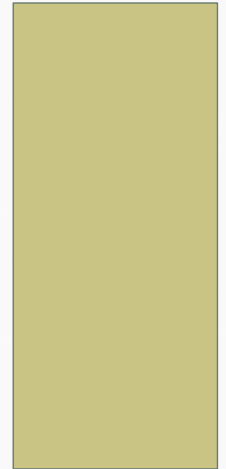


# LEZIONI DI MICROBIOLOGIA

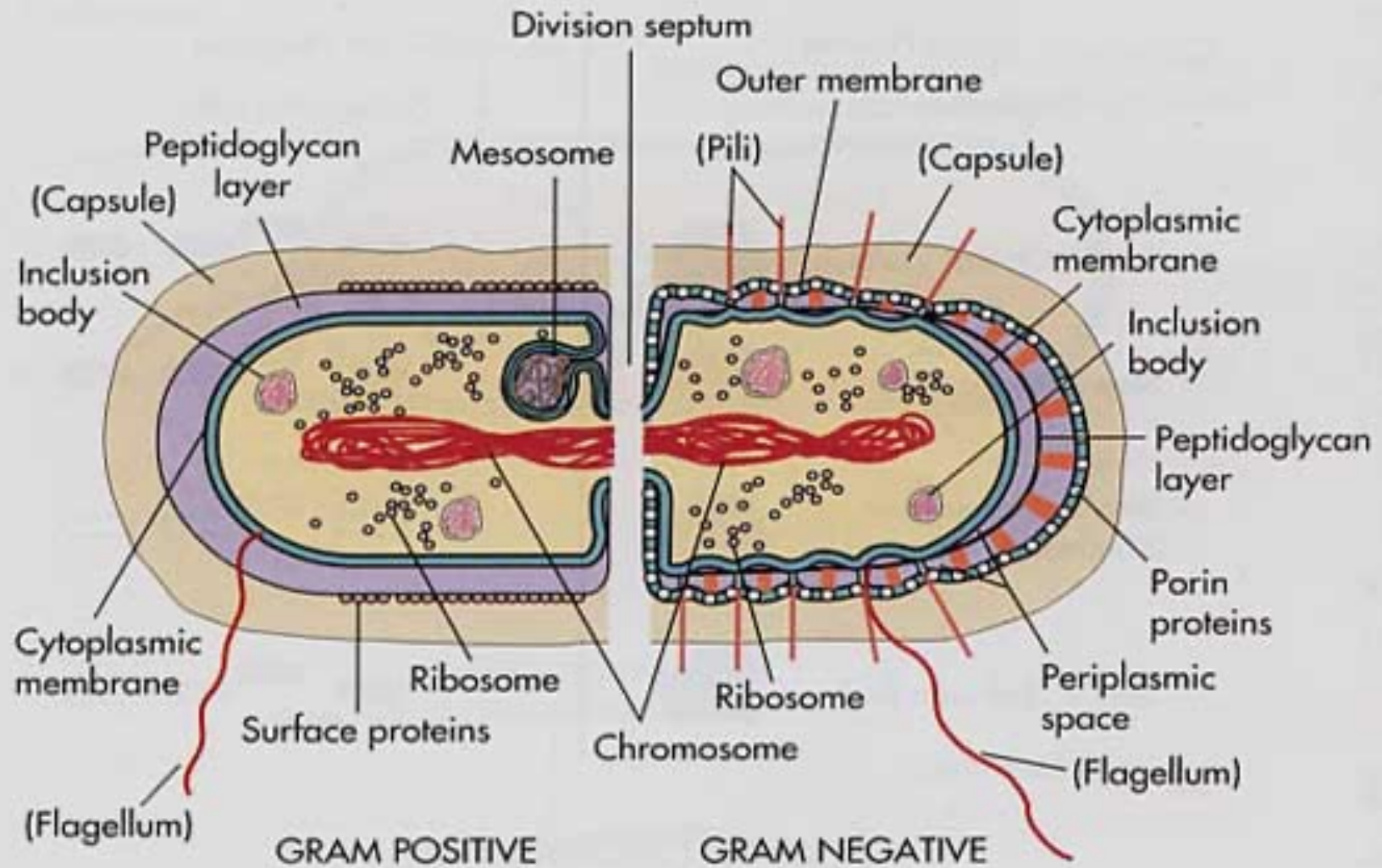
INVOLUCRO E INCLUSIONI E ORGANULI

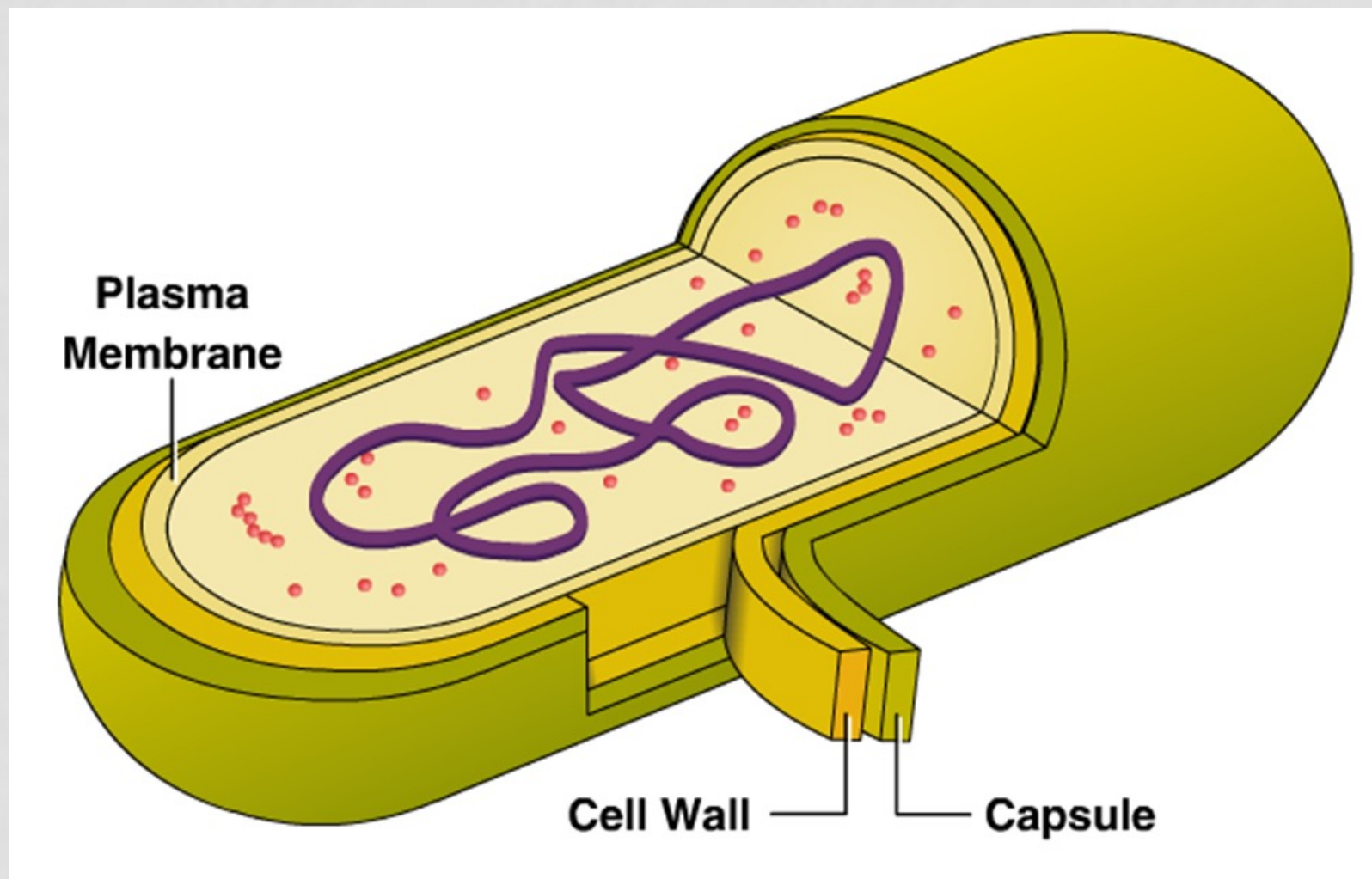


## I GRAM VARIABILI

- *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Propionibacterium* sono batteri Gram positivi che risultano positivi alla colorazione di Gram a seconda della fase di crescita.

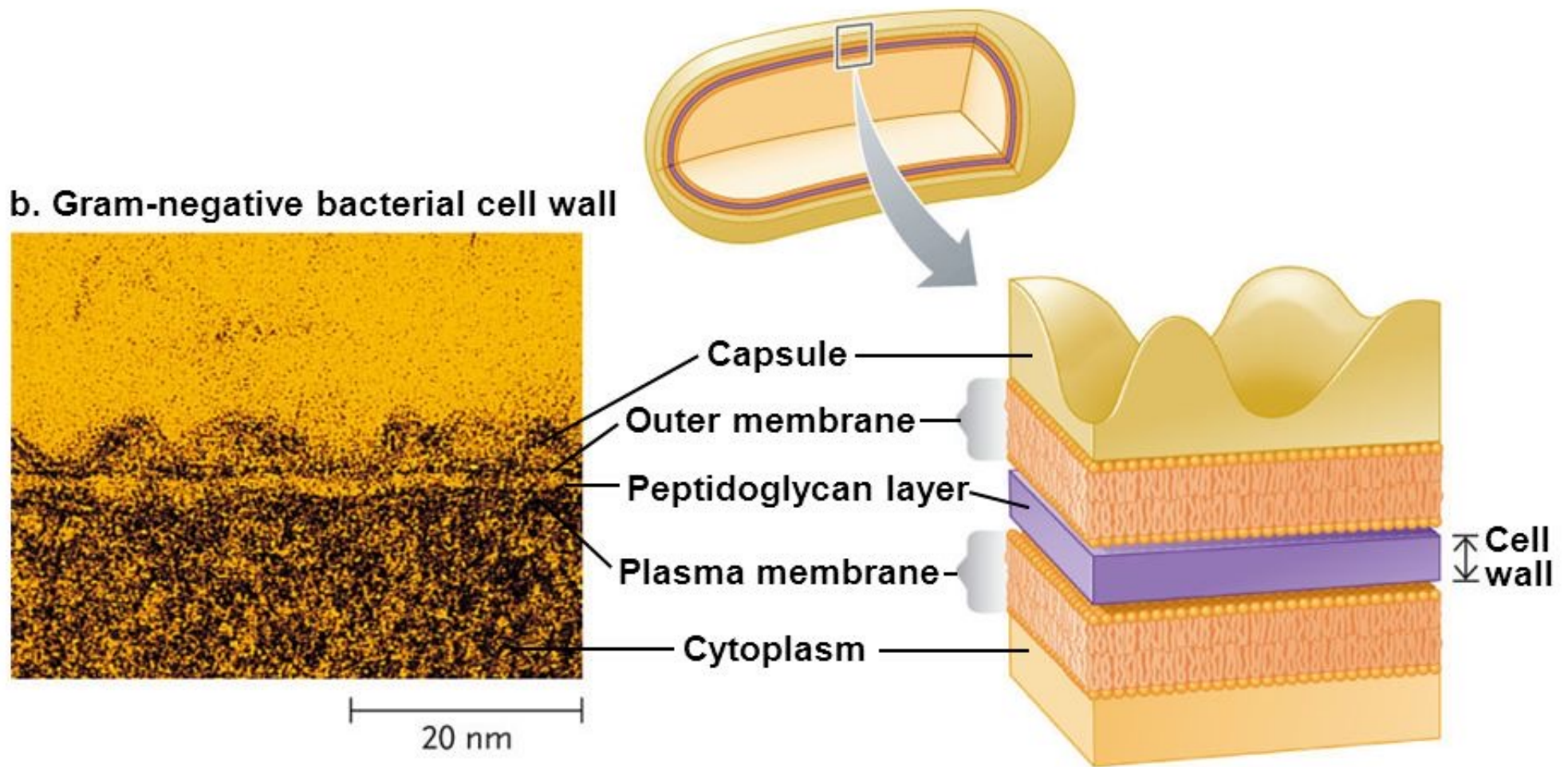
# La capsula: struttura e funzione





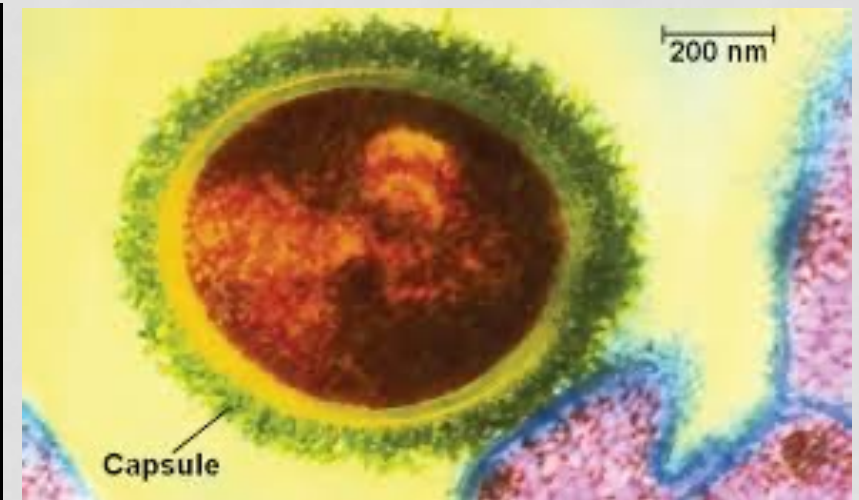
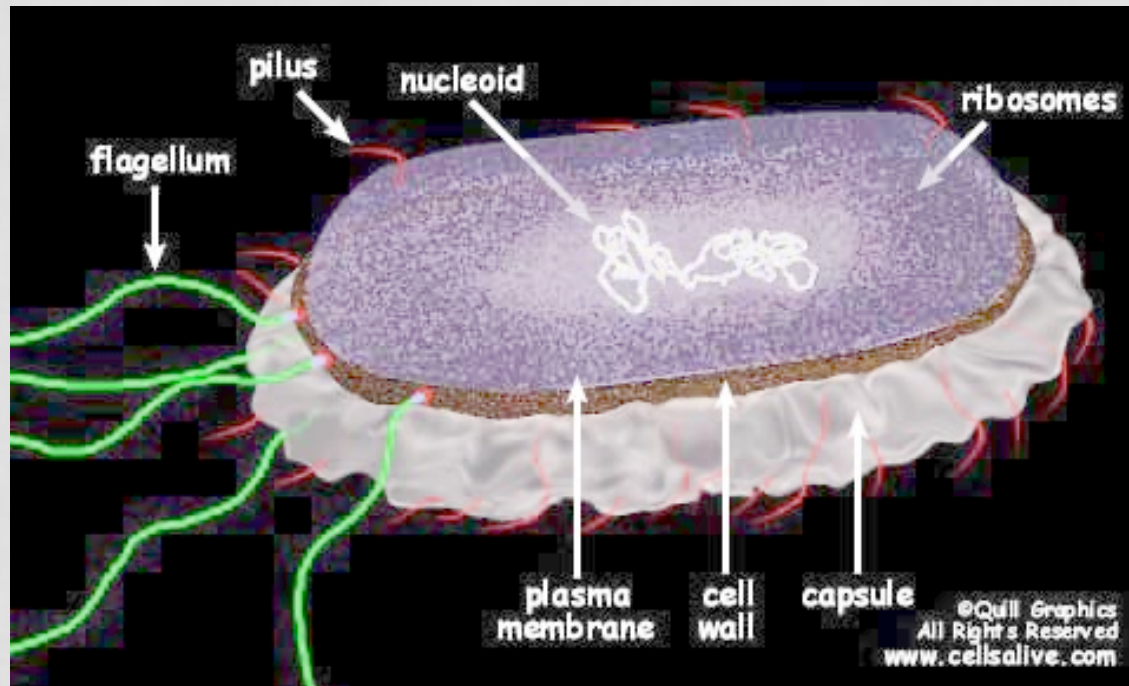


**b. Gram-negative bacterial cell wall**



© Thomson Higher Education

# LA CAPSULA



## Alcuni esempi di batteri dotati di capsula

***Streptococcus pneumoniae*: agente di polmonite, meningite, otite**

***Haemophilus influenzae* di tipo b: agente di meningite, otite, sinusite**

***Neisseria meningitidis*: agente di meningite, meningoencefalite,  
polmonite**

***Bordetella pertussis*: agente della pertosse catarrale e parossistica**

***Bacillus anthracis*: agente dell' antrace cutaneo, polmonare,  
gastrointestinale**

Le capsule proteggono i batteri . . .

. . dall'assemblamento di protozoi nocivi  
o da globuli bianchi (fagociti)

. . . dall'attacco di agenti antimicrobici  
di origine vegetale o animale

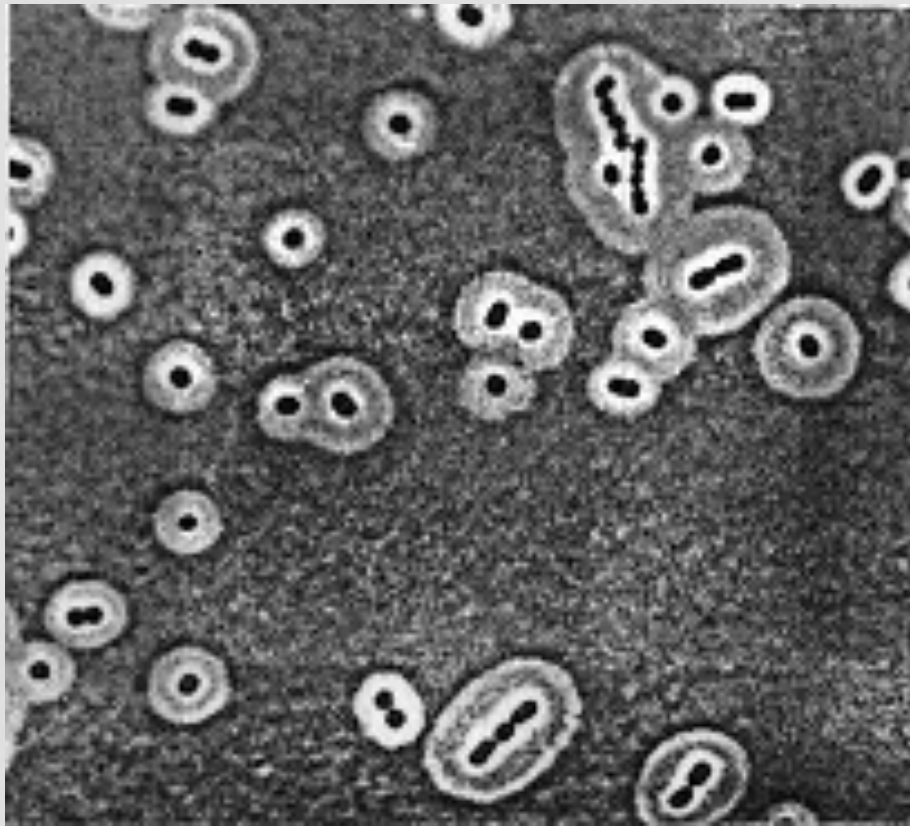
. . . in alcuni tipi di suolo, dagli effetti  
a lungo termine della disidratazione  
o dell'essiccamento



Le CAPSULE - La maggior parte dei procari contiene uno strato di polisaccaridi al di fuori del polimero della parete cellulare o degli LPS.

Generalmente questo strato è chiamato 'capsula'.

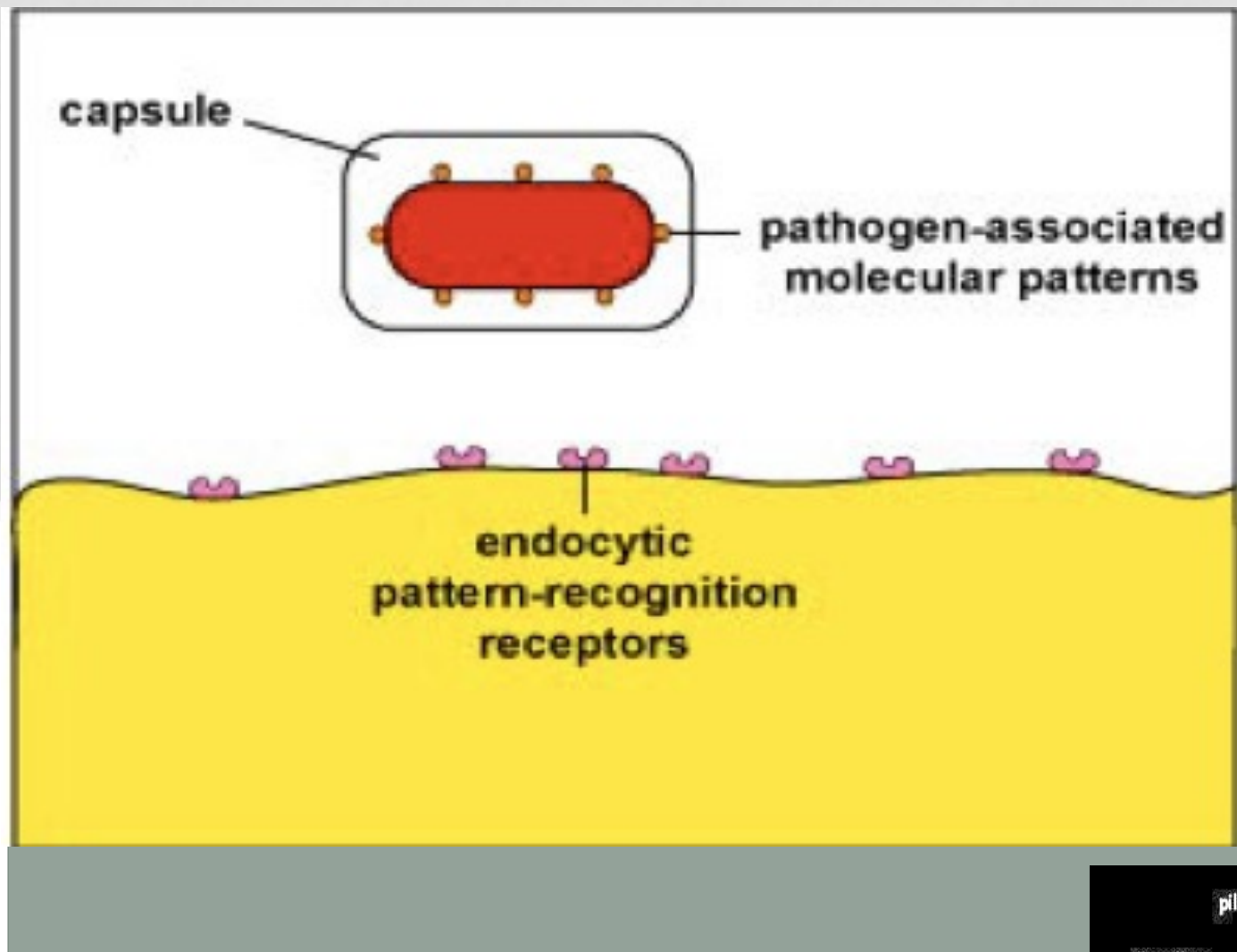
Una vera capsula è uno strato di polisaccaridi consistente e visibile depositato al di fuori della parete cellulare



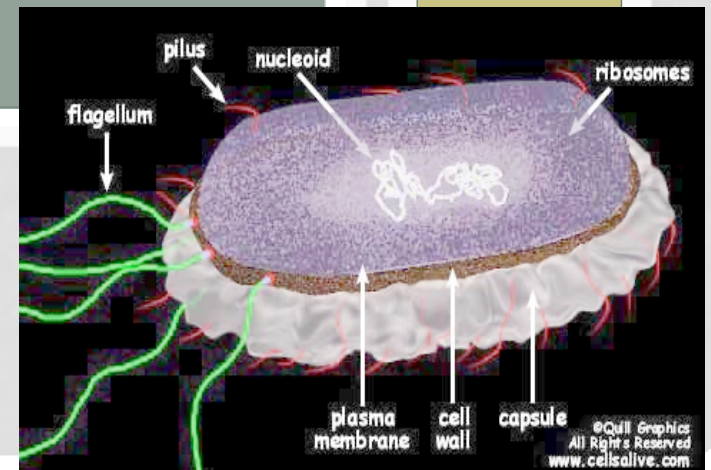
Capsule batteriche, evidenziate con colorazione India ink, viste al microscopio ottico.



L'aspetto mucoso delle colonie batteriche è generalmente indice della produzione di capsula. Tale struttura è un determinante di virulenza essenziale per il batterio nelle fasi iniziali di colonizzazione ed infezione, poiché lo protegge dall'assalto del sistema immunitario e dei fagociti.



La capsula impedisce il riconoscimento da parte del sistema immunitario





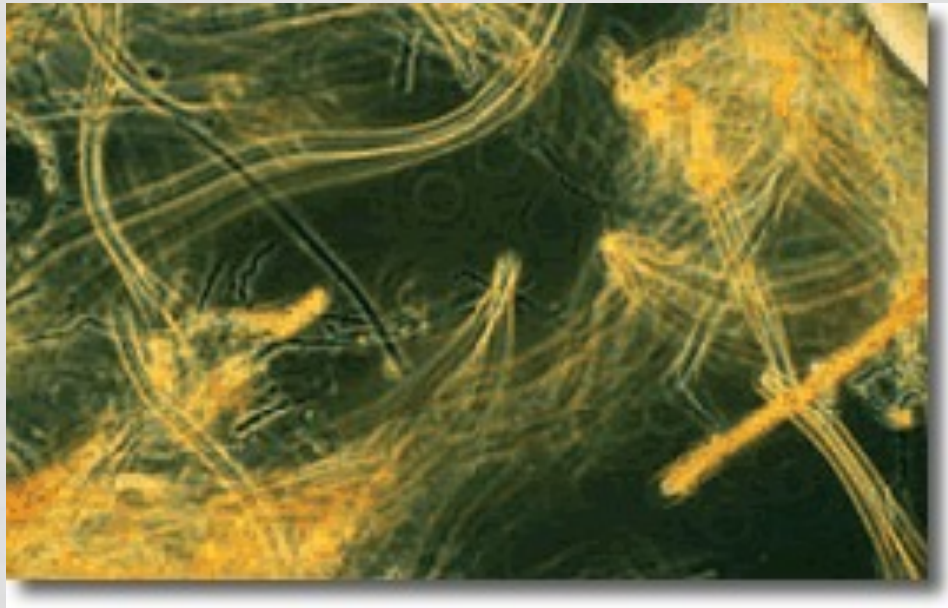
**Tabella 2.4** Composizione chimica di alcune capsule batteriche.

BATTERIO	COMPOSIZIONE DELLE CAPSULE	MONOMERI
<b>Gram positivi</b>		
<i>Bacillus anthracis</i>	Polipeptidi (acido poliglutamico)	Acido D-glutamico
<i>Bacillus megaterium</i>	Polipeptidi e polisaccaridi	Acido D-glutamico, aminozuccheri, zuccheri
<i>Streptococcus mutans</i>	Polisaccaridi	(Destrano) glucosio
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Polisaccaridi	Zuccheri, aminozuccheri, acido uronico
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Polisaccaridi (acido ialuronico)	N-acetil-glucosamina e acido glucuronico
<b>Gram negativi</b>		
<i>Acetobacter xylinum</i>	Polisaccaridi	(Cellulosa) glucosio
<i>Escherichia coli</i>	Polisaccaridi (acido colanico)	Glucosio, galattosio, fucosio, acido glucuronico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polisaccaridi	Acido mannuronico
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Polisaccaridi	Acido glucuronico
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Polisaccaridi	(Glucano) glucosio

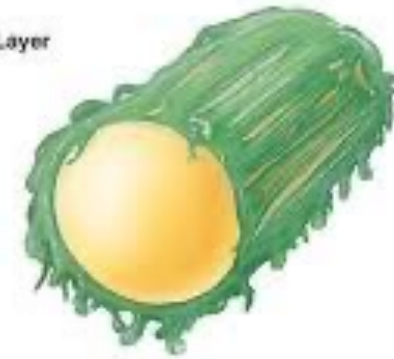


# LO SLIME

- Quando i polisaccaridi di superficie sono rilasciati nell' ambiente o nel mezzo di coltura possiamo parlare di SLIME.
- Per esempio *Leuconostoc mesenteroides*, un batterio lattico che contamina le raffinerie, è in grado di trasformare il saccarosio in destrano all' esterno della cellula tramite l' enzima destran-saccarasi. Questa proprietà può essere sfruttata industrialmente in quanto il destrano è un gelificante.
- Altri esempi sono gli alginati prodotti da *Azotobacter vinelandii*, lo xantano e gli eteroglicani.
- L' esempio più conosciuto è quello della zooglea, degli esopolimeri polisaccaridici, insolubili in acqua, che costituisce una massa gelatinosa e amorfa, presente nelle acque inquinate.



Slime Layer



(a)

Capsule



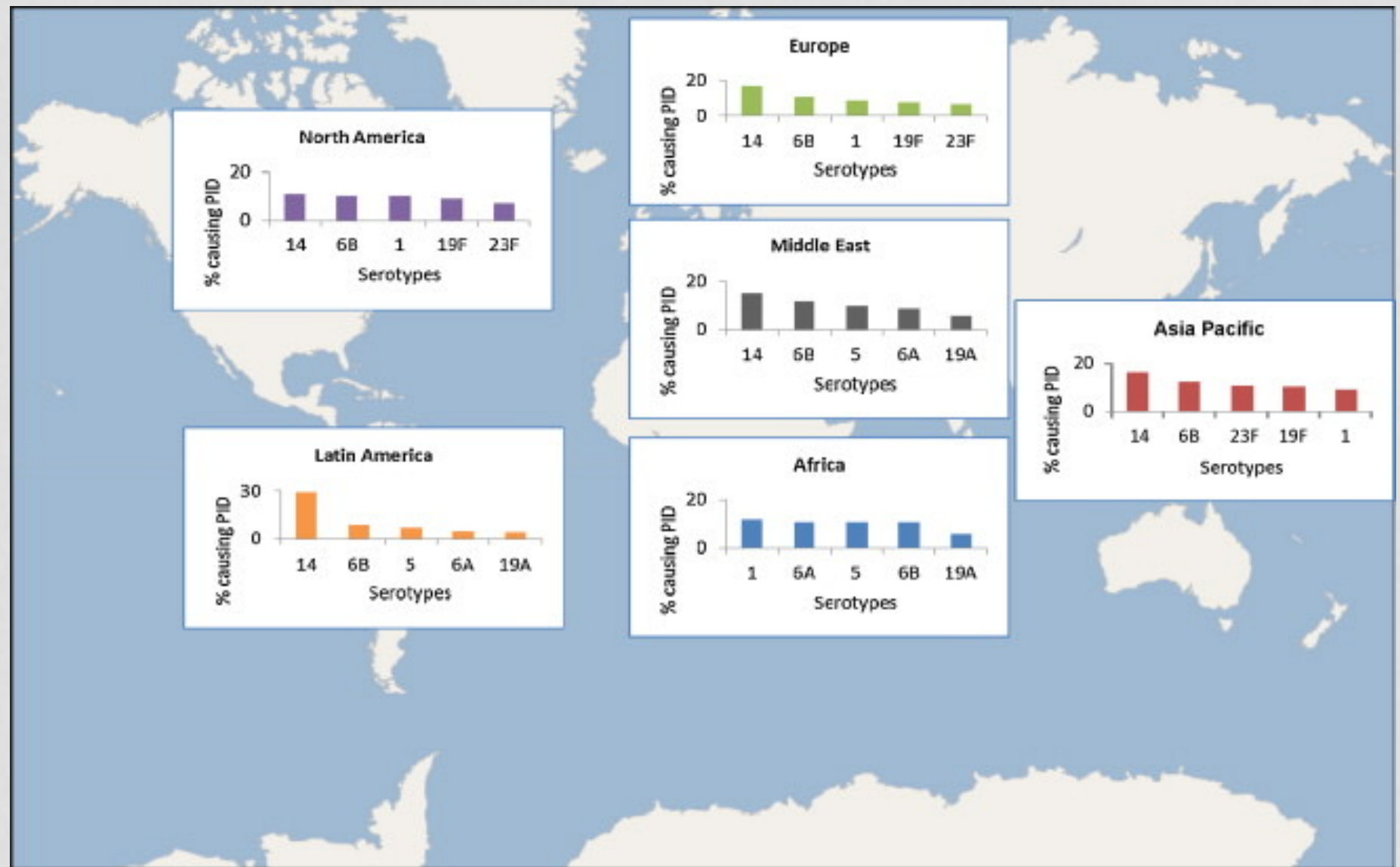
(b)







## *Streptococcus pneumoniae* 90 sierotipi in 47 sierogruppi

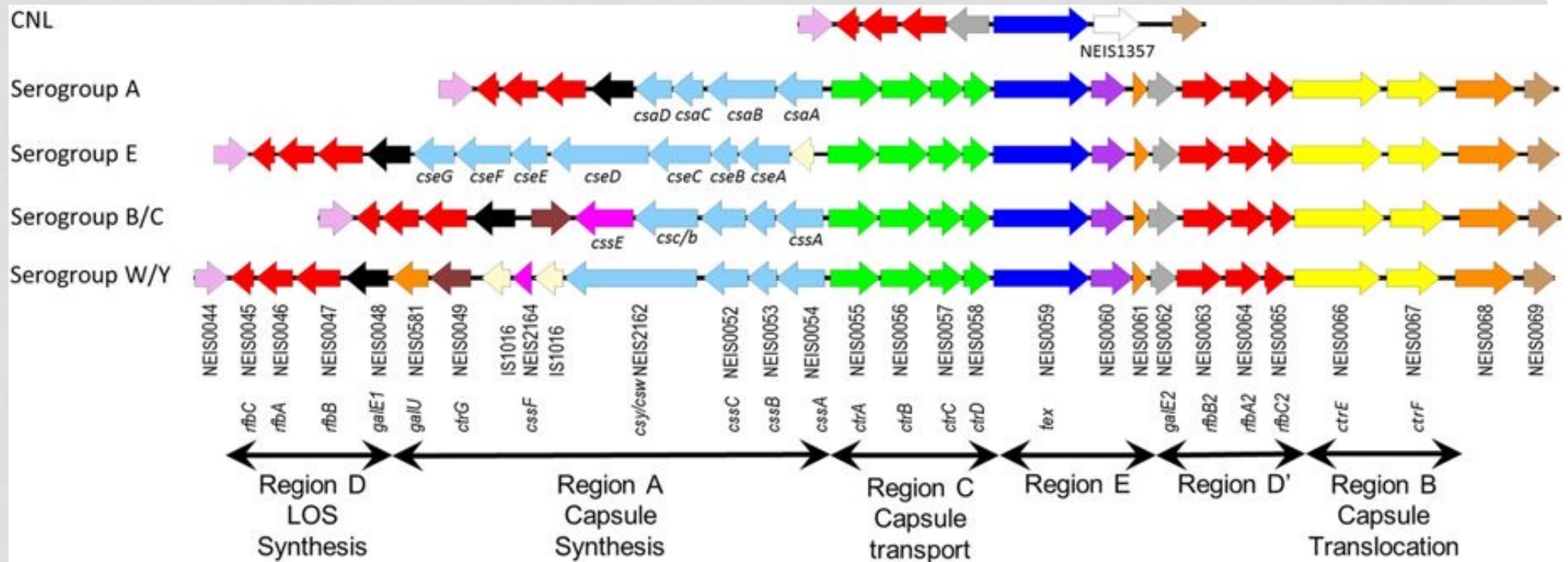




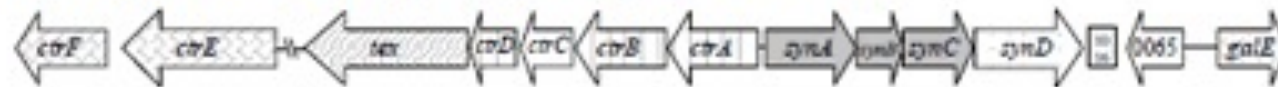
# *Neisseria meningitidis*

13 sierogruppi

Ciascun sierogruppo viene suddiviso in circa 20 sierotipi anche in funzione delle proteine di superficie



*N. meningitidis* Serogroup B [( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 8)-N-acetylneuraminic acid]



*N. meningitidis* Serogroup C [( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 9)-N-acetylneuraminic acid]



*N. meningitidis* Serogroup Y [6-D-Glc ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylneuraminic acid ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6)]



*N. meningitidis* Serogroup W135 [6-D-Gal ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylneuraminic acid ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6)]



*N. meningitidis* Serogroup A [( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate]



*N. meningitidis* Serogroup X [( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine-1-phosphate]



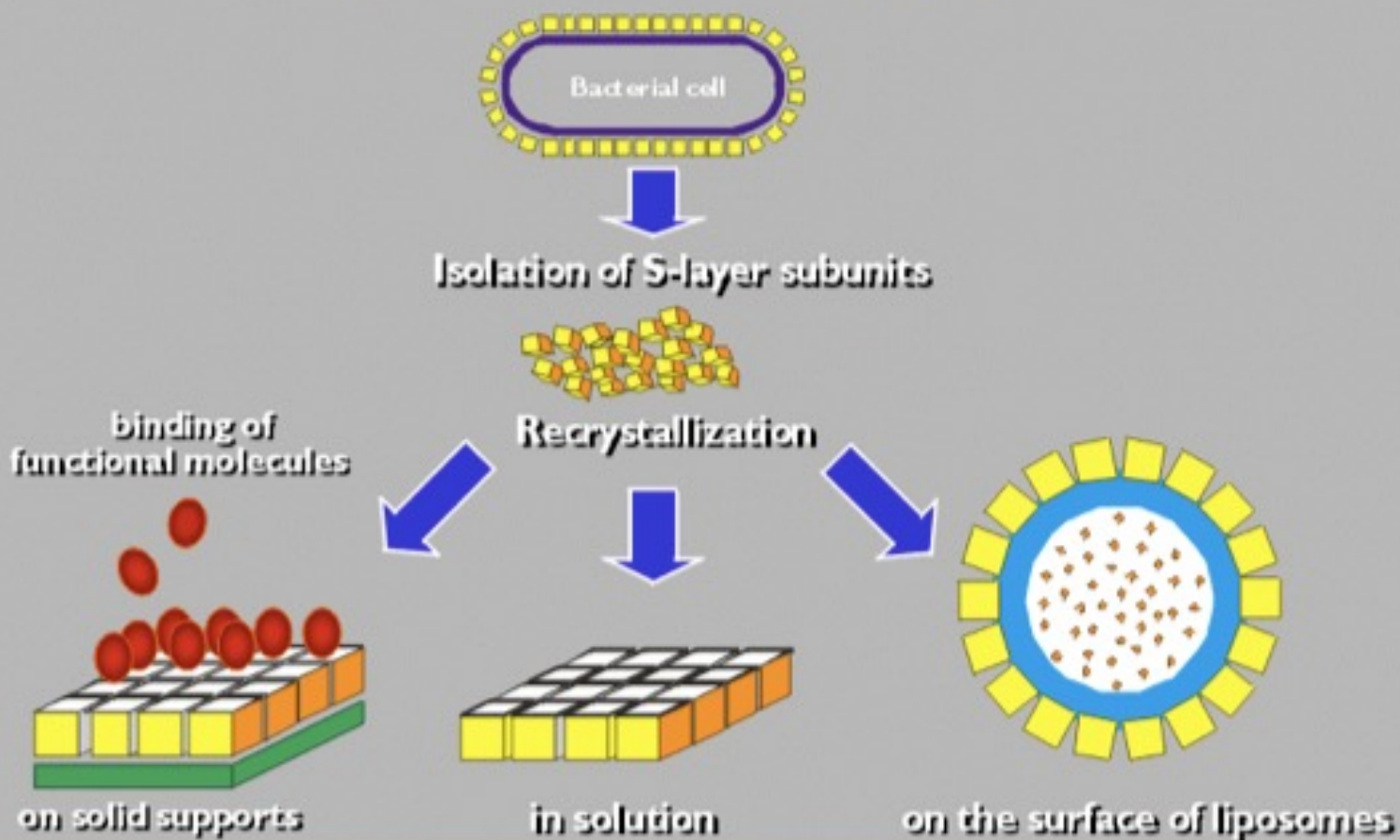
*N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, and some nongroupable *N. meningitidis*



# LO STRATO S

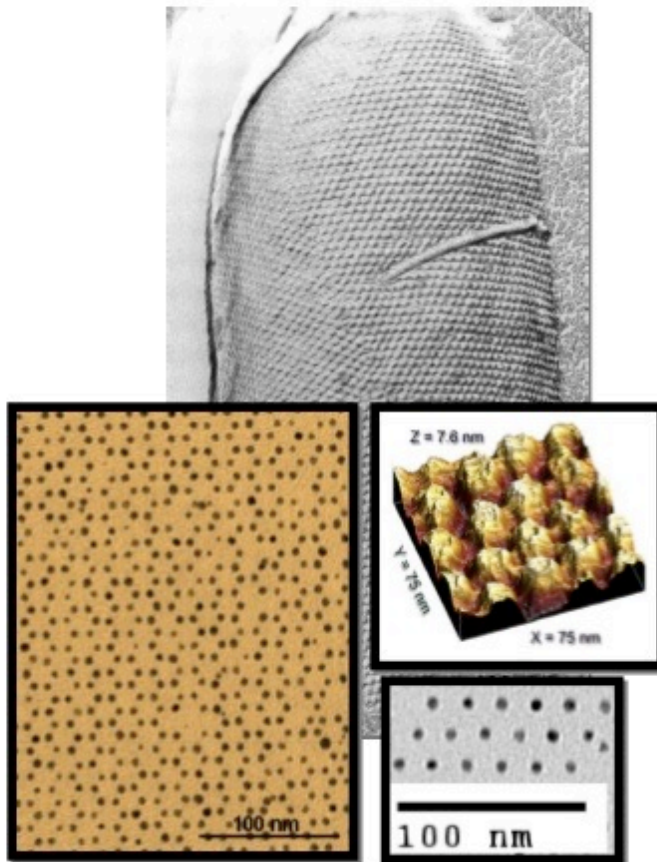
- E' uno strato superficiale a struttura cristallina composto da proteine o glicoproteine.
- Ha la caratteristica di essere costituito da unità che formano simmetrie esagonali, tetragonali o trimeriche.
- La funzione proposta è quella di agire come barriera esterna di permeabilità, consentendo il passaggio di molecole di dimensioni compatibili con il volume delle maglie (che possono variare da 3 a 35 nm)

# S-Layer Self-Assembly System

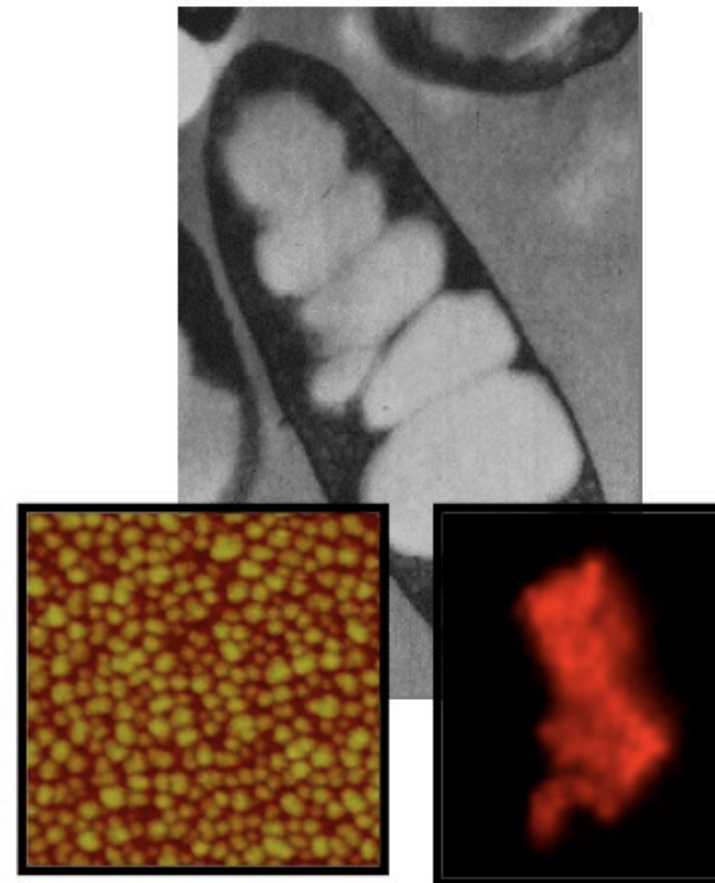




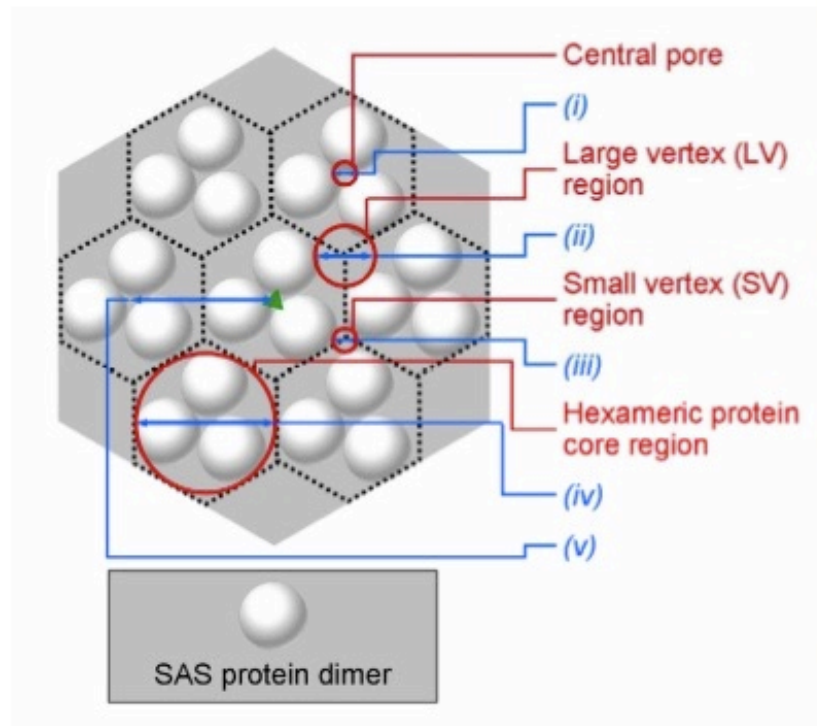
## Bacterial S-layer Proteins



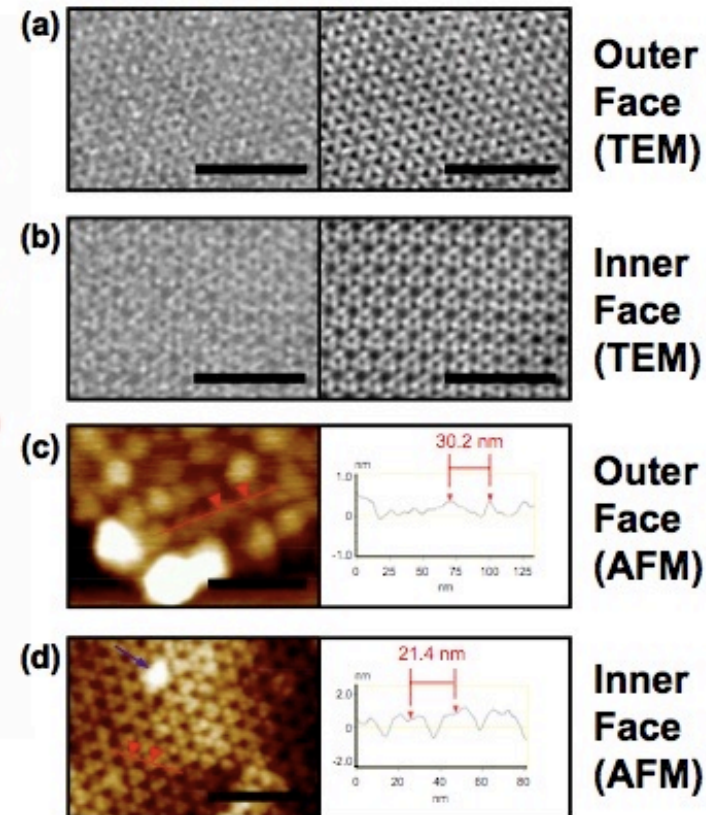
## Bacterial Polyester



# Morphology of the *Sulfolobus acidocaldarius* S-layer (SAS)



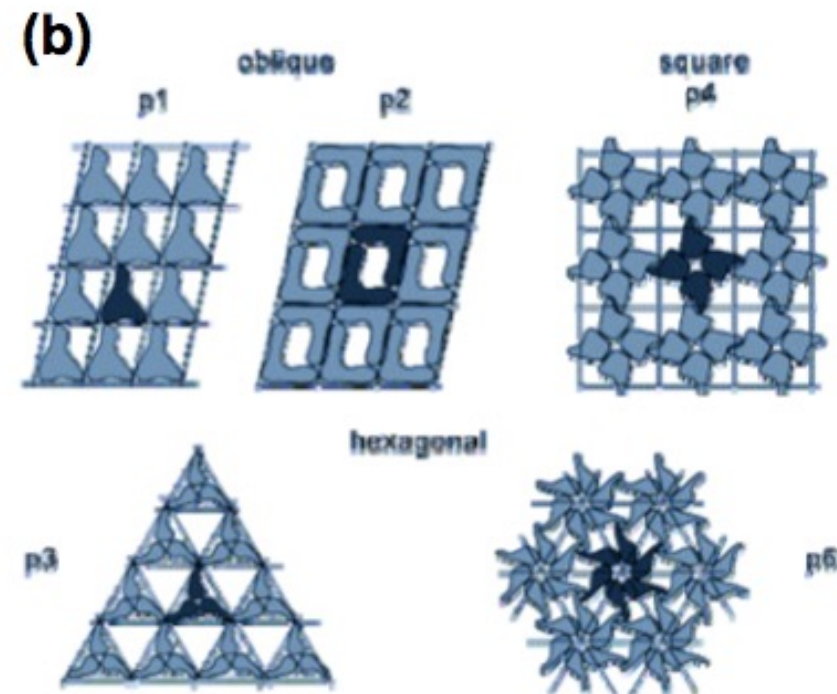
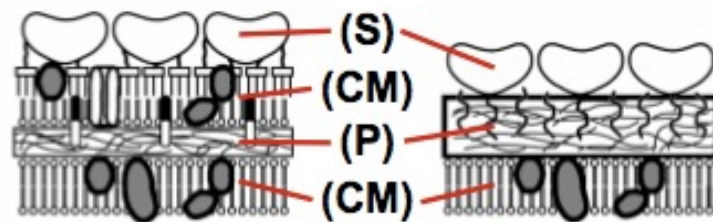
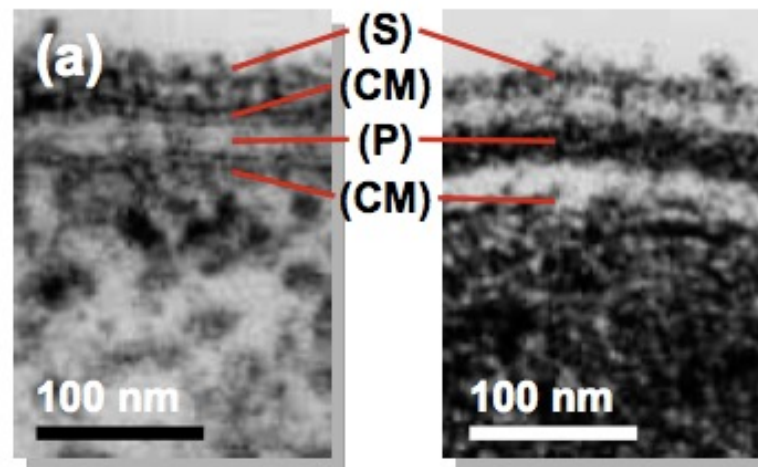
Scale Bars = 100 nm



- Le proteine dello strato S sono proteine debolmente acide, solubili in acqua.
- La composizione presenta acido aspartico, lisina, e aminoacidi idrofobi.
- Molto spesso queste proteine sono legate a glicani (glicoproteine)
- Questi glicani sono composti da unità ripetute di zuccheri che compongono una struttura che sporge nell' ambiente.
- Il grado di glicosilazione dipende da vari fattori: le proteine dello strato S devono venire sintetizzate e trasportate attraverso la membrana mediante un processo dipendente dal sistema SEC.



# Surface Layer (S-Layer) Proteins

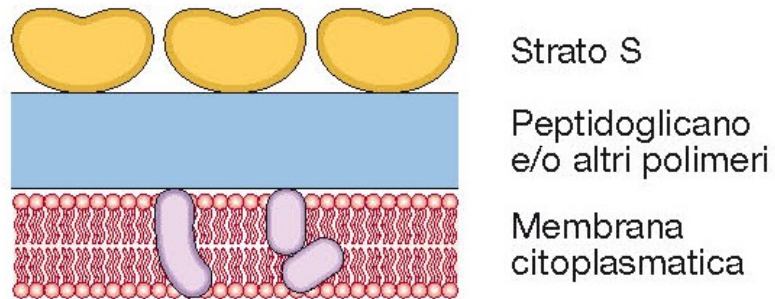


**(a)** Comparison of Gram-negative (left) and Gram-positive (right) cell wall structures. **(S)**, S-layer; **(CM)**, cell membrane; **(P)**, peptidoglycan. **(b)** Types of S-layer morphologies

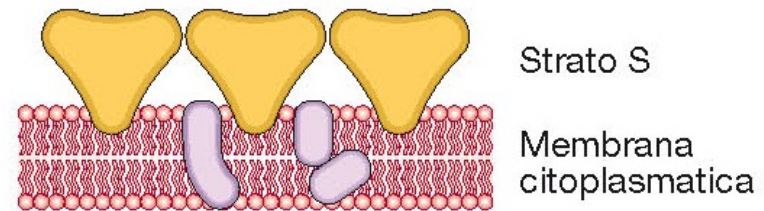


- Gli strati S possono essere associati alle strutture dell' involucrio cellulare
- Nei Gram positivi e negli Archea lo strato S è legato al PGN o alla pseudomureina.
- Negli Archea che non hanno parete, lo strato S è legato direttamente alla MC
- Nei batteri Gram-negativi, invece, lo strato S è legato alla membrana esterna.

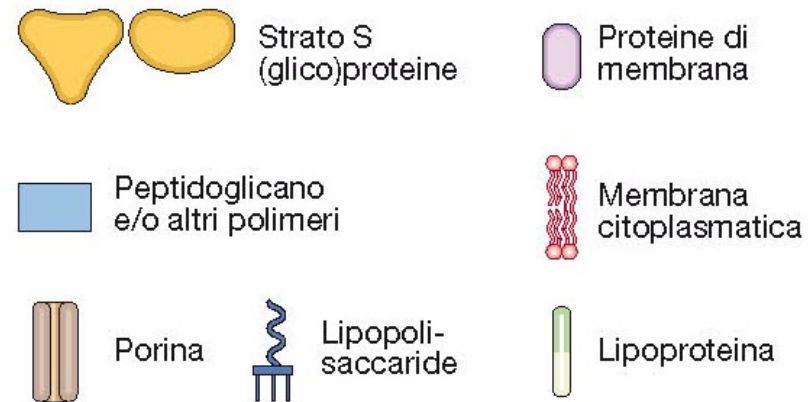
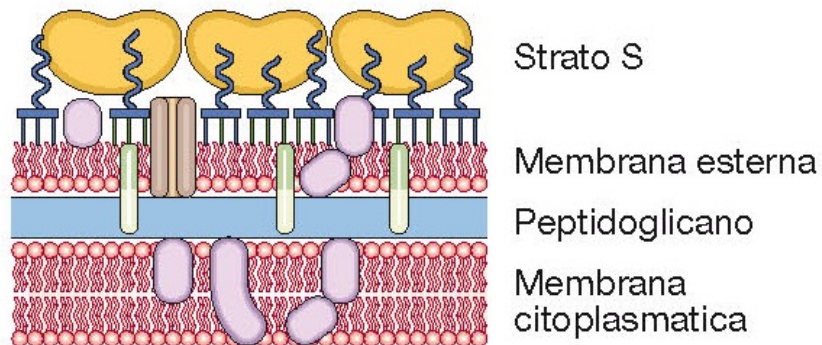
a)



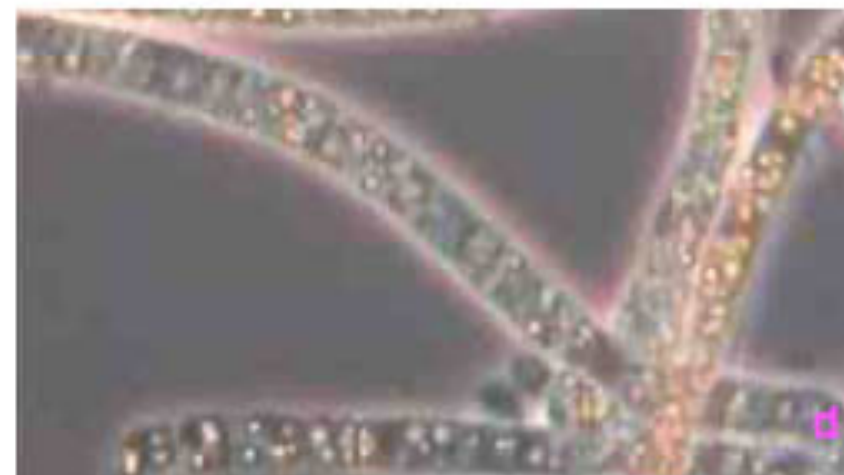
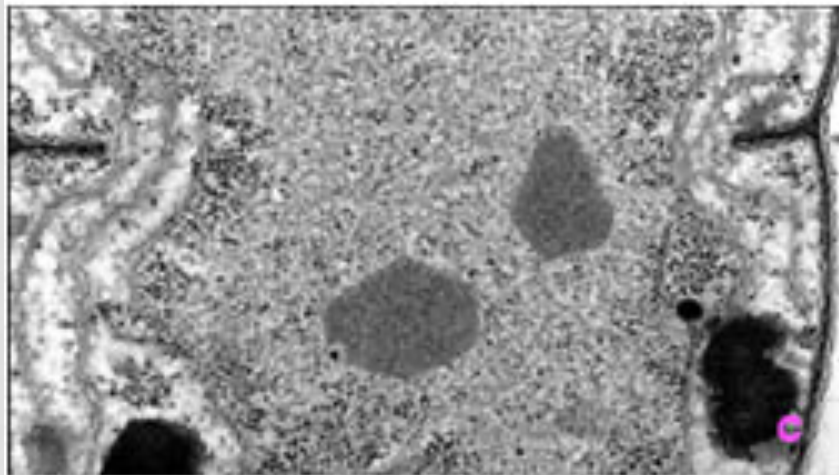
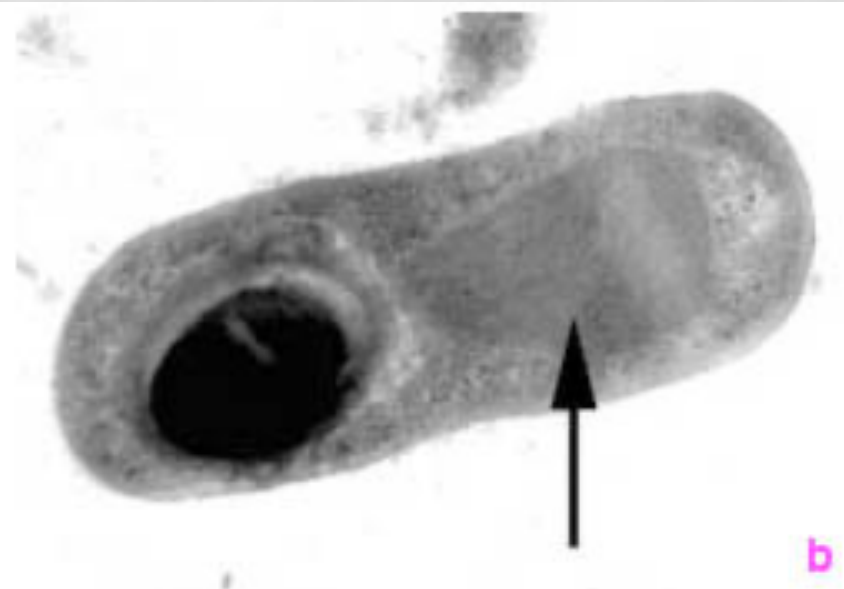
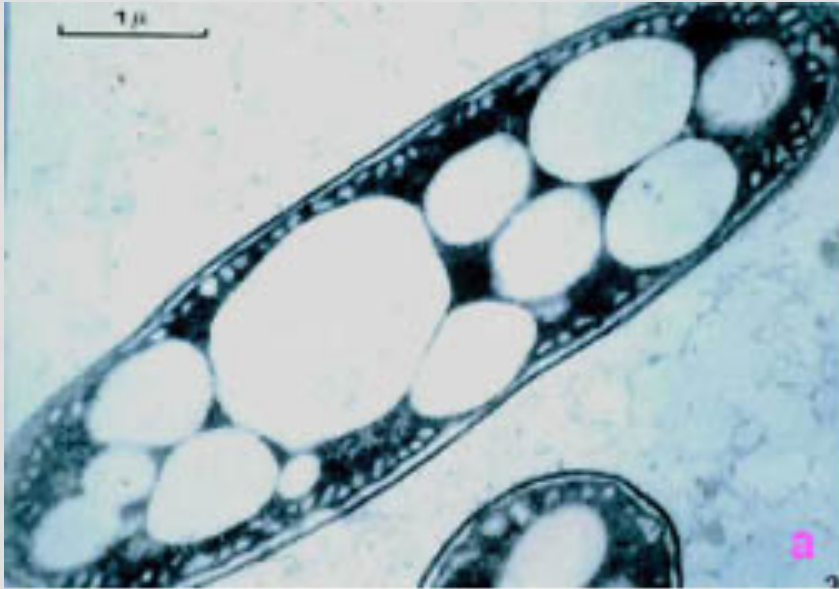
c)



b)



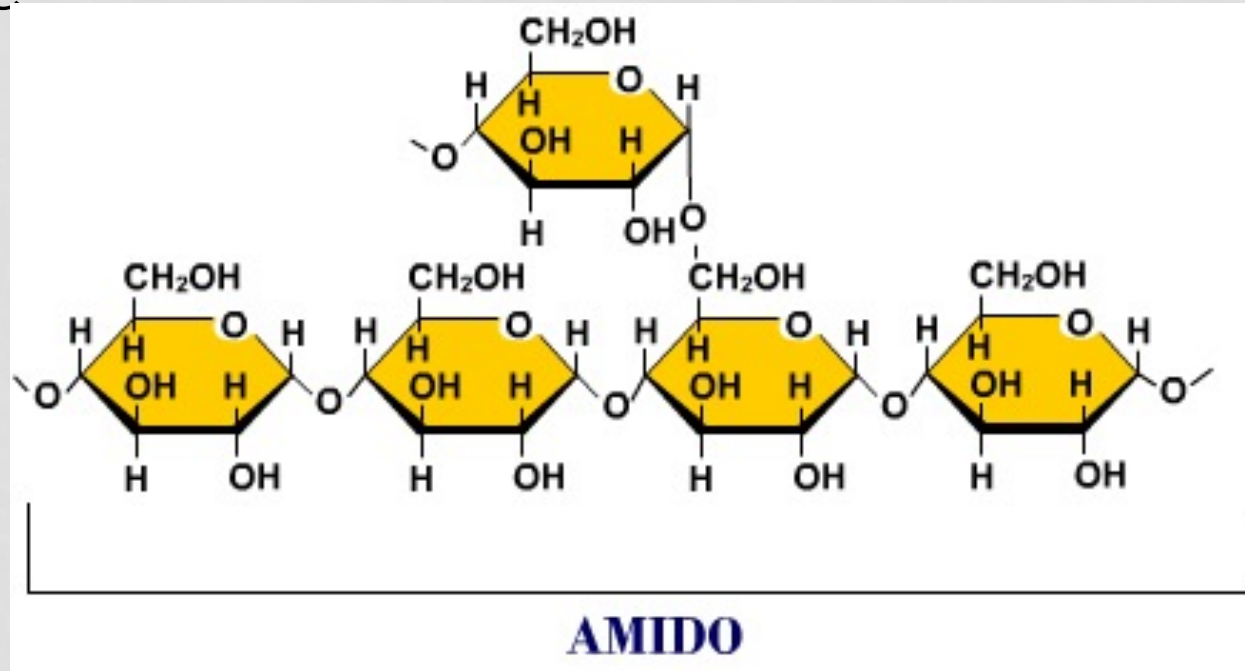
# LE INCLUSIONI BATTERICHE



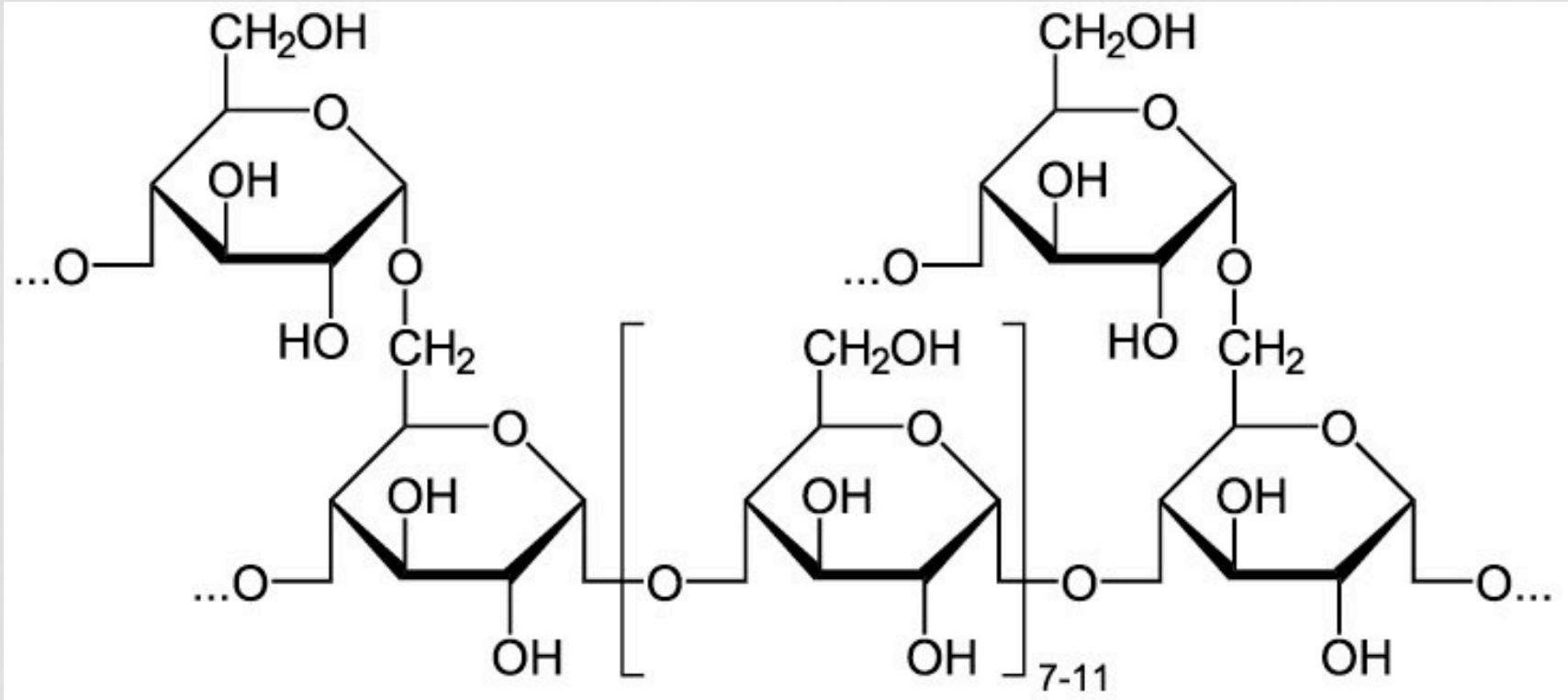


- ◆ Molti batteri contengono delle sostanze di riserva che vengono accumulate in condizioni di abbondanza del nutriente mentre vengono utilizzate in situazione di carenza.
- ◆ I batteri usano accumulare queste sostanze sotto forma di “corpi di inclusione”. Questo permette di accumulare le sostanze senza aumentare la pressione osmotica del citoplasma.
- ◆ I corpi di inclusione, a volte, sono circondati da membrane, la cui composizione differisce dalle comuni membrane in quanto la “membrana” è formata da un monostrato lipidico o a volte contenenti proteine (2-4 nm).
- ◆ I corpi di inclusione circondati da membrana sono:
  - ◆ I granuli di  $\beta$ -poliidrossibutirrato
  - ◆ Granuli di glicogeno e zolfo
  - ◆ Carbossisomi
  - ◆ Vacuoli gassosi

I corpi di inclusione possono essere costituiti da polisaccaridi del tipo amido e glicogeno. Entrambe queste molecole hanno funzione di riserva di C.



L'amido è costituito da **amilosio e amilopectina**, Quest'ultima presenta catene ramificate, oltre **ai legami  $\alpha$ -1,4 nelle ramificazioni è presente il legame  $\alpha$ -1,6**. L'amido è anche una sostanza di accumulo nelle piante e nelle alghe



Il glicogeno è una macromolecola costituita da  **$\alpha$ -glucosio in cui si hanno principalmente legami  $\alpha$ -1,4 glicosidici e ramificazioni dovute a legami  $\alpha$ -1,6 glicosidici.**

Il glicogeno è la sostanza di riserva delle cellule animali.

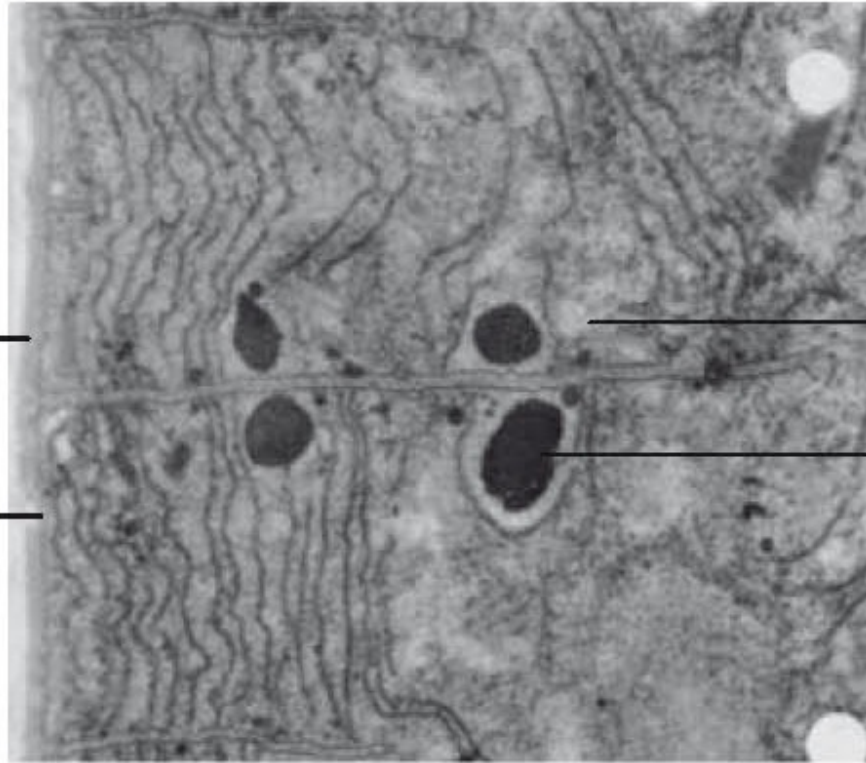
Quando si trova nel citoplasma batterico è in genere sotto forma di piccoli granuli (circa 20-100nm) ed è visibile solo al ME



a)

Parete  
cellulare

Membrana  
cellulare



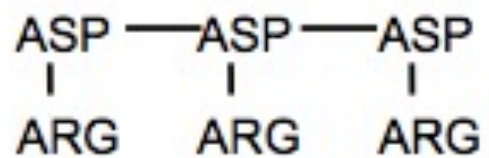
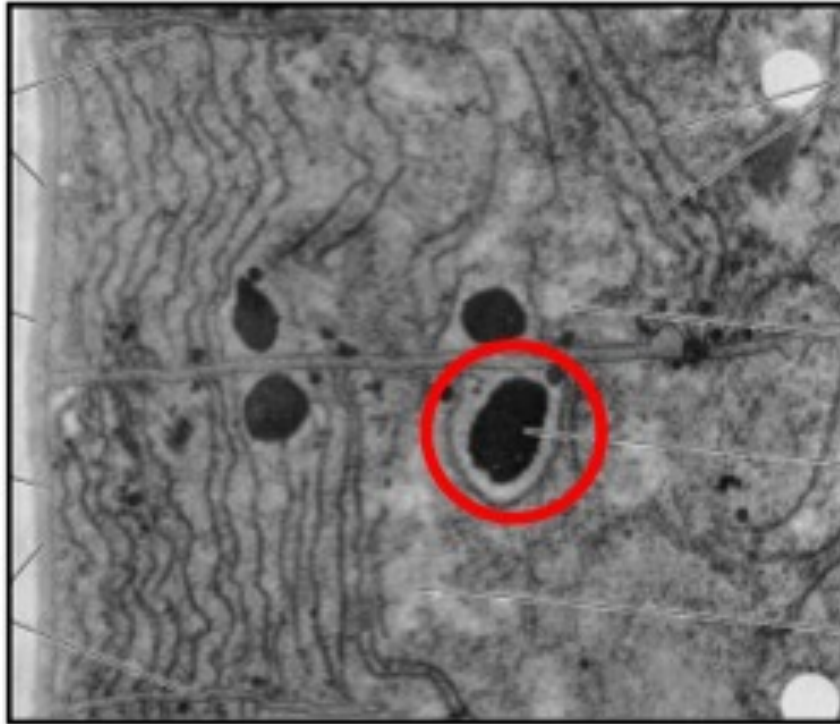
b)

Granuli di  
glicogeno

Granuli di  
cianoficina

Cianobatterio *Symploca mucscorum*. La **cianoficina** è un polimero formato da acido **aspartico e arginina** presente solo nei cianobatteri. Questi grandi polipeptidi rappresentano una riserva di azoto

## CIANOFICINA



Unico accumulo di azoto biologico che si conosca

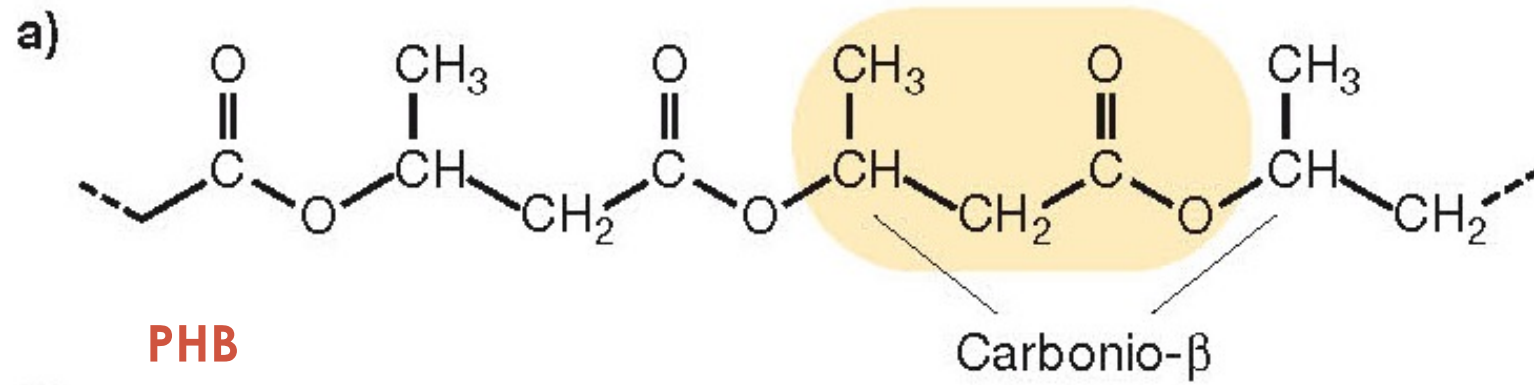
Polimero di acido aspartico

In cui a ogni residuo ASP è legato un residuo di arginina

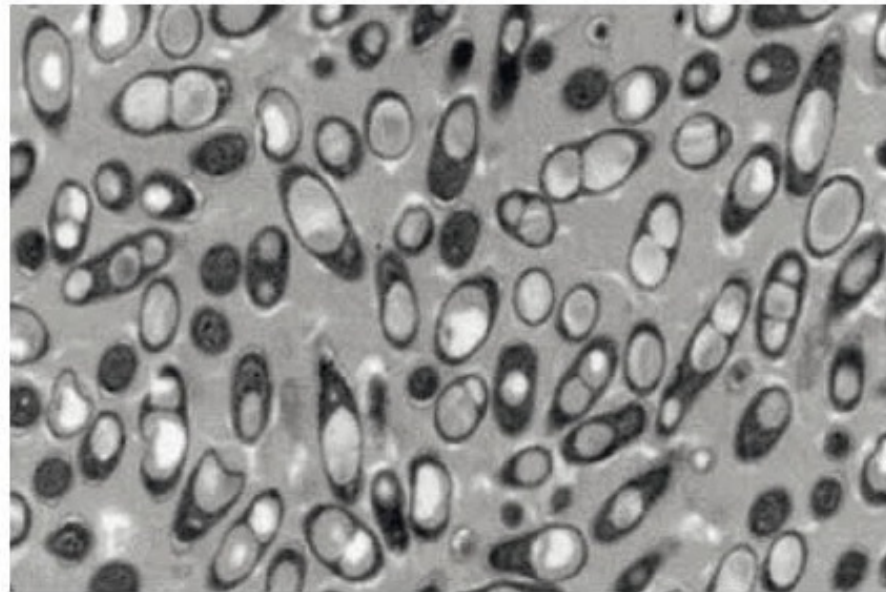
- ◆ Alcuni batteri del tipo:
  - ◆ *Mycobacterium*
  - ◆ *Bacillus*,
  - ◆ *Azotobacter*
  - ◆ *Rhodospirillum*
- ◆ Hanno come riserva di C polimeri di poli- $\beta$ -idrossialcanoati (PHA), come ad esempio il poli- $\beta$ -idrossibutirrato (PHB).
- ◆ Questi granuli appaiono come granuli sferici e rifrangenti al ME.
- ◆ Sono rappresentati da granuli di circa 0,2-0,7 micron
- ◆ In genere la presenza di glicogeno o amido è alternativa a quella del PHB. Solo nei batteri porporini fotosintetici sono presenti sia il glicogeno che il PHB.
- ◆ Questi polimeri sono usati come plastiche biodegradabili



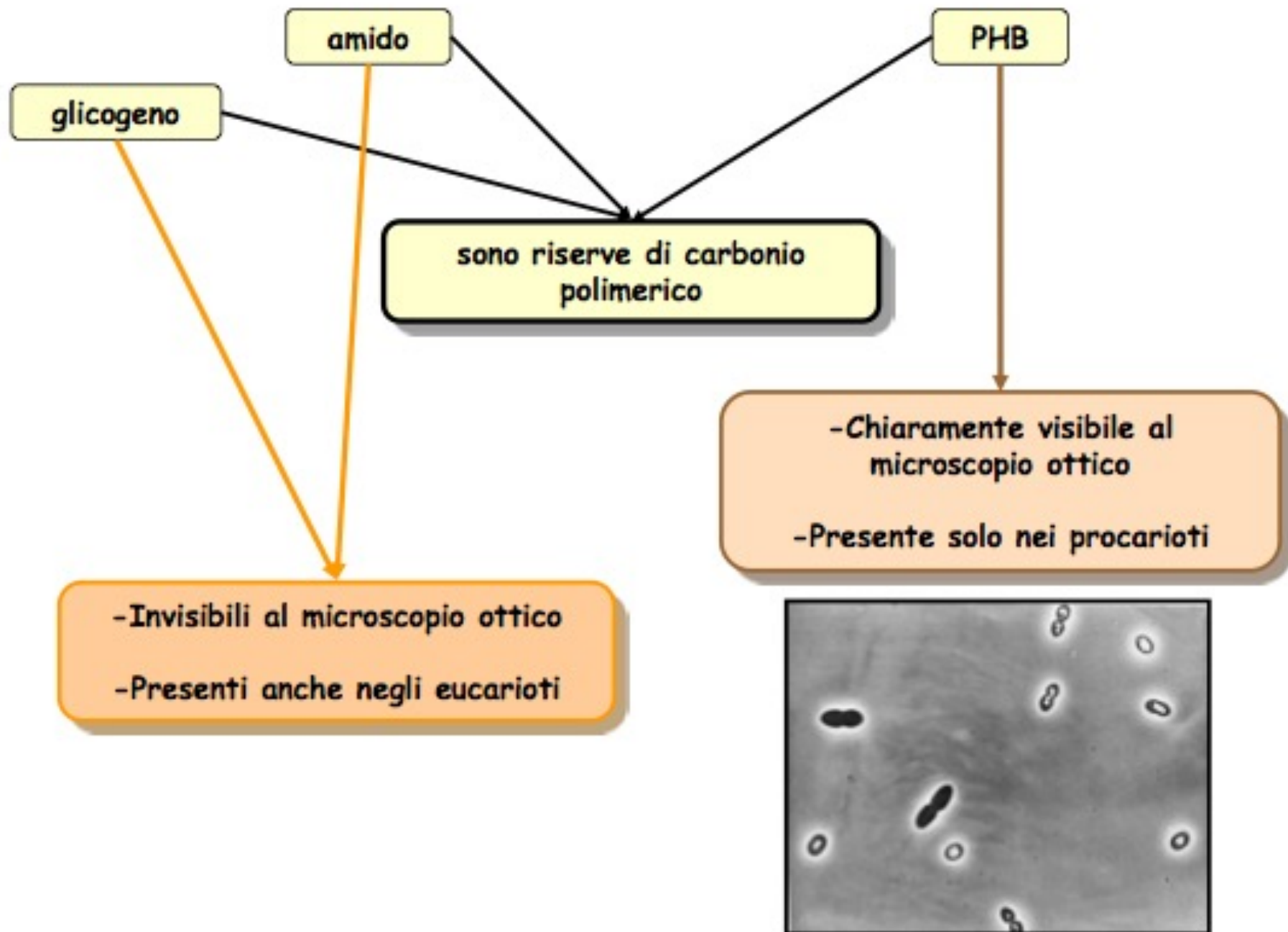
## Acido butirrico



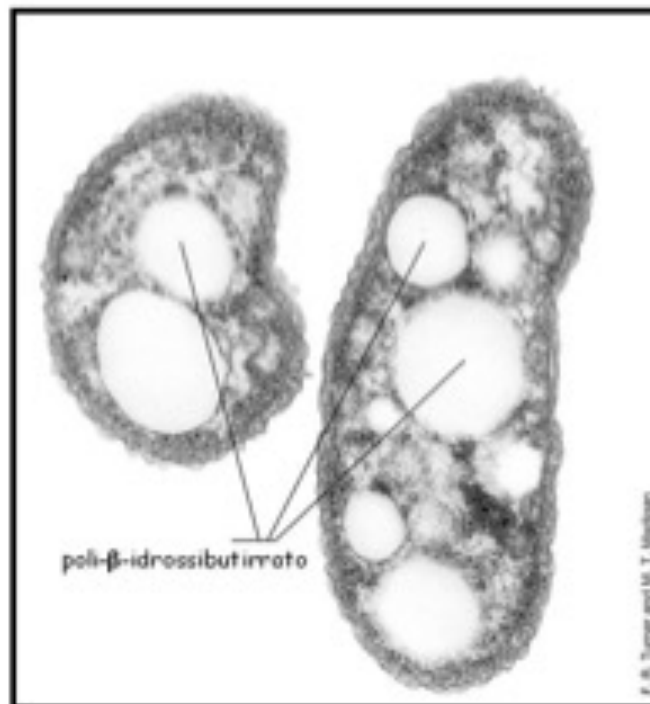
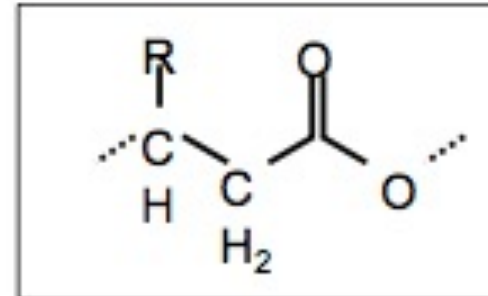
b)



*Halomonas boliviensis* contenente PHB

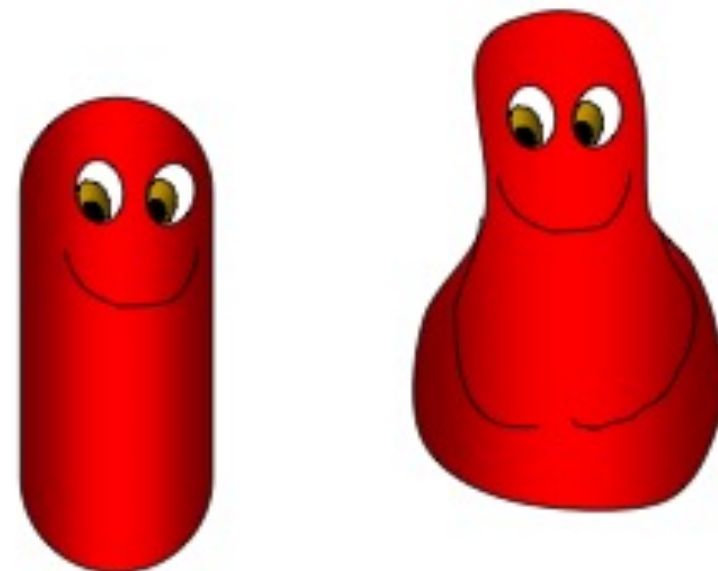


il poli- $\beta$ -idrossibutirrato

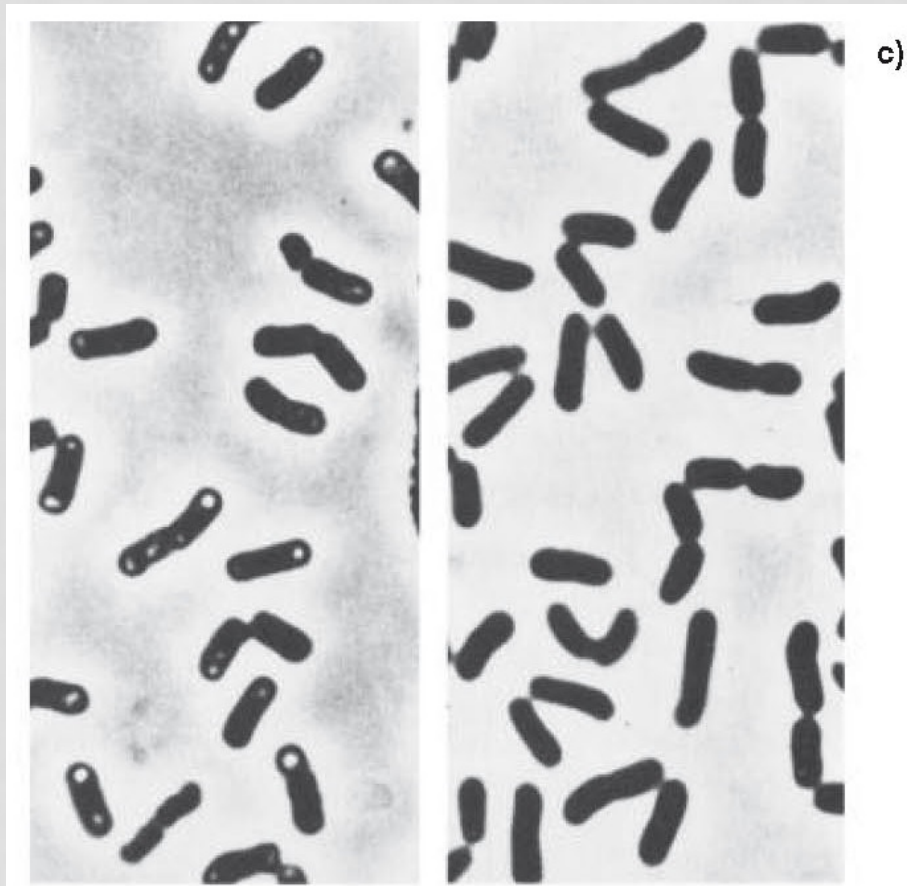


Le sue inclusioni sono circondate da un monostrato di fosfolipidi

E' un composto lipidico della classe dei poli- $\beta$ -idrossi-alcanoati (PHA)



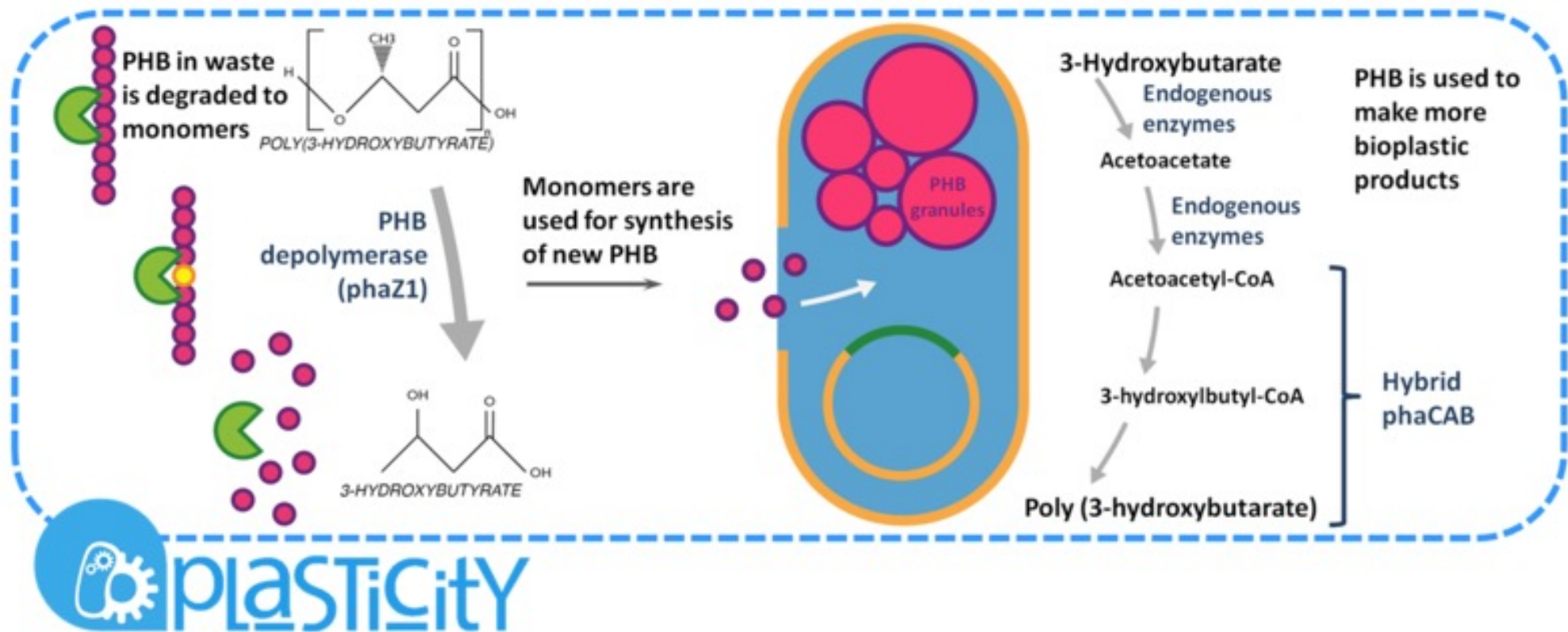




+ GLUCOSIO  
Sono visibili i  
granuli di PHB

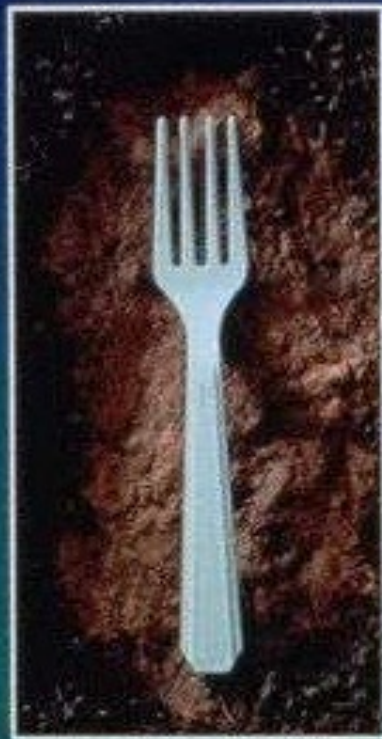
- GLUCOSIO  
I granuli di PHB  
sono stati  
utilizzati

*Bacillus  
megaterium*,  
cresciuto a sinistra in  
presenza di glucosio  
ed acetato e dopo  
24 h di incubazione  
in assenza di  
glucosio





# Degradation of PHB by Microorganisms



*Day 0*



*Day 12*



*Day 33*



*Day 45*





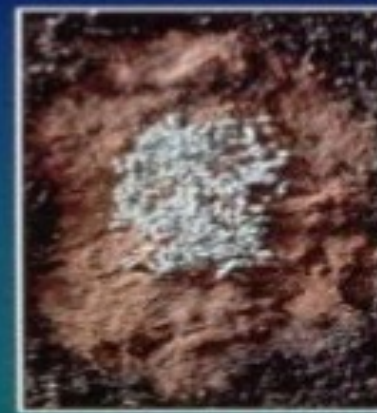
*Day 0*



*Day 12*



*Day 33*



*Day 45*

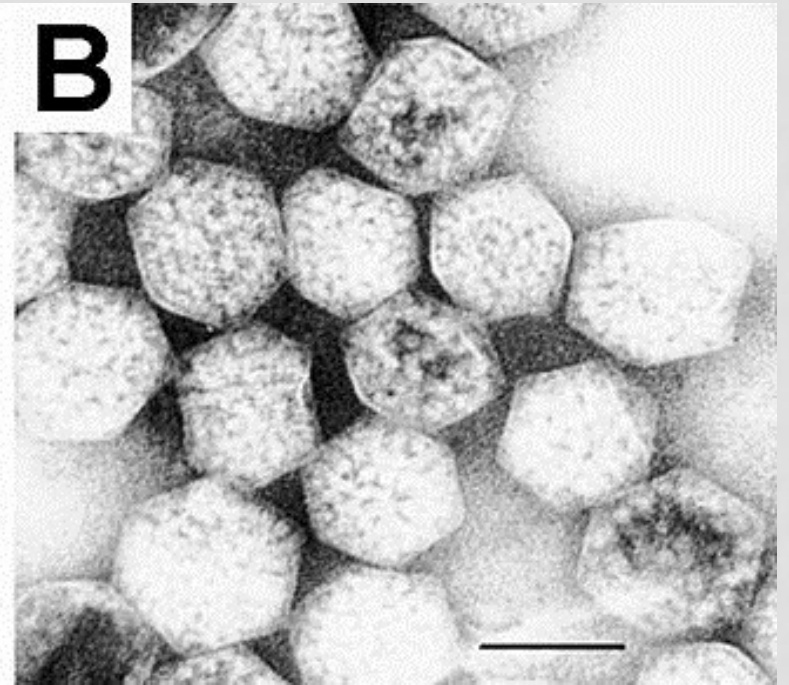
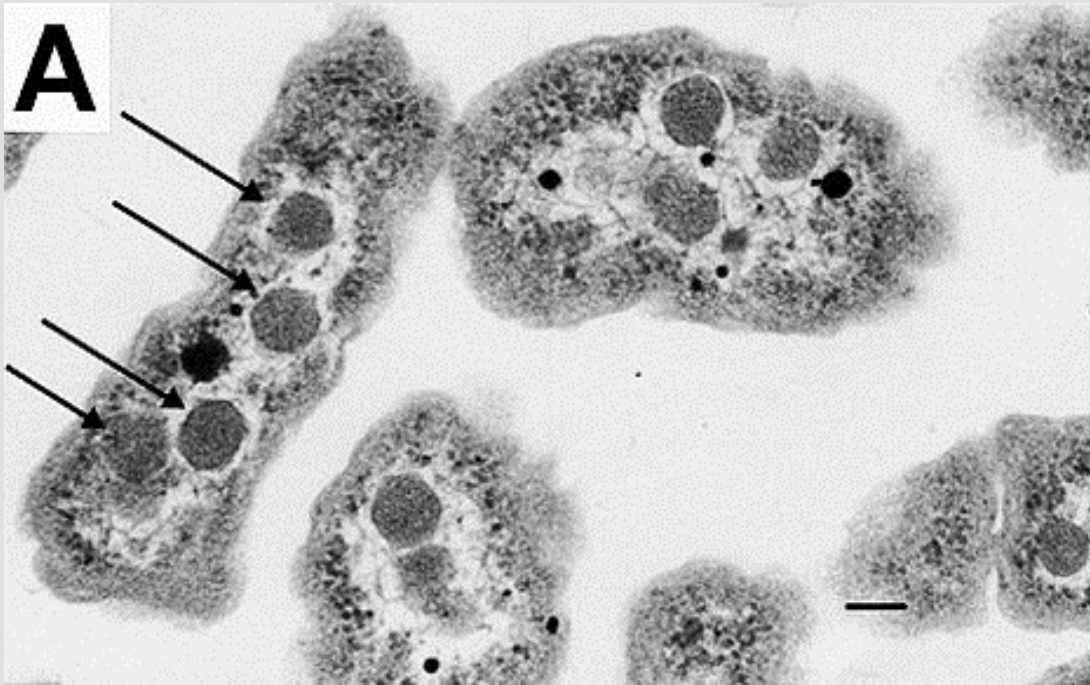
**Table 1** Microorganisms isolated from cold environment with capability for degradation of plastic

Microorganism	Source	Plastic	References
<i>Shewanella</i> , <i>Moritella</i> sp., <i>Psychrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Deep-sea sediment, the Kurile and Japan Trenches	PCL	Sekiguchi et al. (2010)
<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio</i> <i>parahemolyticus</i>	Benthic zones of marine environments	PVA-LLDPE	Raghul et al. (2014)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Clonostachys</i> <i>rosea</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	The Arctic soil	PCL, commercial available bag based on potato and corn starch	Urbanek et al. (2017)
<i>Zalerion maritimum</i>	Marine environment	PE	Paco et al. (2017)
<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus</i> sp.	Kovalam coast—off the Bay of Bengal, 500 m away from shore at the depth of 5 m	LDPE	Pramila and Vijaya Ramesh (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Deep seawater of Tottori Prefecture and offshore in Toyama bay	PCL	Sekiguchi et al. (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcanivorax</i> sp., <i>Tenacibaculum</i> sp.	Deep seawater	Monofilament fibers of PCL, PHB/V, PBS	Sekiguchi et al. (2011)



- ◆ **I Carbossisomi** fanno parte di un ristretto gruppo di microcomparti delimitati da membrane composte da unità proteiche che contengono enzimi di specifiche funzionalità.
- ◆ **I carbossisomi contengono l'enzima ribulosio 1.5 difosfato carbossilasi (RuBisCO)**
- ◆ Queste strutture sono riserve di questo enzima che serve nei cicli di fissazione della CO<sub>2</sub>.
- ◆ Nei carbossisomi è anche presente l'enzima anidrasi carbonica che aumenta la fissazione del carbonio.
- ◆ I carbossisomi sono presenti in batteri auxotrofi, specialmente nei cianobatteri, nei batteri nitrificanti e nei tiobacilli.



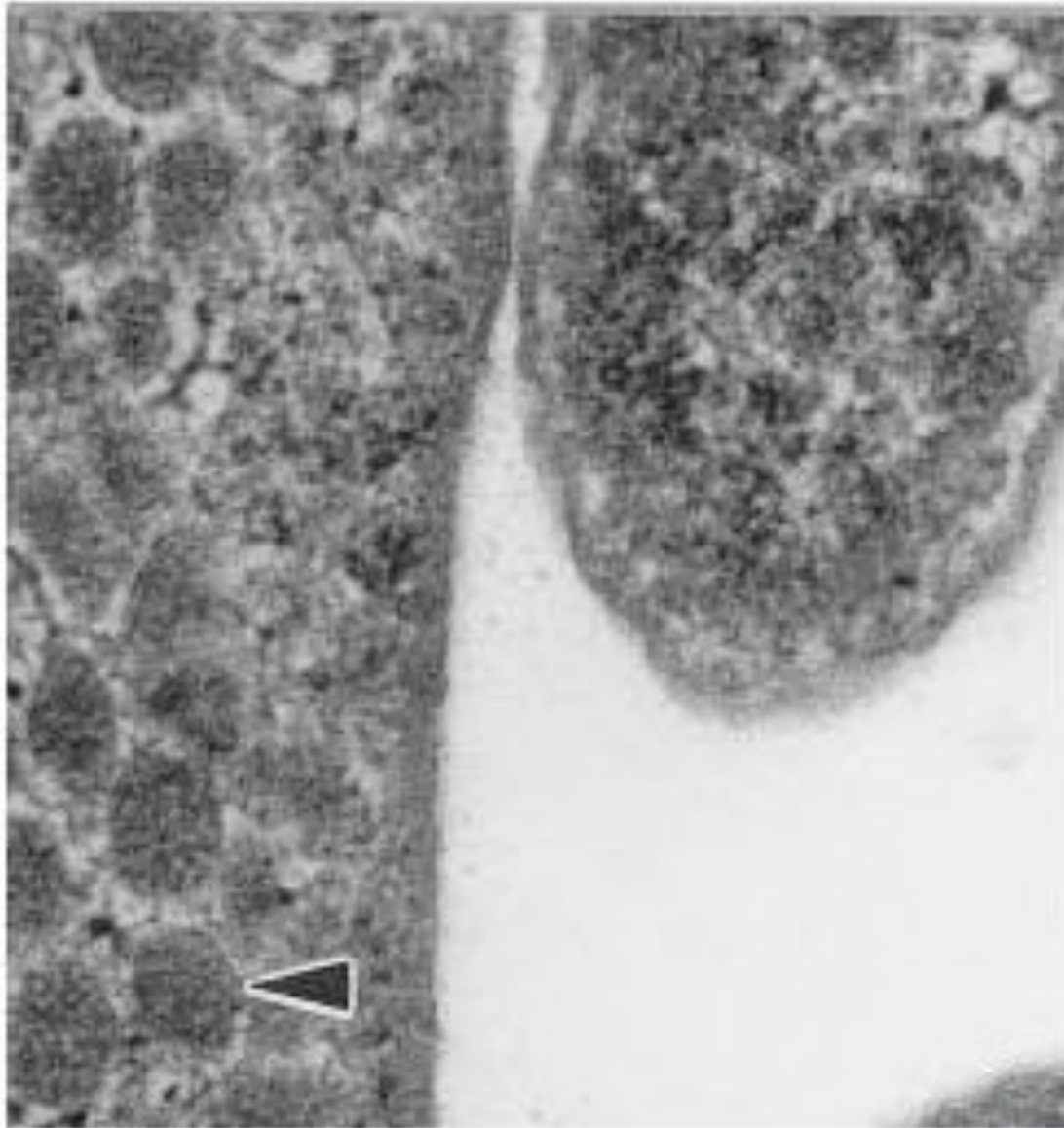


*Halothiobacillus  
neapolitanus*

Cyanobacterio  
Cyanothece



- ◆ Gli enterosomi sono stati identificati per primi negli enterobatteri del genere *Salmonella*.
- ◆ Gli enterosomi **NON** contengono il **RuBisCO** in quanto sono eterotrofi obbligati e non sono in grado di fissare l'anidride carbonica.
- ◆ Gli enterosomi contengono enzimi che servono per il metabolismo di composti quali il **propandiolo** e l'**etanolamina**, quando questi siano presenti.
- ◆ Il **propandiolo** deriva dal fucosio che è presente nella membrana delle cellule eucariotiche.
- ◆ La capacità di utilizzare il fucosio può avere un vantaggio per i batteri patogeni nel processo di interazione con l'ospite.



c)

*S. typhimurium* cresciuta  
su propanolo in  
condizioni aerobie

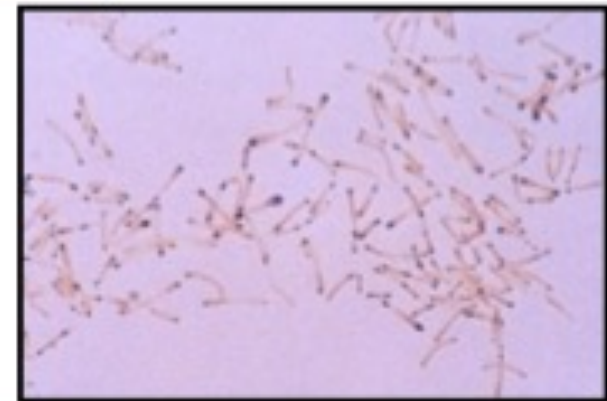
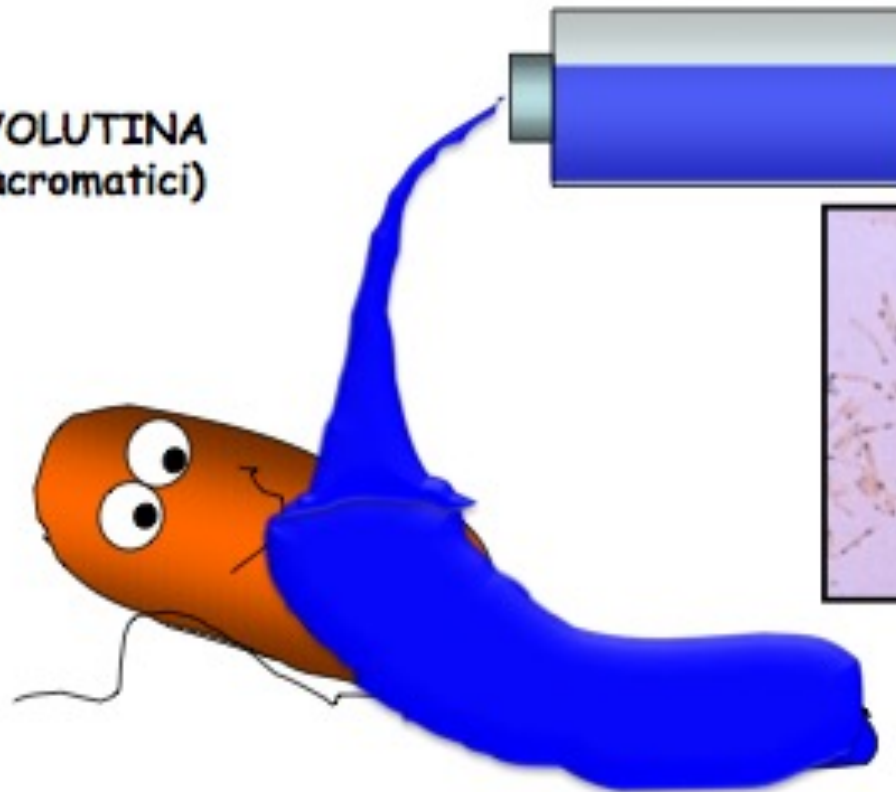


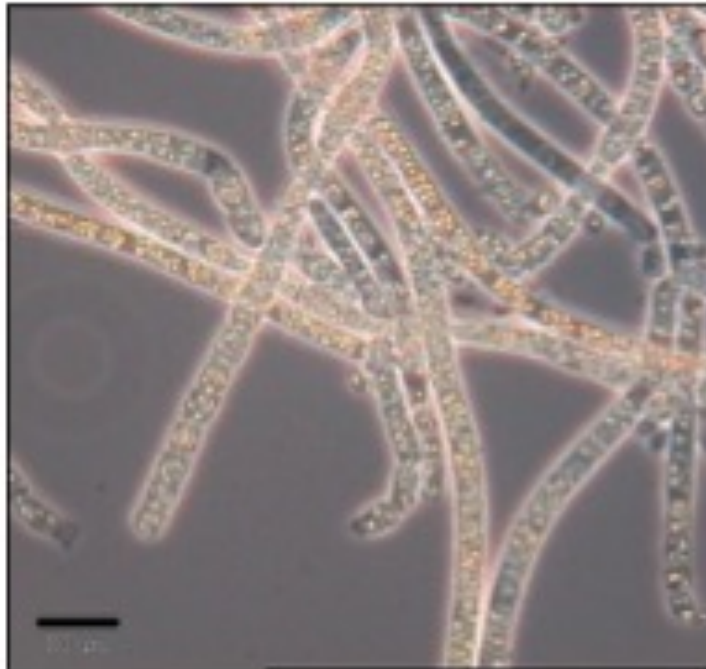
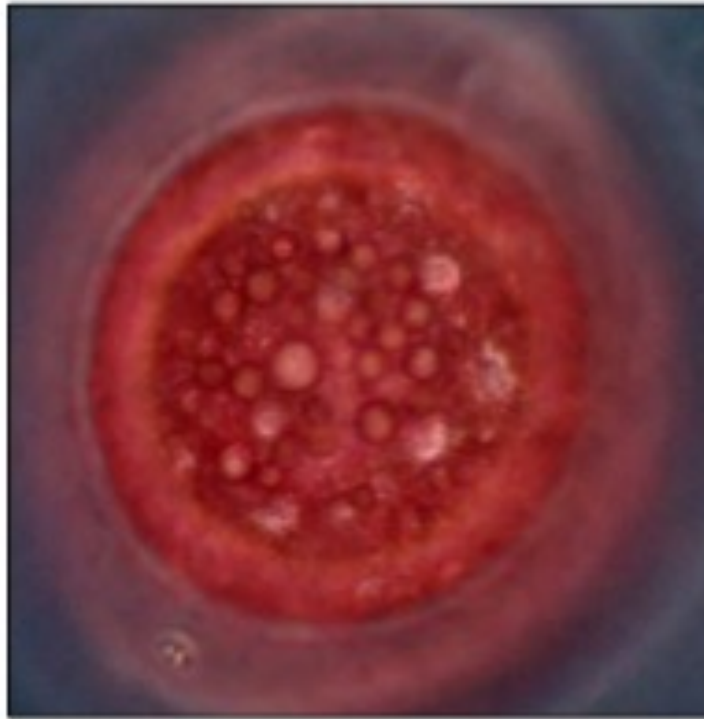
- ◆ Fra le inclusioni inorganiche i **granuli di polifosfati o granuli di volutina** costituiscono una riserva inorganica di fosfato che può essere utile per la sintesi di ATP e degli acidi nucleici.
- ◆ **La volutina è costituita da polimeri lineari di ortofosfato, uniti da legami estere.**
- ◆ Vengono spesso denominati come unità metacromatiche in quanto al MO appaiono come granuli rossi o di varie tonalità di blu, a seconda del colorante usato per metterli in evidenza.
- ◆ Un'altra inclusione inorganica è costituita da **granuli di zolfo**.
- ◆ I granuli di zolfo derivano dall'**ossidazione dei solfuri**.
- ◆ In realtà i granuli di zolfo si accumulano nel periplasma (non nel citoplasma) dove formano aree sferiche di colore giallo.

Molecole lineari di polimeri  
di unità fosfato

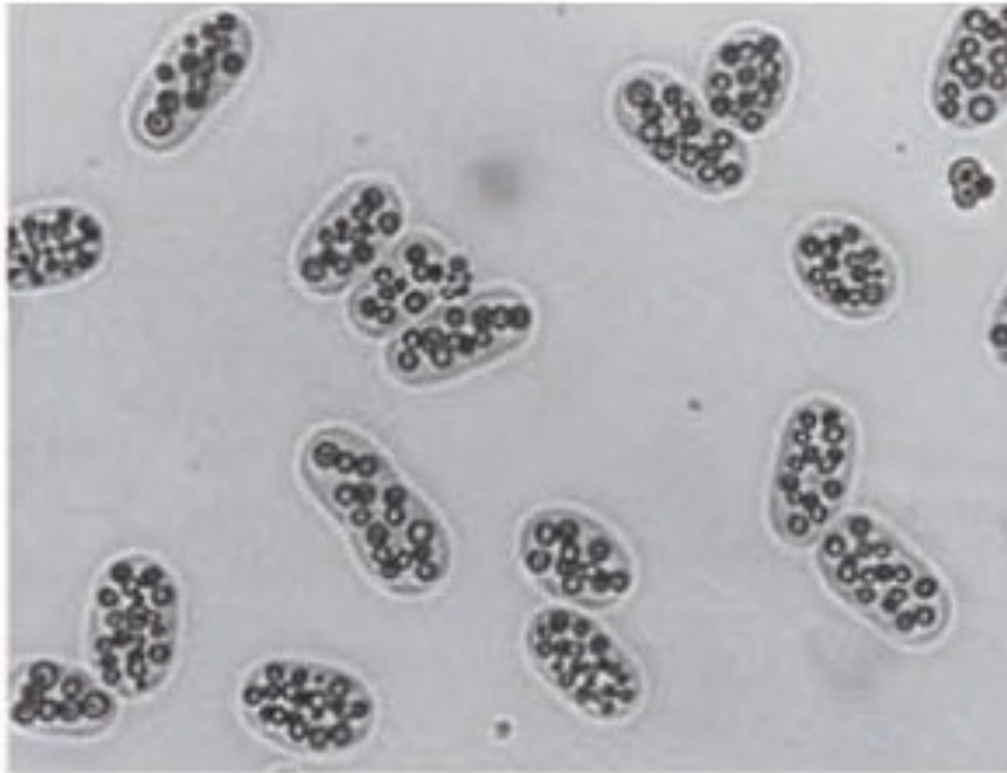


Formano la VOLUTINA  
(granuli metacromatici)





a)



Batterio purpureo  
sulfureo, *Isochromatium  
burderi*

b)

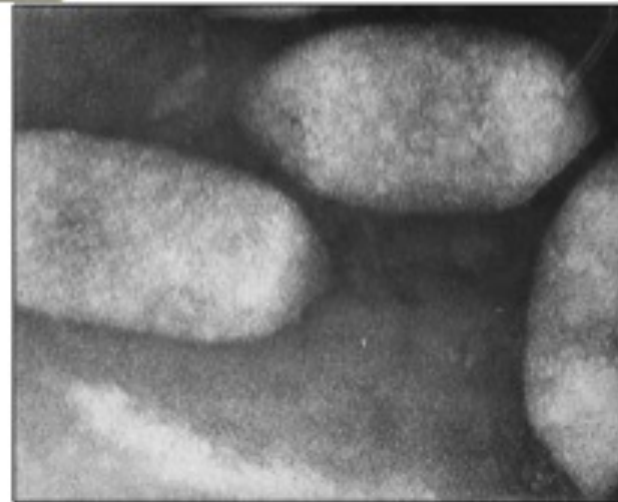
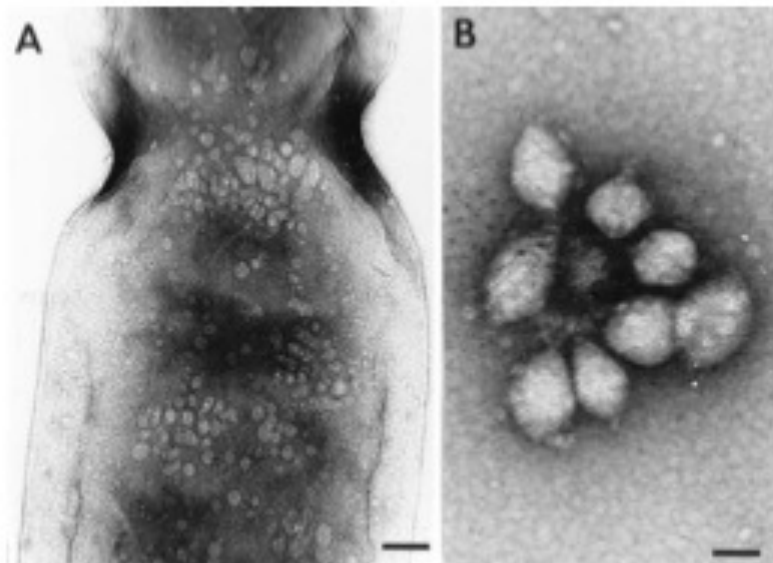


Solfobatterio,  
*Thiotrix nivea*



- ◆ Le vescicole acquatiche servono ai batteri come organi di galleggiamento.
- ◆ A seconda del tipo di microrganismo le vescicole gassose servono per raggiungere zone più luminose (fototrofi) o acque più superficiali (aerobi).
- ◆ La pressione dei gas all'interno delle vescicole è identica all'ambientale.
- ◆ Le vescicole gassose sono impermeabili ai liquidi e permeabili ai gas

### Le vescicole gassose



Permettono ai batteri che le possiedono di galleggiare :  
sono impermeabili all'acqua e permeabili ai gas

La presenza delle vescicole diminuisce la densità della cellula e ne favorisce il galleggiamento

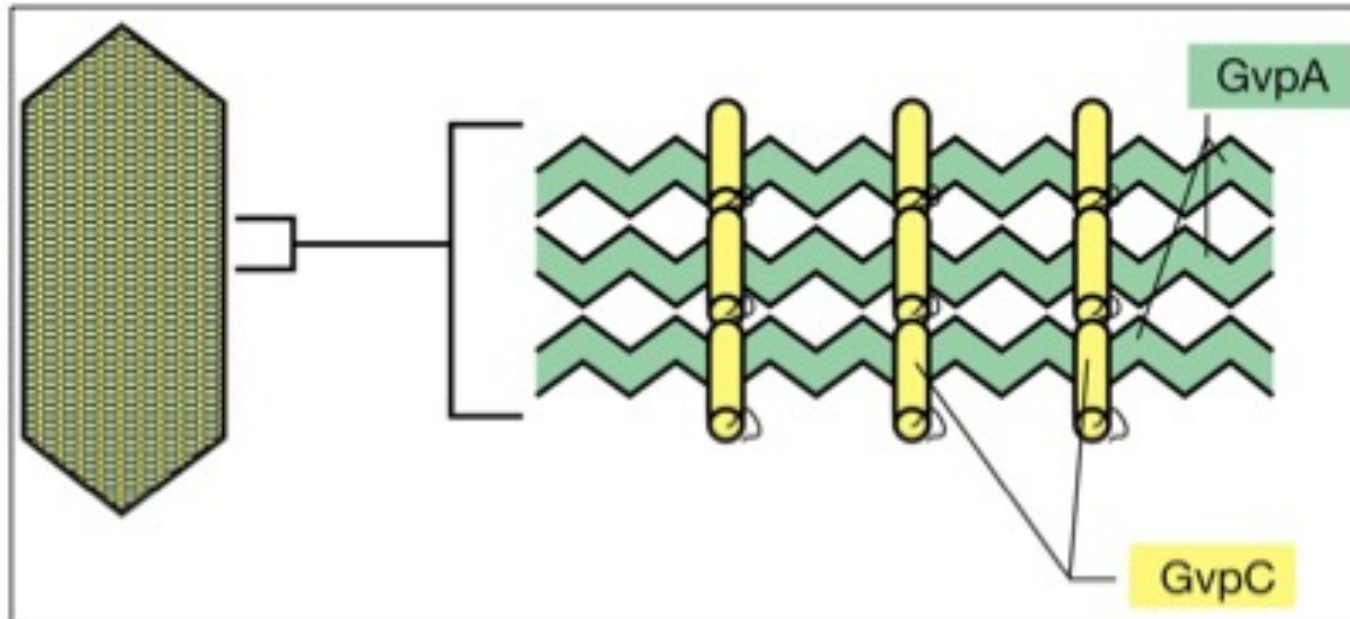


Il rapporto percentuale tra le vescicole e il contenuto citoplasmatico determina il grado di galleggiabilità e la posizione delle cellule batteriche

Alcuni batteri (es. Cianobatteri) possono modificare la propria posizione collassando le vescicole o producendo una maggior quantità di polimeri densi

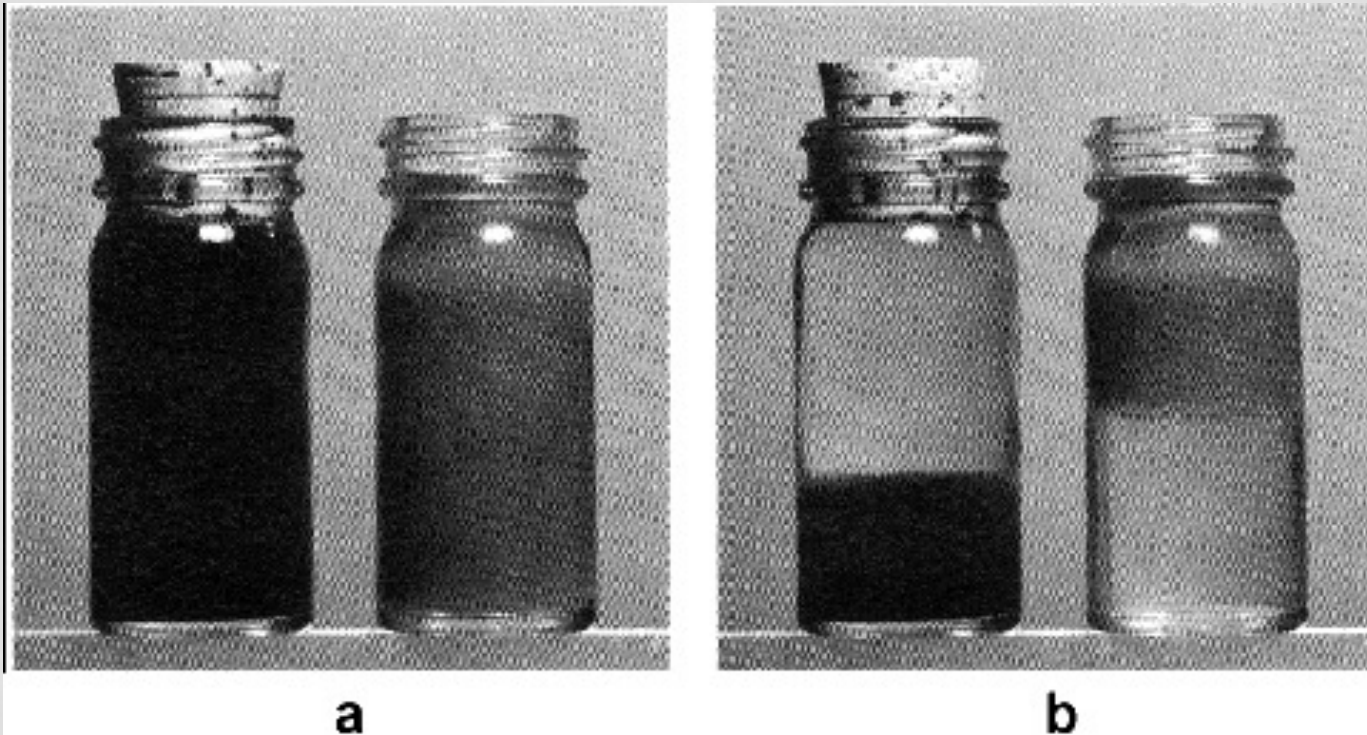


La membrana delle vescicole è rigida e formata da due proteine: *GvpA* e *GvpC*



*GvpA* è un foglietto beta rigido che forma l'ossatura;  
*GvpC* ( $\alpha$ -elica) forma nastri che legano l'ossatura

Si forma un cilindro cavo e rigido



Due bottiglie sono riempite di una soluzione di batteri muniti di vescicole gassose e quindi galleggianti. Una (quella di sinistra) viene colpita sul tappo con un martello. Le vescicole collassano.

L'altra è di controllo. Dopo un certo periodo di tempo quella dove le vescicole hanno collassato mostrerà la coltura batterica sul fondo, nell'altra i batteri muniti di vescicole continuano a galleggiare.