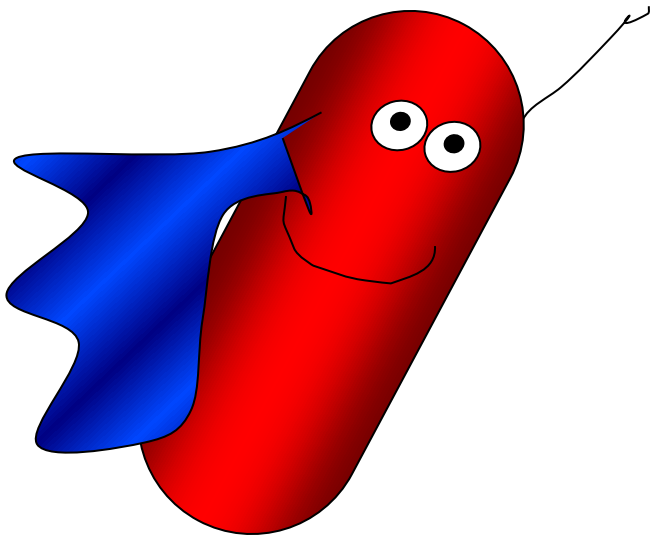
Quanto tempo impiegherà
la mia coltura ad arrivare
a una certa densità?

$$\frac{T_{\text{gen}} \times \log OD(?) - \log OD(\text{obs})}{\log(2)}$$

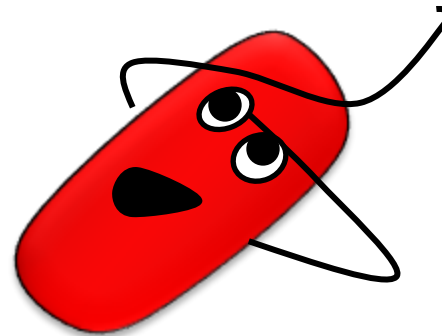


A diverse velocità di crescita corrispondono diverse quantità di ribosomi, DNA e proteine

Le cellule che crescono velocemente sono più grandi



Di quelle che crescono lentamente



COLTURE CONTINUE

Per studiare la crescita microbica in condizioni di nutrienti basse, simili a quelle naturali

È utile ottenere colture che restino in fase esponenziale, crescendo a velocità nota

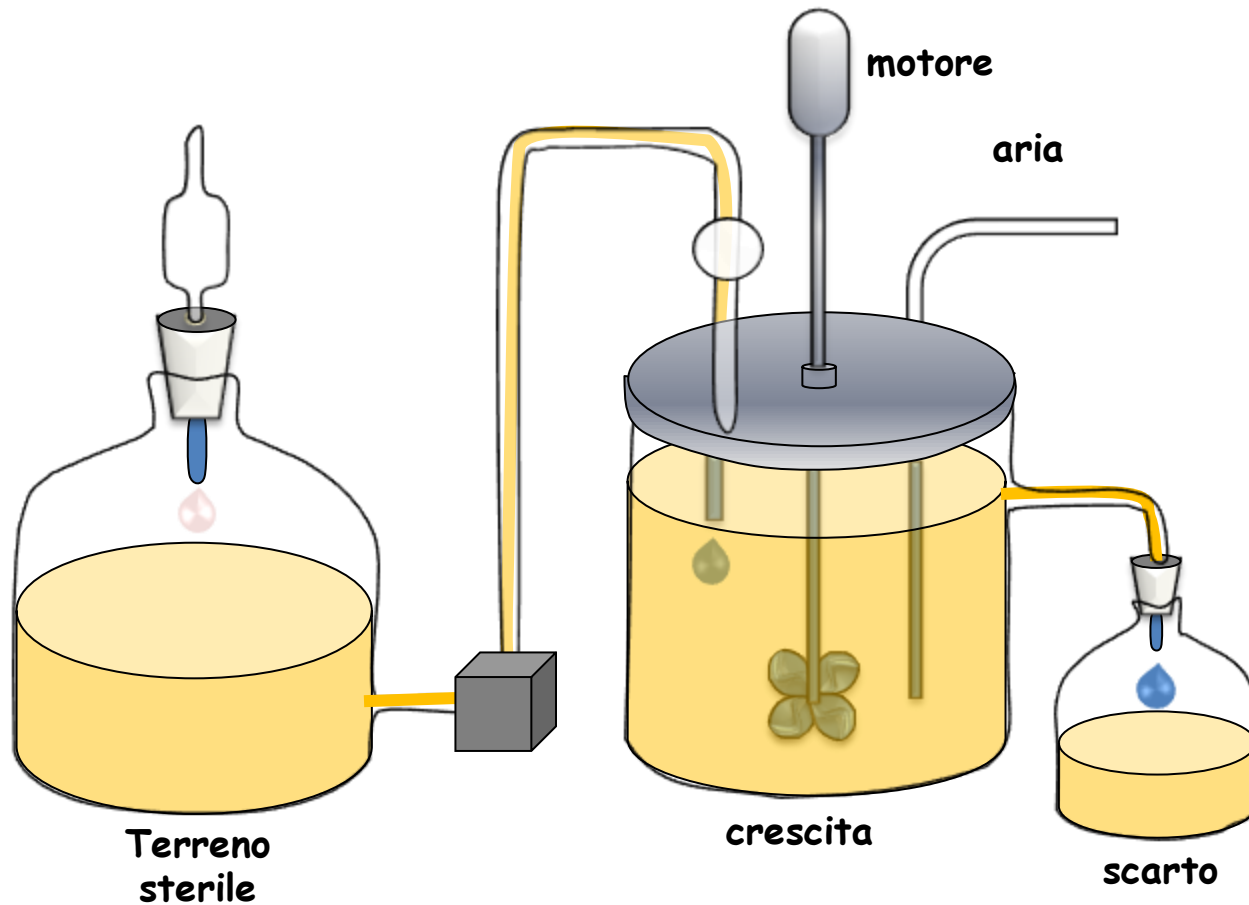
Questo è possibile nel

```
graph TD; A[Questo è possibile nel] --> B[CHEMOSTATO]; A --> C[TURBIDOSTATO];
```

CHEMOSTATO

TURBIDOSTATO

CHEMOSTATO



Nel turbidostato l'afflusso di terreno è
regolato da un sensore ottico

CHEMOSTATO

il terreno contiene un fattore limitante

il tasso di crescita dipende dalla velocità di immissione di terreno fresco

Il tasso di crescita viene mantenuto costante

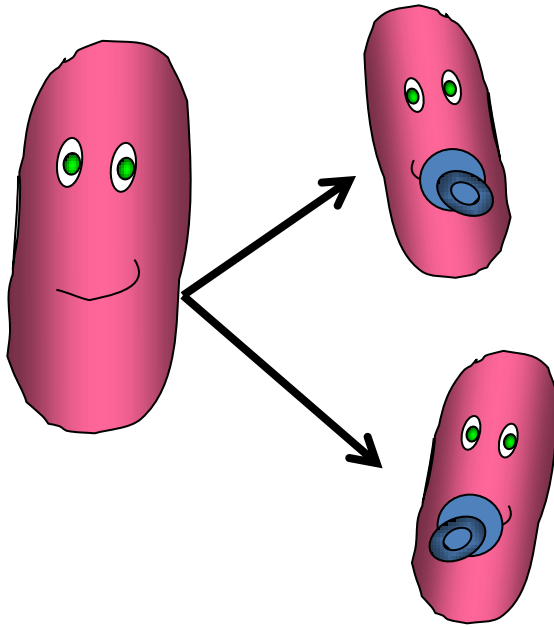
TURBIDOSTATO

Non ci sono fattori limitanti nel terreno

la diluizione del terreno varia a seconda della velocità di crescita della coltura

la torbidità viene mantenuta costante

**I batteri si dividono per via schizogonica
(asessuata)**



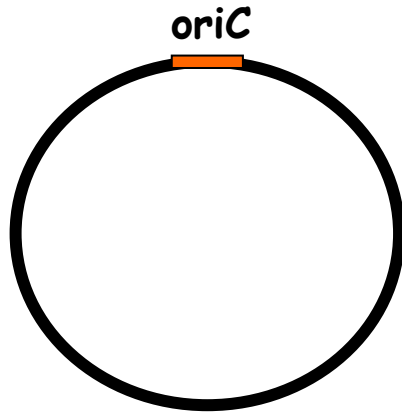
**Tutto quello che troviamo in una cellula
batterica si trova nelle cellule figlie in
cui essa si divide**

**Il ciclo vitale di ogni cellula
batterica è legato al tasso di
replicazione del suo DNA**

La replicazione del DNA prosegue durante tutto il ciclo di divisione

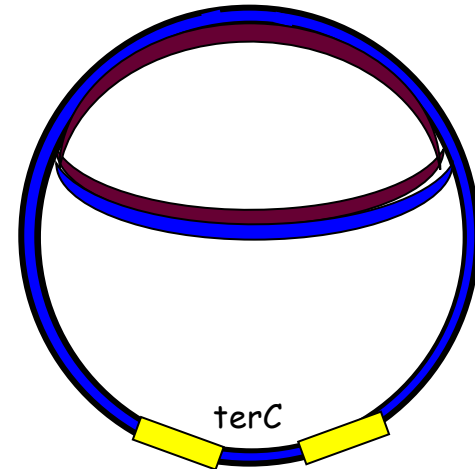
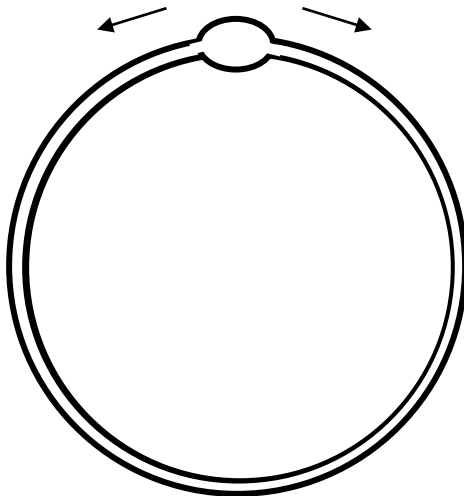
L'inizio della replicazione richiede un set di proteine specifiche

DnaA, DnaB, DnaC, Hu, Girasi, SSB



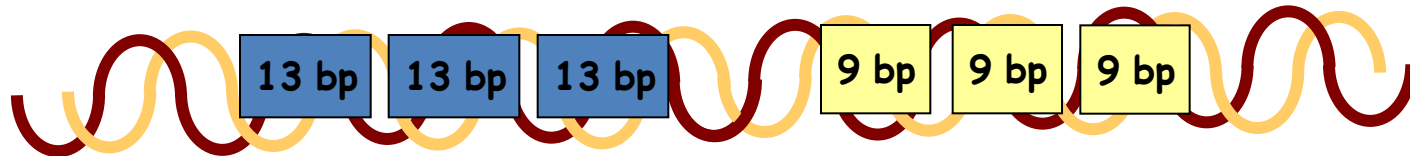
i filamenti si separano in corrispondenza di un sito particolare (oriC-245 bp) che è l'origine di replicazione del cromosoma

Osservando le fasi della replicazione al ME, si distingue una struttura a "occhio"

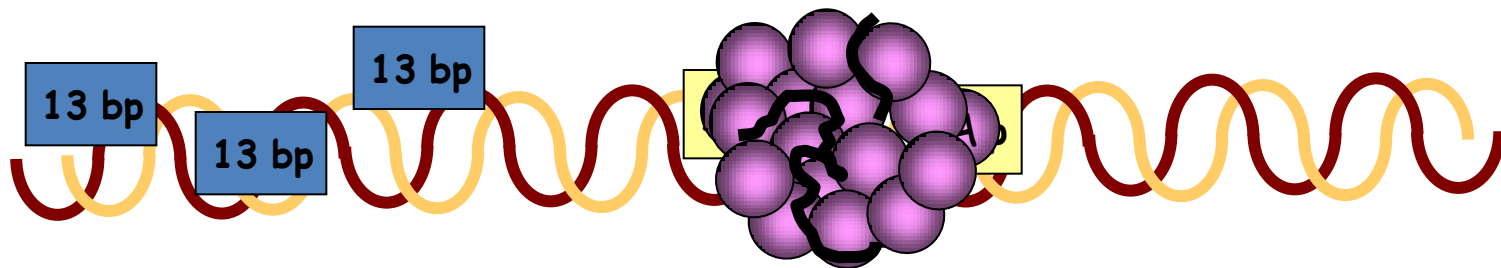


Seguita da una struttura a "Theta" (θ)

Nella regione oriC sono presenti sequenze ripetute di 9 e 13 basi, diverse tra loro ma entrambe ricche in AT

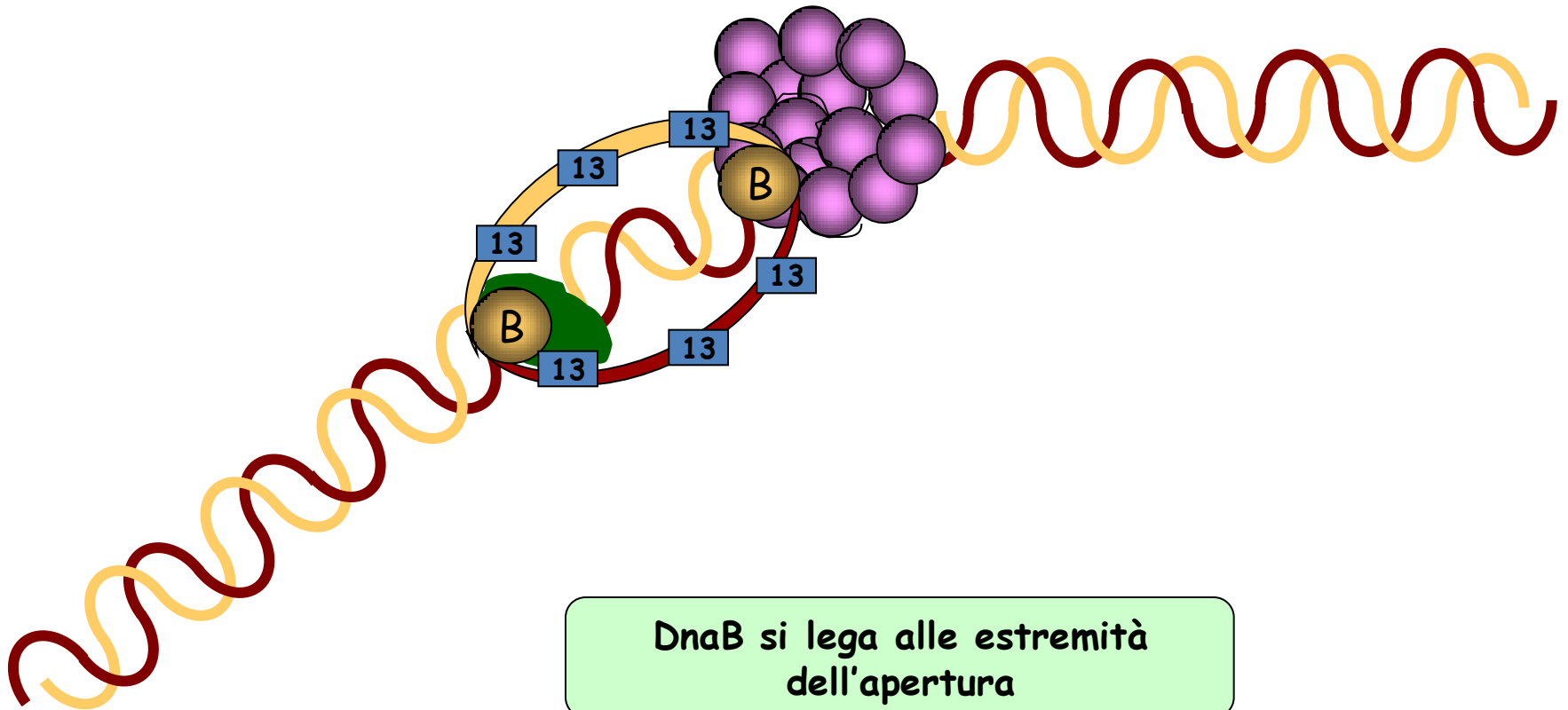


Dna-A si lega alle sequenze di 9bp



Fino a formare un nucleo di 20-40 monomeri attorno al quale si avvolge il DNA di oriC

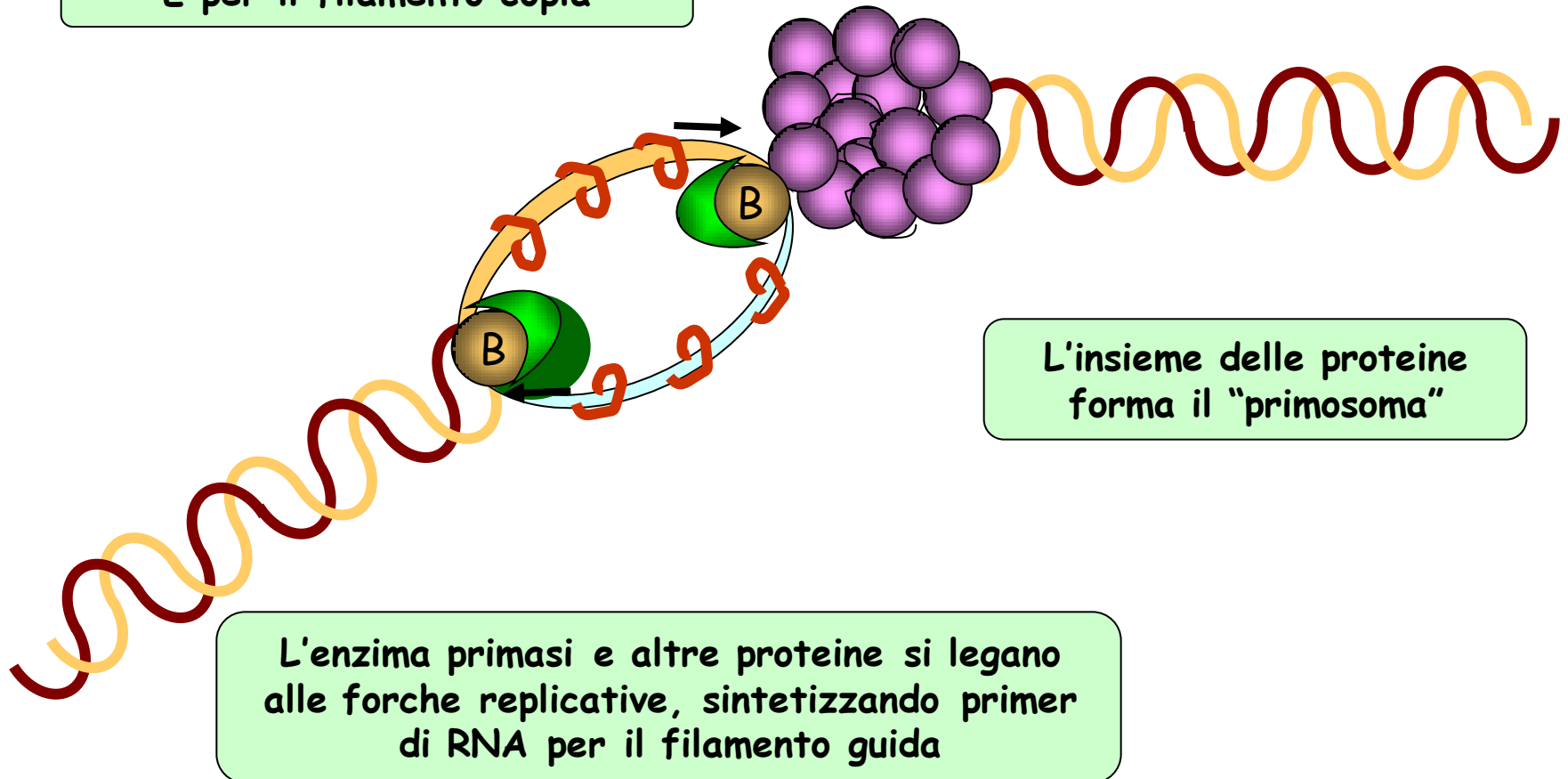
I filamenti si separano in corrispondenza delle sequenze di 13 bp



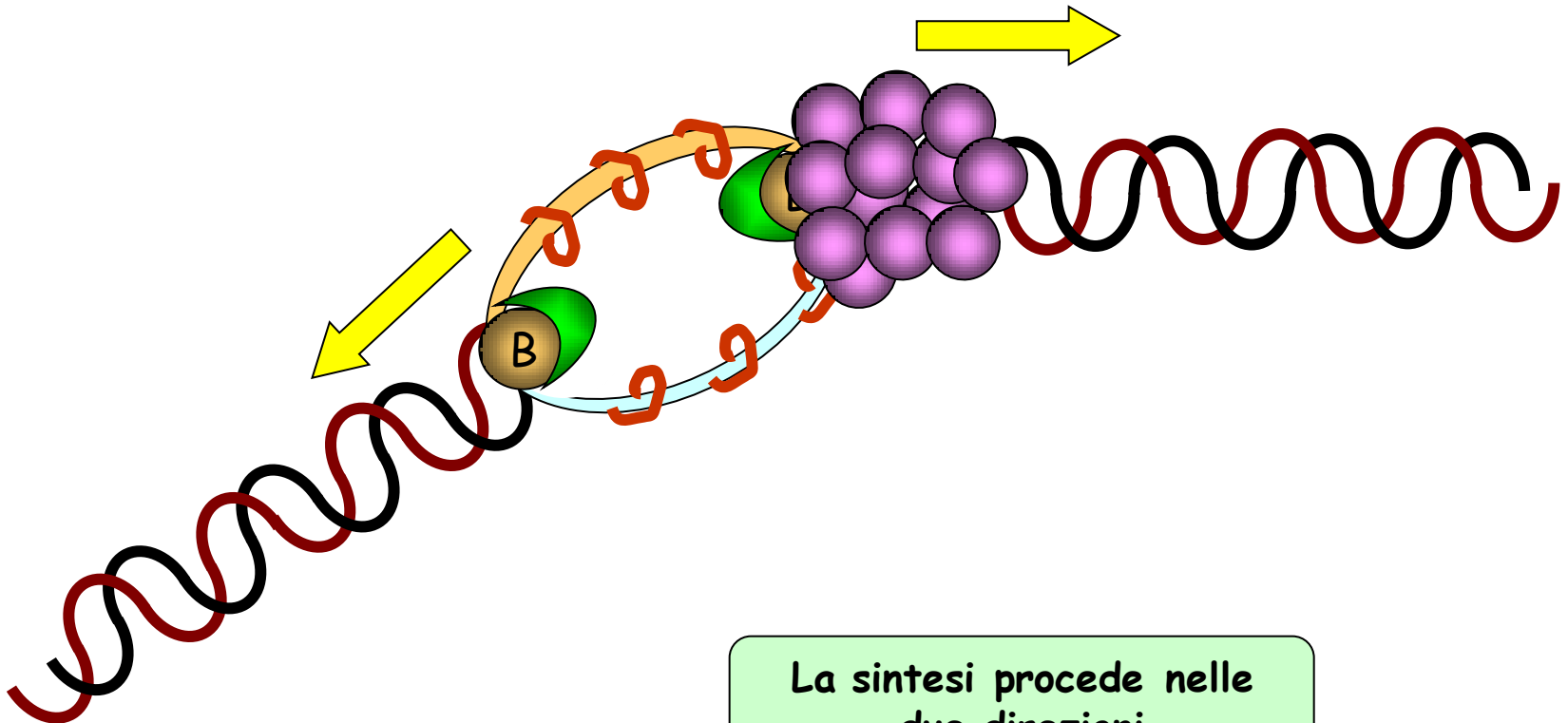
DnaB si lega alle estremità
dell'apertura

Le proteine SSB (Single Strand Binding)
impediscono il riappaiamento dei filamenti

E per il filamento copia

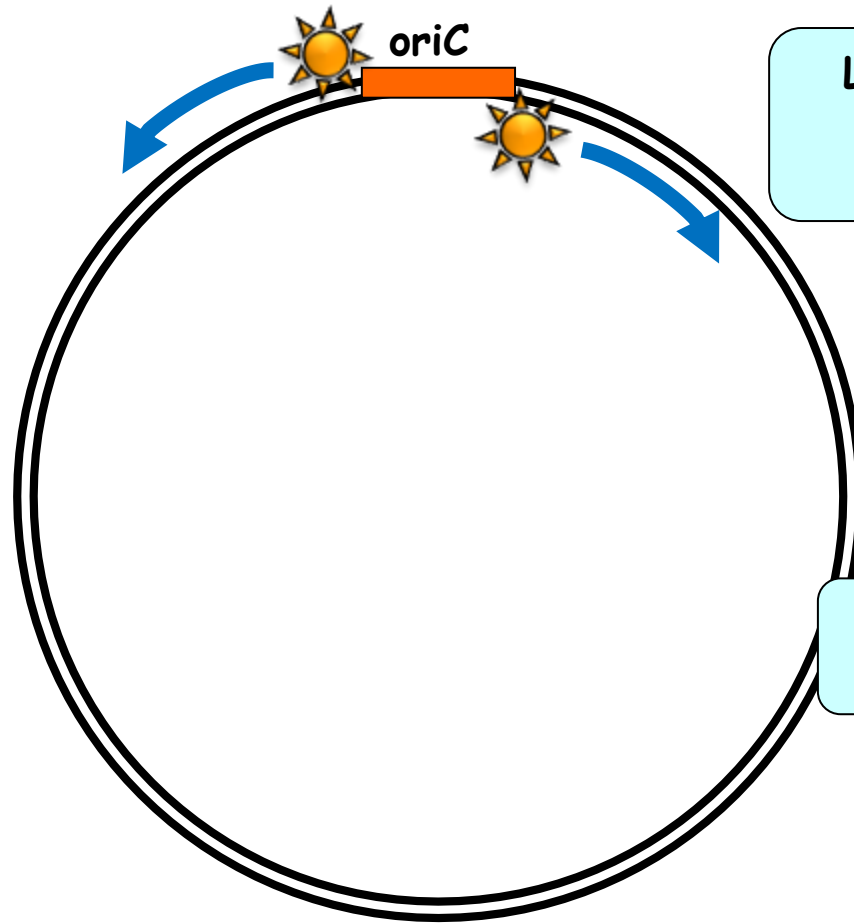


Durante questo processo il DNA legato a DnaA si svolge e DnaA viene gradatamente rimossa da oriC



La sintesi procede nelle due direzioni

Quando la cellula cresce e raggiunge dimensioni idonee



La concentrazione di DnaA permette che si formino due replisomi uno su ciascun filamento di OriC

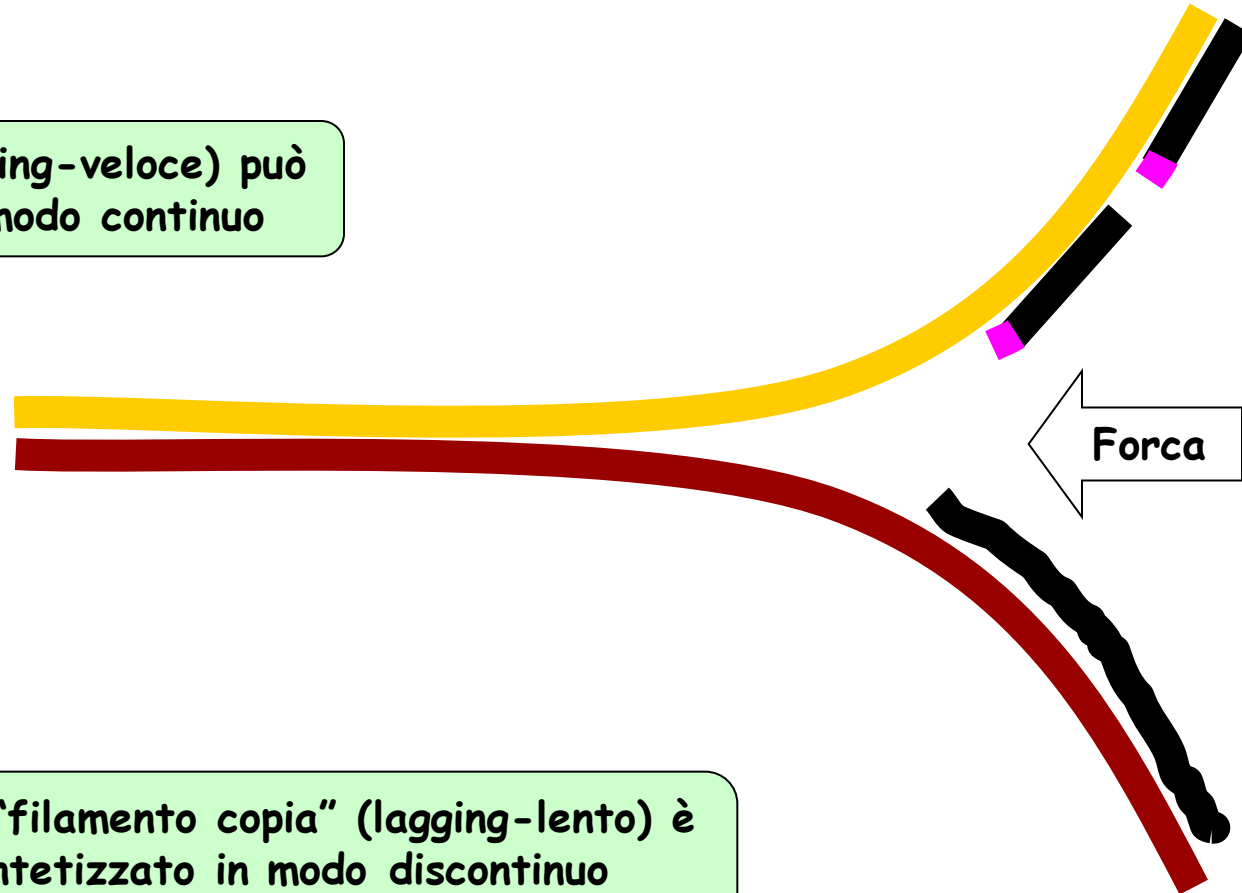
I replisomi iniziano a muoversi in direzioni opposte

il DNA legato a DnaA si svolge e DnaA viene gradatamente rimossa da oriC

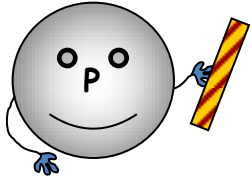
La DNA polimerasi III aggiunge i nucleotidi all'estremità 3' (-OH)

Il "filamento guida" (leading-veloce) può essere sintetizzato in modo continuo

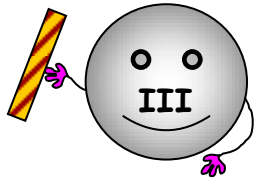
Ma il "filamento copia" (lagging-lento) è sintetizzato in modo discontinuo (frammenti di Okazaki)



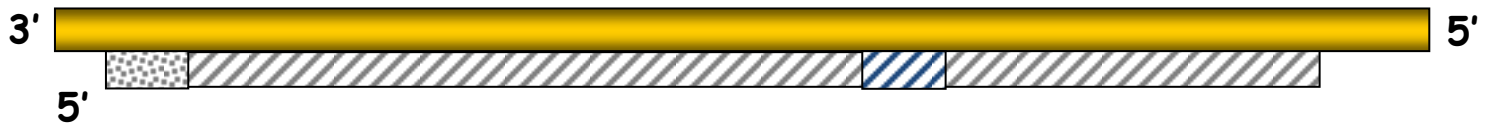
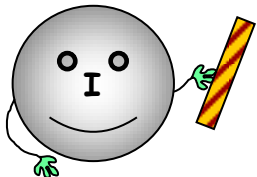
PER IL FILAMENTO LAGGING SERVE L'INTERVENTO DI MOLTI ENZIMI



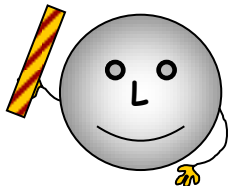
Primasi: sintetizza inneschi di RNA



DNA polimerasi III: aggiunge nucleotidi al 3' fino a raggiungere il frammento precedente



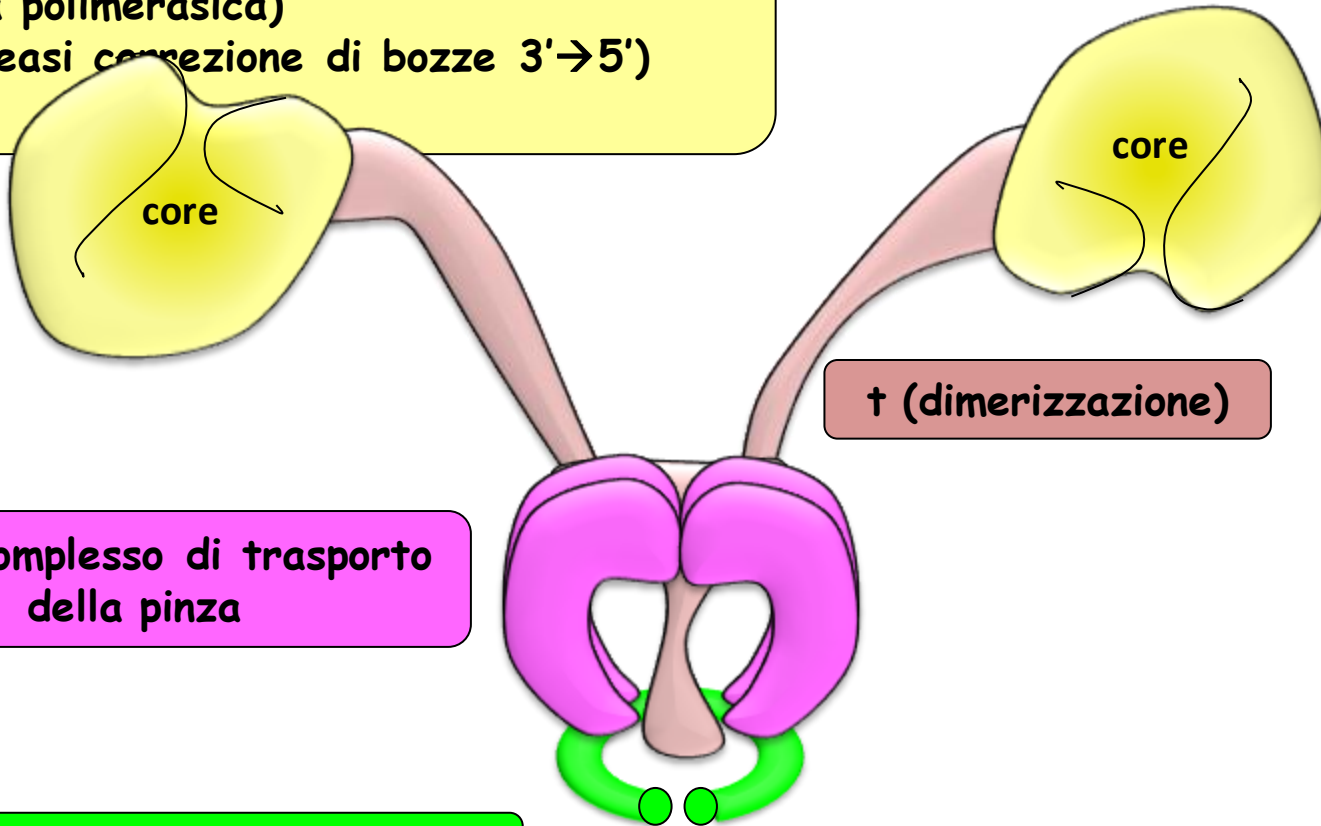
DNAsi I: elimina l'innescio di RNA, lo sostituisce con DNA e si stacca



DNA ligasi I: unisce i frammenti in un unico filamento

La DNA-polimerasi III ha
diverse subunità

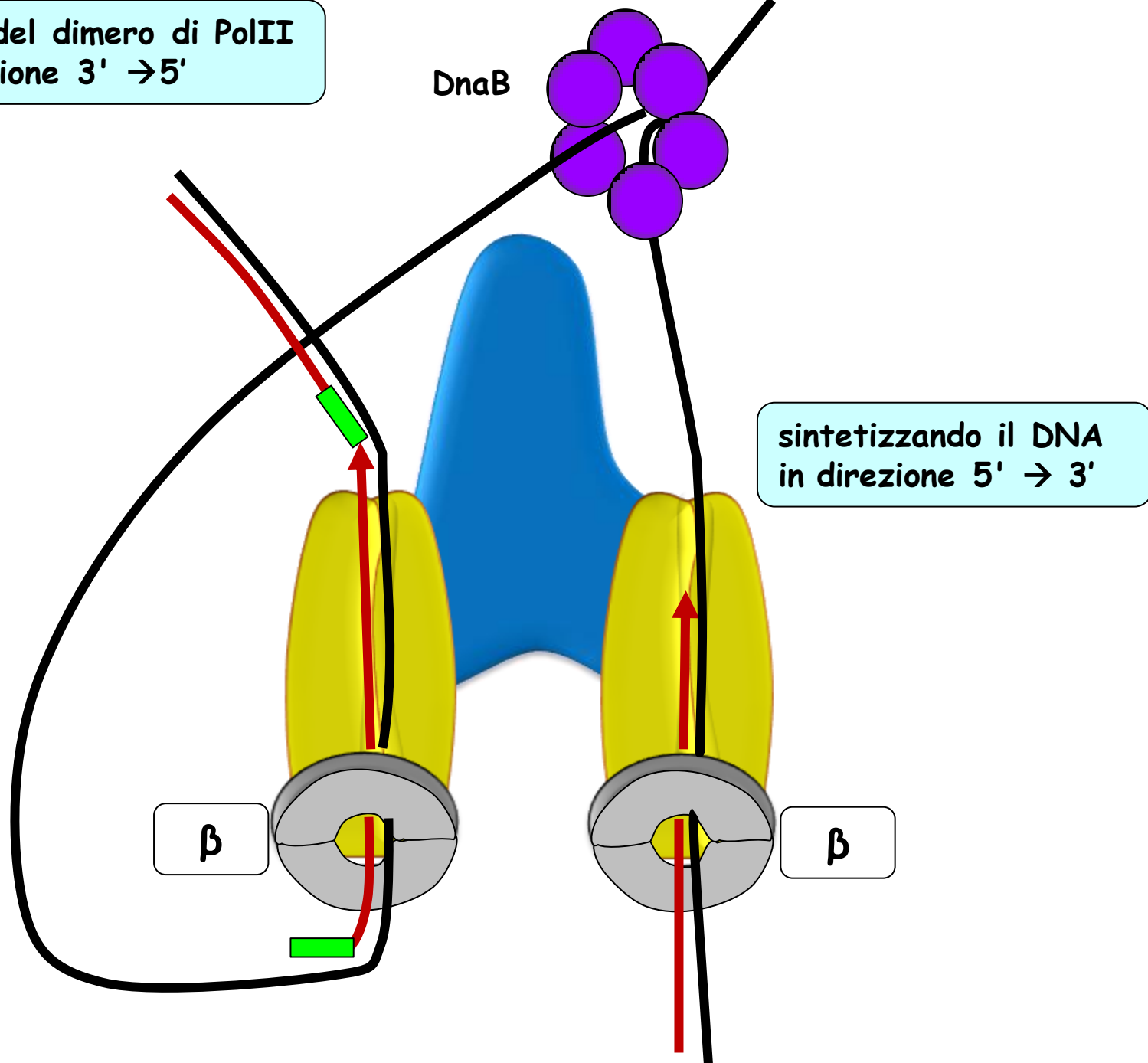
Core enzima
 α (attività polimerasica)
 ϵ (esonucleasi correzione di bozze 3'→5')
 θ



$\gamma\delta\chi\psi$: complesso di trasporto
della pinza

β "pinza scivolante"

le subunità attive del dimero di PolII
si muovono in direzione 3' → 5'



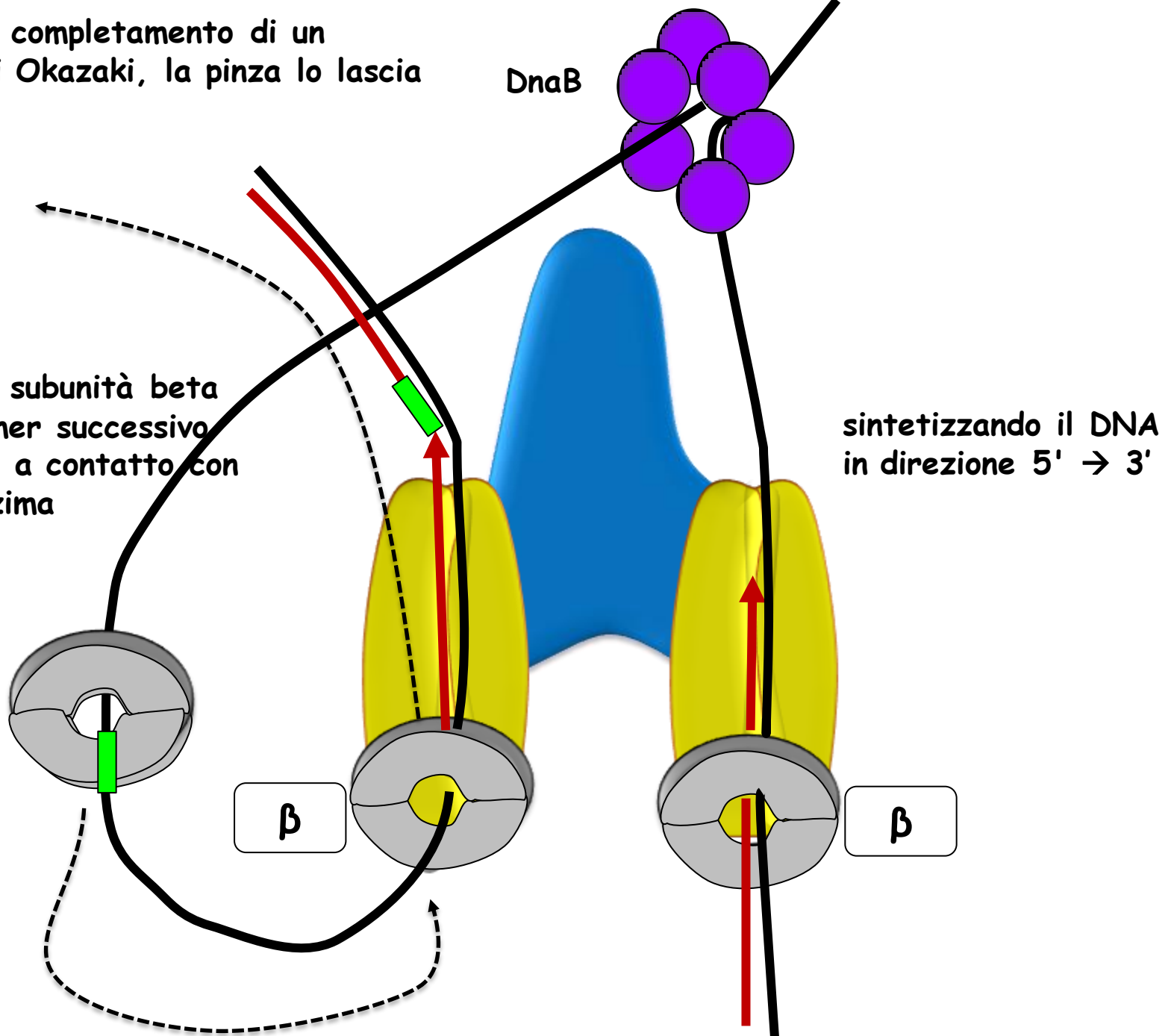
sintetizzando il DNA
in direzione 5' → 3'

Dopo il completamento di un frammento di Okazaki, la pinza lo lascia

DnaB

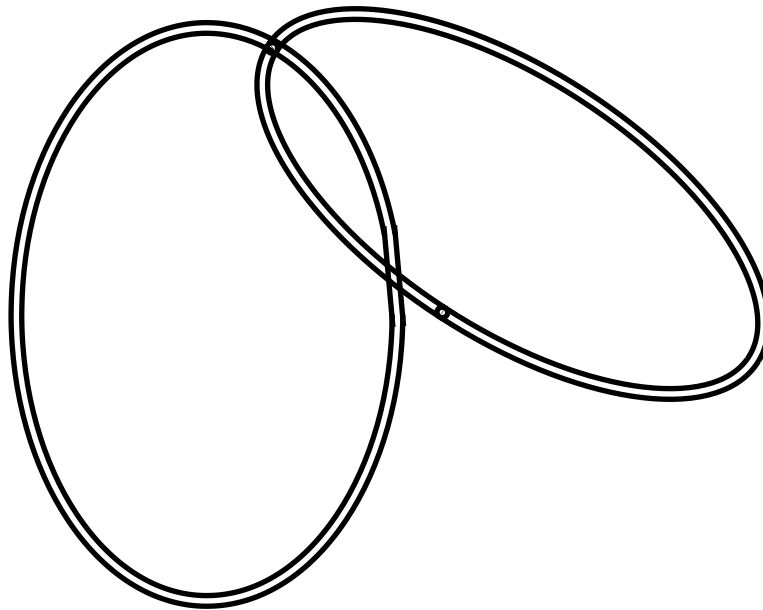
Una nuova subunità beta tira il primer successivo portandolo a contatto con il core enzima

sintetizzando il DNA in direzione 5' → 3'



La replicazione termina in corrispondenza di "ter C"
(sito di terminazione) dove le forche si incontrano in
corrispondenza di due sequenze di 23 bp

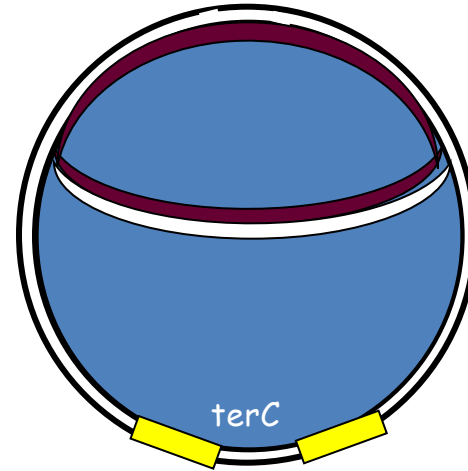
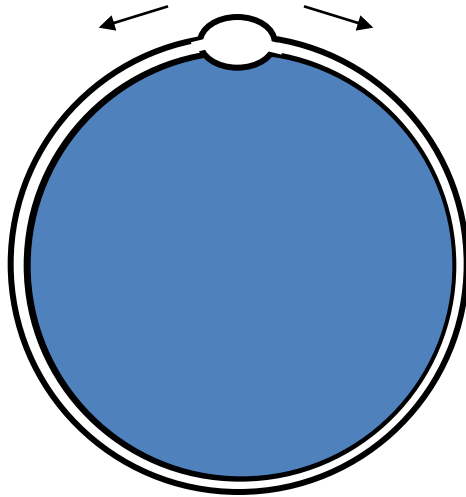
I due cromosomi figli sono
intrecciati in concatenamero



Le topoisomerasi provvedono a
separarli

E a rinsaldare la rottura dopo la
separazione

Osservando le fasi della replicazione al ME, si distingue una struttura a "occhio"



Seguita da una struttura a "Theta" (θ)

L'intero processo dura circa 40'