

Analisi di comunità microbiche con metodi colturali

Anche se 99% delle specie non è coltivabile in laboratorio, la tecnica più potente per lo studio di un microrganismo è quella di riuscire ad isolare microrganismi da campioni naturali direttamente o in seguito ad arricchimento.

La strategia della coltura di arricchimento si basa sulla possibilità di riprodurre le condizioni ambientali e le risorse presenti in una determinata nicchia ecologica.

Qual è il principio di una coltura di arricchimento?

Scegliere un terreno di coltura e delle condizioni che

- siano selettive per l'organismo di interesse
- in grado di contrastare la crescita di altri microrganismi

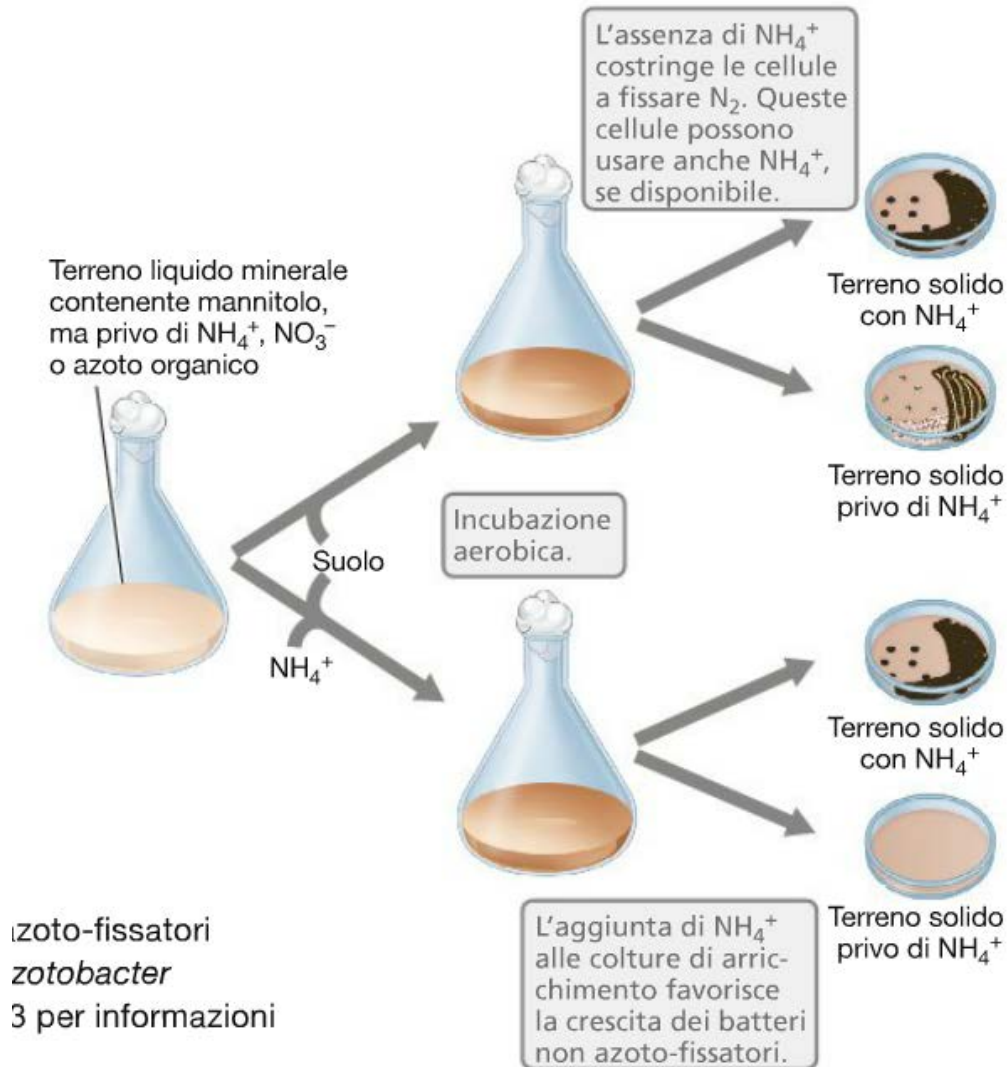
Fare in modo di riprodurre il più possibile, in termine di parametri ambientali (pH, temperatura, osmolarità) e di condizioni nutritive quelle presenti nella nicchia ecologica

Si parte sempre da un inoculo da una matrice (**suolo**, **acqua**, **sedimento**) che contenga il microrganismo da analizzare

Alcuni esempi di terreni di arricchimento

<i>Condizioni di incubazione</i>	<i>Organismi arricchiti</i>	<i>Inoculo</i>
Incubazione in aerobiosi		
N ₂ come fonte di azoto	Cianobatteri	Acqua di lago o di stagno; fanghi ricchi di solfuri; acqua stagnante; acque di scarico; lettiera di foglie umide in decomposizione; suolo umido esposto alla luce
NO ₃ ⁻ come fonte di azoto, 55 °C	Cianobatteri termofili	Ammassi microbici stratificati presso sorgenti geotermiche
Incubazione in anaerobiosi		
H ₂ o acidi organici; N ₂ come unica fonte di azoto	Batteri rossi non sulfurei, eliobatteri	Come sopra e inoltre acqua di ipolimnio lacustre (↔ Paragrafo 19.8); suolo pastorizzato (eliobatteri); ammassi microbici stratificati da sorgenti geotermiche per le specie termofile
H ₂ S come donatore di elettroni	Batteri sulfurei rossi e verdi	
Fe ²⁺ , NO ₂ ⁻ come donatore di elettroni	Batteri rossi	

L'isolamento di *Azotobacter*



zoto-fissatori
zotobacter
3 per informazioni

Azotobacter è un batterio azoto fissatore aerobio

Si prepara un terreno privo di azoto in modo da selezionare solo i batteri azotofissatori

Se si aggiunge un composto azotato (ammoniaca, nitrato) si favorisce la crescita di batteri non azotofissatori e quindi non si riuscirà ad isolare *Azotobacter*

Analisi di comunità microbiche con metodi indipendenti dalla coltivazione.

Nell'ambito di ricerche di microbiologia ambientale vi è la necessità di

- Quantificare le cellule presenti in un determinato habitat
- Stabilire l'abbondanza relativa delle diverse specie

Questo studio si basa sulla ricerca di particolari geni presenti tipicamente in una determinata specie e si utilizza in genere

- RNA ribosomiale
- enzimi implicati in specifici processi metabolici

Da specie a comunità

Si può effettuare anche uno studio a livello di comunità globale cercando di ricavare informazioni

- sulla biodiversità
- sulle capacità metaboliche di una comunità microbica valutando non il singolo microrganismo ma l'insieme dei genomi presenti in un habitat.

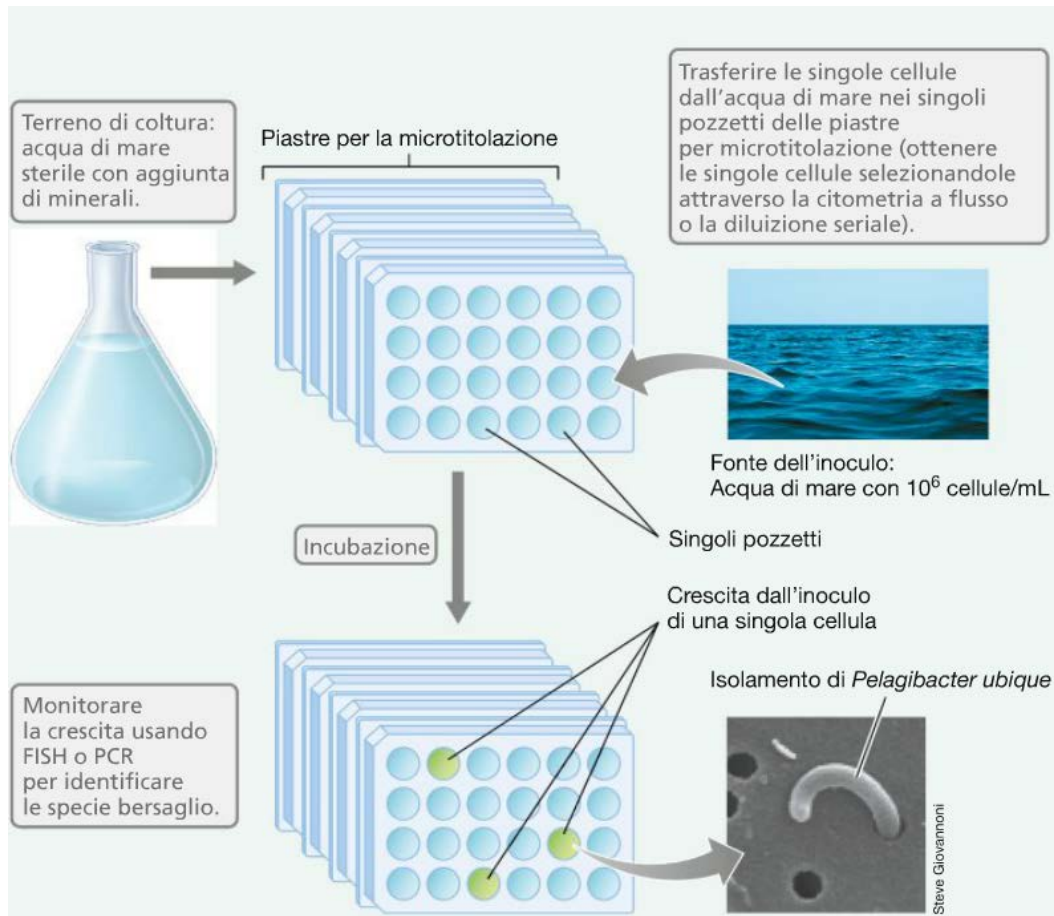
Tabella 18.3 Geni comunemente utilizzati per rilevare specifici processi metabolici in campioni ambientali utilizzando la PCR

<i>Processo metabolico^a</i>	<i>Gene bersaglio</i>	<i>Enzima codificato</i>
Denitrificazione	<i>narG</i>	Nitrato riduttasi
	<i>nirK, nirS</i>	Nitrito riduttasi
	<i>norB</i>	Ossido nitrico riduttasi
	<i>nosZ</i>	Ossido nitroso riduttasi
Fissazione dell'azoto	<i>nifH</i>	Nitrogenasi
Nitrificazione	<i>amoA</i>	Ammonio monossigenasi
Ossidazione del metano	<i>pmoA</i>	Metano monossigenasi
Riduzione del solfato	<i>apsA</i>	Adenosina fosfosolfato riduttasi
	<i>dsrAB</i>	Sulfito riduttasi
Produzione di metano	<i>mcrA</i>	Metil coenzima M riduttasi
Degradazione di componenti del petrolio	<i>nahA</i>	Naftalene diossigenasi
	<i>alkB</i>	Alcano idrossilasi
Fotosintesi anossigenica	<i>pufM</i>	Subunità M del centro di reazione fotosintetico

Per cercare di capire quali funzioni vengano svolte dai microrganismi di un particolare ambiente si può, tramite PCR, cercare di identificare se vi siano presenti alcuni geni caratteristici ed eventualmente sondare la presenza dei trascritti

I metodi high-throughput per l'isolamento di specie batteriche

Per cercare di far crescere un microrganismo nella sua *nicchia realizzata* sono state messe a punto molte combinazioni di fattori nutritivi e ambientali al fine di trovare la combinazione che risponda meglio. Si effettuano varie diluizioni fino ad ottenere la possibilità che vi sia una singola cellula in ogni pozzetto.



Isolamento di ***Pelagibacter ubiquus*** un batterio del plankton marino che prospera in presenza di sostanza organica molto diluita presente in oceano aperto.

Nicchia fondamentale si intendono ambienti in cui una specie si sviluppa in presenza di risorse non limitate

Nicchia realizzata si intendono ambienti naturali in grado di sostenere la crescita di un organismo in presenza di risorse limitate, predazione e competizione

Le colorazioni

Questi metodi forniscono informazioni quantitative sul numero totale di microrganismi presenti in un determinato habitat.

Fluorocromi che legano gli acidi nucleici

I fluorocromi sono coloranti fluorescenti che possono essere utilizzati per evidenziare microrganismi provenienti da qualunque habitat. I fluorocromi che legano il DNA sono ampiamente utilizzati per la quantificazione di microrganismi in campioni ambientali, alimentari e clinici.

I più utilizzati sono

il DAPI

Arancio d'acridina

Syber green I

Questi coloranti si legano al DNA e dopo irraggiamento con radiazioni UV a seconda del loro assorbimento

DAPI	400nm	luce blu
Arancio d'acridina	500nm	luce arancio
SYBER Green I	497nm	luce verde

emettono luce di diversa lunghezza d'onda rendendo le cellule microbiche ben visibili e facilmente contabili

VANTAGGI

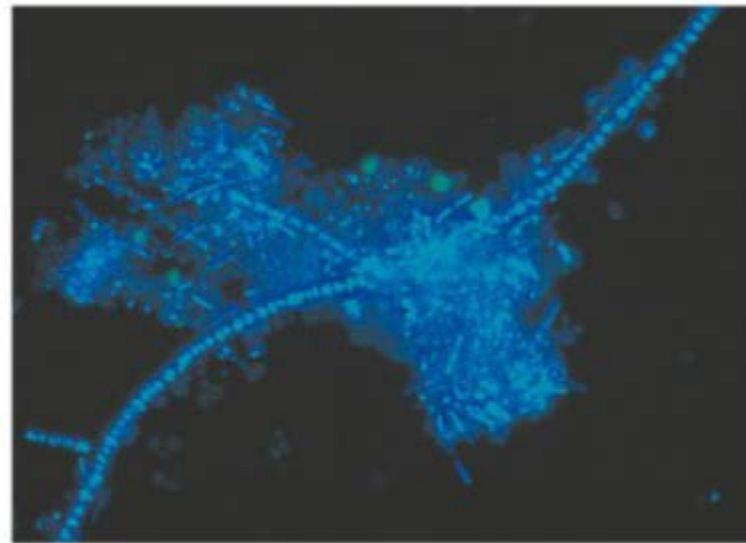
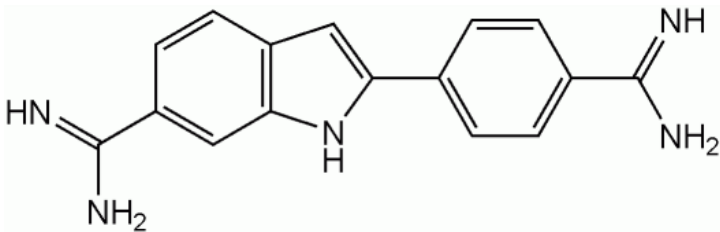
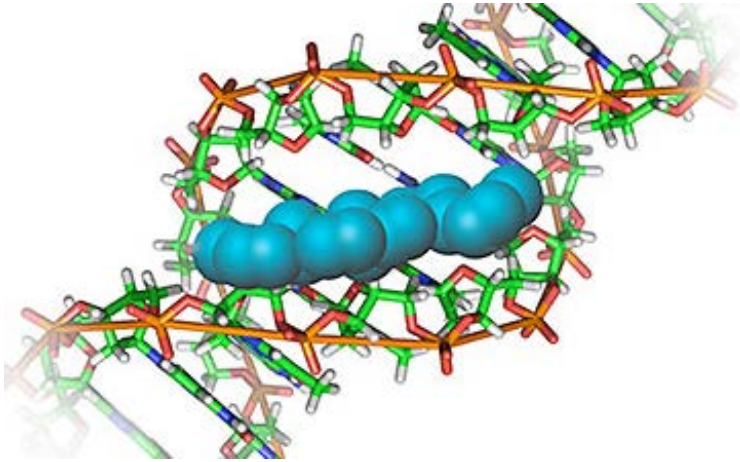
- Non reagiscono con altro materiale inerte quindi sono specifici per cellule
- Forniscono una stima affidabile del numero di cellule presenti
- La colorazione con Syber Green I fornisce dati quantitativi su popolazioni virali acquatiche .
- Nel caso di campioni acquatici permettono di colorare cellule trattenute da filtri

DAPI

Assorbimento nello spettro UV a 358
Emissione a 468

Colorazione blu

Si lega al solco minore del DNA
Regioni ricche in AT

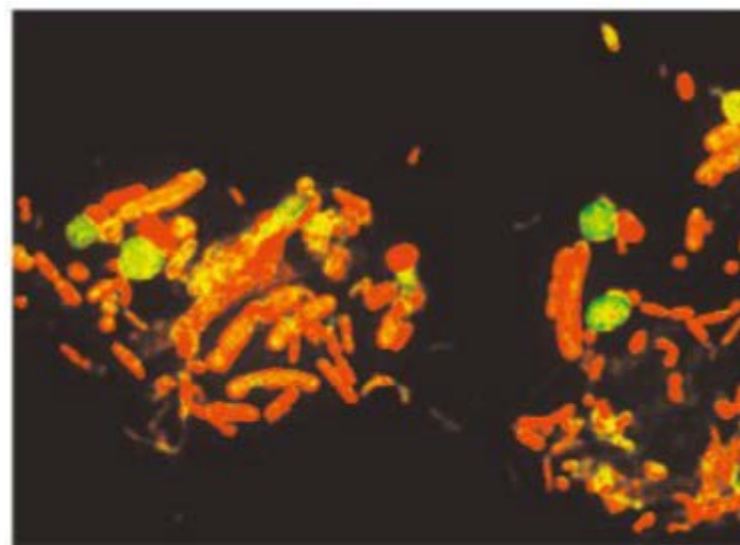
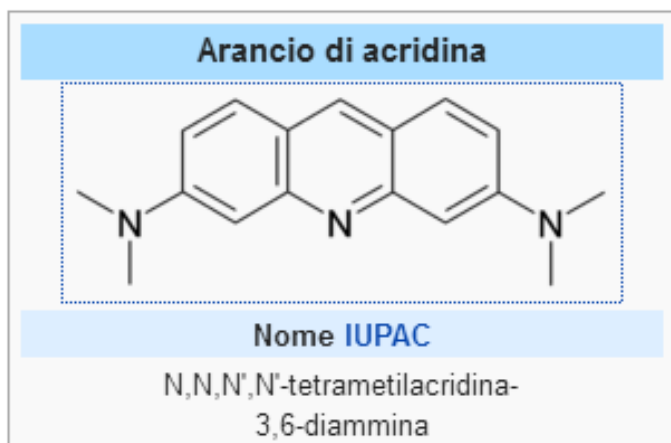


Colorazione con il DAPI di un fango attivo proveniente da un impianto di depurazione di acque reflue urbane

Arancio d'acridina

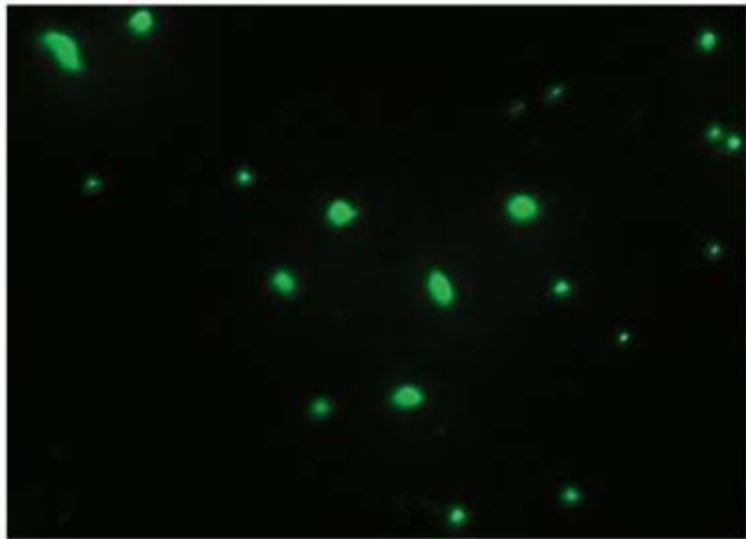
Colorante metacromatico che si lega sia al DNA che al RNA.

In presenza di basse concentrazioni di RNA da colorazione verde,
In presenza di alte concentrazioni di RNA da colorazione arancio



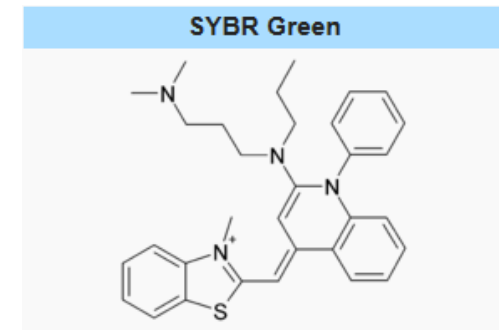
Colorazione con Arancio d'acridina dello stesso campione di fango attivo colorato con DAPI

SYBR Green composto organico aromatico si lega al DNA ds.



Willim Martins-Habenna

(c) Campione di acque superficiali colorato con SYBR green si vedono in verde le cellule batteriche



Il complesso DNA-SYBR assorbe luce blu (488 nm) ed emette luce verde (522nm)

Molto sensibile può essere utilizzato anche per i virus

SVANTAGGI

Si legano a tutte le cellule presenti in un campione in quanto riconoscono il DNA

Il DAPI e l'arancio di acridina non riescono a distinguere tra cellule vive e cellule morte

Non permettono di distinguere specie diverse

Non possono essere usati per valutare la vitalità

Non possono essere usate per rintracciare specie particolari in un campione.

Come si individuano le cellule vitali?

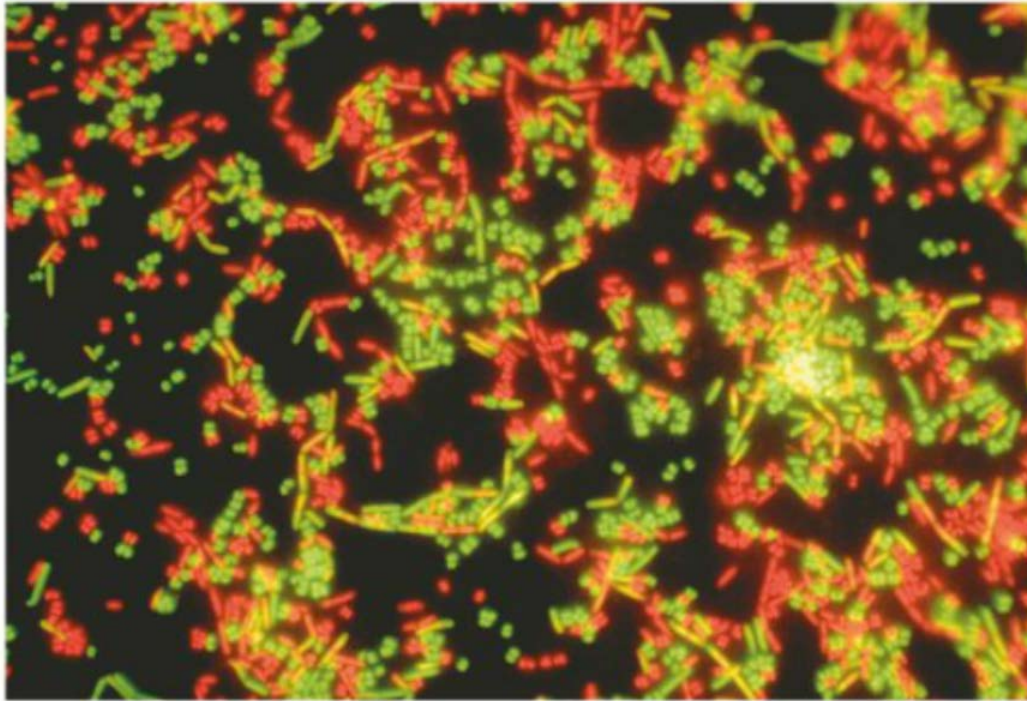
Vi sono tecniche di colorazione specifiche che permettono di differenziare cellule vive e cellule morte.

In questo modo si possono avere contemporaneamente informazioni

- Sul numero di microrganismi presenti in un dato campione
- Sulla vitalità di tali microrganismi

-La colorazione si basa sull'integrità della membrana cellulare.

Al campione vengono aggiunti due coloranti fluorescenti: uno che emette luce verde e uno luce rossa



Molecular Probes, Inc., Eugene, OR

Figura 18.7 Colorazione per individuare cellule vive.

Cellule vive (verdi) e morte (rosse) di *Micrococcus luteus* (cocchi) e di *Bacillus cereus* (bastoncini) colorate con LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Stain.

Il colorante verde penetra in tutte le cellule indipendentemente che siano vive o morte

Il colorante rosso che contiene ioduro di propidio può penetrare solo nelle cellule con la membrana non più integra (morte).

Al microscopio a fluorescenza le cellule vive appariranno quindi di colore verde e quelle morte di colore rosso .

Vantaggi

- Si ha una stima immediata dell'abbondanza e vitalità dei microrganismi nel campione
- Molto utile quando si utilizzano colture di laboratorio

Nel caso di campioni provenienti da ambienti acquatici il campione viene filtrato e il filtro viene sottoposto a colorazione

Molto utilizzato negli studi di microbiologia delle acque per valutare la vitalità di popolazioni microbiche in colonne d'acqua lacustri o oceaniche, fiumi, ruscelli

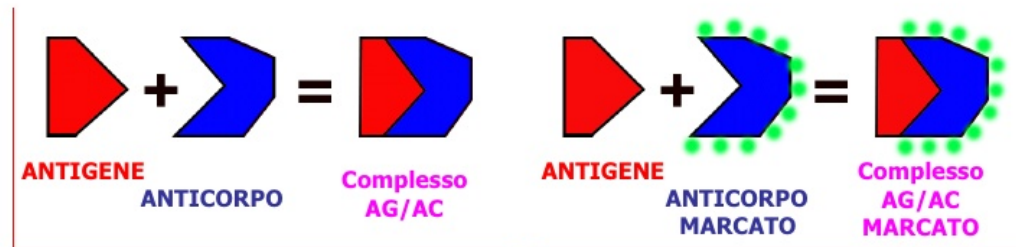
Svantaggi

- Quando si usano campioni provenienti da habitat naturali la doppia colorazione risulta poco adatta perché i materiali inerti presenti nel campione possono interferire.

Anticorpi fluorescenti

L'IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza permette la visualizzazione di **antigeni** mediante **anticorpi** precedentemente marcati con fluorocromi.



Con la marcatura, all'anticorpo viene legato un fluorocromo, quindi l'anticorpo marcato reagendo con l'antigene specifico, lo renderà visibile in fluorescenza.

E' possibile rendere più specifiche le tecniche di colorazione utilizzando degli anticorpi fluorescenti.

Gli anticorpi sono in grado di riconoscere strutture superficiali di un determinato tipo di cellule. Vista l'elevata specificità può venir utilizzato per rintracciare un determinato microrganismo in un habitat complesso contenente molti microrganismi come il suolo o campioni clinici. Richiede la preparazione di anticorpi specifici. Molto utilizzato nella diagnosi clinica

Uso della GFP Green Fluorescent Protein

Invece di utilizzare anticorpi fluorescenti le cellule batteriche possono essere trattate in modo da diventare auto-fluorescenti.

In questo caso viene utilizzata la GFP (Green Fluorescence Protein) il cui gene può essere inserito tramite appositi vettori plasmidici all'interno delle cellule batteriche.

Quando può venir usata questa tecnica?

Non è adatta allo studio di comunità microbiche ma si può utilizzare per seguire un microrganismo in un determinato ambiente, per esempio le radici di una pianta.

Utilizzando questo metodo si possono effettuare studi di competizione per vedere gli effetti del microrganismo marcato con GFP sulle comunità microbiche autoctone di un determinato ambiente.

La marcatura con GFP viene ampiamente utilizzata anche per studiare le associazioni simbiotiche tra microrganismi e piante o animali. La GFP richiede ambienti aerobici perché la fluorescenza dipende dalla presenza di O₂ molecolare.

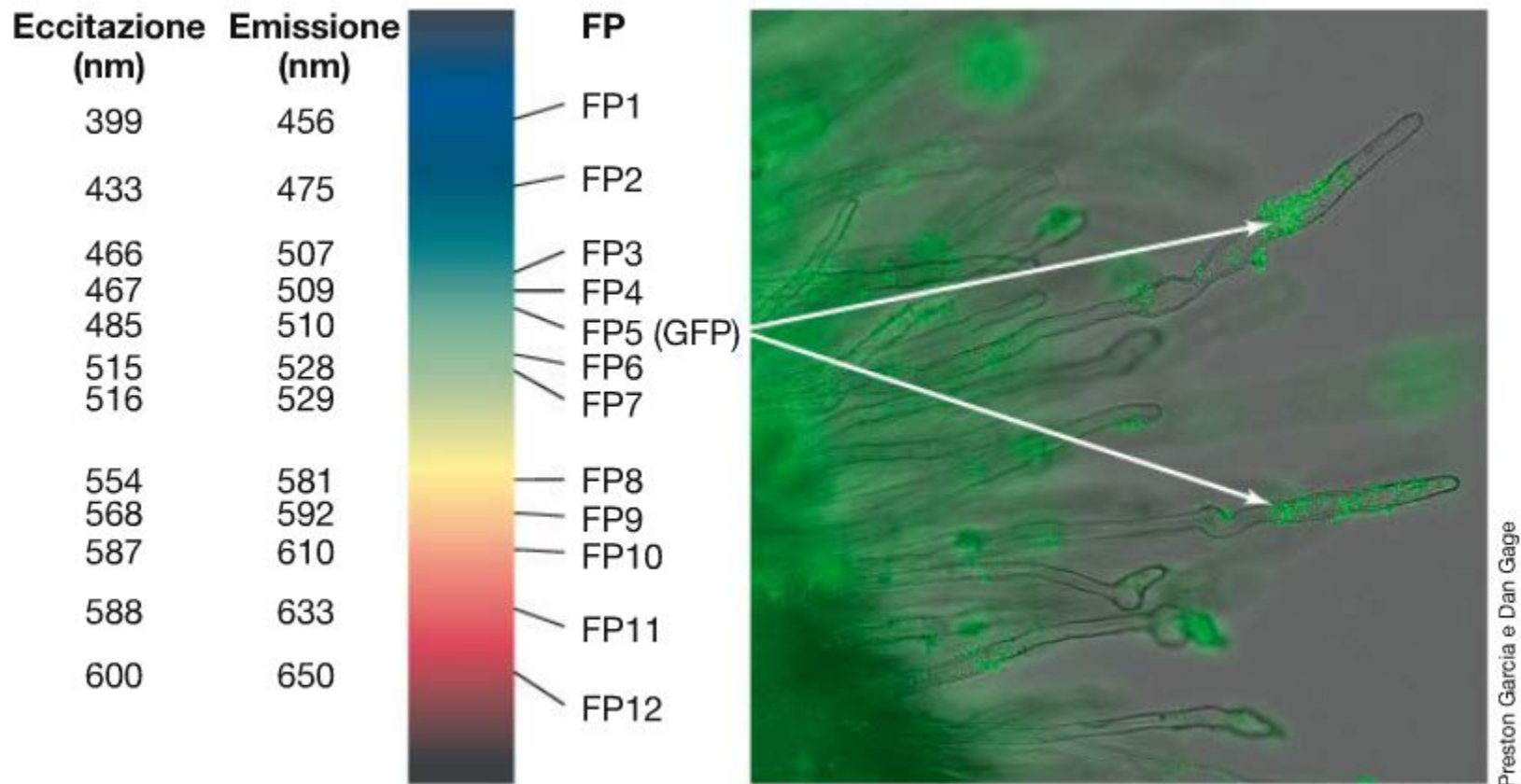
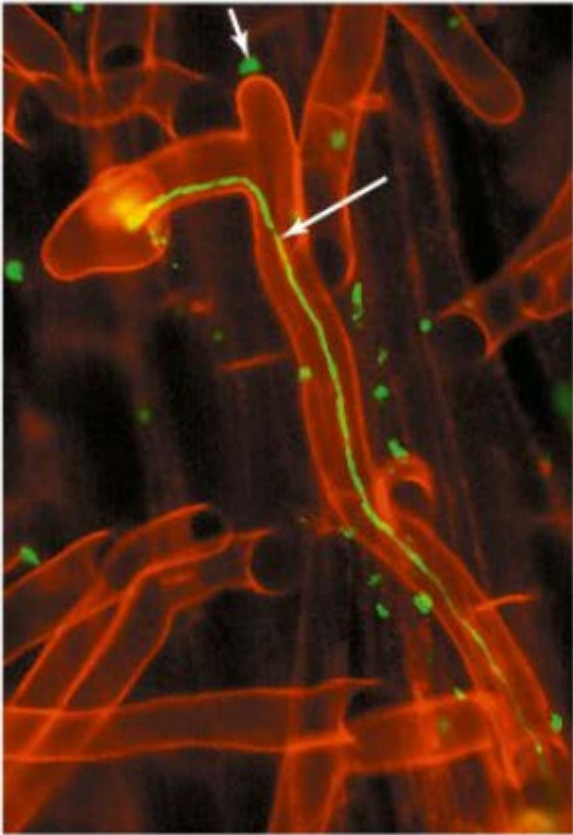


Figura 18.8 **Proteine fluorescenti reporter.** (a) Si conoscono dodici diverse proteine fluorescenti (FP1-FP12), con differenti proprietà di emissione ed eccitazione. (b) Cellule di *Sinorhizobium meliloti* (frecce) che recano un plasmide

contenente un promotore inducibile da un alfa-galattoside fuso alla GFP (FP5): le cellule si trovano sulla radice di un germoglio di trifoglio. La fluorescenza verde indica che sono stati secreti e resi disponibili per la crescita del batterio alfa-galattosidi.



Preston Garcia e Dan Gage

(c)

galattosidi. **(c)** Cellule di *S. meliloti* (freccia) che recano un plasmide con un promotore inducibile da succinato fuso alla GFP. La fluorescenza verde indica che i peli radicali della pianta hanno rilasciato succinato o altri acidi carbossilici C₄.