

M.C. THALLER

APPUNTI DI MICROBIOLOGIA GENERALE



**IN NATURA, IL RUOLO DELL'INFINITAMENTE PICCOLO
È INFINITAMENTE GRANDE (Louis Pasteur)**

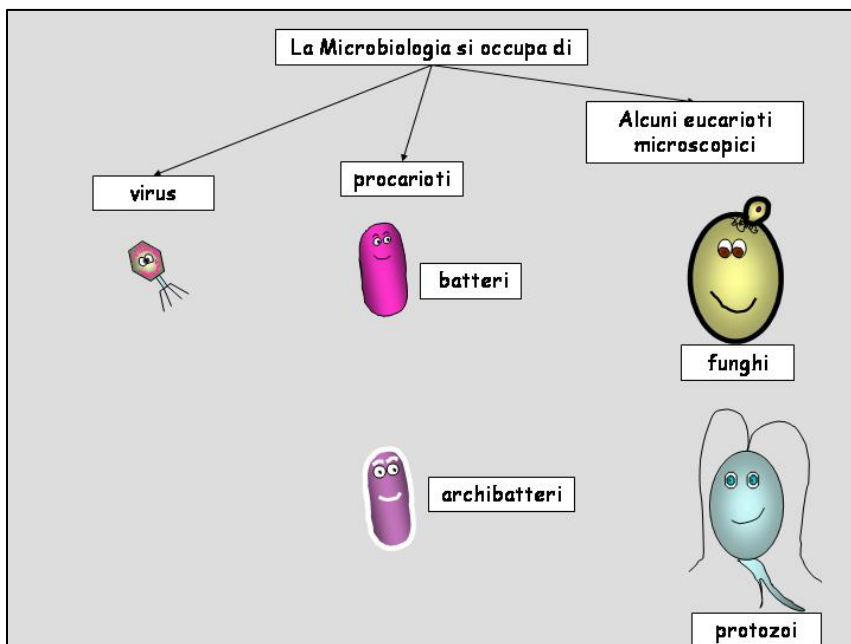
CORSO DI LAUREA TRIENNALE "ECOLOGIA"

A.A. 2007-2008

COS'È LA MICROBIOLOGIA?

La microbiologia è lo studio dei microrganismi (microbi) e può seguire due approcci diversi e complementari :

- 1) Lo studio dei microrganismi in quanto tali, e della loro biologia (tassonomia microbica, biochimica dei microrganismi, genetica batterica...)
- 2) Lo studio delle attività microbiche che, in un modo o nell'altro, interessano l'uomo (microbiologia medica, agraria, industriale, alimentare, veterinaria..)



La Microbiologia si occupa di microrganismi dotati di un'organizzazione di tipo "procariotico" (batteri e archibatteri); di alcuni eucarioti microscopici (funghi o protozoi), ma anche di entità tecnicamente "non vive", in quanto prive di organizzazione cellulare, come i Virus - formati da

un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) e da proteine; i Viroidi - parassiti obbligati, formati da RNA nudo, e i Prioni - proteine infettive, capaci di replicare se stesse.

L'esistenza dei microrganismi ha sempre condizionato, accompagnato e influenzato la vita e le attività umane anche se, per lungo tempo, l'umanità non ne è stata consapevole.

L'impossibilità di osservare i microrganismi a occhio nudo fece attribuire per lungo tempo i fenomeni dovuti alle loro attività, a forze misteriose: "miasmi" energie vitali... e anche quando fu possibile osservarli, il dibattito sulla loro origine si trascinò per oltre due secoli.

L'INIZIO DELLA MICROSCOPIA:

I primi microscopi erano molto semplici ma, con la loro capacità di aumentare le possibilità della vista umana, hanno aperto la strada per la scoperta della vita microbica. Il primo microscopio (1595 circa) fu costruito dall'artigiano olandese Zacharias Janssen e da suo padre

Hans, fabbricanti di occhiali negli ultimi anni del sedicesimo secolo. Gli occhiali a lenti concave, per correggere la presbiopia, erano conosciuti da più di un secolo, e gli Janssen applicarono due di queste lenti alle estremità opposte di un tubo, per ottenere di amplificare gli oggetti osservati. Un modello perfezionato permise all'inglese Robert Hooke, nel 1665, di osservare funghi microscopici (ma non ancora batteri). Hooke pubblicò i suoi risultati nel libro che divenne rapidamente molto popolare, e destò l'interesse dell'olandese Anton van Leewenhoek per la microscopia. Van Leewenhoek (1632-1723) era un commerciante di tessuti che usava le lenti per esaminare le fibre e la qualità delle stoffe; il suo microscopio era semplicissimo, dotato di una singola lente quasi sferica, ma riusciva a fornire un ingrandimento da 50 a 300 volte (circa 1/3 di un microscopio moderno), rivelando una quantità e una varietà di vita tanto sbalorditiva da fargli scrivere: " ci sono più *animalcules* nella schiuma tra i denti di un uomo di quanti uomini ci siano in un regno intero". Van Leewenhoek fu il primo a vedere batteri, protozoi parassiti e a vita libera, spermatozoi, eritrociti, rotiferi e nematodi microscopici...le sue ricerche ebbero una vasta diffusione e misero un intero mondo invisibile alla portata degli occhi e della consapevolezza degli scienziati dell'epoca.

La scoperta sorprendente dell'esistenza di queste "entità", innescò un considerevole dibattito sulla loro origine, che si prolungò per circa due secoli, innestandosi sulla nascente polemica riguardo la teoria della "generazione spontanea", in auge fin dall'antichità e accettata senza discussione per tutto il medio evo e il rinascimento.

LA POLEMICA SULLA TEORIA ABIOTICA



La teoria della generazione spontanea nacque da alcune osservazioni di Aristotele: il celebre filosofo aveva infatti un grande interesse per l'investigazione biologica e aveva anche pubblicato un vasto trattato sulla vita di alcuni animali marini; ma l'impossibilità di osservare il molto piccolo, e la difficoltà di collegare alcuni stadi larvali a un adulto morfologicamente molto diverso, lo portò a ipotizzare che le mosche e altri piccoli animali (per esempio le rane) nascessero

direttamente dal fango dei sedimenti di fiumi e laghi. Il pensiero di Aristotele ebbe poi una importanza enorme in tutta la cultura occidentale e nessuna delle sue teorie (compresa questa) fu messa in discussione per molto tempo.

L'idea che organismi viventi potessero essere creati da materiale non vivente o materia organica in decomposizione, infatti, era ancora considerata un quasi un dogma nel 17° secolo: Jean Baptiste van Helmont (1577-1644) un noto botanico belga, fu un dichiarato sostenitore della teoria della generazione spontanea e scrisse che, volendo ottenere dei topi, era necessario collocare stracci umidi e fangosi e una camicia sporca (che portasse la forza vitale del sudore umano) in una soffitta buia e circondarli di chicchi di frumento o pezzi di formaggio. Altri autori offrivano ricette per rane, serpenti, api, anguille.

Intorno al 1680 però, il medico italiano Francesco Redi ideò un semplice esperimento per dimostrare l'assurdità dell'assunto secondo il quale le mosche si originavano dalla carne in decomposizione. Redi pose diversi tipi di carne in recipienti a bocca larga; ne lasciò alcuni aperti e ne coprì altri con una garza sottile per impedire l'accesso alle mosche, attratte dalla carne che marciva. Nei recipienti scoperti, dove le mosche avevano potuto deporre le uova sulla carne, le larve apparvero sulla superficie di questa ma, dove la garza aveva protetto il recipiente, le uova erano rimaste su di essa e lì si svilupparono le larve. Le mosche che comparvero in seguito nei due

diversi casi erano assolutamente identiche. Dopo aver ripetuto i suoi esperimenti diverse volte e con tipi di carne differenti (leone, pesce, manzo....) Redi ritenne di aver definitivamente dimostrato che le mosche nascevano dalle uova



deposte sulla carne o sulla stoffa e pronunciò la teoria della biogenesi, che sostiene che gli organismi viventi si originano per riproduzione da altri organismi viventi.

Gli esperimenti di Francesco Redi demolirono la teoria della generazione spontanea degli organismi visibili ma, paradossalmente, la scoperta dei microrganismi rilanciò la polemica. Leeuwenhoek aveva osservato che lasciando della paglia in infusione nell'acqua per pochi giorni, era poi possibile trovarvi numerosi microrganismi. Nel 1710, un microscopista francese, Louis

Joblot, osservò il medesimo fenomeno e ne dedusse che la generazione spontanea potesse essere considerata provata.... limitatamente ai i microrganismi.

Nel 1765 il naturalista italiano Lazzaro Spallanzani preparò due serie di vasi contenenti brodo, lasciandone una aperta all'aria e sigillando l'altra (fondendone il collo) dopo aver bollito il brodo al suo interno per uccidere tutte le forme di vita. Spallanzani osservò che solo il brodo nel recipiente sigillato restava sterile.

Questi risultati, pubblicati nel 1767, sembravano aver messo la parola fine a questa lunga polemica ma, nel 1774 il chimico inglese Joseph Priestly dimostrò che l'ossigeno è necessario alla vita. Sulla base del suo lavoro, i sostenitori della generazione spontanea conclusero che nelle fiasche sigillate di Spallanzani.. il trattamento al calore doveva aver alterato l'ossigeno e reso impossibile lo sviluppo spontaneo dei microrganismi. La parola fine a questa "*annosa questio*" fu posta da Schwann, Pasteur e Tyndall che, indipendentemente, eseguirono esperimenti con carni e succhi di piante sterilizzati esposti a un'atmosfera di ossigeno inalterata e libera da microrganismi. L'esperimento più noto è quello di Pasteur (1861) che riprodusse gli esperimenti di Spallanzani usando particolari fiasche a collo di "cigno",



disegnate da un suo assistente. Il brodo nelle fiasche era stato fatto bollire all'inizio dell'esperimento e le fiasche erano lasciate aperte per garantire la libera circolazione dell'ossigeno. Grazie alla conformazione del collo, tuttavia, non si osservava alcuna crescita microbica, perché i microrganismi non potevano arrivare al brodo. Inclinando la fiasca fino a portare il brodo a toccare la piega del collo, il brodo si inquinava.

La sconfitta della teoria della generazione spontanea aprì l'era della microbiologia moderna, ma la strada era ancora lunga: tutto era da scoprire e tutto da spiegare. Le ricerche fiorirono, i risultati erano sbalorditivi, si accavallavano, si inseguivano, cambiavano il volto della medicina e non solo di quella. Ferdinand Kohn (1828-1898) uno studioso che scoprì le proprietà delle endospore, pose anche le basi della tassonomia e della classificazione dei batteri; Koch (1843-1910) studiò soprattutto i microrganismi patogeni, e introdusse un utilissimo strumento di studio: la tecnica della coltura axenica (pura) ottenuta a partire da un isolamento diretto. Vinogradskij (1856-1953) e Beijerinck (1851-1931), rivolsero la propria

attenzione ai microrganismi ambientali e alle loro attività, mettendo a punto tecniche di arricchimento e di studio di comunità che hanno permesso di chiarire molto sulle interazioni tra microrganismi e sul rapporto microrganismi-ambiente. Le strade tracciate da questi pionieri e seguite da molti altri scienziati, hanno permesso alla Microbiologia di svilupparsi come una scienza completa e di comprendere appieno l'enorme importanza dei microrganismi in ogni campo. Negli ultimi anni, l'uso di tecniche biochimiche e molecolari ci ha permesso di disporre di molte informazioni anche su specie che non si riesce a coltivare, e la cui fisiologia rimane quindi un problema aperto.

I BATTERI: LA MORFOLOGIA

La forma dei batteri viene spesso riferita a tre modelli principali: sfera, cilindro o spirale anche se le variazioni sono moltissime.

SFERICHE (più o meno.....)

Forma	Esempio
Sfere	<i>Staphylococcus, Streptococcus</i>
Sfere allungate (coccobacilli)	<i>Brucella, Listeria</i>
Emisfere (sf. appiattite su un lato)	<i>Neisseria</i>
Barre (sf. appiattite su due lati)	<i>Nodularia</i>
A forma di lancia (emisf. coniche)	Pneumococco
Ovoidi	<i>Azotobacter</i>
Sfere allungate, appiattite su 4 lati lungo l'asse maggiore	<i>Lamproedia</i>
Sfere lobate	<i>Sulfolobus</i>

CILINDRICHE (e dintorni..)

Cilindri con estremità emisferiche	<i>Escherichia coli</i>
Cilindri con estremità squadrate	<i>Bacillus anthracis</i>
Cilindri con estremità cilindriche ristrette	<i>Caulobacter</i>
Cilindri troncati (dischi)	<i>Beggiatoa</i>
Dischi triradiati in sezione trasversa	<i>Starria</i>
Fusiformi	<i>Fusobacterium</i>
Cilindri con rigonfiamento terminale	<i>Bacilli a spora terminale</i>
Cilindri con rigonfiamento centrale	<i>Bacilli a spora centrale</i>
Cilindri con ramificazioni cilindriche	<i>Actinomyces</i>
Filamenti (cilindri lunghissimi)	<i>Actinomyces, cianobatteri</i>

CILINDRI CURVI O AVVOLTI AD ELICA O SPIRALE (grosso modo..)

Eliche con estremità emisferiche	Spirilli e spirochete
Eliche con estremità appuntite	<i>Thiospira</i> , alcuni treponemi
Cilindri curvi con estremità emisferiche	<i>Vibrio</i>
Cilindri curvi con estremità affusolate	<i>Caulobacter</i>
Reniforme o a mezzaluna	<i>Selenomonas, Gallionella</i>
Spirali (a molla di orologio)	<i>Vitroscilla, Beggiatoa</i>

PIATTE (!)

Con estremità squadrate	"Square bacterium" di Walsby
A forma di stella di David	<i>Stella</i>

COME É FATTA UNA CELLULA BATTERICA?

Generalmente i batteri sono unicellulari e di piccole dimensioni. Le dimensioni ridotte sono un vantaggio dal punto di vista della facilità di scambi con l'ambiente circostante. L'interazione con l'ambiente, infatti, avviene attraverso la superficie della cellula batterica, che aumenta con l'aumentare del quadrato della dimensione lineare mentre il volume (e di conseguenza la materia vivente che da questi scambi dipende) aumenta con il cubo della dimensione lineare. Quanto più una cellula è grande, tanto minore sarà il rapporto tra superficie e volume.

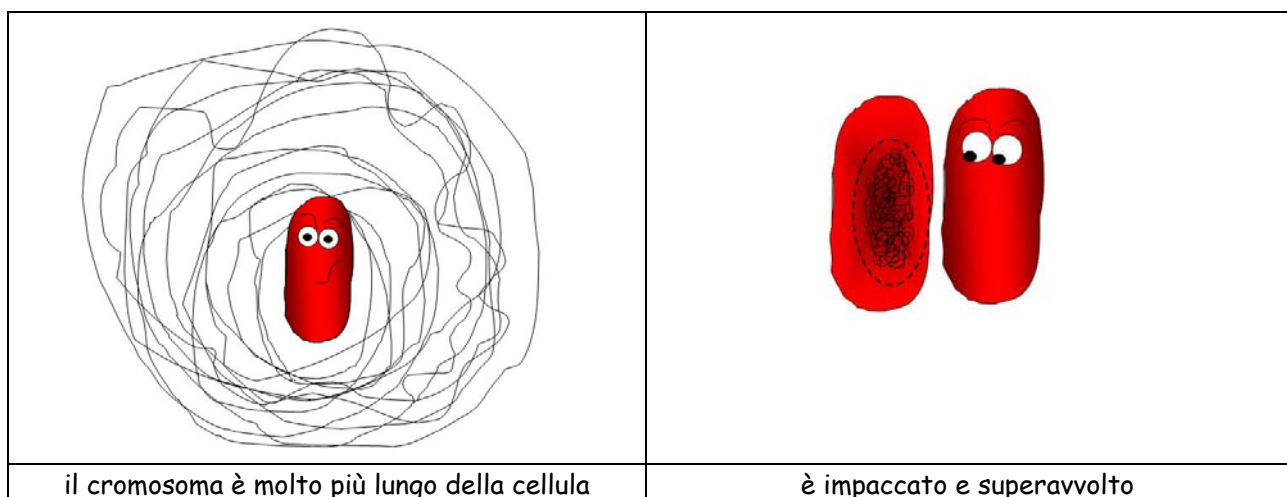
Le cellule microbiche non sono "meno organizzate" delle cellule eucariotiche: sono semplicemente organizzate diversamente. Prenderemo in considerazione la struttura della cellula batterica, iniziando dall'interno e procedendo verso l'esterno

CITOPLASMA

ACIDI NUCLEICI

La vastità della diversità tra batteri è ben illustrata anche dalle differenze delle dimensioni del genoma che si possono osservare. Il più piccolo genoma che si conosca in una cellula procariota è quello di *Mycoplasma genitalium* (0,58 Mb), seguito (0,65) dal genoma di *Buchnera apidicola* (un endosimbionte degli afidi, che ha perduto buona parte dei geni che si trovano in specie a lei vicine).

DNA: A differenza di quello eucariotico, il DNA procariotico è disperso nel citoplasma; La regione in cui si addensa è il "nucleoide" o "regione nucleare" . Per quanto nella maggior parte



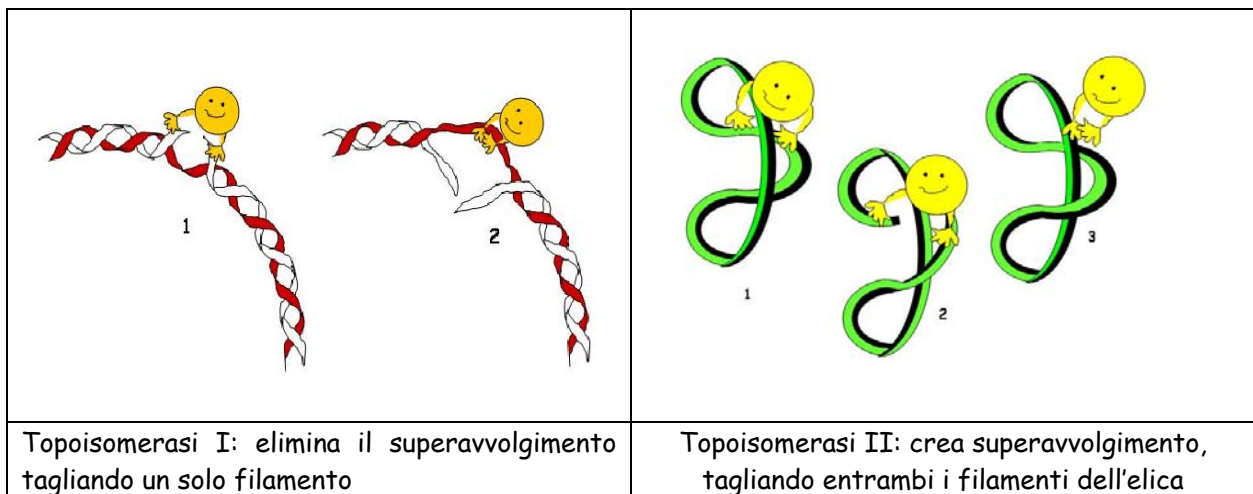
dei casi i batteri abbiano un solo cromosoma circolare, ci sono molte eccezioni a questa regola: per citare solo pochi esempi, *Vibrio cholerae* (agente del colera) e *Ralstonia solanarum* (un microrganismo fitopatogeno) possiedono due cromosomi; *Burkholderia cepacia* (microrganismo

comune nell'ambiente) ne ha 3; *Borrelia burgdorferi* (una spirocheta agente del morbo di Lyme) ha un solo cromosoma ma lineare come anche lineari sono i suoi plasmidi.

Un genoma procariotico "medio" ha dimensioni di circa 4 Mb, ma può essere anche molto più grande, fino alle circa 10 Mb del genoma di *Streptomyces coelicolor*.

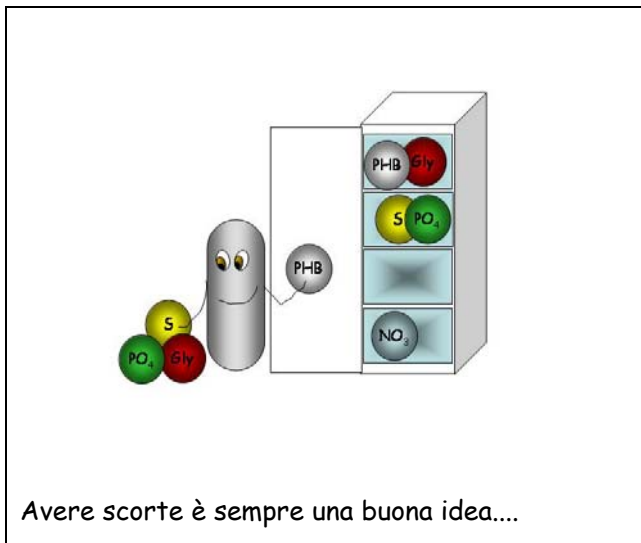
La lunghezza del cromosoma "rilassato" (circa 1 mm) è comunque molto superiore (500-1000 volte) a quella della cellula batterica: per questo motivo il cromosoma è impaccato all'interno della cellula, dove occupa la regione centrale della cellula senza essere delimitato da alcuna membrana.

Il DNA è in genere superavvolto negativamente: questo significa che è avvolto intorno al suo asse, in direzione CONTRARIA a quella della doppia elica destrorsa. L'introduzione o l'eliminazione dei giri di superavvolgimento è opera delle "topoisomerasi". In particolare, la topoisomerasi I elimina giri di superavvolgimento, tagliando uno solo dei due filamenti e passandolo oltre a quello intero; la topoisomerasi II introduce giri di superavvolgimento, tagliando entrambi i filamenti dell'elica e rilegandoli dopo averli incrociati.



RNA: La cellula batterica attiva è particolarmente ricca di RNA: il citoplasma è cosparso di ribosomi e vi si trova RNA messaggero in abbondanza. Il ribosoma batterico differisce da quello eucariotico per la costante di sedimentazione dei singoli elementi (30 e 50S) e del ribosoma assemblato (70S). La subunità 30S è formata da 21 proteine e una molecola di RNA 16s; la subunità 50S da 34 proteine e due molecole di RNA 23s e 5s.

INCLUSIONI CITOPLASMATICHE



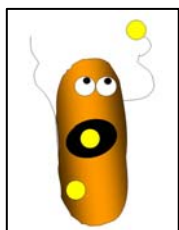
In una cellula batterica si possono trovare inclusioni di molti tipi: alcune sono molto comuni mentre altre, caratteristiche di poche specie, sono strettamente correlate alle loro strategie di produzione di energia. Le inclusioni che si osservano più di frequente sono quelle che costituiscono riserve di energia e nutrienti per la cellula.

RISERVE DI CARBONIO

Nella maggior parte degli ambienti naturali l'apporto di nutrienti è discontinuo: il poter disporre di sostanze di riserva rappresenta un vantaggio selettivo non indifferente per una cellula batterica. Le inclusioni di riserva possono essere formate da nutrienti, in genere in forma polimerica, come il glicogeno e l'amido (sostanze di riserva anche per gli eucarioti) o i poli- β -idrossialcanoati (PHA), lipidi formati da lunghi polimeri di unità idrofobiche ripetute. Tra i PHA, il composto maggiormente diffuso è il poli- β -idrossibutirrato (PHB) che ha un gruppo metile nella catena laterale. Le inclusioni di PHB sono racchiuse in una membrana monostratificata di fosfolipidi; a differenza di amido e glucosio, visibili nella cellula solo attraverso reazioni istochimiche che ne rivelano la presenza, gli accumuli di PHB sono caratterizzati da una rifrangenza accentuata che li rende evidenti all'esame microscopico.

ACCUMULO DI POLIFOSFATI

Anche composti come i polifosfati si accumulano nella cellula di molte specie e possono essere degradati, all'occorrenza, per far fronte alla necessità di fosfati per la sintesi dei fosfolipidi di membrana o di acidi nucleici. Queste particolari inclusioni sono anche definite "granuli di volutina" perché sono stati osservati per la prima volta in cellule di *Spirillum volutans*, oppure "granuli metacromatici" perché modificano il colore di coloranti blu (di metilene o di toluidina).



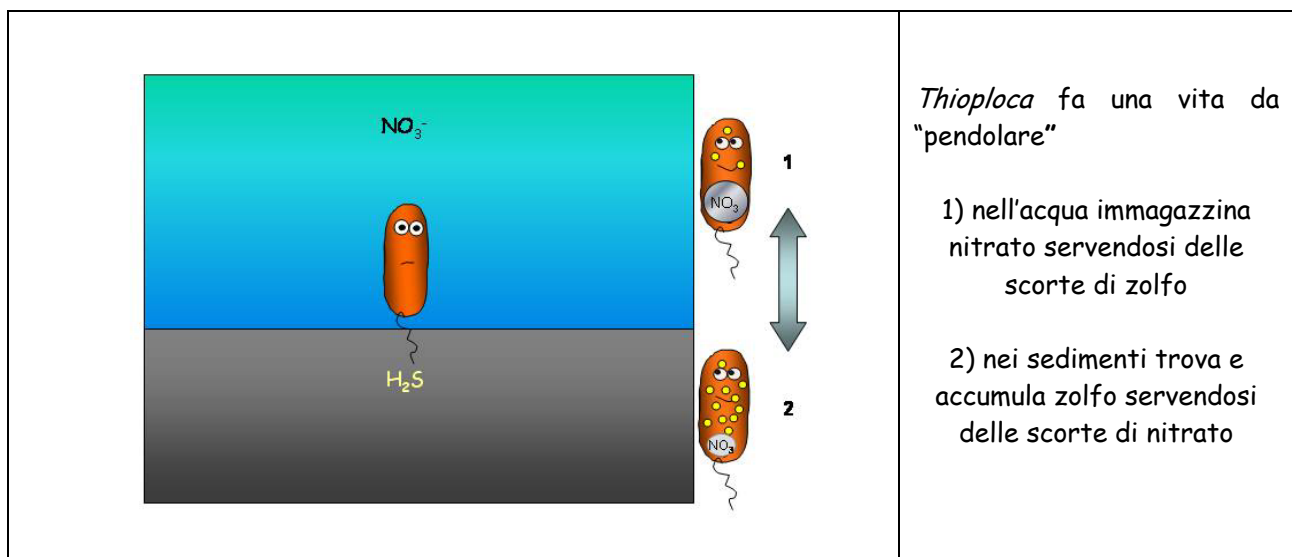
GRANULI DI ZOLFO

Inclusioni di zolfo elementare nel citoplasma sono comuni nei batteri che producono la propria energia ossidandolo a solfato. Nella maggior parte dei

casi la localizzazione dei granuli di zolfo è interna alla cellula ma in alcune specie (batteri fotosintetici verdi) i granuli si trovano all'esterno della cellula strettamente associati alla membrana, in modo da poter essere facilmente utilizzati. Le specie fotosintetiche (anaerobie, anossigeniche) che ossidano lo zolfo traggono un vantaggio selettivo dalla disponibilità di una fonte di energia che possa essere utilizzata anche nell'oscurità.

RISERVE DI COMPOSTI AZOTATI

Azoto inorganico- alcuni microrganismi sono in grado di ossidare lo zolfo, usando come accettore terminale di elettroni il nitrato (NO_3^-) invece dell'ossigeno. Si tratta di specie anaerobie (es. *Thioploca*), che vivono nei sedimenti. Il problema che devono superare è costituito dal fatto che il nitrato (accettore) e il solfuro di idrogeno (donatore di elettroni) non si trovano nello stesso posto; quando la cellula batterica si trova nell'acqua, quindi, il nitrato viene immagazzinato in un grosso vacuolo, utilizzando le riserve di zolfo già accumulate nel citoplasma, per produrre energia. La cellula batterica si sposta poi nel sedimento, dove

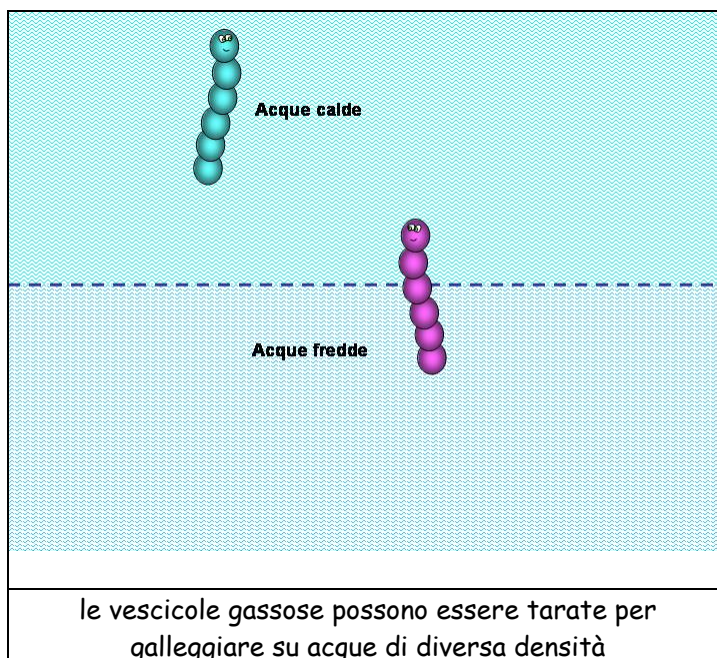


torna a accumulare zolfo utilizzando le scorte di nitrato. *Thioploca* è dotata di una mobilità di tipo "scivolante"; che le permette di spostarsi; *Thiomargarita* (imparentata con *Thioploca*) invece è immobile e per giungere nell'acqua dove può trovare il nitrato deve dipendere da turbolenze occasionali. La riserva di nitrato deve quindi avere dimensioni tali da sopperire alle richieste della cellula per lungo tempo: per questo motivo il vacuolo ha dimensioni enormi e il citoplasma è solo uno strato sottile all'esterno di esso. Sono proprio le dimensioni del vacuolo a fare di *Thiomargarita namibiensis* il batterio più grande del mondo.

2) **azoto organico**- Le riserve di azoto organico sono inconsuete: l'unico esempio che se ne conosce è quello dei granuli di cianoficina, caratteristici dei cianobatteri. La cianoficina è costituita da residui di acido aspartico, ognuno dei quali è legato a un residuo di arginina che rappresenta la riserva di azoto organico.

Vescicole di galleggiamento

Alcune specie acquatiche immobili ricorrono a vescicole gassose che hanno funzione di organi di galleggiamento, per spostarsi verticalmente lungo una colonna d'acqua. La membrana delle vescicole è proteica, rigida e resistente alla pressione esterna; il gas all'interno corrisponde alla composizione del gas presente nell'ambiente dove il microrganismo vive.



Le proteine che formano la vescicola gassosa sono solo due (GvpA e GvpC). GvpC, ha invece una struttura ad α -elica, e forma strati paralleli che circondano la vescicola come nastri. GvpA è costituita da un foglietto beta rigido e tiene insieme i nastri di GvpC con legami crociati, formando l'ossatura della struttura; La forma può essere varia: vescicole lunghe e strette sono meno efficienti come organi di galleggiamento ma più resistenti.

Sono molto comuni nei cianobatteri e in altri batteri, particolarmente quelli fotosintetici, che vivono in acqua. Le vescicole di galleggiamento sono impermeabili all'acqua ma non ai gas: preparando due bottiglie colme di una sospensione di cianobatteri dotati di vescicole di galleggiamento, tappandole e percuotendo il tappo di una di esse con un martello, si può osservare l'affondamento della massa dei cianobatteri, causato dal collassamento delle vescicole provocato dall'aumento improvviso di pressione. In alcuni casi, la tendenza al galleggiamento conferita dalle vescicole è controbilanciata dalla sintesi di polimeri caratterizzati da un'elevata densità.

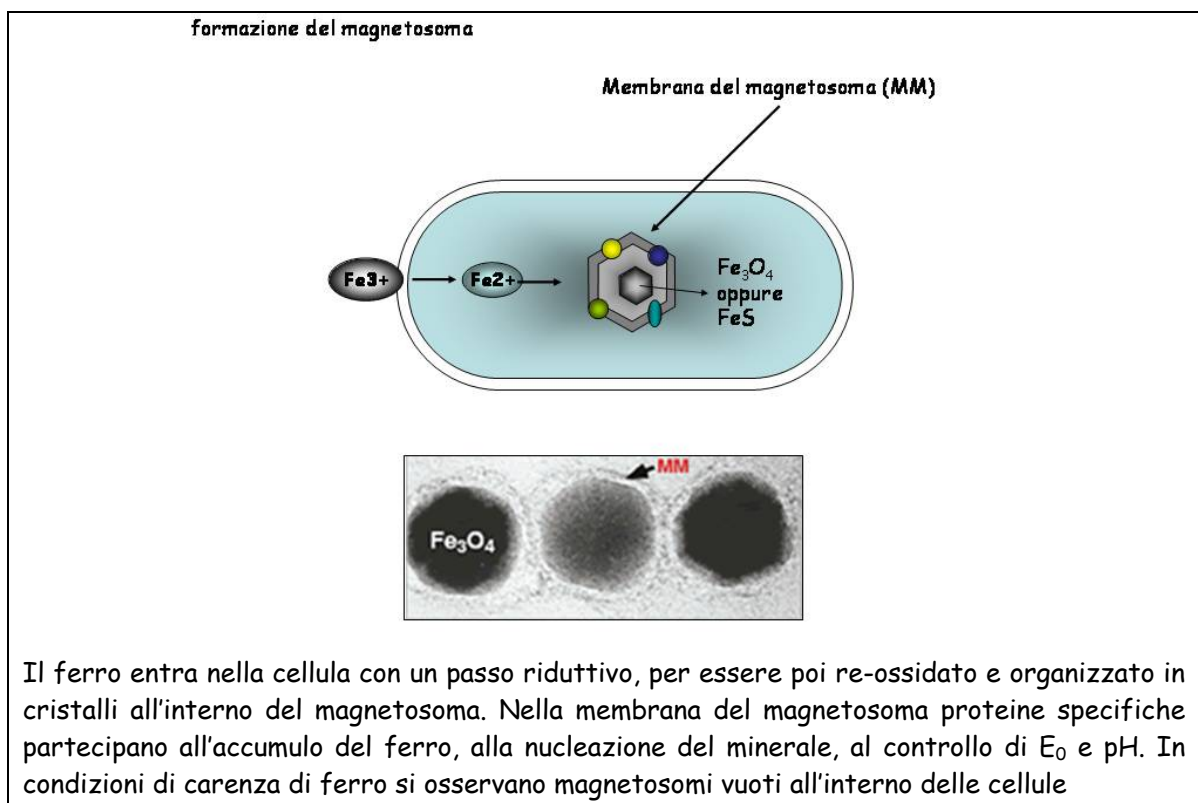
Alcuni microrganismi (per esempio *Oscillatoria rubescens* un cianobatterio) sono dotati di vescicole idonee a garantire il galleggiamento su acque fredde (dense), questo microrganismo galleggia quindi spesso a mezz'acqua.

Accumuli di proteine

A volte si possono osservare, nelle cellule batteriche, accumuli particolari formati da proteine, ne sono un esempio i carbossisomi, inclusioni circondate da una membrana sottile, formate da cristalli dell'enzima RuBisCO (Ribulosio-difosfato-carbossilasi) necessario per fissare CO_2 .

Accumuli di ferro: i magnetosomi

Un tipo di inclusione molto particolare è quella rappresentata dai magnetosomi: particelle cristalline intracellulari di magnetite o greigite (ossido e solfuro di ferro rispettivamente) racchiuse in una membrana di fosfolipidi proteine e glicoproteine, simile a quella che circonda le inclusioni di poli-idrossi- β -butirrato.



La presenza della membrana impedisce l'aggregazione delle particelle magnetiche fra loro.

I magnetosomi creano un dipolo magnetico permanente nella cellula, rendendola capace di rispondere a un campo magnetico; la loro formazione è un procedimento biologico che controlla

l'accumulo del ferro e la sua biomineralizzazione, all'interno delle vescicole di membrana, in cristalli magnetici che hanno forma e grandezza caratteristiche nelle diverse specie.

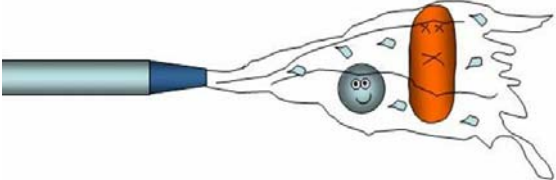
Endospore

Le endospore sono particolari forme di resistenza tipiche di pochi generi (*Bacillus*, aerobi o *Clostridium*, anaerobi sono i più diffusi) che si formano nella cellula batterica.

Per quanto si tratti in effetti di cellule quiescenti, vengono trattate insieme alle inclusioni citoplasmatiche a causa della loro collocazione all'interno della cellula batterica vegetativa, nella quale si formano, e in cui possono essere osservate prima che vengano liberate dalla lisi degli involucri esterni.

Una endospora ha una struttura molto differente da quella della cellula vegetativa in cui si forma e nel suo involucro si riconoscono molti strati: dall'esterno all'interno si trovano:

- 1) una membrana sottile (l'esosporio)
- 2) la tunica (o parete) sporale di natura proteica
- 3) la corteccia formata da uno strato lasso di peptidoglicano
- 4) il "core" che corrisponde al protoplasto della spora e che ha le medesime strutture convenzionali della cellula vegetativa (parete, membrana, citoplasma e nucleoidi).

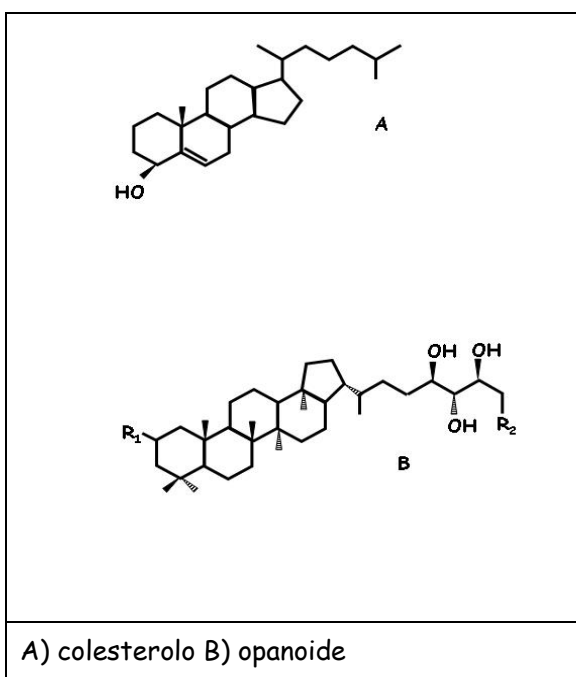
			
calore	essiccamento	invecchiamento	ultravioletti
		Le endospore sono particolarmente resistenti anche nei confronti delle normali pratiche di disinfezione	

Differenze importanti sono un contenuto d'acqua pari al 10-30% di quello di una cellula vegetativa; la presenza di un composto tipico (il dipicolinato di calcio) e di particolari proteine (SASP: **S**mall **A**cid-soluble **S**pore **P**roteins). La disidratazione e il dipicolinato di calcio proteggono la spora dall'azione del calore; le SASP legano il DNA e lo proteggono da UV, calore e disidratazione.

Le specie che sono in grado di formare endospore iniziano il processo di sporulazione quando la concentrazione dei nutrienti nell'ambiente scende al di sotto di un certo limite: la cellula smette di dividersi e il nucleotide forma un filamento assiale al centro di essa. La membrana della cellula si invagina, racchiudendo una parte del DNA, forma un setto e continua a crescere fino a racchiudere la spora nascente in un secondo strato; tra i due strati di membrana viene sintetizzata la cortex, in cui si accumulano calcio e acido dipicolinico, e poi la tunica. Infine la spora, matura, è rilasciata dalla cellula. Quando le condizioni migliorano, le spore possono germinare, dando luogo nuovamente alla forma vegetativa.

Il processo di germinazione è complesso e la spora deve generalmente essere attivata (es con l'esposizione al calore). All'attivazione segue la germinazione propriamente detta, in cui la spora esce dallo stato quiescente, si gonfia e perde rifrangenza; la terza fase (esocrescita) è quella in cui la nuova cellula vegetativa attiva emerge dalle tuniche sporiali. Durante le fasi di germinazione e esocrescita le SASP sono utilizzate come fonte di carbonio e di energia

LA MEMBRANA CITOPLOSMATICA

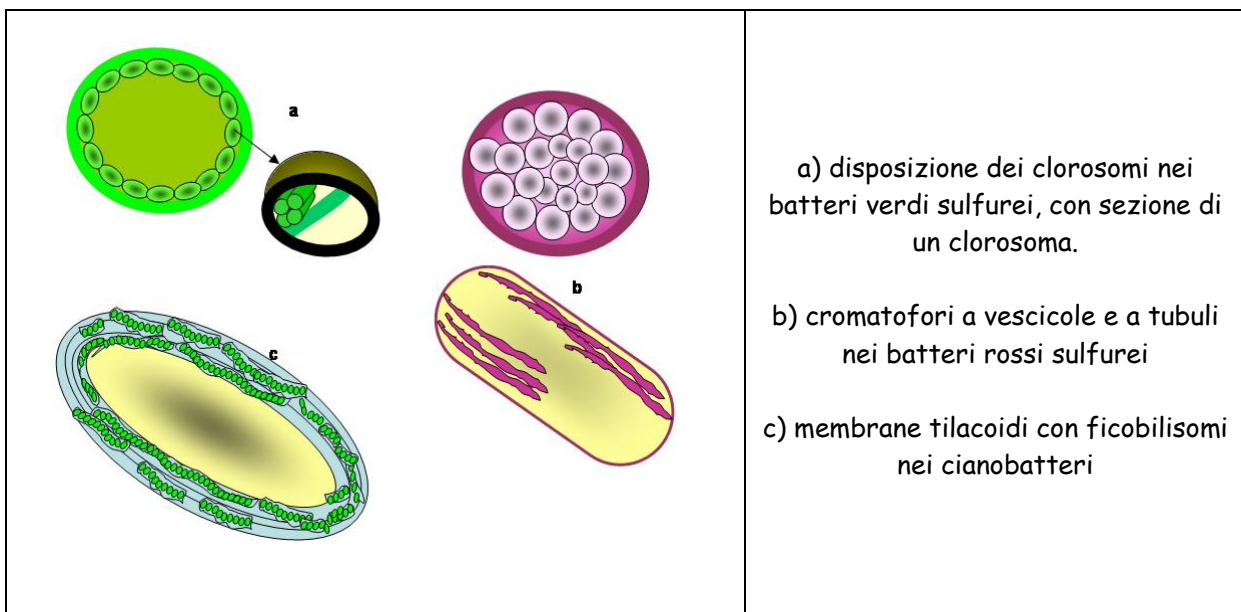


Il citoplasma è delimitato dalla membrana citoplasmatica, formata da un doppio strato di fosfolipidi, in cui coesistono una componente idrofobica (acidi grassi) e una relativamente idrofilica (glicerolo). I fosfolipidi tendono all'aggregazione spontanea in strutture a doppio strato, con gli acidi grassi verso l'interno e la porzione idrofilica all'esterno. La composizione della membrana è soggetta a variazioni tra una specie e l'altra, con differenti fosfolipidi (il tipo più comune è la fosfoserina) e diversi tipi di acidi

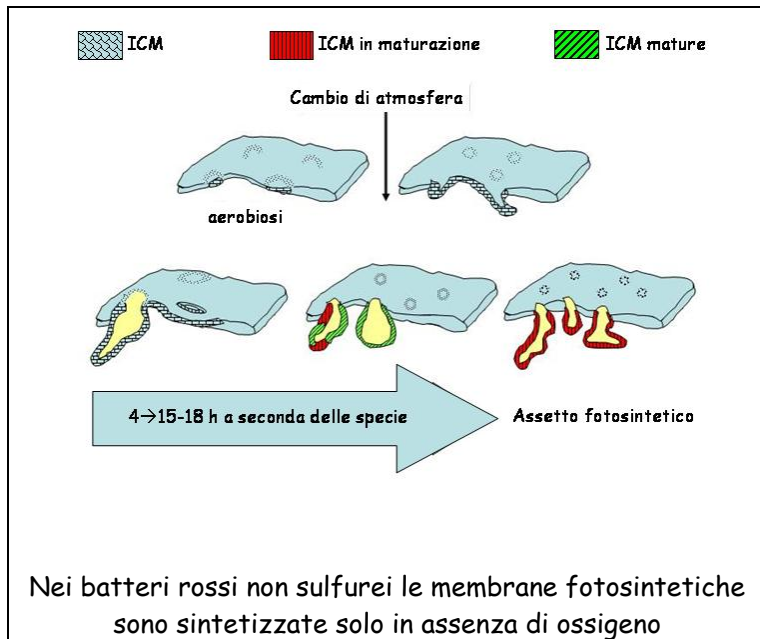
grassi; il glicerolo è unito agli acidi grassi con un legame estere. Diversamente da quanto si osserva negli eucarioti (e con la sola eccezione dei micoplasmi, batteri privi di parete e dei batteri che ossidano il metano) la membrana procariotica non contiene steroli. Possono tuttavia presenti gli opanoidi, chimicamente simili agli steroli.

La membrana cellulare delimita il citoplasma, costituisce una barriera di permeabilità selettiva permettendo il passaggio libero a solo pochi ioni e soluti e alloggia i sistemi di trasporto per i nutrienti; ha un ruolo importante nella produzione di energia, mantiene l'ordine spaziale delle catene respiratorie e separa i nucleoidi, fissati alla membrana, nel corso della replicazione.

MEMBRANE INTERNE



Per quanto nell'organizzazione procariotica della cellula manchino organelli membranosi complessi, alcune specie hanno sistemi di membrane interne, dedicate in genere a funzioni particolari. Nei batteri **fotosintetici verdi**, per esempio, le batterioclorofille e i pigmenti accessori sono situati all'interno di strutture allungate, connesse alla membrana da una placca basale, che prendono il nome di clorosomi. Nei cianobatteri le membrane fotosintetiche (tilacoidali) sono disposte intorno alla cellula e contengono i ficobilisomi, che racchiudono i pigmenti (ficocianina). Nei batteri **fotosintetici rossi sulfurei** esiste un sistema di membrane interne connesse alla membrana citoplasmatica (i cromatofori) che possono assumere la forma di vescicole, o di tubuli.



I batteri **rossi non sulfurei**, che adottano la fotosintesi solo in condizioni di anaerobiosi, sintetizzano le membrane interne e i pigmenti fotosintetici solo quando è necessario. Le membrane fotosintetiche sono lamellari e parallele alla membrana cellulare. Quando la tensione di ossigeno diminuisce, le zone di assemblaggio delle membrane interne cromogeniche (ICM) iniziano a proliferare e, in

poche ore, l'aspetto della coltura cambia radicalmente passando da incolore a rosso, grazie ai pigmenti fotosintetici che sono stati sintetizzati.

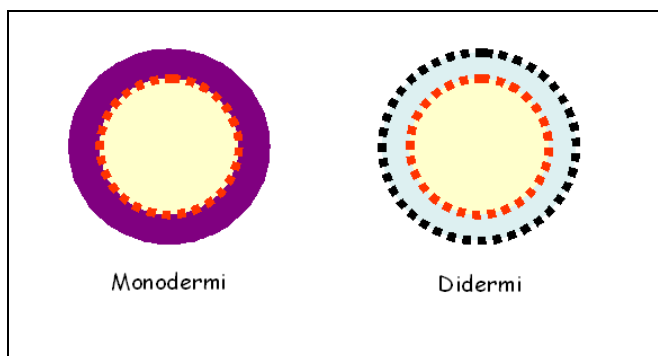
Altre membrane interne ad assetto lamellare si trovano nei batteri nitrificanti e nei batteri metanotrofi; in questi ultimi la disposizione delle membrane può essere di tipo I (perpendicolare alla membrana) oppure di tipo II (parallela alla membrana).

ORGANIZZAZIONE DEGLI INVOLUCRI ESTERNI

PARETE

All'esterno della membrana citoplasmatica si trova nella quasi totalità dei casi una "parete" caratteristica delle cellule procariotiche, che ne determina la forma e le protegge dalla lisi osmotica. L'insieme di membrana e parete viene anche definito globalmente come "envelope" cellulare.

L'organizzazione della parete permette di suddividere i microrganismi procarioti in due grandi



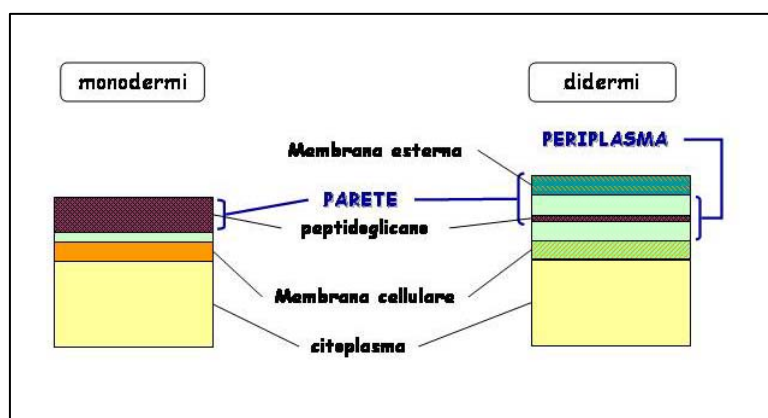
gruppi: monodermi (dotati di una sola membrana: quella citoplasmatica) e didermi (dotati anche di una membrana esterna).

La parete è il più esterno degli strati indispensabili alla cellula batterica che, infatti, può vivere senza di essa solo in

condizioni artificiali, al riparo da possibili rotture e da variazioni della pressione osmotica. Gli unici microrganismi abitualmente privi di parete sono i micoplasmi (*Tenericutes*) la cui membrana è rafforzata e stabilizzata dalla presenza di steroli.

Il componente principale della parete batterica è il peptidoglicano. Il principale componente della parete è il peptidoglicano (mureina) che forma una rete intorno alla cellula. La rete si compone di monomeri in cui due amminozuccheri (N-acetil-glucosamina e acido N-acetilmuramico) sono uniti tra loro da un legame glucosidico β -1,4. All'acido N-acetilmuramico è legato un pentapeptide in cui il terzo residuo è un di-aminoacido, seguito da un dipeptide D-alanil-D-alanina. Il di-aminoacido (con due gruppi amminici) può essere la lisina, oppure l'acido diaminopimelico, tipico del peptidoglicano e presente solo nelle pareti delle cellule procariotiche. I monomeri si uniscono a formare lunghe file grazie a reazioni di transglicosilazione che uniscono i monomeri legando gli amminozuccheri; reazioni di transpeptidazione tra i pentapeptidi provvedono all'organizzazione a rete. Le reazioni di transpeptidazione sono possibili grazie alla presenza dei due gruppi amminici della lisina (o dell'acido diaminopimelico) che permettono la formazione di due legami peptidici. Nei batteri monodermi i legami crociati sono formati attraverso un ponte di penta-glicina, mentre nei batteri didermi i legami sono diretti, tra un pentapeptide e l'altro.

Entrambe le reazioni enzimatiche che portano alla formazione della rete: la transglicosilazione e la transpeptidazione, sono opera delle Penicillin Bind Proteins (PBP): enzimi bifunzionali, che riconoscono il dipeptide terminale (D-Ala - D-Ala); tagliano l'ultimo residuo e legano la destro-alanina rimanente al residuo di lisina e di acido diaminopimelico del pentapeptide adiacente. Nel peptidoglicano dei batteri monodermi, inoltre, si trovano gli acidi teicoici (polimeri di



glicerolo o ribitol fosfato) e gli acidi teicuronici (polimeri di subunità ripetitive, di cui una formata da un acido uronico) che mancano completamente nel peptidoglicano dei batteri didermi. Oltre alle differenze nella composizione chimica del peptidoglicano, si

possono osservare differenze sostanziali nell'organizzazione degli involucri esterni tra batteri monodermi e batteri didermi.

Nei batteri monodermi lo strato di peptidoglicano è molto spesso; il periplasma, inteso come spazio fisico, è assente, e il suo ruolo fisiologico viene riconosciuto alla stretta zona immediatamente al di sotto dello strato di peptidoglicano.

Nei batteri didermi la membrana esterna (OM) delimita uno spazio, il periplasma, all'interno del quale si trova uno strato molto sottile di peptidoglicano. La parete va dalla OM al peptidoglicano. La diversità strutturale tra i due tipi di batteri può essere messa in evidenza con una colorazione differenziale, la colorazione di Gram (dal nome dello scienziato danese, Hans Gram che l'ha messa a punto nel 1884). I batteri monodermi (Gram-positivi) si colorano con il violetto di genziana, che si fissa al peptidoglicano, e non sono decolorati da un trattamento con alcool. Nei batteri didermi la colorazione viola viene persa dopo il trattamento con la soluzione decolorante e, per poterli osservare, è necessario usare un secondo colorante (safranina, rossa) che costituisce la "colorazione di contrasto".

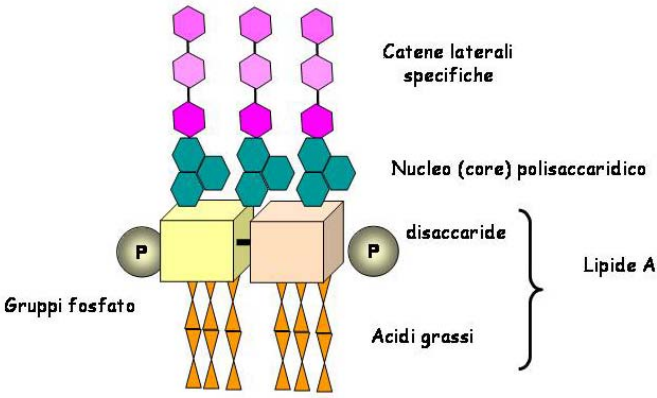
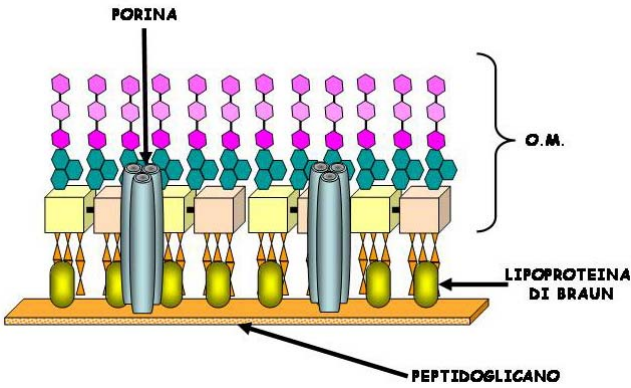
MEMBRANA ESTERNA

La membrana esterna, tipica dei batteri didermi, è composta da fosfolipidi, proteine, lipoproteine (OMP-Outer Membrane Protein) e lipopolisaccaridi (LPS); come barriera di permeabilità è molto più permissiva della membrana citoplasmatica e viene facilmente attraversata da molecole complesse che sono poi processate nel periplasma da enzimi idrolitici. La proteina più rappresentata è una piccola lipoproteina (lipoproteina di Braun) che, unita con legami covalenti al peptidoglicano, lo unisce alla membrana esterna in diversi punti.

I costituenti peculiari della OM sono i lipopolisaccaridi in cui si distinguono tre regioni:

- 1) il lipide A,
- 2) il "core" polisaccaridico
- 3) le catene laterali "O".

Il lipide A è il principale componente del lipopolisaccaride ancorato alla OM, mentre il resto del lipopolisaccaride si proietta verso l'esterno della cellula. All'interno della membrana esterna sono situate le porine, piccole proteine tubolari, aggregate in gruppi di tre, che formano canali in cui passano liberamente molecole di dimensioni inferiori ai 600-700 dalton.

	Il lipide A ha effetti tossici (endotossina). Il nucleo polisaccaridico è attaccato al lipide A Le catene laterali conferiscono alla cellula batterica la specificità antigenica "O" (antigene somatico)
	La lipoproteina di Braun è la proteina più rappresentata nella OM La OM permette il passaggio di piccole molecole come glucosio e altri monosaccaridi, grazie alle porine.

PERIPLASMA

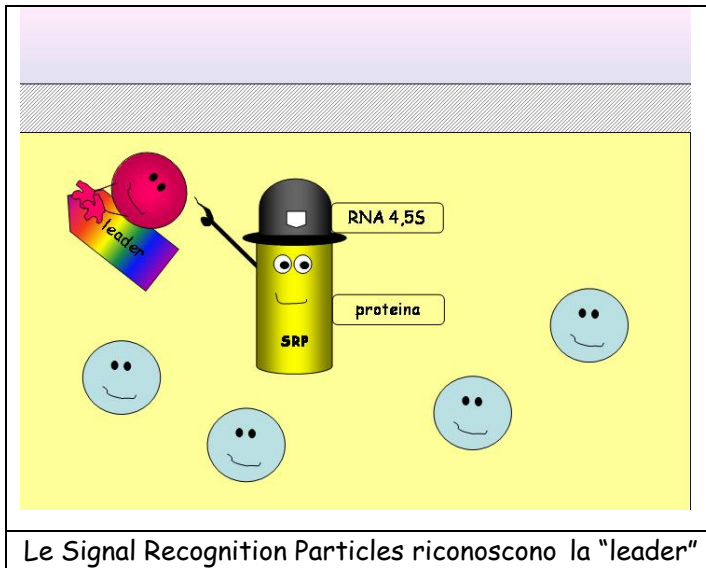
Tra le due membrane dei batteri didermi si estende lo spazio periplasmico, di consistenza gelatinosa, in cui si trovano numerose proteine: le idrolasi che trasformano i nutrienti che hanno superato la membrana esterna in composti adatti a passare la membrana interna o a essere trasportati attraverso questa; le proteine di legame che avviano il trasporto dei nutrienti, i chemocettori, coinvolti nella percezione e nella risposta all'ambiente (CNFR. CHEMIOTASSI).

SECREZIONE DELLE PROTEINE

Il 20% circa dei polipeptidi che vengono sintetizzati nella cellula batterica sono destinati a raggiungere il periplasma dopo essere stati traslocati attraverso la membrana, o a essere inseriti nella membrana stessa. Il passaggio di molecole grandi e strutturalmente complesse come le proteine, necessita dell'intervento delle "traslocasi", proteine deputate alla secrezione di peptidi. Alcune traslocasi sono molto specifiche ma altre sono in grado di

trasferire (o di collocare nel giusto orientamento nella membrana) molti peptidi diversi. Il sistema di secrezione più diffuso è il sistema "sec" formato da tre componenti (SecYEG).

Per poter essere riconosciuti dal sistema "Sec" e avviati al periplasma o alla membrana, i polipeptidi devono avere una particolare sequenza aminotermine, la "sequenza leader" (o sequenza segnale). La sequenza leader è composta di 15-20 aminoacidi, con residui carichi positivamente all'inizio, una zona idrofoba al centro seguita da una zona polare.



Nel citoplasma sono presenti delle particelle che riconoscono la sequenza segnale (Signal Recognition Particles) formate da una proteina e una molecola di RNA 4,5S. Le SRP avviano i peptidi dotati di una sequenza segnale per il trasporto, al sistema "Sec" che le trasloca. La fine della sequenza segnale coincide con la sequenza di taglio di una peptidasi, che asporta la leader, liberando nel

periplasma la proteina matura.

SECREZIONE DELLE PROTEINE NELL' AMBIENTE

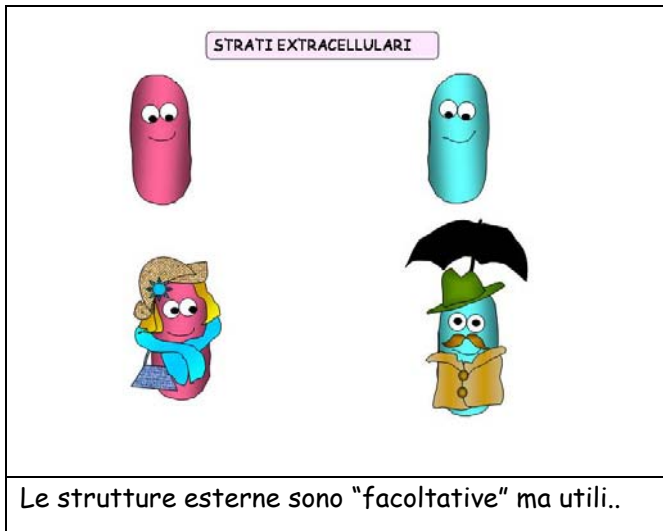
Quando le proteine devono essere ulteriormente traslocate dal periplasma all'esterno della cellula, devono passare il filtro della membrana esterna.

Il trasferimento può essere operato attraverso diversi sistemi: il sistema di tipo I trasferisce le proteine all'esterno della cellula in un solo passo; nel sistema di tipo II, invece, le proteine vengono traslocate in un primo momento nel periplasma dal sistema "Sec" e il trasporto all'esterno della cellula è operato da un secondo sistema.

Altri sistemi di secrezione (cnfr:interazioni patogeno-ospite) sono tipici di batteri patogeni per piante o animali.

STRUTTURE ESTERNE

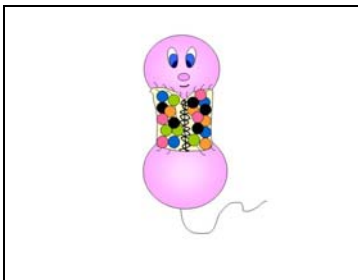
All'esterno della parete si possono trovare ancora molte strutture diverse, presenti ora



nell'una ora nell'altra specie. Alcuni microrganismi hanno uno strato proteico a trama fitta, situato esternamente alla cellula (**strato S**). La funzione dello strato S non è chiara: in alcuni archibatteri si trova al posto della parete ma in altri organismi coesiste con essa. A volte lo strato S rappresenta la via di ingresso per i virus che attaccano i batteri (batteriofagi).

GUAINE:

Alcune specie batteriche sono "inguainate": le cellule sono circondate e protette da involucri (guaine) composte di proteine lipidi e carboidrati.

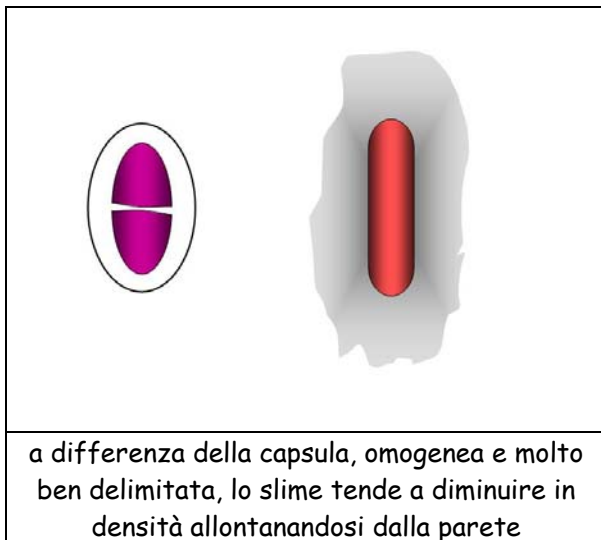


In qualche caso le guaine si incrostanto di minerali come ferro o manganese, assumendo colorazioni brune o rossastre. Le guaine sono prodotte da batteri come *Sphaerotilus*, che alterna forme cellulari flagellate a forme sessili. Le forme sessili sintetizzano la guaina, in cui si replicano dando origine a cellule flagellate che ne

escono sciamando via. Anche alcuni cianobatteri filamentosi producono guaine, in cui sono raccolti fasci di filamenti. Le guaine proteggono i batteri dalla predazione in ambienti acquatici e dall'essiccamento in ambienti dove l'acqua è scarsa.

CAPSULE E "SLIME":

Le cellule batteriche possono essere circondate da una capsula, che le protegge dall'essiccamento, dalle difese immunitarie dell'ospite (batteri patogeni) e dall'attacco dei batteriofagi. Alcune specie (*Azotobacter*) utilizzano la capsula per limitare la diffusione dell'ossigeno nella cellula. La composizione della capsula conferisce specificità antigenica al ceppo che la produce. Per quanto le capsule siano in genere di natura polisaccaridica, esistono eccezioni a questa regola: la più nota è quella di *B. anthracis*, la cui capsula è formata da residui di acido D-glutamico.



Le capsule hanno una rifrangenza simile a quella del mezzo acquoso e sono quindi difficilmente distinguibili al microscopio, con osservazioni a fresco. per metterle in evidenza si ricorre alla colorazione negativa o a una reazione detta di "quellung" (rigonfiamento) in cui si usano anticorpi specifici che, legandosi alla superficie della capsula stessa, ne rendono più marcati i confini. A differenza della capsula lo "slime" (cnfr. **EPS e**

Biofilm) ha contorni sfumati e diminuisce di densità man mano che si allontana dalla superficie della cellula. Alcune specie batteriche impiegano lo slime per un particolare tipo di mobilità (gliding: scivolante) in cui la cellula si sposta scivolando su una superficie solida. Si tratta di un meccanismo molto complesso, osservato in alcuni cianobatteri e nei mixobatteri.

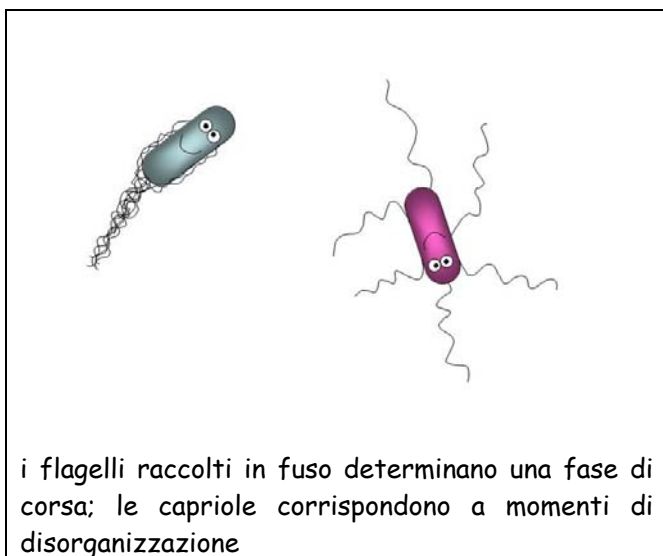
SPINE, PILI, FIMBRIE:

sono tutte strutture di natura proteica, formate da subunità ripetute e disposte a elica intorno a una cavità centrale. le spine hanno le dimensioni maggiori, sono tipiche di microrganismi acquatici e il loro ruolo è quello di aumentare la superficie della cellula mettendola in grado di restare in sospensione e di essere trasportata dalle correnti con maggiore efficienza. Le spine si trovano più facilmente in microrganismi planctonici. I pili sono coinvolti nell'adesione delle cellule batteriche a recettori e possono costituire un sito di attacco per i batteriofagi. I pili sessuali servono al trasferimento orizzontale di materiale genico; alcuni pili particolari (Pili di tipo IV) sono alla base della mobilità "twitching", che si osserva spesso nei batteri che vivono in biofilm: la cellula "lancia" il pilo attaccandosi a una superficie, e poi si "tira" verso il punto di appoggio. Le fimbrie sono più sottili e più corte dei pili; spesso coinvolte in fenomeni di adesione.

FLAGELLI: Una importante struttura esterna è il flagello, che permette alle specie che ne sono dotate di spostarsi liberamente nell'ambiente. Una cellula batterica può avere da uno a più flagelli, disposti a una estremità (monotrichi), su entrambe le estremità (lofo trichi) oppure tutto intorno alla cellula (peritrichi)

Il flagello è una struttura proteica, formata da tre parti distinte: 1) il corpo basale che è ancorato alla membrana citoplasmatica e immerso nella parete, è composto da alcuni anelli, all'interno dei quali si trova una struttura rigida.

Nei batteri didermi ci sono due coppie di anelli: L e P (ancorati l'uno al lipopolisaccaride l'altro al peptidoglicano) e M-S (ancorati nella membrana interna); nei batteri monodermi è presente solo la coppia M-S. Intorno agli anelli interni sono disposte le proteine Mot che provvedono all'energia necessaria per la rotazione e le proteine "Fli" che ne determinano il senso. Un uncino (o gancio) proteico connette il motore al filamento del flagello. Il filamento è proteico, elicoidale, formato da subunità di flagellino disposte in modo regolare che vengono trasportate all'esterno della cellula da un particolare sistema di secrezione e si aggregano all'apice del filamento in crescita. La formazione del flagello quindi avviene per allungamento sulla punta e non dalla base, man mano che le subunità, che giungono attraverso il canale del sistema di secrezione, si aggiungono a quelle già assemblate.

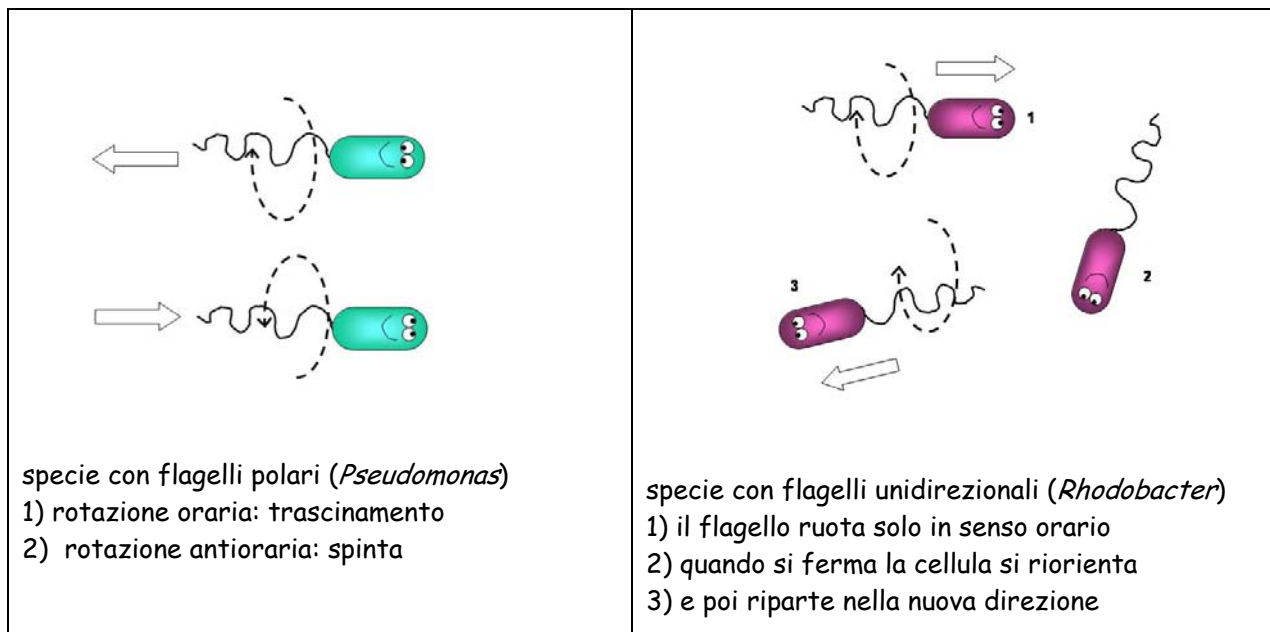


Quando i flagelli ruotano in senso antiorario (CCW) si riuniscono insieme in un fuso la cui rotazione guida la cellula in avanti. Periodicamente, la maggior parte dei flagelli cambia direzione e ruota in senso orario (CW), disorganizzando il fuso. Le cellule quindi si capovolgono e quando il fuso si riforma (quando cioè la maggior parte dei flagelli ritorna alla rotazione CCW) la cellula (influenzata anche dal moto "Browniano") è

orientata in una nuova direzione, in cui svolgerà il prossimo periodo di nuoto regolare.

Specie dotate di un singolo flagello polare, come *Pseudomonas aeruginosa* nuotano grazie alla spinta o al trascinamento da parte del flagello e cambiano dall'uno all'altro modo per modificare il senso di marcia; altre ancora, come *Rhodobacter sphaeroides*, ruotano il flagello solo in senso orario e cambiano senso arrestando la rotazione.

In tutti questi casi, l'alternarsi del nuoto regolare e dei periodici cambiamenti di senso, risulta in un modello tridimensionale.



ALTRE STRUTTURE ESTERNE

Alcune specie acquatiche sono dotate di prostecche (estrusioni citoplasmatiche rivestite da membrana e parete) o di peduncoli (estrusioni amorse, che non contengono citoplasma). I peduncoli sono forme di organi di ancoraggio e consentono alla cellula batterica di rimanere adesa a una superficie; le prostecche possono svolgere ruolo analogo permettendo l'unione di molte cellule in formazioni chiamate "rosette". Le rosette facilitano l'afflusso di nutrienti, ma la loro funzione non si limita a questo, la lunghezza della prosteca infatti è regolata da stimoli ambientali e aumenta la superficie di scambio della cellula. I batteri prosteccati hanno cicli cellulari complessi, con alternanza delle forme prostecate e di quelle flagellate (CNFR DIVISIONE).

CELLULE MODIFICATE

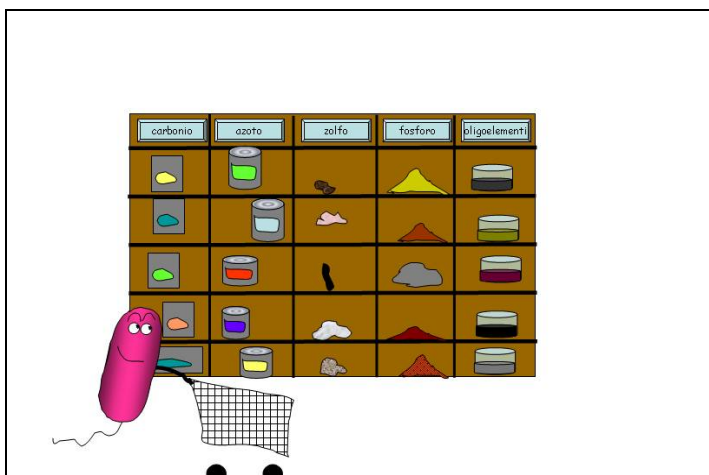
Per quanto non sia una strategia molto diffusa, alcuni microrganismi producono cellule modificate, che possono garantire la sopravvivenza (essere quindi forme di resistenza) o svolgere funzioni particolari. Della prima categoria, oltre alle endospore che abbiamo già trattato, fanno parte gli acineti dei cianobatteri che proteggono la cellula durante i periodi di siccità, buio o gelo; hanno una parete molto spessa, che poi si rompe per permettere l'esocrescita di un nuovo filamento.

Le cisti (es. *Azotobacter*) sono resistenti all'essiccamento, alla rottura meccanica, a raggi UV e radiazioni ionizzanti, come le endospore. Non hanno tuttavia la stessa resistenza

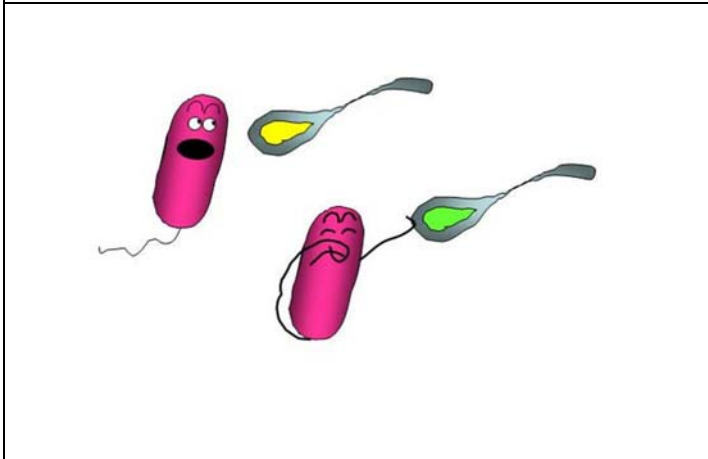
termica e non sono completamente dormienti (metabolizzano rapidamente fonti di energia di origine esogena). Le Mixospore (myxobatteri), resistenti all'essiccamento, sono cellule quiescenti racchiuse in un corpo fruttifero. Le eterocisti, tipiche dei cianobatteri, non hanno invece alcun ruolo nella resistenza a stress ambientali, ma sono deputate alla fissazione di azoto. In queste particolari cellule l'enzima che fissa l'azoto (nitrogenasi) è protetto dall'ossigeno a cui è estremamente sensibile, dalla mancanza del secondo sistema fotosintetico (che produce ossigeno - **cnfr FOTOSINTESI OSSIGENICA**). La presenza di cellule specializzate implica anche l'esistenza di una comunicazione tra cellule, un aspetto ancora poco esplorato ma sicuramente molto interessante.

NUTRIZIONE E CRESCITA

I microrganismi devono procurarsi i composti necessari alla sintesi delle componenti cellulari,



I batteri devono procurarsi i nutrienti nell'ambiente circostante



le colture axeniche hanno permesso di chiarire le necessità di diverse specie

alla produzione di energia, al funzionamento dei propri enzimi, dall'ambiente che li circonda. In questo campo, le ricerche condotte su colture axeniche hanno premesso di chiarire le esigenze nutrizionali e le capacità metaboliche di diversi gruppi di microrganismi: le capacità metaboliche, infatti, sono alla base delle differenti richieste di nutrimenti che si possono osservare e che permettono di dividere i microrganismi in gruppi funzionali.

Macronutrienti

Le sostanze necessarie per le biosintesi a tutti i microrganismi, in quantità notevoli (quelle che entrano a far parte delle principali componenti strutturali della cellula, come carboidrati, proteine,

lipidi e acidi nucleici) si definiscono "Macronutrienti"

Un secondo gruppo di macronutrienti comprende gli elementi usati in quantità relativamente

MACRONUTRIENTI-1

	CARBONIO AZOTO OSSIGENO IDROGENO ZOLFO FOSFORO
servono per la sintesi dei componenti strutturali della cellula	

elevate rispetto agli altri sali. La maggior parte di queste sostanze è necessaria a tutti i batteri, ma alcune sono fondamentali soltanto per alcune specie o in particolari momenti. È il caso del sodio,

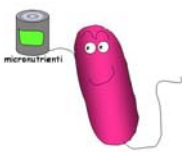
assolutamente indispensabile solo per i batteri marini, o del calcio, irrinunciabile per i batteri sporigeni al momento della formazione dell'endospora. Potassio Magnesio e Ferro sono invece assolutamente necessari per il funzionamento di molti enzimi; per il trasporto degli elettroni nelle catene respiratorie (Ferro) per conferire stabilità alle membrane, ai ribosomi, agli acidi nucleici (Magnesio).

Macronutrienti-2

Macronutrienti-2	
Potassio	necessario sempre; attiva molti enzimi
Magnesio	necessario sempre; cofattore di enzimi, stabilizza membrana, ribosomi, acidi nucleici
Ferro	necessario sempre; costituente di citocromi e di enzimi
Sodio	necessario per alcuni gruppi (es. marini)
Calcio	necessario per alcuni gruppi specialmente in alcuni momenti (stabilizza la parete, componente delle endospore)

micronutrienti

Micronutrienti

Micronutrienti		
	Cobalto	entra nella sintesi di vitamina B12
	Zinco	indispensabile per la funzione di metalloenzimi
	Molibdeno	nelle nitrogenasi e in altri enzimi azoto-riduttori
	Rame	negli enzimi della respirazione
	Manganese	attivatore di enzimi
	Nickel	nelle idrogenasi

Un ultimo gruppo è rappresentato dai micronutrienti, elementi che sono necessari alla cellula, ma di cui sono sufficienti quantità molto esigue: generalmente le tracce contenute in altri sali o nell'acqua sono sufficienti a garantire la crescita. Se tuttavia si usano sali e acqua

particolarmente puri, questi elementi devono essere aggiunti ai terreni sotto forma di soluzioni bilanciate.

Fattori Di Accrescimento

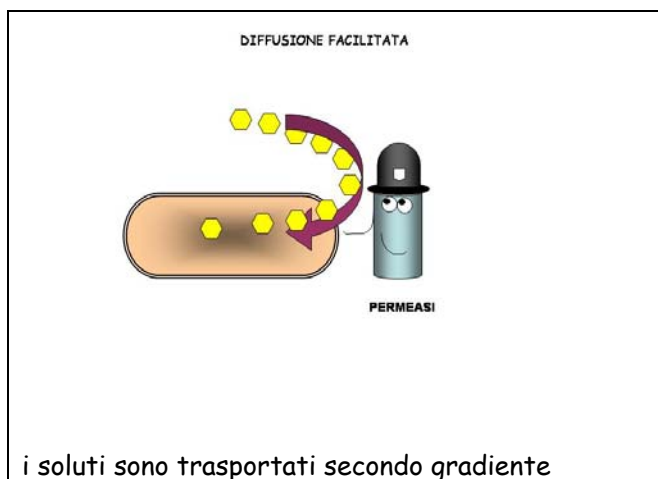
Alcuni composti organici (purine, pirimidine, vitamine, aminoacidi) sono necessari in quantità minima (come i micronutrienti). Generalmente i batteri sono in grado di sintetizzarli in modo autonomo (in questo caso si definiscono metaboliti essenziali) ma a volte non è così, per una specie o per alcuni mutanti. Se uno di questi fattori non viene sintetizzato, la cellula deve procurarselo dall'ambiente circostante. In questo caso il composto si definisce "fattore di accrescimento". I fattori di accrescimento più richiesti dai batteri sono le vitamine, che, nella cellula funzionano da coenzimi.

IL TRASPORTO DEI NUTRIENTI ALL'INTERNO DELLA CELLULA

Per poter utilizzare i nutrienti è necessario portarli all'interno della cellula: l'unico composto chimico che entra o esce senza difficoltà alcuna dalla cellula batterica, infatti, è l'acqua.

DIFFUSIONE FACILITATA

Alcuni soluti possono passare il filtro della membrana per diffusione passiva (senza spesa di energia da parte del microrganismo) questo



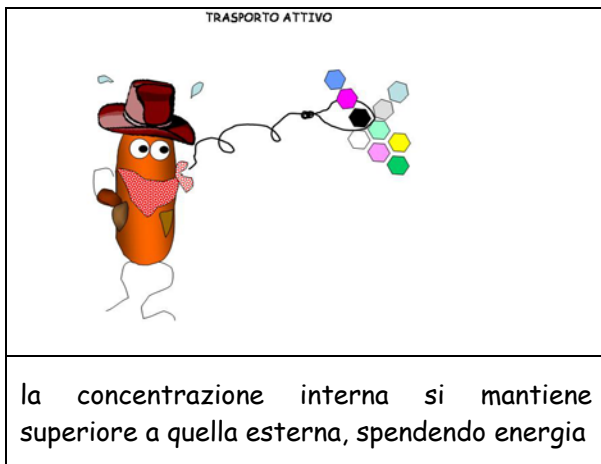
processo è tuttavia poco efficiente e troppo lento e i procarioti fanno ricorso a enzimi di membrana (le permeasi) per quella che viene definita diffusione facilitata: l'accelerazione della diffusione per quei composti che potrebbero in ogni caso diffondere anche da soli. I soluti entrano quindi secondo un gradiente e non possono trovarsi nella cellula

a concentrazioni superiori a quelle dell'ambiente esterno, spesso molto basse. Questa tipologia di ingresso dei nutrienti è rara nei procarioti, che la adottano per esempio, per assumere il glicerolo, uno zucchero utilizzato molto rapidamente dalla cellula batterica.

TRASPORTO ATTIVO

I soluti destinati invece a raggiungere, all'interno della cellula, concentrazioni superiori a quelle che si trovano all'esterno della membrana, non possono essere trasportati con un processo di diffusione facilitata e devono essere trasportati attivamente nella cellula,

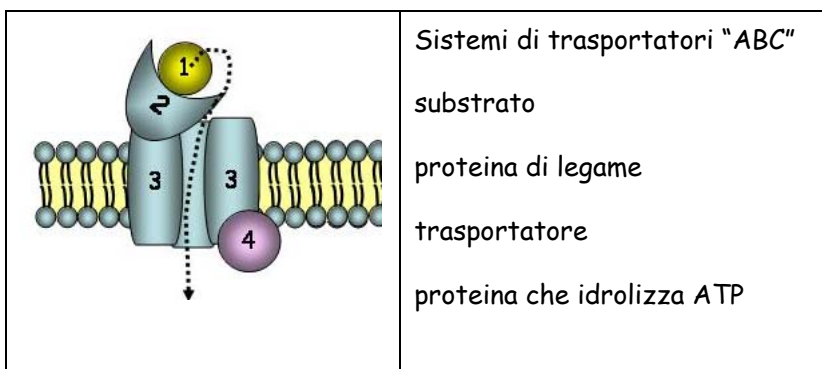
spendendo l'energia necessaria a combattere il gradiente che si forma. L'energia spesa per il trasporto dei nutrienti può provenire dall'idrolisi di ATP come nel caso del maltosio o



dall'energia di membrana (cnfr. respirazione) come accade nel trasporto del lattosio. I sistemi di trasporto che traggono energia dall'idrolisi di ATP vengono definiti "trasportatori ABC" (ATP-binding cassette).

In questo tipo di trasporto, il substrato si attacca a una proteina di legame, che lo trasferisce al trasportatore vero e proprio,

situato nella membrana. Il trasportatore cambia conformazione e rilascia il nutriente nel citoplasma; il legame e



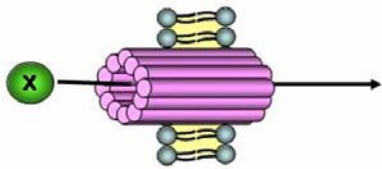
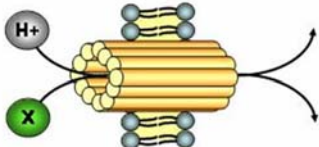
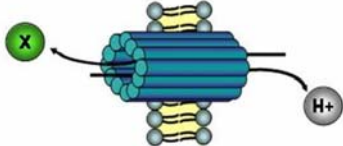
Sistemi di trasportatori "ABC"
 substrato
 proteina di legame
 trasportatore
 proteina che idrolizza ATP
 l'idrolisi dell'ATP avvengono in corrispondenza dell'estremità citoplasmatica del trasportatore, con l'intervento di proteine dedicate a questo scopo. La

proteina di legame si trova nel periplasma nei batteri didermi e sulla superficie delle membrana, sotto lo strato di peptidoglicano, nei batteri monodermi. I nutrienti raggiungono il trasportatore diffondendo attraverso il peptidoglicano (monodermi) o superando la OM attraverso le porine (didermi).

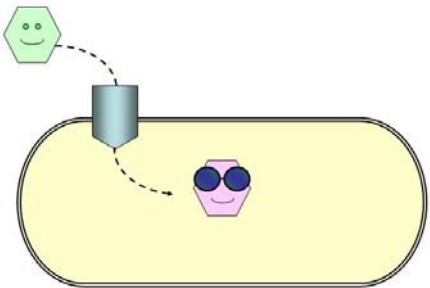
Nei sistemi che sfruttano l'energia di membrana, le proteine di trasporto sono formate nella maggior parte dei casi da 12 alfa eliche che si spostano avanti e indietro nella membrana. Le proteine che effettuano il trasporto possono essere trasportatori semplici "uniporto" (la sostanza è trasportata da sola) o co-trasportatori (in questo caso il trasporto del substrato specifico è accoppiato con quello di un'altra sostanza).

A loro volta i co-trasportatori possono essere di tipo simporto (le sostanze entrano insieme nella cellula) o antiporto (la sostanza cotrasportata esce e il soluto

trasportato entra). I composti che sono oggetto di trasporto attivo non vengono modificati.

	Uniporto trasferisce cationi (es K^+) attraverso il gradiente elettrochimico della membrana (positiva all'esterno, negativa all'interno)
	Sinporto trasporta zuccheri anioni o aminoacidi insieme a un protone, che si lega alla proteina e ne modifica la conformazione, rendendo possibile il trasporto
	Antiporto trasferisce all'esterno uno ione Na^+, sfruttando l'ingresso di un protone. Il gradiente di sodio favorisce l'ingresso di altri soluti, modificando la conformazione della proteina di trasporto

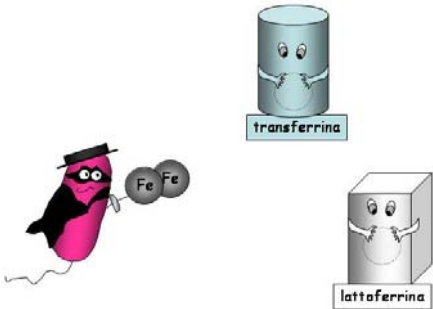
TRASLOCAZIONE DI GRUPPO

	Un'altra strategia di trasporto, presente nei soli procarioti, è la traslocazione di gruppo in cui il composto viene invece modificato durante il trasferimento. Grazie alla modificazione subita, il composto non può lasciare la cellula per la stessa via per la quale è entrato, e la modificazione impedisce che si crei un gradiente tra esterno e interno, e che
il composto è trasportato e modificato allo stesso tempo	

sia necessario spendere energia per contrastarlo. Uno dei sistemi di traslocazione di gruppo maggiormente studiati è il PTS (Phosphotransferase System) che trasporta molecole di zuccheri modificandoli per fosforilazione.

A Caccia Di Ferro:

Tutti i microrganismi hanno bisogno di ferro: le uniche eccezioni note sono *Lactobacillus plantarum* e *Borrelia burgdorferi* che lo sostituiscono con il manganese. Non sempre, tuttavia, il ferro è facilmente disponibile: molto spesso è molto scarso o è presente in forme insolubili.

	
Il ferro in mare è difficile da trovare	I batteri patogeni devono strappare il ferro a proteine con un'elevatissima affinità

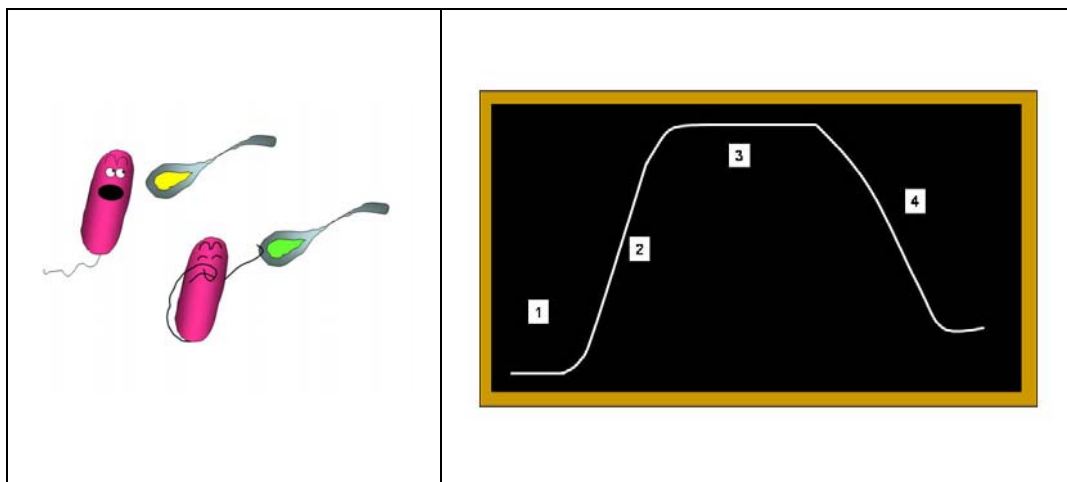
Nei riguardi del ferro, quindi, la maggior parte dei microrganismi ha predisposto strategie di ricerca e raccolta specializzate e molto efficienti. Ad occuparsi della ricerca e della cattura del ferro sono piccole molecole (i siderofori) che vengono secrete dalla cellula, solubilizzano i sali di ferro legando il minerale e reagiscono poi con un recettore situato sulla superficie cellulare, a cui il ferro viene ceduto perchè entri nella cellula attraverso un passo riduttivo ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). In qualche caso anche il sideroforo entra nella cellula e cede il ferro in un secondo momento. Come esempi di adattamenti a condizioni ambientali in cui il ferro scarseggia possiamo considerare quelli dei batteri marini (nell'acqua di mare la concentrazione di ferro è nell'ordine di picogrammi/litro) e dei batteri patogeni di organismi superiori, dove il ferro è abbondante ma legato a proteine con alta affinità, e quindi non disponibile. Nel primo caso, è molto importante che il sideroforo, accanto a un'affinità molto elevata, sia dotato anche della capacità di resistere a lungo senza degradarsi.

Alcuni batteri marini (*Halomonas* e *Marinobacter*) hanno evoluto un sistema di siderofori particolari (acquacheline e marinobattine) con una coda lipidica (acido grasso) che si associa

alla superficie della cellula e una porzione peptidica che lega gli ioni Fe^3 . Quando sono in soluzione, queste molecole flottano insieme riunite in micelle, ma in presenza di ferro cambiano conformazione assumendo la forma di vescicole a bolla.

Per molte specie patogene la caratteristica più importante è l'affinità dei siderofori, che devono riuscire a strappare il ferro a proteine eucariotiche con affinità elevatissima, come transferrine e lattoferrine. Un esempio di notevole efficienza è quello dell'aerobactina il cui gene è localizzato anche su plasmidi e quindi facilmente trasferibile.

LA CURVA DI CRESCITA



La conoscenza delle richieste nutrizionali dei microrganismi ha permesso di mettere a punto tecniche idonee a studiare la crescita di una popolazione microbica (aumento del numero delle sue cellule). Una curva di crescita standard (in un sistema chiuso) prevede diverse fasi che possono essere seguite attraverso la determinazione del numero di UFC (unità formanti colonia) o della densità ottica raggiunta dalla coltura.

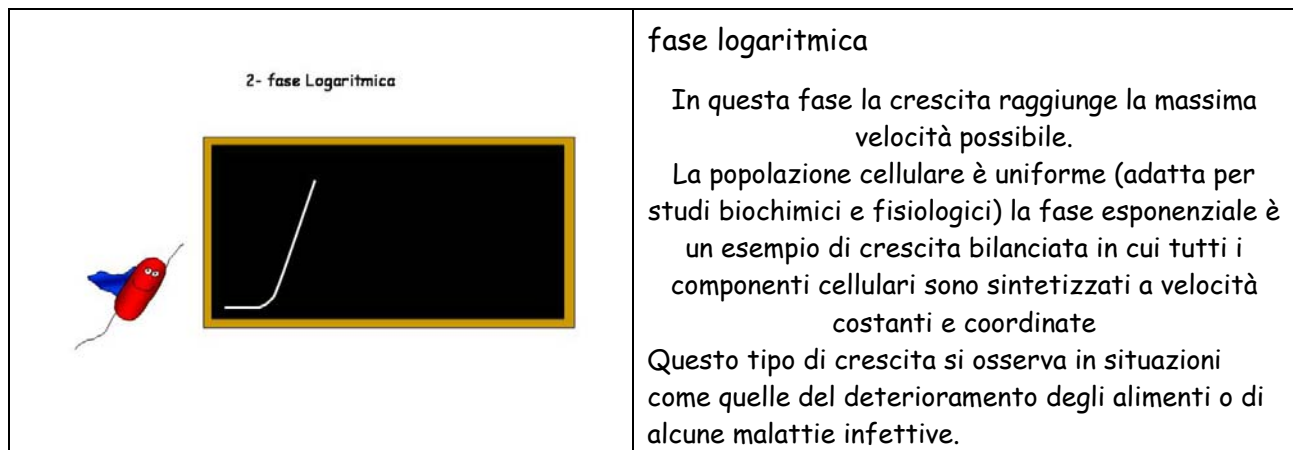
FASE DI LATENZA

La fase di latenza (fase lag): corrisponde al tempo necessario alle cellule batteriche per adeguarsi alle condizioni del terreno. La sua durata dipende dal tipo di inoculo (età, entità) e dalla natura del terreno. si tratta di una fase di crescita sbilanciata, in cui solo alcuni componenti sono sintetizzati. per esempio: nel passaggio da un terreno povero a un terreno ricco, prima che la moltiplicazione possa avviarsi, sarà necessario sintetizzare nuovi ribosomi per adeguare il ritmo della sintesi proteica alle nuove disponibilità. al contrario, da un terreno ricco a uno povero, le cellule non si moltiplicano finché non siano stati prodotti gli enzimi biosintetici necessari a sopravvivere. analogamente, se una coltura è invecchiata o se è stata

esposta a fattori che possano averne danneggiato le cellule, prima che la replicazione possa aver inizio dovranno essere portati a termine i processi di riparazione



Una volta che la cellula si sia messa in condizione di sfruttare al meglio le nuove condizioni, può iniziare la fase di replicazione attiva, detta anche fase esponenziale o logaritmica. La fase esponenziale è un esempio di crescita bilanciata in cui tutti i componenti cellulari sono sintetizzati a velocità costanti e coordinate



La crescita rapida della fase esponenziale consuma i nutrienti e accumula prodotti di scarto: il tempo generazionale (tempo in cui la coltura raddoppia il numero di cellule) aumenta progressivamente e la densità della coltura raggiunge un "plateau", che corrisponde alla fase stazionaria.

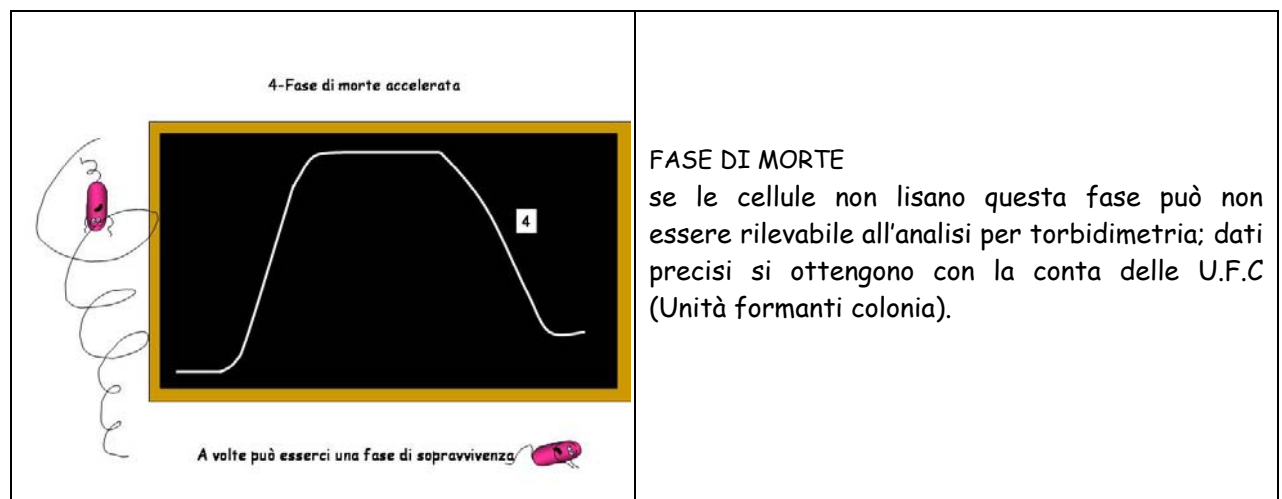
FASE STAZIONARIA:

Durante la fase stazionaria, il numero delle cellule in divisione bilancia quello delle cellule che muoiono: l'arresto della crescita è apparente e l'equilibrio è "statistico" e dinamico. Le cellule che si trovano in fase stazionaria hanno caratteristiche differenti da quelle della fase esponenziale: sono più resistenti nei confronti di condizioni avverse; accumulano prodotti di riserva; esprimono geni tipici (tra cui quelli della sopravvivenza- geni *sur*) che non vengono

espressi in fase logaritmica. La fase stazionaria rappresenta lo stato in cui le cellule batteriche si trovano, nell'ambiente, quando crescono lentamente o non crescono affatto.



Dopo la fase stazionaria, quando le possibilità di nutrimento si esauriscono, la coltura entra nella fase di morte:



Alla fase di morte può seguire una fase di sopravvivenza, in cui alcune cellule sopravvivono utilizzando i nutrienti resi disponibili dalla morte delle altre.

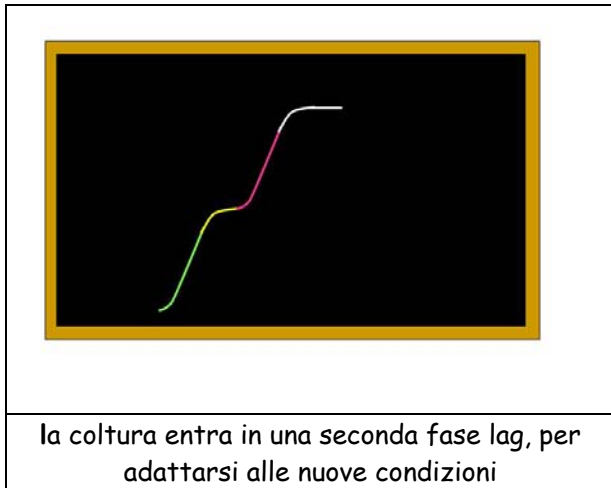
La curva di crescita descrive lo stato della popolazione: dal suo aspetto si possono trarre importanti informazioni.

Diauxie

Un esempio delle possibilità di ottenere informazioni sulle capacità metaboliche dallo studio della curva di crescita è quello delle "diauxie" che aiutano a stabilire quali nutrienti siano attaccati da enzimi sempre presenti (costitutivi) e quali invece siano utilizzati grazie a enzimi inducibili, che vengono sintetizzati solo in risposta alla presenza del substrato.

Si aggiunge al terreno una quantità limitata di un substrato facilmente utilizzabile (es. glucosio) e un altro substrato, su cui si vogliono ottenere dati.

Nella curva disegnata in questa figura, la coltura ha iniziato la fase esponenziale, si è fermata,



e ha poi ripreso la crescita logaritmica, fino al momento di entrare in fase stazionaria.

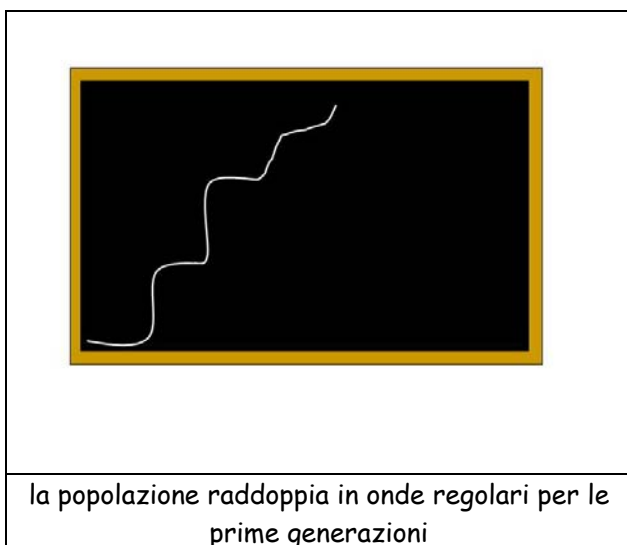
La forma di questa curva ci dice che la seconda fonte di carbonio non è attaccata dai medesimi enzimi che degradano la prima. La coltura infatti è entrata in una seconda fase lag, perché ha esaurito il glucosio e non dispone del corredo enzimatico necessario a proseguire la crescita

utilizzando la seconda fonte di carbonio: deve quindi adattarsi sintetizzando le proteine necessarie.

COLTURE SINCRONE

L'analisi della crescita di una popolazione non permette di ottenere dati su quanto accade effettivamente nella cellula batterica: le condizioni delle cellule all'interno della popolazione, infatti, non sono omogenee, alcune cellule stanno per dividersi, altre lo hanno appena fatto.

Per ottenere una coltura in cui le cellule siano in uno stato omogeneo si può tentare di indurle a dividersi allo stesso tempo (allestire una coltura sincrona).



La sincronizzazione di una coltura può essere ottenuta in vari modi: usando filtri che lascino passare solo le cellule più piccole, che si sono appena divise; limitando la disponibilità di un nutriente, per causare l'arresto della crescita, e reintroducendolo o variando luminosità o temperatura. Il perdurare della sincronia, evidente nell'andamento a scalini della curva di crescita, dura però solo 2-3 generazioni: le

osservazioni vanno fatte quindi all'inizio dell'incubazione.

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 effetto può essere ottenuto attraverso due differenti strategie, che si avvalgono di dispositivi diversi:

CHEMOSTATO: Nella camera di crescita viene immesso continuamente terreno di coltura fresco, in cui uno dei nutrienti è presente in quantità limitante. Il tasso di crescita della coltura viene regolato dalla disponibilità (concentrazione nel terreno) del nutriente, e quindi dalla velocità di immissione del terreno stesso. La coltura in eccesso è eliminata periodicamente quando supera una linea di "troppo pieno". Quando la densità della coltura e il rifornimento di nutrienti raggiungono l'equilibrio, si dice che la coltura è entrata in "steady state" (stato di equilibrio)

turbidostato:

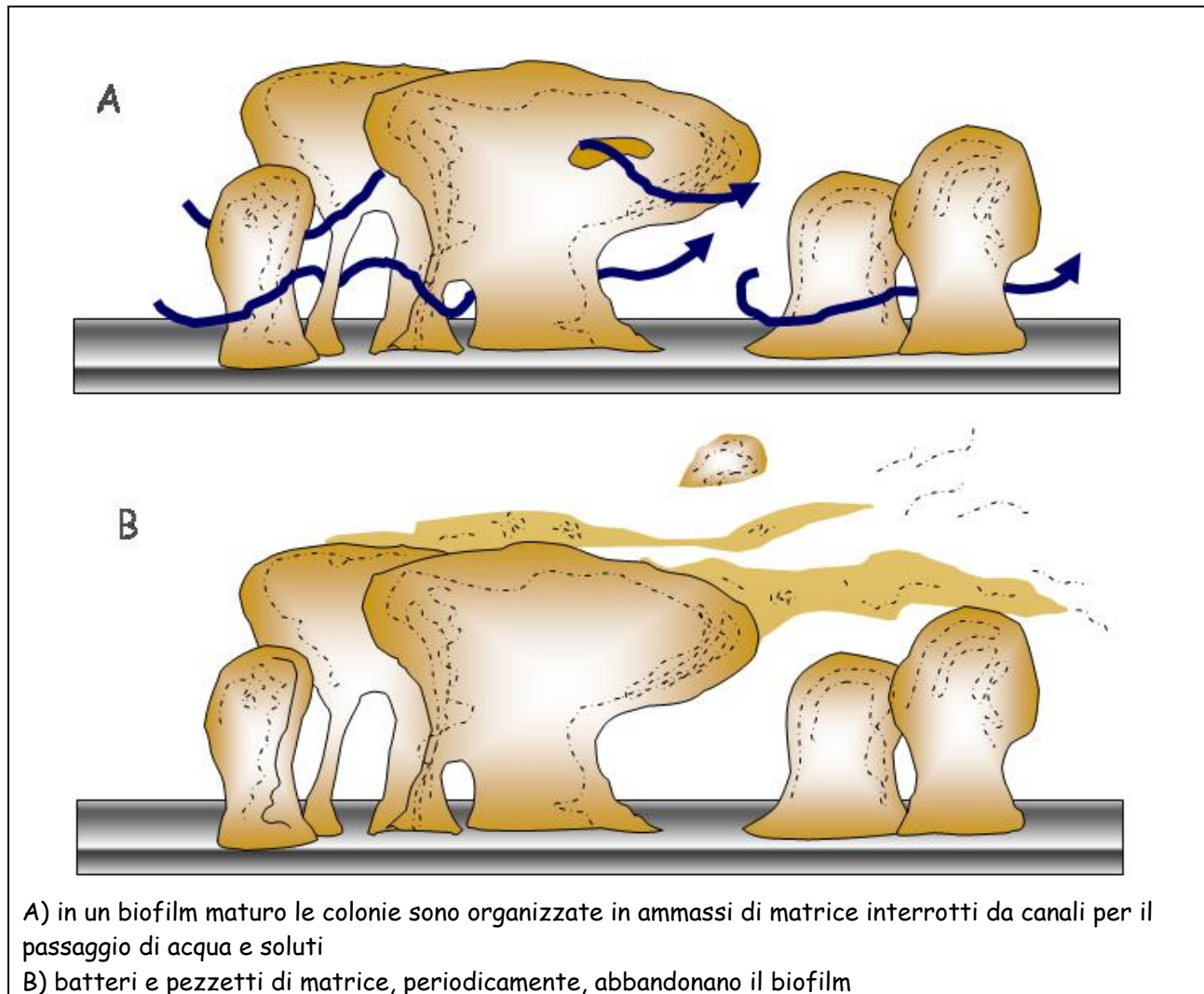
In questo caso non ci sono fattori limitanti nel terreno: un controllo densitometrico della coltura regola l'immissione del terreno e quindi la diluizione della coltura, in modo da mantenere costante la torbidità. La velocità con cui viene immesso il terreno quindi dipende dalla velocità di crescita della coltura

LA CRESCITA SESSILE

La curva di crescita descrive molto bene il comportamento di una popolazione batterica axenica, che si trovi in condizioni chimiche e fisiche ottimali; queste condizioni sono, tuttavia, artificiali e create in laboratorio. Nelle condizioni reali in cui una popolazione microbica vive, è molto comune un'altra modalità di crescita: quella sessile, con formazione di biofilm. Qualunque superficie immersa rappresenta un substrato ideale per la colonizzazione microbica perché vi si adsorbono i nutrienti, spinti all'interfaccia solido-liquido dalla tensione superficiale che li spinge all'interfaccia.

Sulle superfici si trova quindi un numero di microrganismi (e di conseguenza un'attività metabolica) maggiore che nell'acqua circostante. Le piccole dimensioni dei microrganismi fanno sì che la fase liquida possa essere rappresentata anche semplicemente da un velo di umidità. Il materiale organico (polisaccaridi e proteine) che si deposita sulla superficie facilita l'attacco delle cellule microbiche, che avviano un attacco reversibile (a volte solo transiente) nel giro di pochi minuti.

Questo primo attacco (assorbimento) è debole, dipende dalle cariche elettriche della superficie dei batteri, dalle forze di Van der Waals e dall'attrazione elettrostatica, e può essere rimosso facilmente.

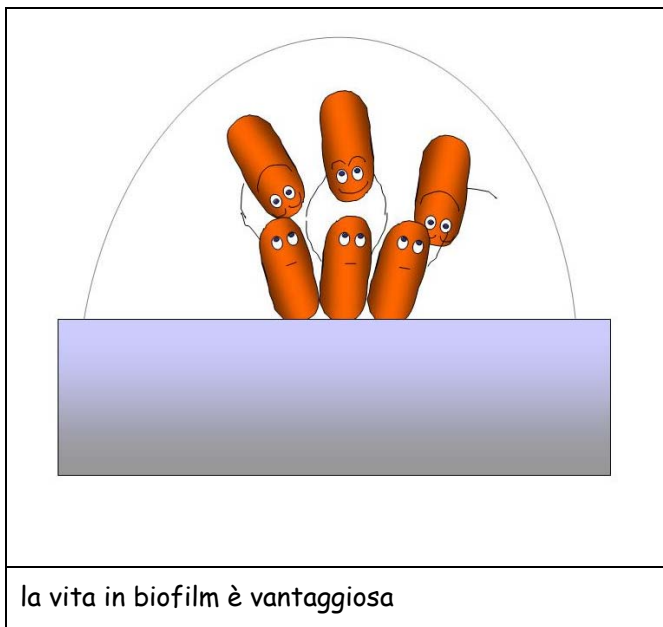


Se l'associazione microrganismo-substrato persiste abbastanza a lungo, l'assorbimento reversibile si trasforma in un attacco permanente irreversibile. Lo stadio finale nell'adesione irreversibile è associato con la produzione di sostanze esocellulari polisaccaridiche (EPS) prodotte dai microrganismi stessi, che rappresentano la principale caratteristica di un biofilm.

I batteri colonizzatori crescono e formano piccole colonie disposte a caso sul substrato; la colonizzazione e l'adsorbimento sono seguiti dalla produzione di matrice e dallo sviluppo di canali per la circolazione dell'acqua, che aiutano l'apporto dei nutrienti e l'allontanamento delle scorie. All'interno del biofilm lo stato metabolico delle cellule batteriche è differente a seconda della localizzazione: le cellule più interne si trovano in una situazione di relativa

anaerobiosi e hanno un metabolismo meno attivo delle cellule superficiali, che si trovano in condizioni simili a quelle delle cellule planctoniche. La presenza della matrice provoca la formazione di gradienti di diversi nutrienti e, in qualche caso, la concentrazione di sostanze che altrimenti verrebbero disperse nell'acqua circostante.

Questa organizzazione richiede l'intervento di sistemi di regolazione sofisticati, che coinvolgono diverse specie microbiche (un biofilm maturo è tipicamente polimicrobico). Periodicamente le cellule più esterne abbandonano il biofilm lungo flussi (streamers) che si creano sugli strati esterni, ma altri batteri planctonici arrivano sulla superficie del biofilm e vi aderiscono. L'intero processo è condizionato da fattori come: il tempo, la temperatura, l'energia libera della superficie, la tensione superficiale e l'idrofobicità.

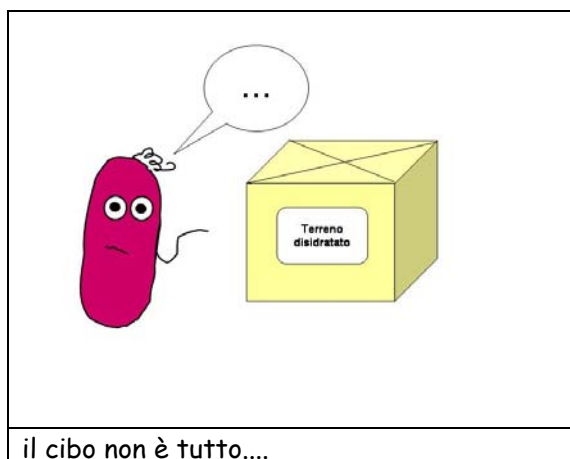


La vita in biofilm offre diversi vantaggi ai microrganismi: la possibilità di mantenere una posizione favorevole in situazioni caratterizzate da correnti tumultuose, la difesa da predatori, da disinfettanti, da antibiotici, la possibilità, per i microrganismi che fanno parte di consorzi funzionali, di mantenere rapporti spaziali precisi

La complessità strutturale dei biofilm è resa possibile anche da una particolare

forma di regolazione che dipende dalla concentrazione delle cellule batteriche e permette alla popolazione di agire in modo sincronizzato. Questa forma di regolazione "sociale" è mediata da piccole molecole e va sotto il nome di "Quorum sensing". (CNFR REGOLAZIONE GENICA)

L' INFLUENZA DEI FATTORI ABIOTICI SULLA CRESCITA BATTERICA



La disponibilità di nutrienti non è l'unico parametro a influire sulle possibilità e sui ritmi di crescita dei microrganismi: ci sono molti altri fattori importanti chimici e fisici da considerare per poter comprendere, prevedere o controllare le attività microbiche nell'ambiente.

I fattori che esercitano la propria influenza in tutti gli ambienti sono: la quantità di acqua disponibile, il

pH, la temperatura e la tensione di ossigeno o di CO_2 e molti altri. A questi se ne possono aggiungere altri che esercitano la propria influenza solo in determinati ambienti (per esempio la pressione, importante soprattutto negli ambienti marini).

FATTORE	SITUAZIONE	PREFISSO	INTERVALLO
temperatura	Fredda	Psicro-	0-30°C
	Moderata	Meso-	12-45°C
	Elevata	Termo-	40-70°C
	Molto elevata	Ipertermo-	70-113°C
pH	Acido	Acido-	<3
	Alcalino	Alcalo-	>10
Aw-	Secchezza	Xero-	fino a 0,75
	osmolarità elevata	Osmo-	fino a 0,75
	salinità elevata (NaCl)	Alo-	fino a 0,75 (2,8 → 6,2M)
Pressione atmosferica	Elevata	Baro-	(Moderati) 1-400 (Estremi) > 400

Tutti questi parametri influenzano la composizione della comunità microbica sia quantitativamente (numero totale di cellule microbiche) che qualitativamente (tipi e rapporti reciproci delle specie microbiche presenti). Per quanto ampie possano essere le variazioni in uno o più di questi fattori, è possibile trovare microrganismi che hanno evoluto strategie idonee ad affrontarle. Le preferenze di vari gruppi microbici per quanto riguarda i fattori abiotici sono indicate abbinando il suffisso "filo" (dal greco φίλος = amico) a un prefisso caratterizzante.

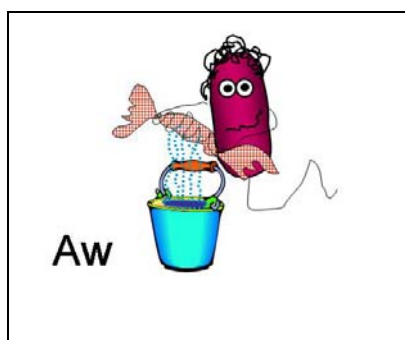
Oltre ai termini e agli intervalli riportati in tabella va ricordato che i microrganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi si definiscono eutrofi e quelli che crescono anche, e a volte solo, in presenza di basse concentrazioni di fonti di carbonio si

definiscono oligotrofi. Per ogni condizione, è possibile identificare un limite massimo e un limite minimo compatibili con la vita, e una condizione ideale.

L'UMIDITÀ È ESSENZIALE

L'acqua importante per un microrganismo è quella che è davvero disponibile, libera di entrare e uscire dalla cellula, libera per partecipare a tutte le reazioni metaboliche. Se nell'acqua sono presenti soluti che la legano rendendola non disponibile all'uso da parte dei batteri, di fatto è come se l'acqua fosse assente. La stima della reale disponibilità dell'acqua è data dal valore: "Aw" (Water Activity) che si calcola con il rapporto [Pressione di vapore della soluzione in esame/PO (pressione di vapore dell'acqua pura)]

I valori di Aw sono compresi tra 0 e 1; la maggior parte dei microrganismi richiede valori



almeno pari a 0,98 (valore dell'acqua marina); i batteri più resistenti possono sopportare valori non inferiori a 0,75. Gli organismi più resistenti che si conoscono (lieviti osmofili) sopportano valori di 0,6. Quando i valori di Aw scendono a 0,55 il DNA denatura e non può esserci vita.

Gli ambienti caratterizzati da bassi valori di Aw sono quelli effettivamente secchi (deserti caldi o freddi) o quelli con una elevata pressione osmotica.

valori Aw	sostanze	chi è capace di viverci?
1,00 0,99 0,90	acqua pura sangue sciroppi, prosciutto	La maggior parte dei batteri
0,95 0,85 0,80	pane salumi marmellate	
0,75 0,70	pesce salato, laghi salati cereali, frutta secca	

Ambienti con osmolarità elevata possono essere, per esempio, i terreni dei frutteti, dove la concentrazione di zucchero è elevata (vi si trovano quasi esclusivamente lieviti osmofili), o ambienti artificiali come melasse o salamoie. Il motivo più comune di una pressione osmotica elevata, tuttavia, è rappresentato dalla concentrazione di sale. Molti microrganismi sono alotolleranti: riescono a crescere in presenza di concentrazioni saline, ma crescono meglio se il valore di Aw è alto. Alostolleranti sono, per esempio gli stafilococchi che tollerano percentuali

di cloruro di sodio fino a 7,5 %; alotolleranti, più che alofile, sono anche molte specie che si trovano in mare e possono passare con disinvoltura dal comparto marino a quello terrestre.

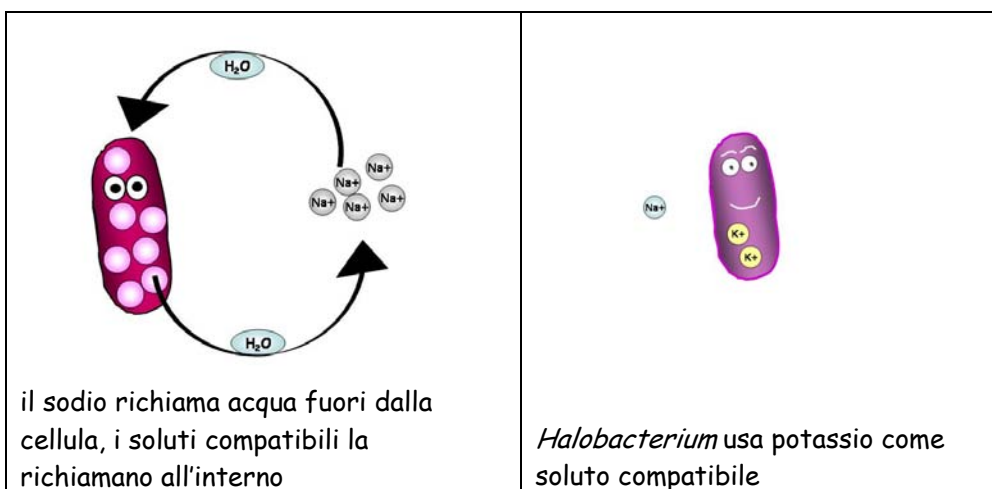


I microrganismi realmente alofili (es. *Vibrio fischeri* e molti *Vibrio* marini) invece crescono solo se la salinità non è inferiore all'1%; il valore ottimale è di circa 3%.

Gli alofili estremi, infine, hanno bisogno di percentuali di sale molto alte (15-30%) e si trovano solo in ambienti ipersalini (saline, mar Morto, cibi conservati per

salagione).

I microrganismi alotolleranti o alofili 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 come la betaina (trimetilglicina) o l' ectoina (derivato ciclico dell'acido aspartico) prodotta da alcuni alofili estremi. Questi soluti vengono definiti "soluti compatibili" e la loro concentrazione intracellulare richiama acqua all'interno



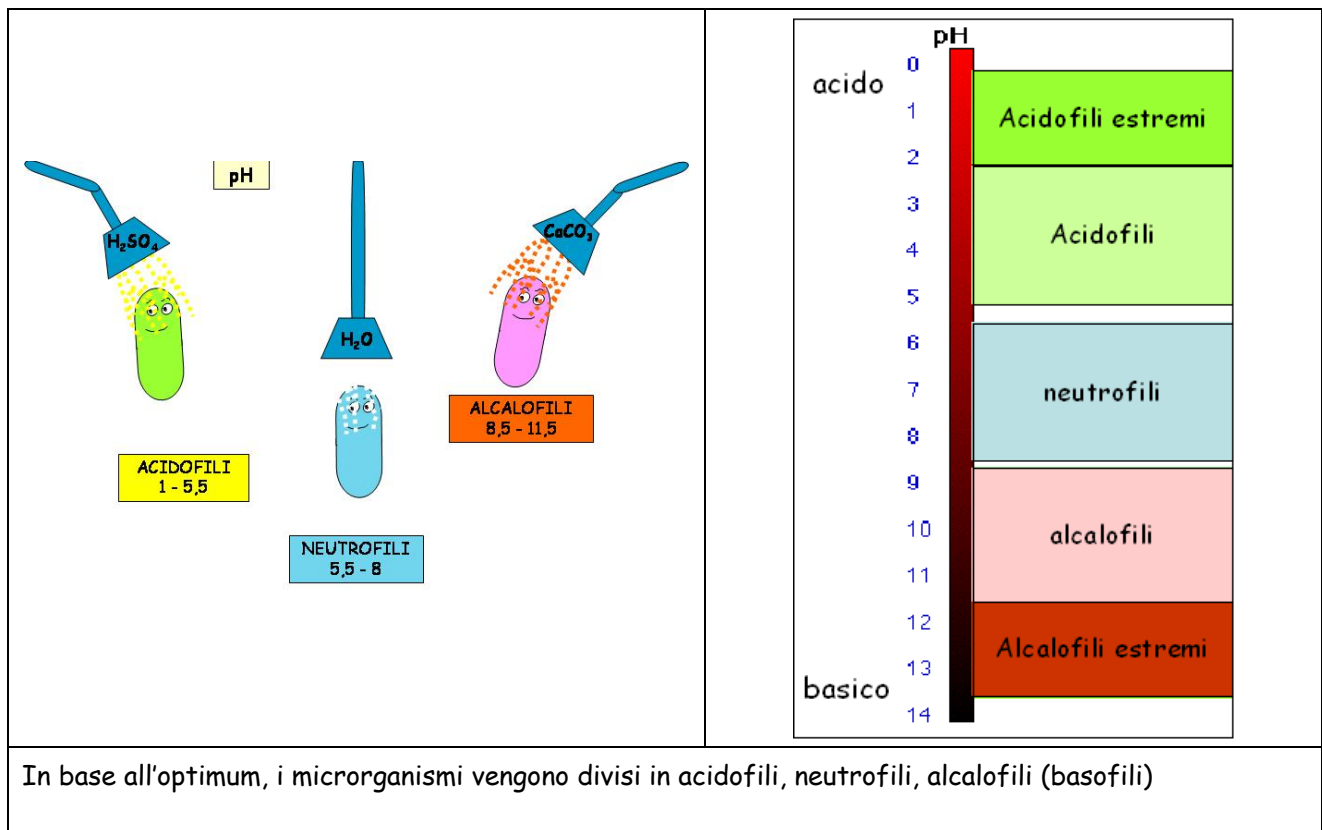
della cellula.

Archibatteri alofili (es. *Halobacterium*) concentrano grandi quantità di ioni K^+ nel citoplasma. La concentrazione del potassio è più alta di quella del sodio che

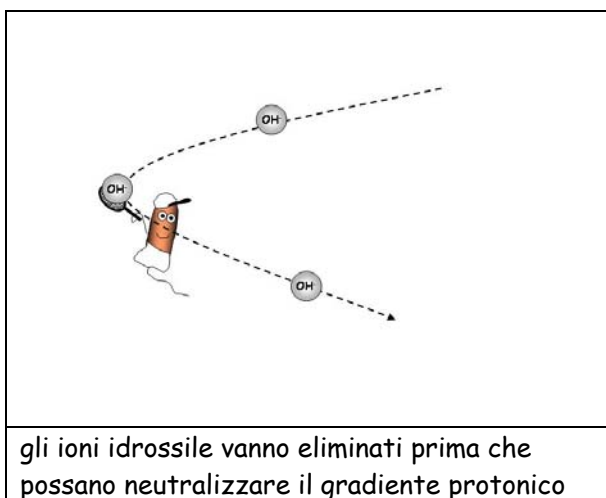
si trova fuori della cellula e riesce a garantire l'equilibrio idrico. La parete di *Halobacterium* è ricca di aminoacidi carichi negativamente che restano coesi fino a quando le loro cariche sono neutralizzate dal sodio che vi si lega. In carenza di sodio gli aminoacidi si allontanano e la parete si disgrega

CONCENTRAZIONE DI IONI IDROGENO (PH)

I microrganismi crescono in un intervallo di valori di pH di circa 2-3 unità, all'interno dei quali si trova il valore ottimale per la crescita.



Questa suddivisione è riferita al pH dell'ambiente esterno alla cellula; il pH interno, del citoplasma, deve restare intorno a valori che si avvicinano alla neutralità, anche se microrganismi acidofili estremi, che vivono in ambienti con pH molto bassi (1-2) possono avere un pH intracellulare di circa 4,6, mentre microrganismi fortemente basofili possono arrivare ad avere un pH interno più alto (circa 9,5) è probabile che questo intervallo definisca i limiti compatibili con la vita. Per alcuni microrganismi l'acidofilia è una scelta obbligata: la loro



membrana si destabilizza se la concentrazione di ioni idrogeno non è sufficientemente elevata. I microrganismi adattati a vivere in ambienti con pH estremi hanno strutture esterne e enzimi molto resistenti e mantengono il pH intracellulare con meccanismi di efflusso ionico.

In particolare, nei microrganismi basofili è necessario che gli ioni ossidrilici siano pompati continuamente fuori dalla cellula per impedire

che il potenziale di membrana venga inattivato (CNFR RESPIRAZIONE); questi particolari

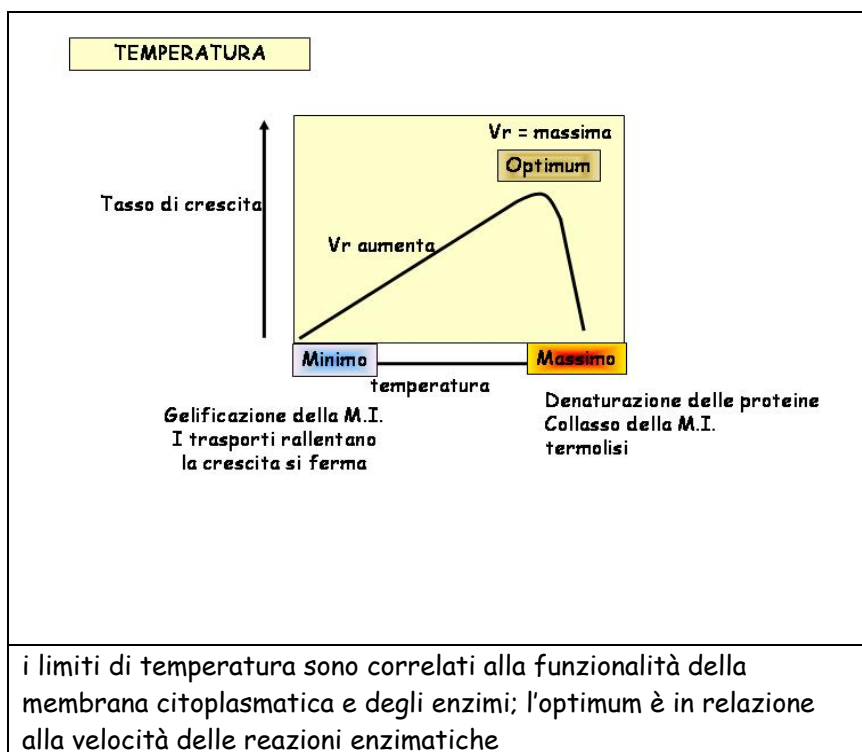
microrganismi hanno membrane modificate per impedirne la saponificazione. Le attività dei batteri acidofili contribuiscono a stabilizzare il pH degli ambienti in cui si trovano. Un esempio molto noto di questo fenomeno è quello delle "acque acide di miniera". Quando giacimenti di carbon fossile vengono aperti, la pirite che vi si trova, esposta al contatto con l'aria, forma acido solforico. In queste acque possono vivere microrganismi acidofili.

Un microrganismo particolarmente adattato a questo tipo di ambienti è *Thiobacillus ferrooxidans* che ossida il solfuro con produzione di acido solforico e si moltiplica anche a pH 0 (un valore che corrisponde a quello di una soluzione 1M di acido solforico).

Thiobacillus ferrooxidans è un batterio acidofilo obbligato: non riesce infatti a crescere a pH neutro, perchè la sua membrana citoplasmatica lisa a pH neutro (~7) causa della insufficiente concentrazione di idrogenioni; in questa specie la differenza di pH tra i due versanti della membrana (esterno della cellula e citoplasma) può raggiungere anche le 6-7 unità di pH.

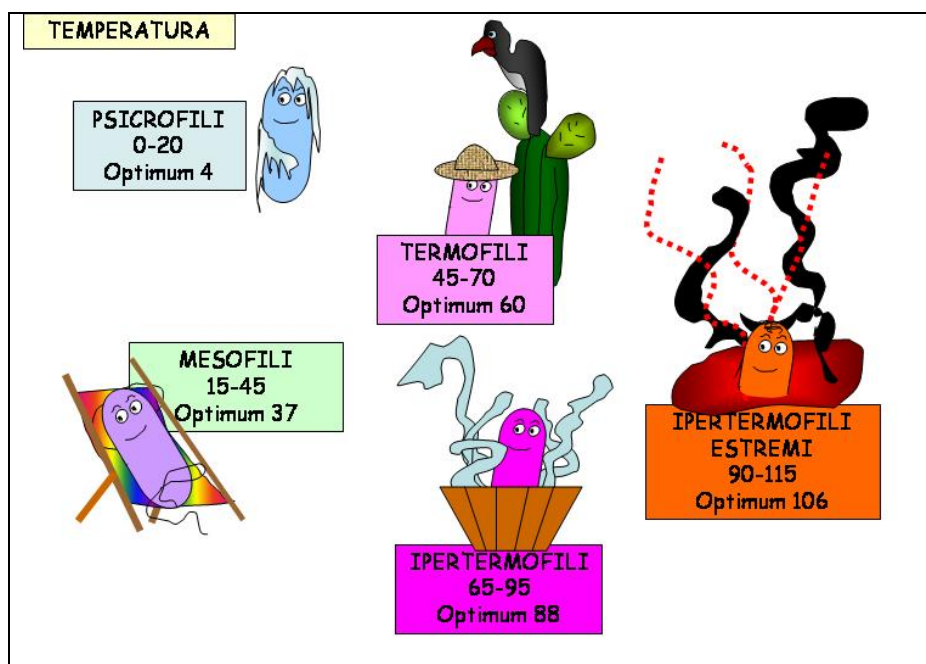
Temperatura

Ogni microrganismo ha tre temperature (temperature cardinali) che definiscono i limiti (massimo e minimo) entro i quali la crescita è possibile, e il punto (o l'intervallo) ottimale per la crescita stessa. Il limite massimo di tolleranza nei confronti della temperatura è connesso con



l'inattivazione termica delle proteine; i fattori che determinano invece il limite minimo a cui la crescita è possibile non sono completamente chiari; si considera probabile che sia implicato l'irrigidimento della membrana e la conseguente perdita delle capacità di formazione del gradiente protonico o di trasporto di nutrienti.

Anche nei confronti della temperatura i microrganismi formano, nel loro insieme, un continuum e le categorie che possono essere individuate sulla base delle temperature ottimali per la



crescita rappresentano una divisione artificiale, che fornisce indicazioni grossolane; non è possibile tracciare tra di loro dei limiti netti. Per questo motivo le divisioni adottate da diversi autori, a volte non si sovrappongono del tutto. Indicativamente si

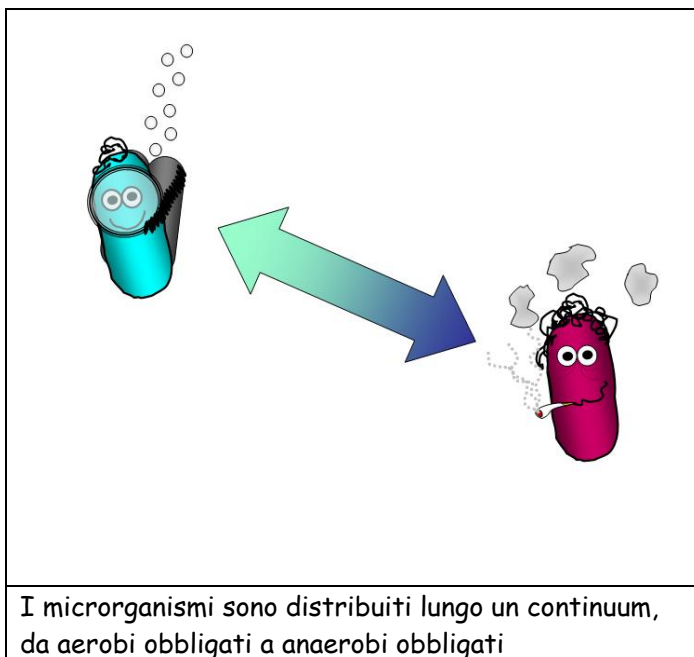
possono considerare 5 categorie: i batteri con valori ottimali di crescita molto bassi (circa 4°C) e con limiti orientativamente tra 0 e 20 gradi, sono considerati psicrofili; la categoria dei mesofili è forse la più difficile da definire: vi appartengono batteri capaci di crescere in un intervallo molto vasto (15-45°C circa) e per i quali si ipotizza una temperatura ottimale intorno ai 30-37°C. Molti batteri ambientali, tuttavia, crescono fino a 28°C ma non a 37°C e ciò li collocherebbe fuori dalla categoria dei mesofili, ma non in quella dei batteri realmente psicrofili, il cui limite superiore dovrebbe porsi a 20°C. Si ricorre quindi a precisazioni del tipo "mesofili psicrotolleranti". Anche i microrganismi termofili vengono divisi in due categorie: termofili (es *Thermus aquaticus*, con optimum a 70°C, da cui viene estratta la Taq polimerasi impiegata per le reazioni di PCR) e ipertermofili, la seconda, a sua volta divisa, a volte, in ipertermofili (archibatteri e poche specie batteriche come *Aquifex* e *Thermotoga*) e ipertermofili estremi (archibatteri). Il microrganismo maggiormente termoresistente finora conosciuto è *Pyrococcus furiosus* (optimum 115°C) un archibatterio che cresce ossidando solfuro e fissando CO₂; la sua parete è formata da glicoproteine e la sua polimerasi (Pfu) è usata nelle reazioni di amplificazione in cui è necessaria una particolare accuratezza.

La crescita a temperature estreme richiede adattamenti particolari: gli enzimi dei batteri psicrofili, attivi anche a basse temperature hanno un numero maggiore di α -eliche e un numero minore di foglietti beta rispetto a quelli dei batteri mesofili.

Questa conformazione, unita alla presenza di molti residui polari e pochi residui idrofobici garantisce una più ampia flessibilità a basse temperature. La fluidità della membrana, che garantisce la funzionalità del trasporto attivo, è mantenuta dalla percentuale elevata di acidi grassi insaturi. Nei microrganismi che vivono in ambienti caratterizzati da temperature molto alte (come sorgenti termali o fumarole oceaniche) le proteine sono fortemente idrofobiche (non si distendono nell'acqua) e la loro struttura compatta è ulteriormente rafforzata dalla presenza di molti legami ionici tra aminoacidi carichi (positivi, come arginina e lisina, o negativi come acido glutamico e aspartico). Per quanto riguarda le membrane, i batteri termofili hanno membrane molto ricche in grassi saturi; negli archibatteri gli acidi grassi sono sostituiti da idrocarburi e la membrana è costituita da un monostrato lipidico, maggiormente termoresistente dell'usuale doppio strato.

concentrazione di ossigeno

Moltissimi microrganismi sono in grado di utilizzare l'ossigeno molecolare, ma solo una piccola percentuale non riesce a vivere senza di esso (aerobi obbligati) quelli che ne sono invece intossicati si definiscono anaerobi. I confini tra le due categorie non sono nette: i



microrganismi sono distribuiti lungo un continuum che va dagli aerobi obbligati agli anaerobi obbligati (anaerobi stretti) passando per gli aerobi facoltativi (crescono in assenza di ossigeno, anche se con minor efficienza), i microaerofili (crescono bene se l'ossigeno è presente in percentuale minore di quella atmosferica (21%); gli anaerobi aerotolleranti (resistono a basse tensioni di ossigeno anche se non lo utilizzano nei loro

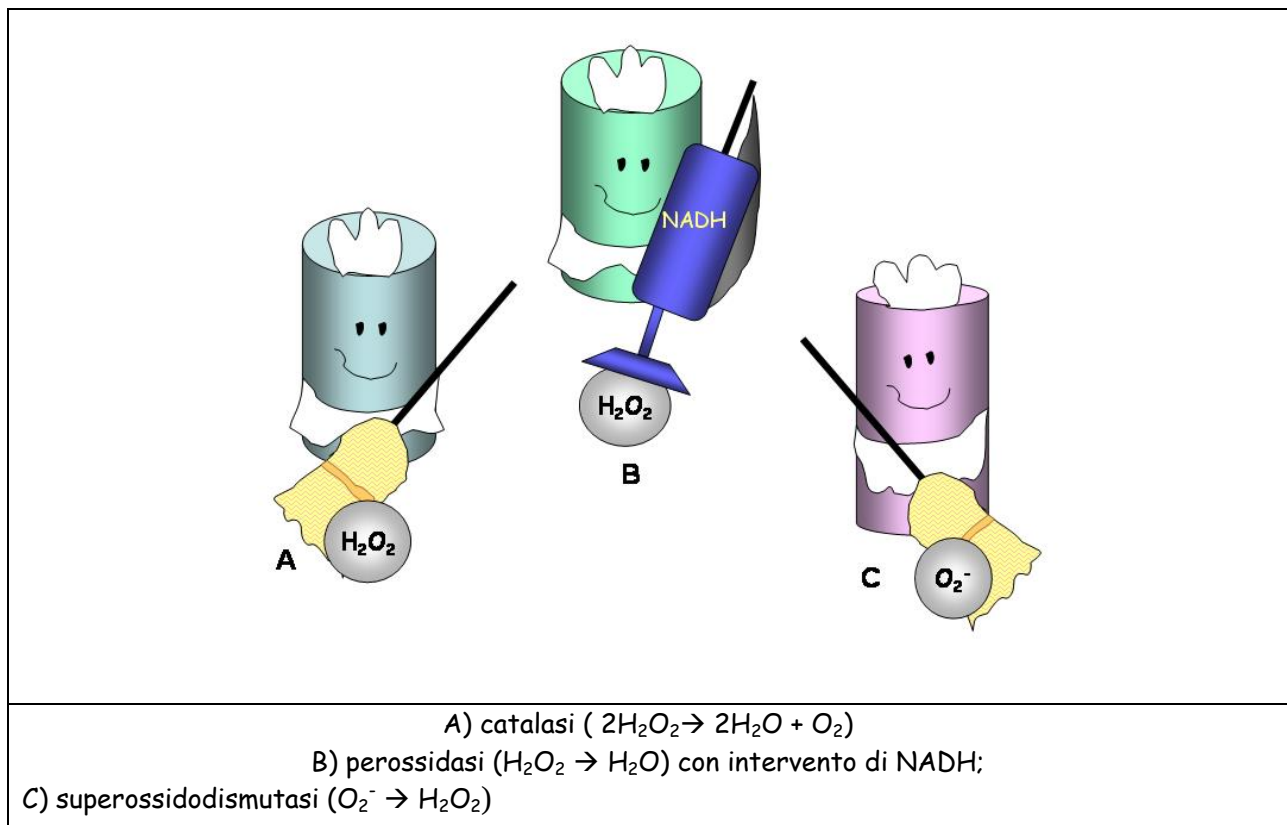
metabolismi).

I microrganismi "aerobi" hanno evoluto strategie di difesa contro alcune forme dell'ossigeno che sono tossiche. Il normale stato di base dell'ossigeno è l'ossigeno tripletto ($^3\text{O}_2$); nel corso di molte reazioni foto- o bio- chimiche, tuttavia, può essere prodotta la forma di ossigeno "singoletto" ($^1\text{O}_2$) che ha una maggiore energia e una grande reattività. L'ossigeno

singoletto è una forma molto tossica, che provoca reazioni di ossidazione incontrollate all'interno della cellula. La produzione di ossigeno singoletto è più frequente negli ambienti fortemente illuminati; tra i microrganismi che vivono in ambienti di questo tipo è molto frequente la sintesi di pigmenti carotenoidi, che sono in grado di reagire con l'ossigeno singoletto convertendolo in forme meno dannose. Altre forme tossiche dell'ossigeno possono essere prodotte nel corso del metabolismo dai batteri stessi: l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2 , acqua ossigenata) e il radicale idrossile $OH^\cdot$.

I batteri, a seconda delle loro necessità, producono diversi tipi di enzimi per eliminare le forme tossiche: la superossido-dismutasi che trasforma l'anione superossido in H_2O_2 ; la catalasi, che trasforma acqua ossigenata in acqua e ossigeno molecolare senza che intervengano coenzimi, e le perossidasi che richiedono l'intervento di NADH ($H_2O_2 + H^+ + NADH \rightarrow 2H_2O + NAD$).

Non si conoscono enzimi in grado di detossicare il radicale idrossile, ma l'eliminazione dell'acqua ossigenata (da cui si forma) ne previene la comparsa.



L'enzima superossido-dismutasi è indispensabile per i batteri aerobi obbligati e facoltativi che sono abitualmente in contatto con l'ossigeno e che sono generalmente dotati anche di catalasi e perossidasi.

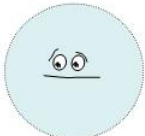
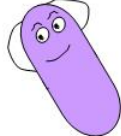
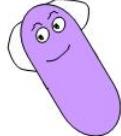
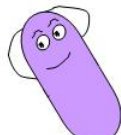
Alcuni anaerobi aerotolleranti (come streptococchi e lattobacilli) mancano di catalasi e di superossido-dismutasi, e resistono alla presenza di ossigeno grazie a un processo non enzimatico mediato da complessi di ioni Mn^{2+} . È possibile che si tratti di un meccanismo di detossicazione primitivo.

Microorganismi come *Pyrococcus furiosus* (archibatterio termofilo e anaerobio obbligato) possiedono un particolare enzima (superossido-riduttasi) che permette loro di ridurre il superossido a H_2O_2 senza che venga prodotto ossigeno molecolare, che sarebbe tossico per la cellula. In *P. furiosus* mancano anche le catalasi (che producono O_2 nel corso della reazione) e la detossicazione dall'acqua ossigenata prodotta nel corso del metabolismo, è affidata a enzimi simili alle perossidasi.

Pressione

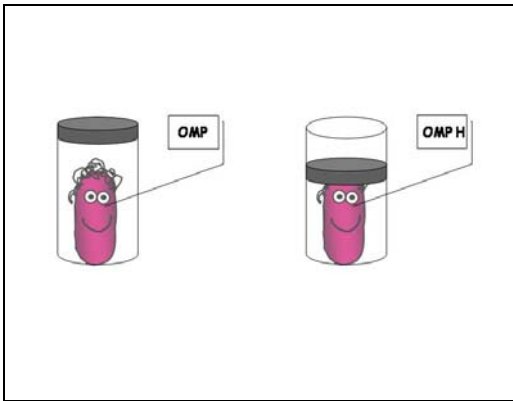


In alcuni particolari ambienti, come quelli marini, anche la pressione, che aumenta di 1 atmosfera ogni 10 metri, riveste una importanza notevole. I microorganismi in grado di sopportare pressioni maggiori di quella atmosferica (fino a 400 atmosfere) ma non danneggiati dalla normale pressione atmosferica, sono considerati barofili moderati.

Pressione	Barofili estremi	Barofili moderati	Non barofili
1			
400			
500			

Altre specie, che riescono a sopportare fino a 300 atmosfere e non oltre, sono considerate "barotolleranti". I microorganismi barofili moderati crescono meglio a pressioni elevate e tollerano la pressione atmosferica; quelli barotolleranti, invece, crescono meglio a pressione normale.

I barofili estremi non crescono a pressioni inferiori a 400 atmosfere e, vivendo così in profondità, sono in genere psicrotrofi. La membrana fluida, ricca di acidi grassi insaturi, che permette la crescita a basse temperature, è anche meno soggetta a variazioni di conformazione sotto pressioni elevate. L'attività enzimatica è ostacolata da alte pressioni (il



legame enzima-substrato ne risente) e quindi gli enzimi dei barofili estremi dovranno avere conformazioni idonee a minimizzare questo effetto.

Di recente è stato anche osservato un meccanismo di regolazione pressione- dipendente: alcuni barofili, che crescono fino a 500-600 atmosfere, sintetizzano una porina particolare (OmpH) in corrispondenza dei valori

più alti. OmpH sostituisce la porina normalmente presente, il cui funzionamento è evidentemente ostacolato dalle pressioni elevate.