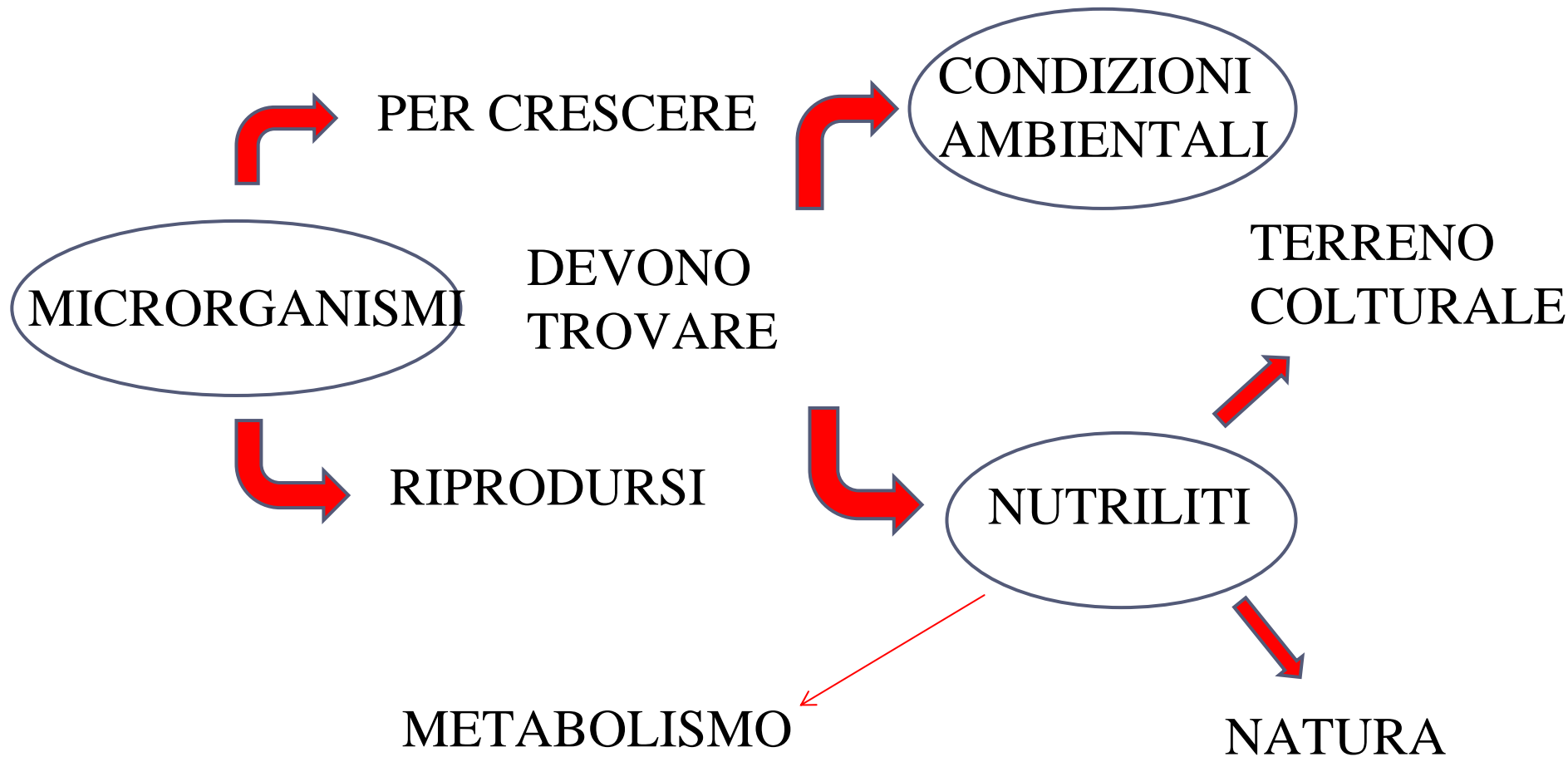


NUTRIZIONE MICROBICA

► Riproduzione ed accrescimento



Colture pure e caratteri colturali

- ▶ I batteri o gli altri microrganismi, quando crescono su un terreno di laboratorio, sono chiamati coltura.
- ▶ La popolazione microbica presente nel nostro ambiente è grande e complessa. Molte differenti specie microbiche abitano normalmente varie parti del nostro corpo (orale, intestinale, cutanea) ed in modo analogo il nostro ambiente (aria, suolo, acqua).

Colture pure e caratteri culturali: popolazioni microbiche naturali

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

Caratteri colturali

- ▶ Uno dei principali caratteri dei batteri è l'aspetto (caratteri di accrescimento) che assumono dopo essere cresciuti su vari terreni.
- ▶ I caratteri colturali forniscono indizi utili per l'identificazione.
- ▶ Una condizione per poter studiare i microrganismi è poterli coltivare nelle condizioni di laboratorio.
- ▶ Per questo scopo si devono conoscere quali **esigenze nutrizionali** (nutriliti) e quali **fattori ambientali** (fisico-chimico) essi richiedono.
- ▶ Tali informazioni hanno consentito di sviluppare numerosi terreni o mezzi per la loro coltura.

Elements of biological relevance

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 1 | | | | | | | | | | | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | |
| 1 | H 1.0079 | | | | | | | | | | | | | | | | He 4.003 | |
| 2 | Li 6.941 | Be 9.012 | | | | | | | | | | | B 10.81 | C 12.01 | N 14.01 | O 16.00 | F 19.00 | Ne 20.18 |
| 3 | Na 22.99 | Mg 24.30 | Transition metals | | | | | | | | | | Al 26.98 | Si 28.09 | P 30.97 | S 32.07 | Cl 35.45 | Ar 39.95 |
| 4 | K 39.10 | Ca 40.08 | Sc 44.96 | Ti 47.87 | V 50.94 | Cr 52.00 | Mn 54.94 | Fe 55.85 | Co 58.93 | Ni 58.69 | Cu 63.55 | Zn 65.41 | Ga 69.72 | Ge 72.64 | As 74.92 | Se 78.96 | Br 79.90 | Kr 83.80 |
| 5 | Rb 85.47 | Sr 87.62 | Y 88.91 | Zr 91.22 | Nb 92.91 | Mo 95.94 | Tc 97.91 | Ru 101.1 | Rh 102.9 | Pd 106.4 | Ag 107.9 | Cd 112.4 | In 114.8 | Sn 118.7 | Sb 121.8 | Te 127.6 | I 126.9 | Xe 131.3 |
| 6 | Cs 132.9 | Ba 137.3 | La through Lu | Hf 178.5 | Ta 180.9 | W 183.8 | Re 186.2 | Os 190.2 | Ir 192.2 | Pt 195.1 | Au 197.0 | Hg 200.6 | Tl 204.4 | Pb 207.2 | Bi 209.0 | Po 209.0 | At 210.0 | Rn 222.0 |
| 7 | Fr 223.0 | Ra 226.0 | Ac through Lr | Rf 104 | Db 105 | Sg 106 | Bh 107 | Hs 108 | Mt 109 | Ds 110 | Rg 111 | Uub 112 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Lanthanides | 57 La 138.9 | 58 Ce 140.1 | 59 Pr 140.9 | 60 Nd 144.2 | 61 Pm 145.0 | 62 Sm 150.4 | 63 Eu 152.0 | 64 Gd 157.2 | 65 Tb 158.9 | 66 Dy 162.5 | 67 Ho 164.9 | 68 Er 167.3 | 69 Tm 168.9 | 70 Yb 173.0 | 71 Lu 175.0 |
| Actinides | 89 Ac 227.0 | 90 Th 232.0 | 91 Pa 231.0 | 92 U 238.0 | 93 Np 237.0 | 94 Pu 244.0 | 95 Am 243.0 | 96 Cm 247.0 | 97 Bk 247.0 | 98 Cf 251.0 | 99 Es 252.1 | 100 Fm 257.1 | 101 Md 258.0 | 102 No 259.0 | 103 Lr 262.0 |



Bulk biological elements



Elements essential for a wide range of bacteria, plants and/or animals



Elements essential or possibly essential for some species

Esigenze nutrizionali

Bisogno di H₂O (70-80%)

- ▶ Tutte le sostanze nutritive devono essere in soluzione, per permettere lo svolgimento delle reazioni metaboliche

Esigenze nutrizionali

Fonti di carbonio:

Zuccherine: melassi di scarto, sieri (latte), amido e cellulosa

Non zuccherine: lipidi e idrocarburi

Le specie microbiche possono utilizzare più fonti di carbonio, influenzando la velocità di riproduzione delle cellule

Esigenze nutrizionali

Richiesta di azoto:

▶ Azoto atmosferico.

▶ *Composti inorganici dell'azoto.*



▶
peptoni, proteine, basi azotate

Urea, amminoacidi,

Esigenze nutrizionali

Richiesta di zolfo e fosforo

Zolfo: amminoacidi, proteine

- ▶ Composti organici dello zolfo
- ▶ Composti inorganici dello zolfo
- ▶ Zolfo elementare

Fosforo: controllo del pH, costituente acidi nucleici, ATP

- ▶ Fosfati.

Esigenze nutrizionali

FATTORI DI CRESCITA:

Vitamine del gruppo B, alcuni amminoacidi, basi azotate

- ▶ Tiamina (B1)
- ▶ Riboflavina (B2)
- ▶ Niacina (B3)
- ▶ Piridossina (B6)
- ▶ Biotina (B8)
- ▶ Acido pantotenico (B5)
- ▶ Acido folico (B9)
- ▶ Cobalamina (B12)
- ▶ Vitamina K

Fattori che influenzano la crescita microbica:

- **osmolarità**
- pH
- temperatura
- concentrazione di ossigeno

➤ L'**osmolarità** è un'unità di misura della concentrazione delle soluzioni usata in chimica, ed in particolare è il numero totale di molecole e ioni presenti in un litro di soluzione

➤ L'osmolarità è una misura del potenziale osmotico che controlla il movimento dell'acqua che tenderà ad andare dalle regioni con meno particelle a quelle con più particelle (a concentrazione, meglio, ad osmolarità maggiore). Il movimento dell'acqua porta dunque a parlare di pressione osmotica.

OSMOSI

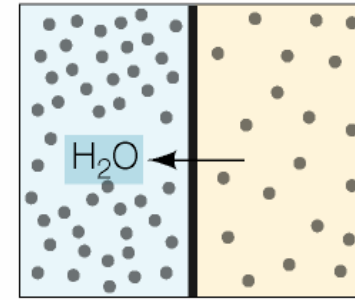
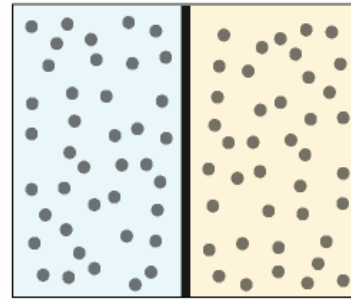
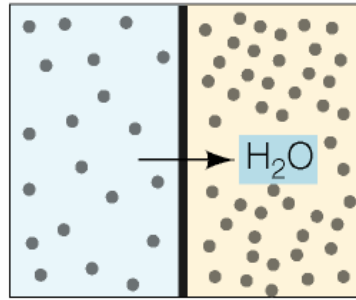
Diffusione di acqua attraverso una membrana a permeabilità selettiva

Soluzione ipertonica
(elevata concentrazione di soluti sul versante esterno)

Soluzioni isotoniche
(soluzioni con equivalenti concentrazioni di soluti sui due versanti)

Soluzione ipotonica
(bassa concentrazione di soluti sul versante esterno)

Ambiente interno alla cellula Ambiente esterno alla cellula

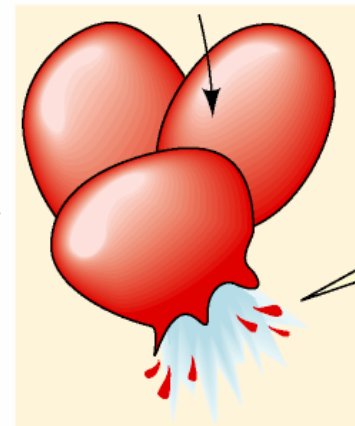
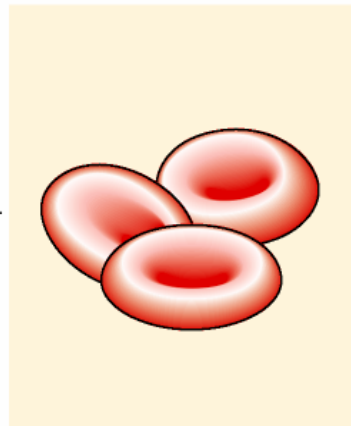
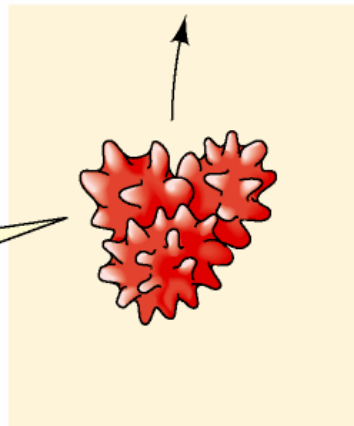


H₂O

H₂O

Cellule animali

Le cellule perdono acqua e si raggrinziscono.

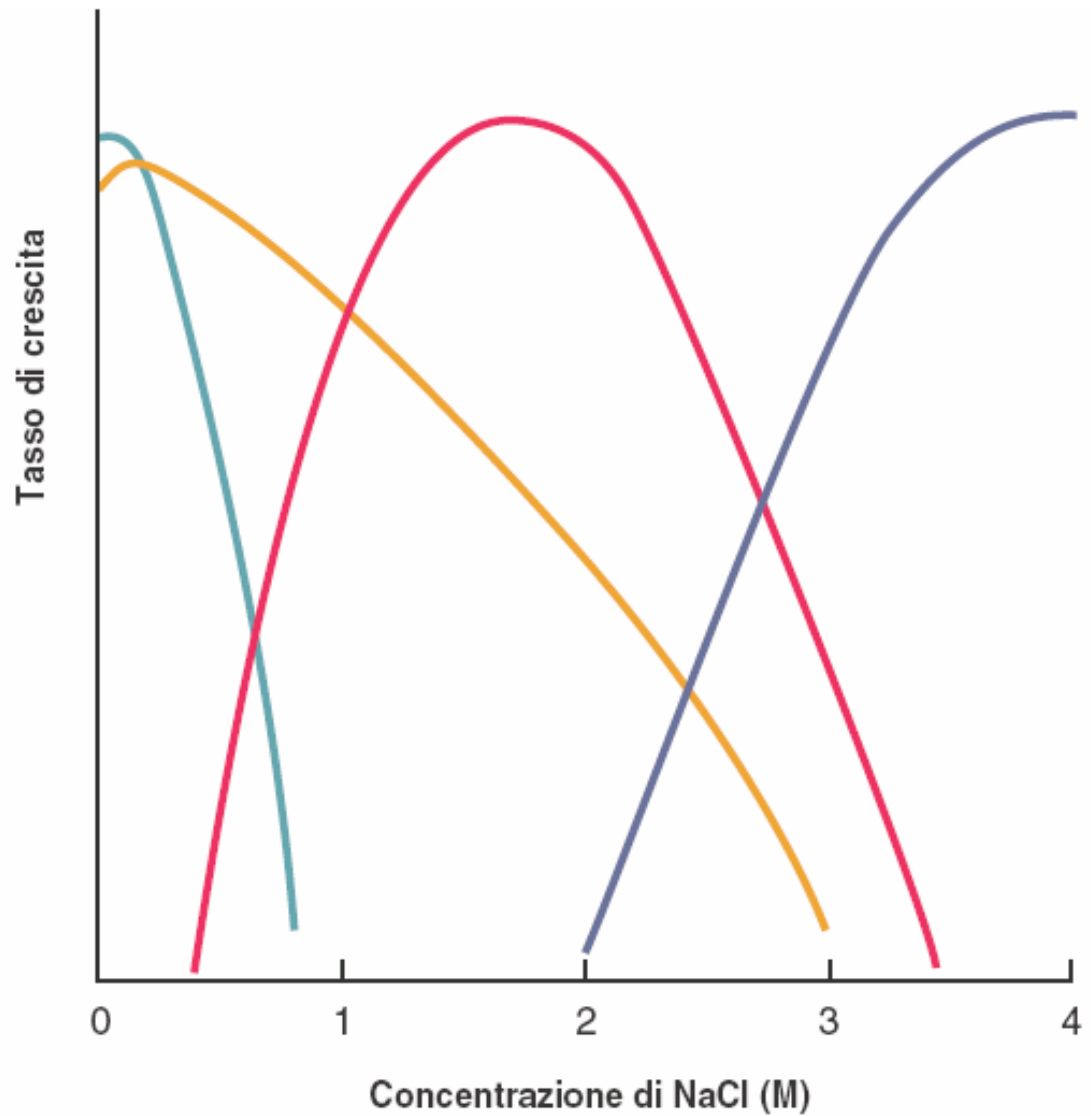


Le cellule assumono acqua, si rigonfiano e infine scoppiano.

- Non alofili
- Alotolleranti
- Alofili moderati ed estremi

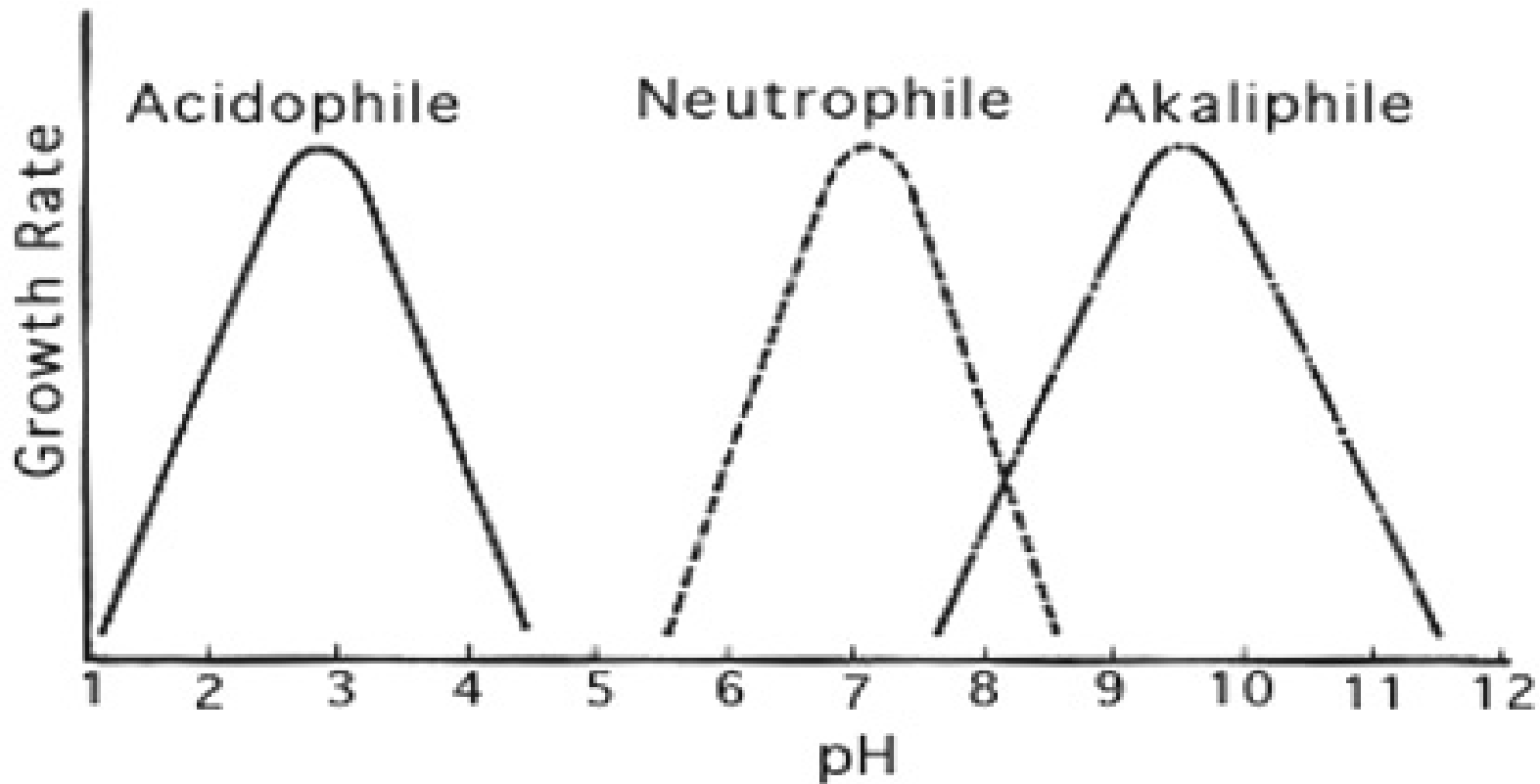
Alofili estremi

(*Halobacterium*) isolato nel mar Nero richiede concentrazioni saline vicine alla saturazione (elevato K^+ intracellulare)



pH

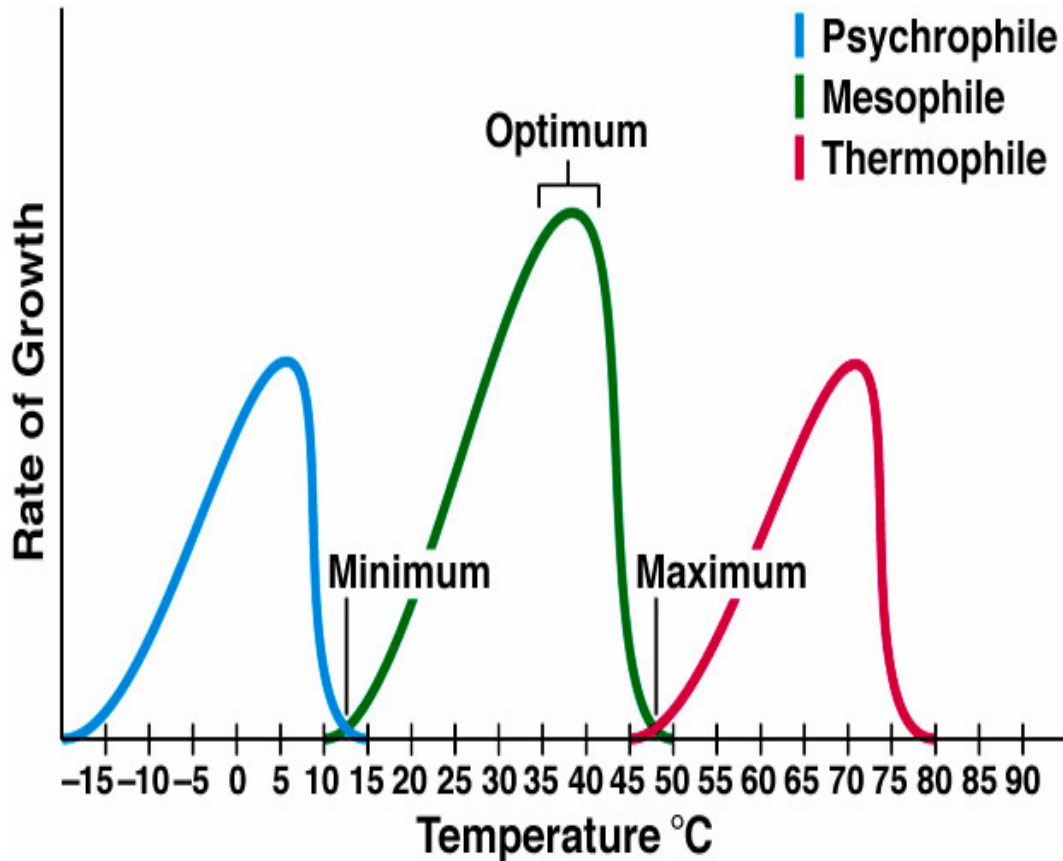
➤ pH: influenza le reazioni enzimatiche in quanto modifica il grado di dissociazione dei gruppi carichi delle proteine



pH citoplasmatico mantenuto neutro attraverso dei sistemi tampone fosfato e bicarbonato

TEMPERATURA

Effetto della T sulla crescita microbica



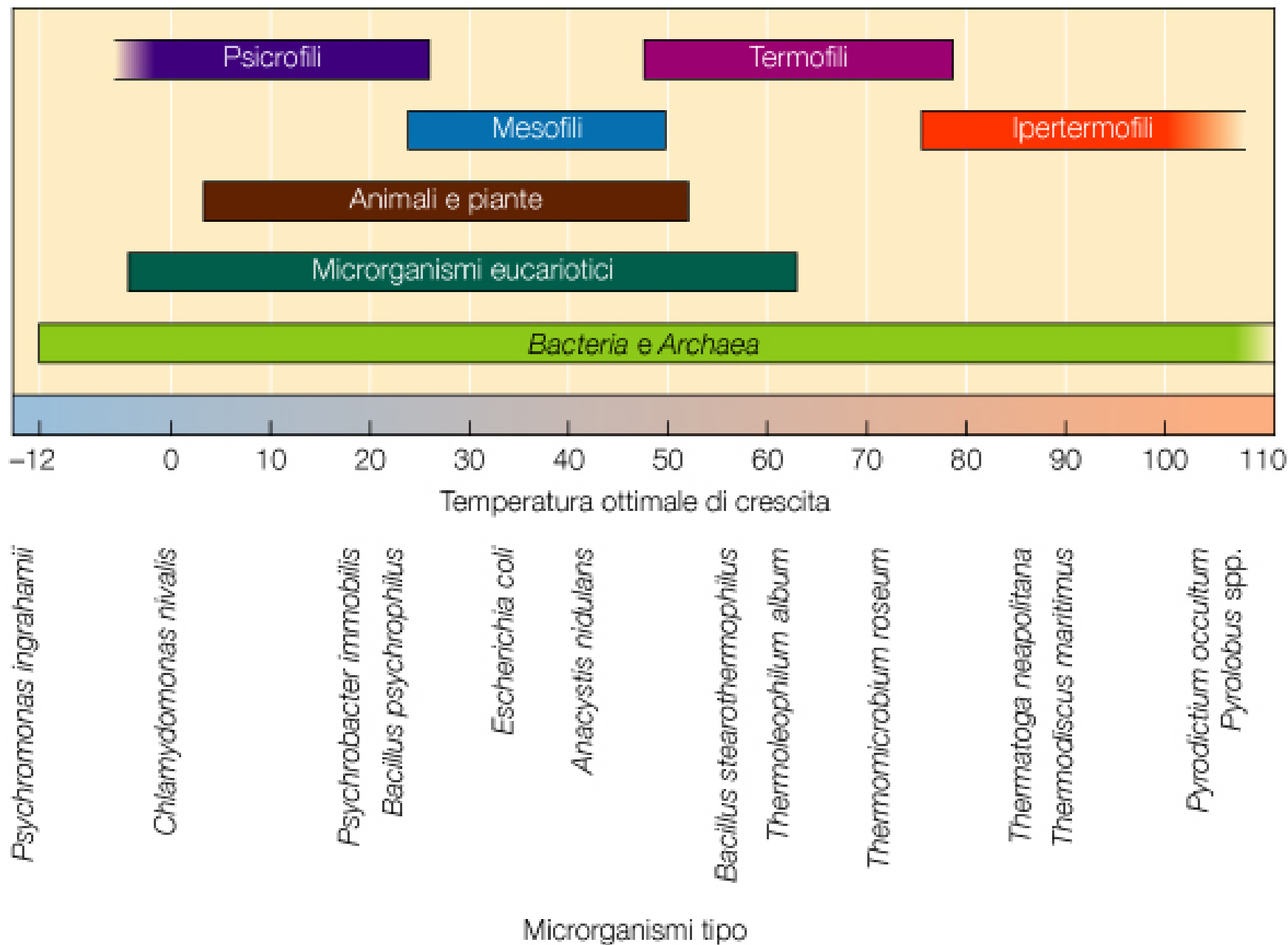
Alte temperature:

- Aumenta l'attività enzimatica e la crescita
- Causa denaturazione degli enzimi e morte

Basse temperature:

- Attività enzimatica ridotta
- Il congelamento blocca la crescita microbica
- Le membrane cellulari sono meno fluide

Ogni organismo ha un Min. un Max e un Optimum di t.crescita



Vita al di sopra dei 100°C

- ▶ Fino ad ora, la temperatura più elevata per la crescita batterica veniva considerata 105°C.
- ▶ In questi ultimi anni, tuttavia, sono stati individuati nuovi batteri che crescono in fumarole di zolfo, localizzate lungo le spaccature ed i crinali del fondo dell'oceano, dalle cui bocche fuoriescono getti d'acqua ricca di zolfo con temperature superiori ai 350°C.
- ▶ Si è osservato che questi batteri sono capaci di crescere e riprodursi a 115°C.
- ▶ Ciò conferma la possibilità di crescita batterica a temperature elevatissime.

- ▶ La pressione presente nel loro habitat è sufficiente a mantenere l'acqua allo stato liquido (a 265 atm).
- ▶ Le proteine, le membrane e gli acidi nucleici di questi batteri rimangono eccezionalmente stabili a queste temperature, tanto da rappresentare soggetti ideali per studiare le modalità necessarie alle macromolecole ed alle membrane per mantenersi stabili.

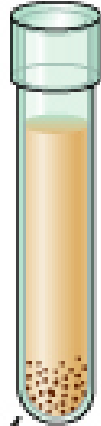
concentrazione di ossigeno:

Aerobi
obbligati

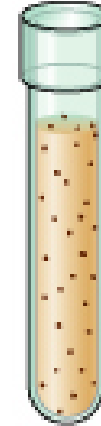
Un organismo strettamente aerobio cresce solo in presenza di O_2 , mentre ...



Un anaerobio facoltatico cresce lungo tutta la provetta, soprattutto dove l'ossigeno è disponibile.



Una specie aerotollerante cresce in tutta la provetta.



Un microaerofilo cresce a livelli di ossigeno ridotti.



Microaerofili

Anaerobi
obbligati

... un organismo strettamente anaerobio cresce solo dove sia stata eliminata qualsiasi traccia di ossigeno.

Anaerobi
facoltativi

Anaerobi
aerotolleranti

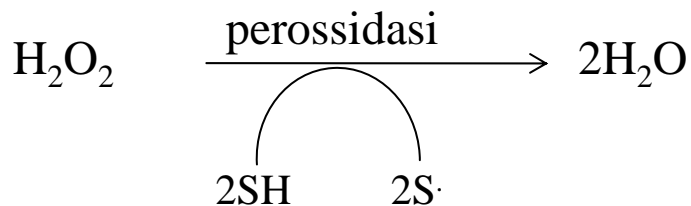
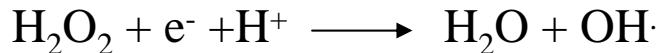
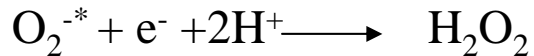
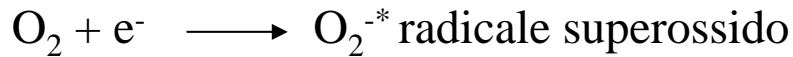
La tolleranza o meno all' O_2 è determinata dalla presenza di un particolare sistema enzimatico nella cellula: **superossido dismutasi, catalasi e perossidasi**

ROS: SPECIE REATTIVE ALL'OSSIGENO:



➤ Alcune reazioni ossidative della demolizione di amminoacidi e dei lipidi, producono tali specie reattive

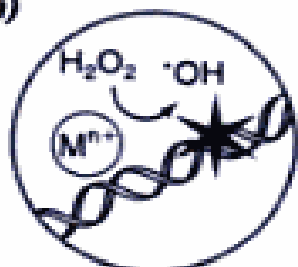
➤ All'interno di piccole vescicole (perossisomi: catalasi) o nel citoplasma avviene la degradazione di tali specie reattive ad opera di enzimi antiossidanti SOD, SOR, catalasi, perossidasi oppure tramite CoQ e vitamina E (membrana cellulare)



DAMAGE

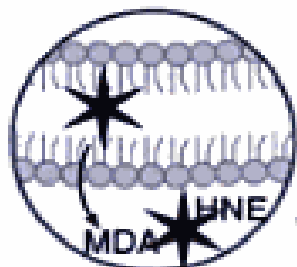
Lipid peroxidation and toxic products: all membranes

(a)



DNA damage: nucleus, mitochondria

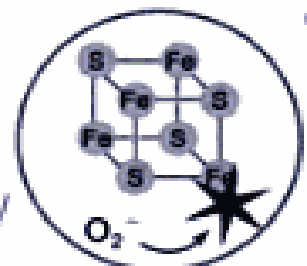
(b)



Protein oxidation: all cell compartments

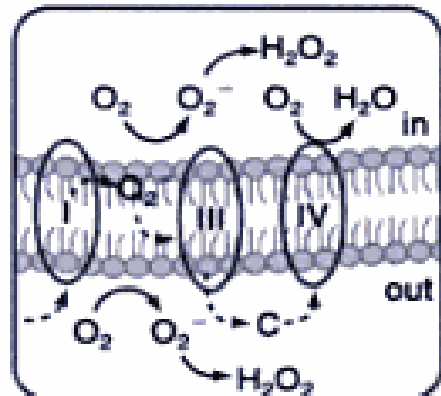


(d)



4Fe-4S clusters: specific enzymes

(e)



Mitochondrial inner membrane

ROS GENERATION

(f)

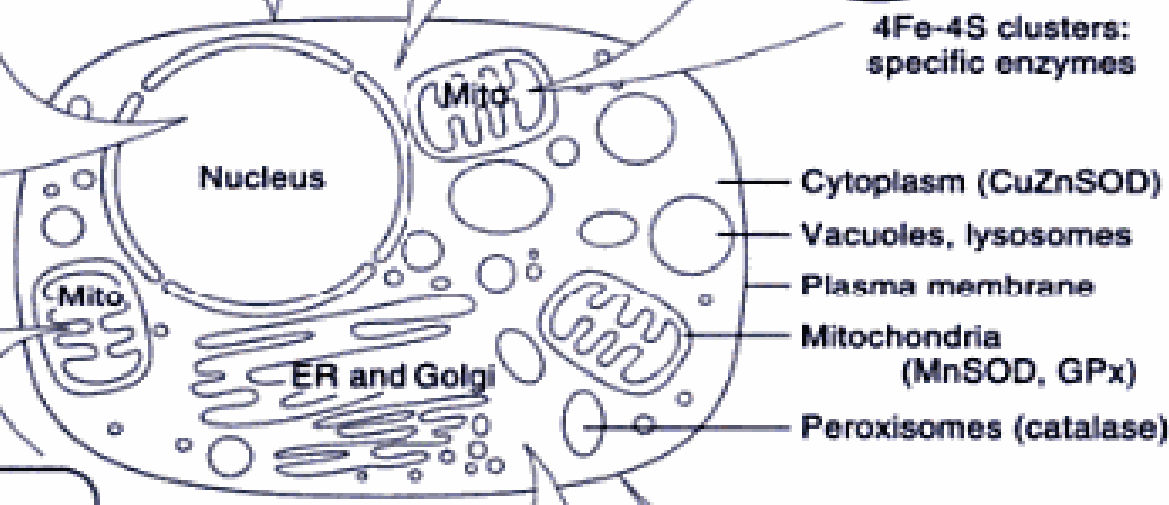


Aqueous compartments



Lipid compartments

DEFENSES



CRESCITA MICROBICA

Per sfruttare nel modo migliore i microrganismi bisogna conoscere come varia nel tempo il numero di cellule che si riproducono

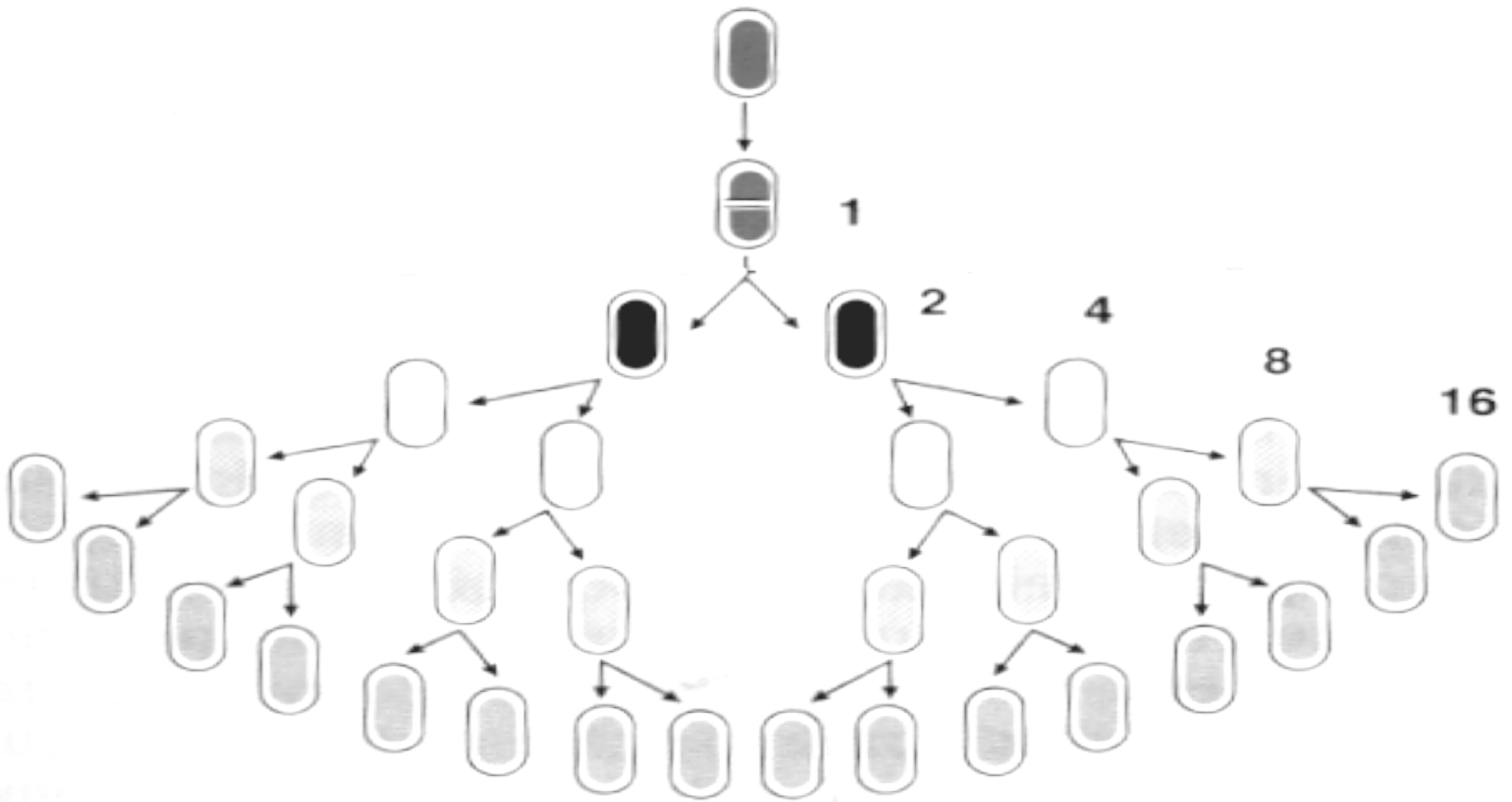
Numero delle cellule:

- ▶ misura della concentrazione cellulare (conta del numero di cellule) attraverso:

Microscopio (conta totale)

Conta colonie UFC (conta vitale)

- misura della massa cellulare attraverso:
- ▶ Spettrofotometro (torbidità)



La divisione batterica per scissione binaria determina la moltiplicazione del microrganismo in maniera esponenziale, così che, dopo tre divisioni, da una cellula batterica se ne formano otto

L'intervallo di tempo necessario al batterio per riprodursi è detto tempo di generazione (o tempo di duplicazione) e varia tra i differenti microrganismi e a seconda delle condizioni di crescita.

Escherichia coli e la maggior parte dei batteri ha, in condizioni ambientali ottimali (create in laboratorio), un tempo di generazione di 20-30 minuti; in questi casi bastano 12 ore (35 generazioni) per ottenere da una singola cellula miliardi di batteri.

In condizioni naturali, ad esempio nell'intestino umano, *Escherichia coli* impiega ben 12 ore per effettuare una divisione cellulare.

| MICROORGANISMI | TEMP | t _{GEN} (min) |
|-------------------------------|------|---------------------------|
| Escherichia coli | 37 | 20 |
| Bacillus mycoides | 37 | 25 |
| Streptococcus lactis | 37 | 35 |
| Spirochete sifilitica | 37 | 33 h |
| Nitrobacter agilis | 27 | 20 h |
| Bacillus Thermophilus | 55 | 20 |
| Mycobacterium tuberculosis | 36 | 16 h |
| Staphylococcus aureus | 37 | 30 |

Crescita batterica

In fase esponenziale ogni microrganismo si duplica a intervalli di tempo costanti, quindi la popolazione raddoppia nell'arco di un certo tempo detto tempo di generazione:

$$\begin{array}{cccccc} \text{N cellule:} & 1 & \xrightarrow{t_{\text{gen}}} & 2 & & 4 & & 8 & & 16 & & 32 \dots\dots\dots \\ & 2^0 & & 2^1 & & 2^2 & & 2^3 & & 2^4 & & 2^5 \dots\dots 2^n \end{array}$$

N_0 = numero di cellule nella popolazione iniziale

N = numero di cellule al tempo t

n = numero di generazioni (numero di divisioni cellulari)

t_{gen} = tempo di generazione (tempo occorrente per una duplicazione cellulare)

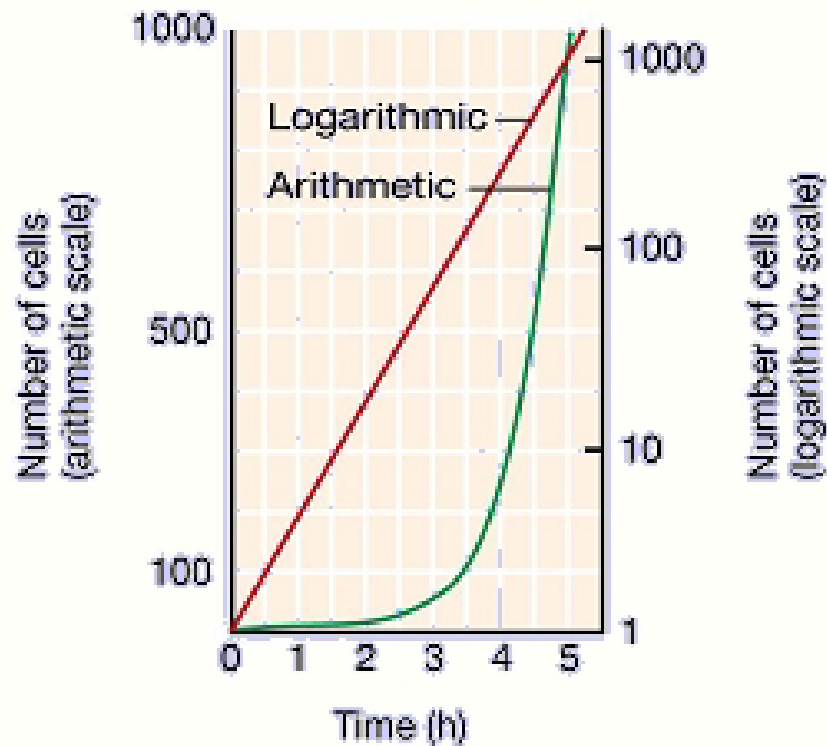
$$N = N_0 2^n \quad (\text{aumento di tipo esponenziale o logaritmico})$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

| Time (h) | Total number of cells | Time (h) | Total number of cells |
|----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| 0 | 1 | 4 | 256 |
| 0.5 | 2 | 4.5 | 512 |
| 1 | 4 | 5 | 1,024 |
| 1.5 | 8 | 5.5 | 2,048 |
| 2 | 16 | 6 | 4,096 |
| 2.5 | 32 | . | . |
| 3 | 64 | . | . |
| 3.5 | 128 | 10 | 1,048,576 |

(a)



Il tempo necessario perché la popolazione raddoppi è il **tempo di generazione**.

Si può calcolare facendo il rapporto tra il tempo di crescita e il numero di generazioni

$$t_{\text{gen}} = t/n = t \cdot 0,301 / \log N - \log N_0$$

ESERCIZIO: Calcoliamo il numero di generazioni e il tempo di generazione

$$N_0 = 10^2 \text{ UFC/g}$$

$$n = 9-2/0,301 = 23,2 \text{ generazioni}$$

$$N = 10^9 \text{ UFC/g}$$

$$t_{\text{gen}} = 7/23,2 = 0,3 \text{ h/gen oppure } 18 \text{ min/gen}$$

$$t = 7 \text{ h}$$

La popolazione compie una generazione ogni 18 minuti

Si definisce **velocità costante di crescita** (k) il numero di generazioni nell'unità di tempo (min o h)

$$\mathbf{k = n/t}$$

$$\mathbf{k = \log N - \log N_0 / t \cdot 0,301}$$

ESERCIZIO:

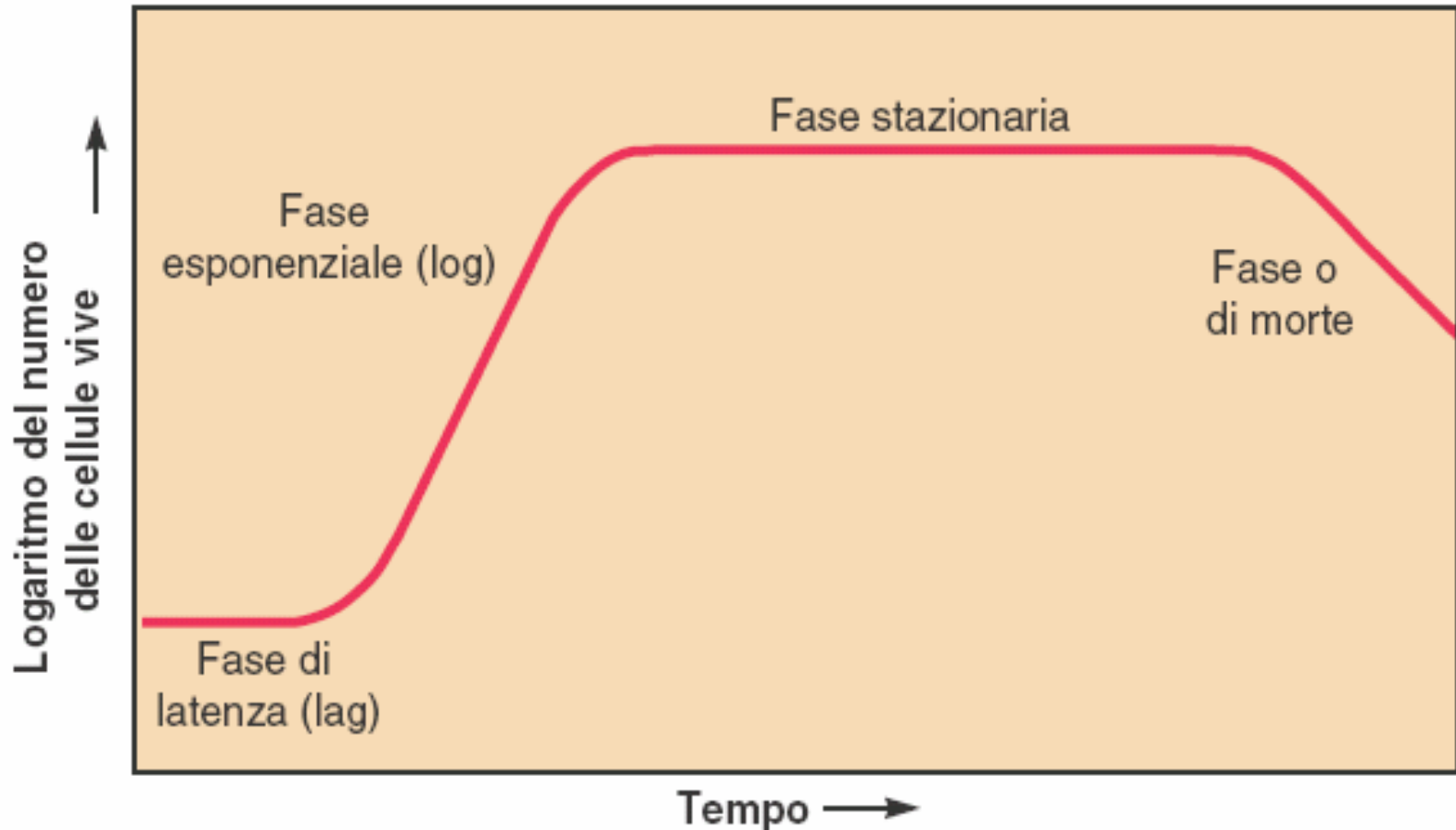
Calcoliamo la velocità di crescita costante:

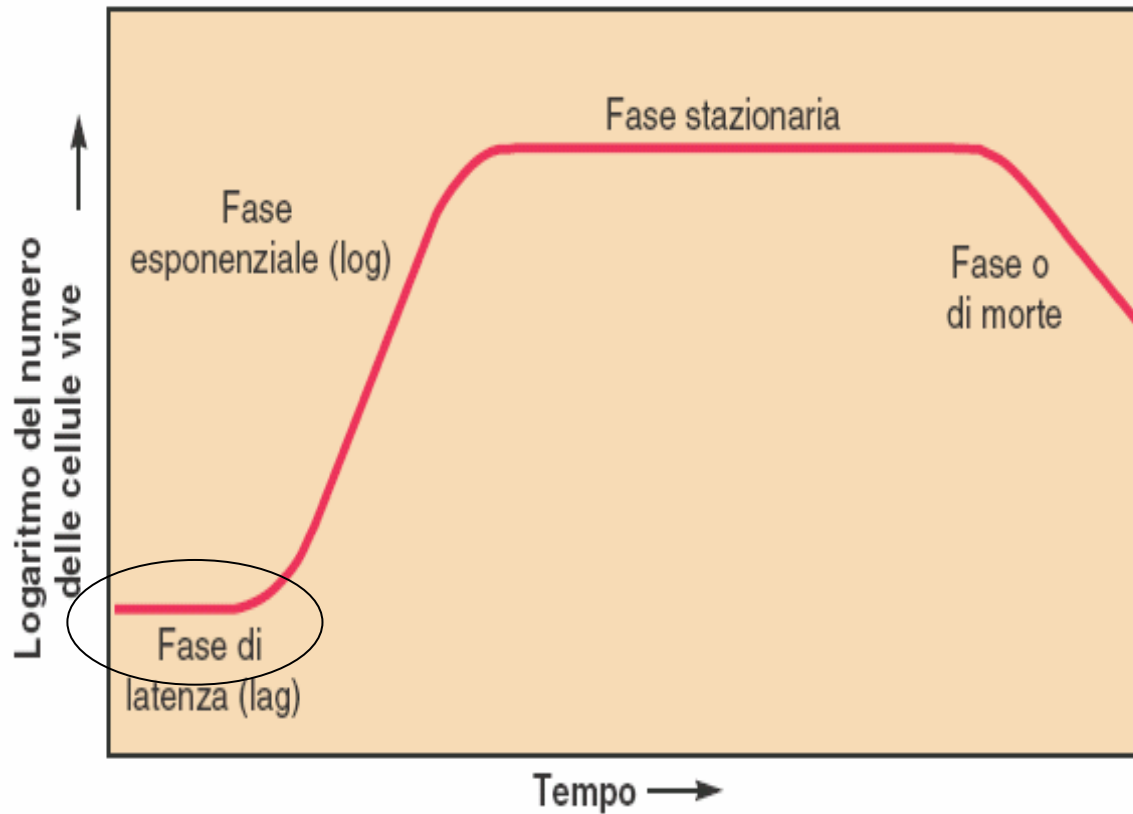
$$k = 9-2/7 \cdot 0,301 = 3,33 \text{ gen/h}$$

La popolazione cresce con una velocità costante di 3,33 gen/h

CURVA DI CRESCITA

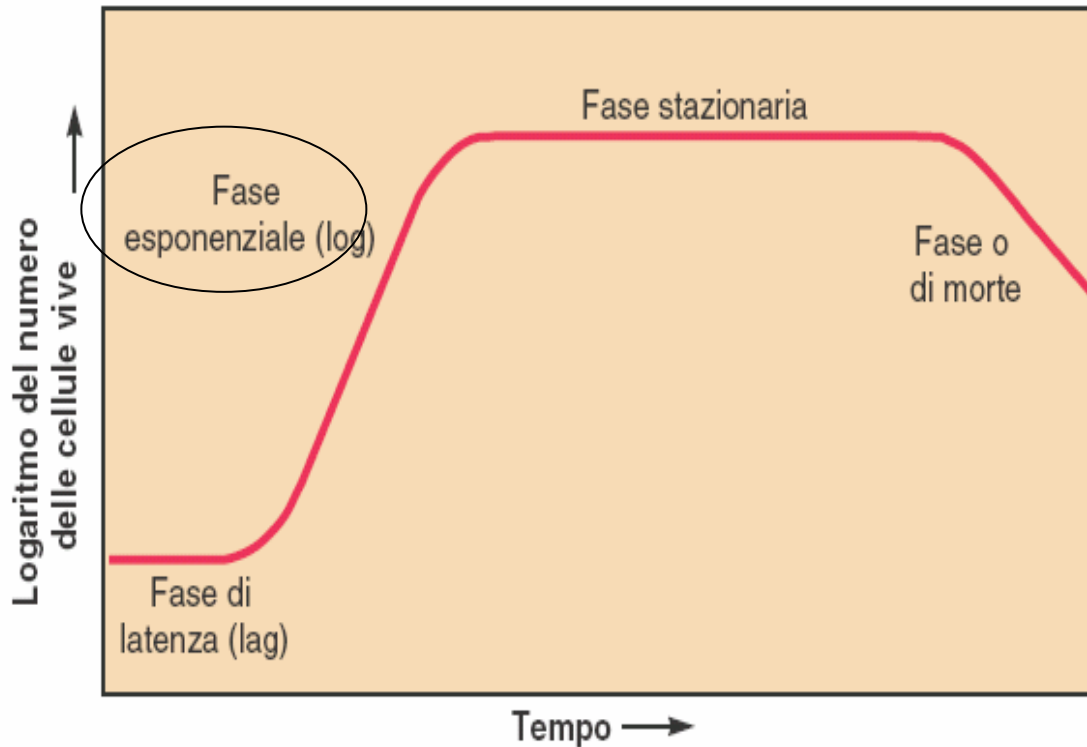
Se durante il periodo di crescita di una coltura (cellule batteriche unicellulari procariote /eucariote) eseguiamo a vari intervalli di tempo in condizioni ottimali una conta totale o vitale, possiamo costruire un grafico della popolazione microbica in funzione del tempo ottenendo delle curve caratteristiche





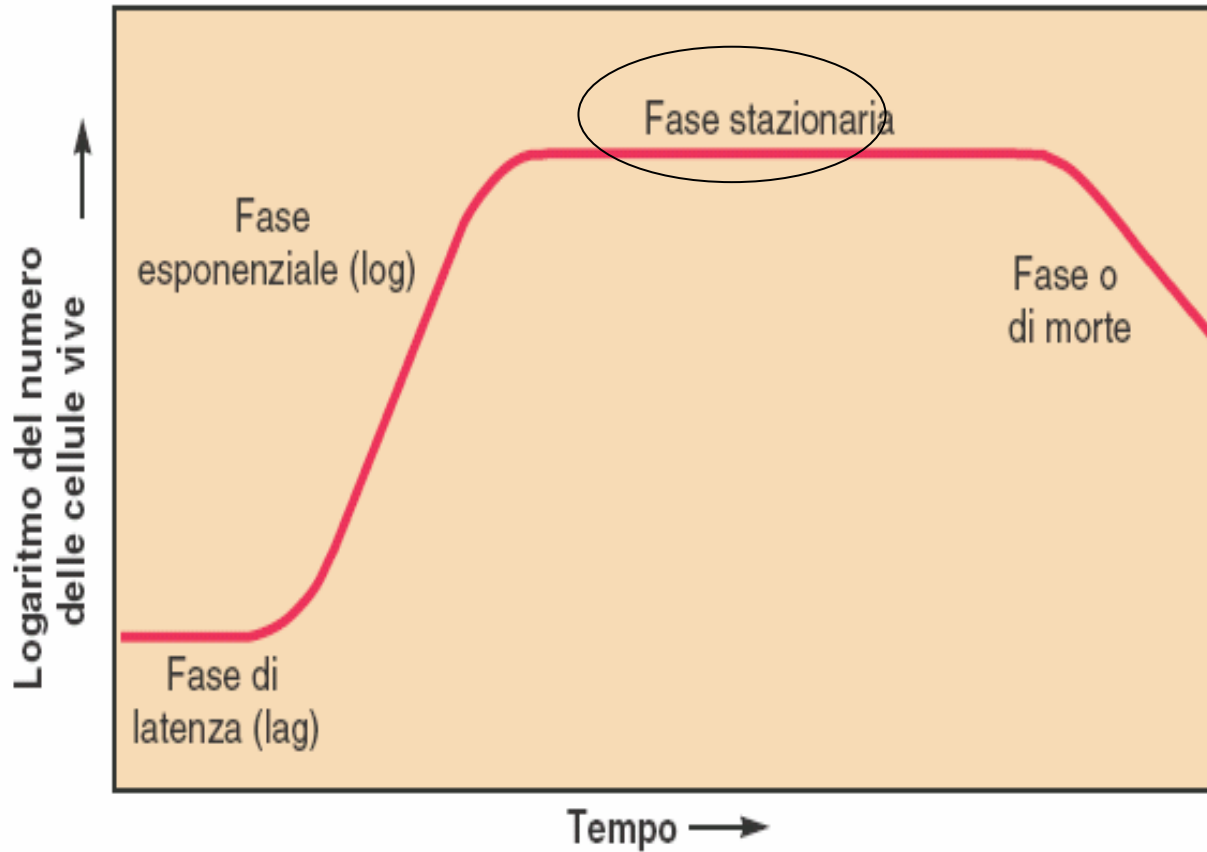
FASE DI LATENZA

- Fase di adattamento alle condizioni di crescita (temperatura, terreno di coltura)
- N° di cellule costante nel tempo
- Durata variabile



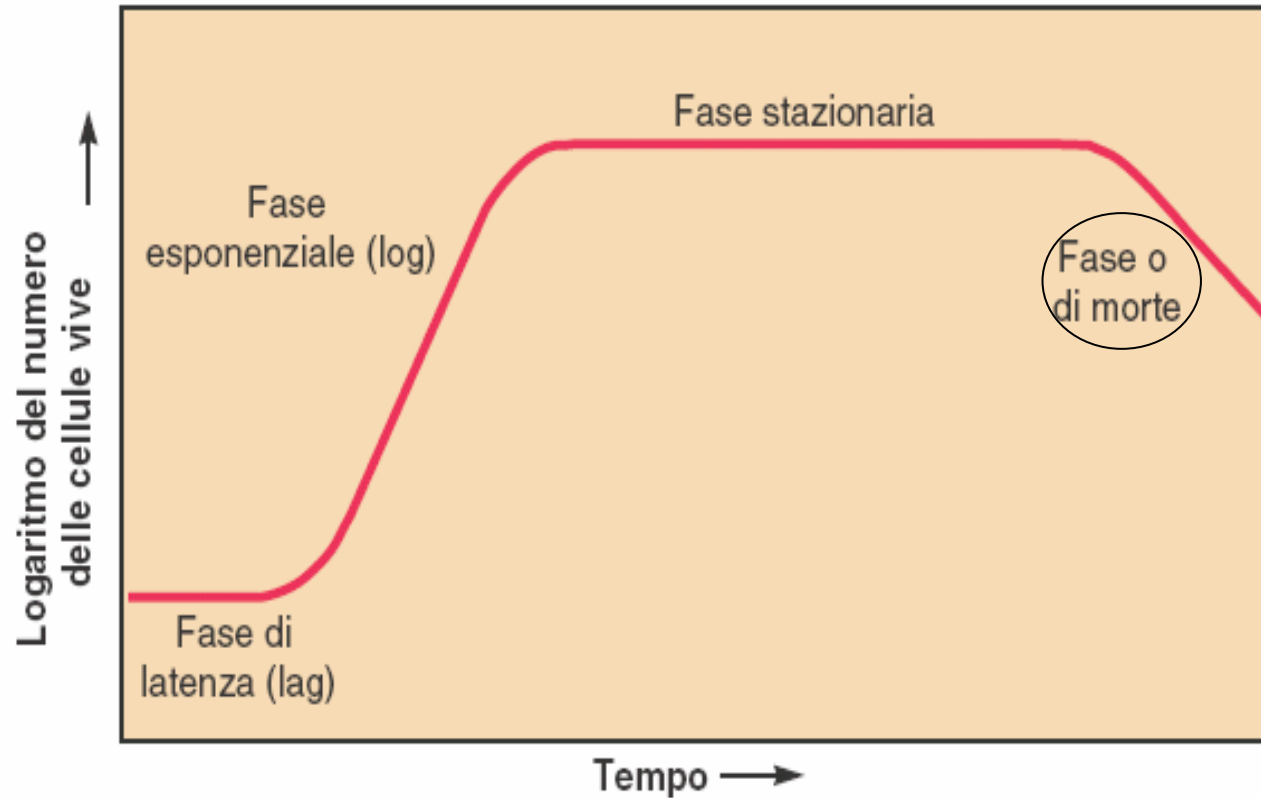
FASE ESPONENZIALE (o LOGARITMICA)

- fase di duplicazione cellulare in cui la velocità di crescita è costante e dipendente dalle condizioni di crescita
- N di cellule aumenta nel tempo e tutte le cellule impiegano lo stesso tempo per duplicarsi
- tempo di generazione è variabile e dipendente dalla specie batterica e/o condizioni di crescita)



FASE STAZIONARIA

- Interruzione della crescita, N° di cellule costante nel tempo
- equilibrio tra divisione cellulare e morte
- accumulo di metaboliti tossici, scarsità di nutrienti



FASE DI MORTE

- diminuzione del numero di cellule vive nel tempo
- andamento in molti casi logaritmico (ogni ora muore una percentuale costante di cellule)
- accumulo di metaboliti tossici, scarsità di nutrienti