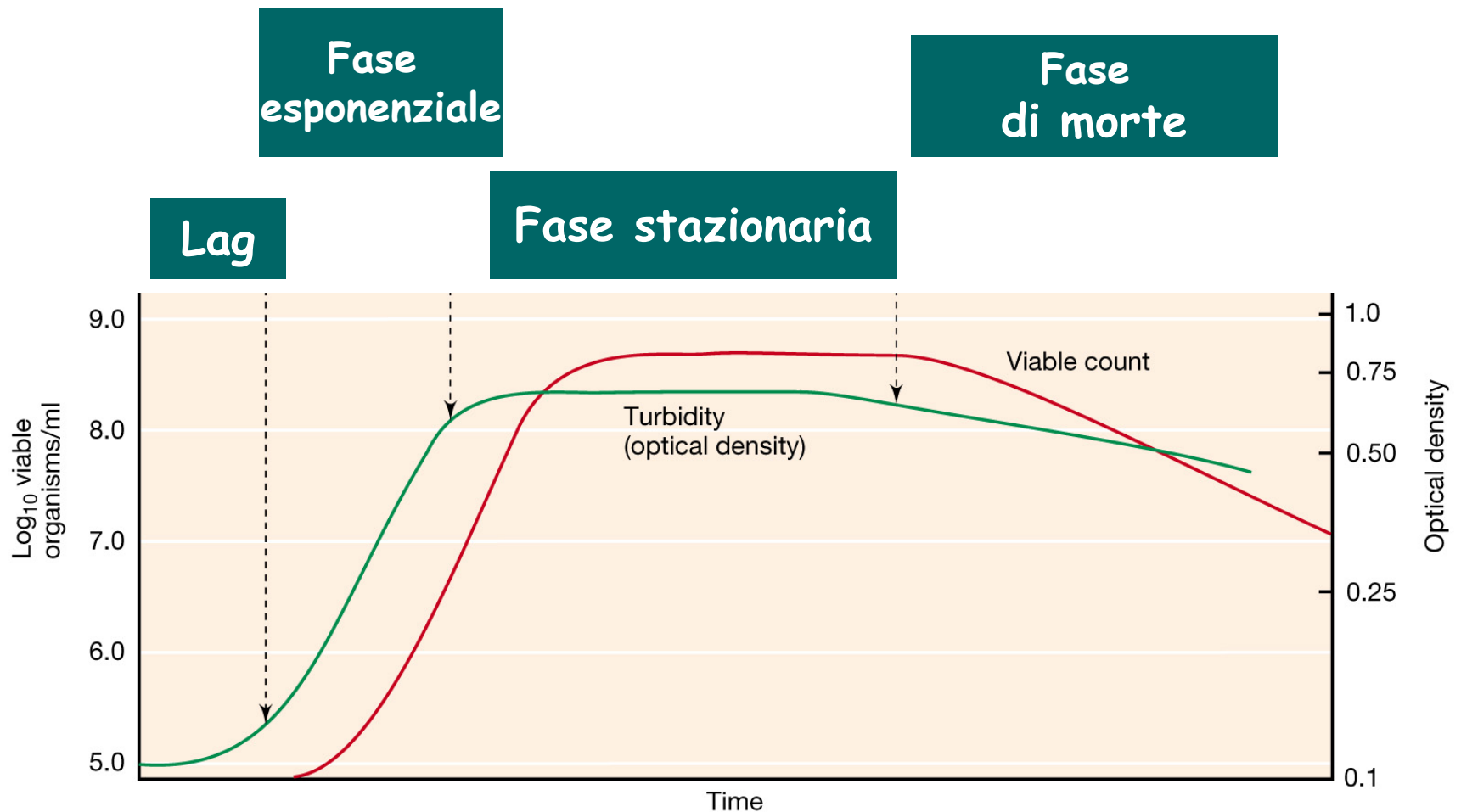


Fasi della crescita batterica: ma come si contano i batteri??



Valutazione della quantità di microrganismi in coltura

1. Determinazione della biomassa: calcolo del peso secco

- Questa tecnica permette di pesare le cellule batteriche presenti in una coltura dopo averle centrifugate, risospese in soluzione fisiologica, ricentrifugate (processo definito lavaggio), asciugate.

- Non permette di distinguere tra cellule vive e cellule morte

- Viene utilizzato per grandi quantità di batteri

2. Misurazione della torbità

La crescita dei microrganismi in un terreno di coltura liquido determina l'intorbidamento del terreno che sarà tanto maggiore quanto maggiore è il numero di batteri presenti.

Generalmente si usano strumenti che permettono di calcolare indirettamente la quantità di luce dispersa ovvero si calcola la luce che non viene dispersa tramite

Colorimetro il raggio di luce viene creato attraverso un filtro colorato

Spettrofotometro la luce viene diffratta attraverso un prisma si ha un raggio con una precisa lunghezza d'onda

Anche in questo caso non si distingue tra cellule morte e vive.

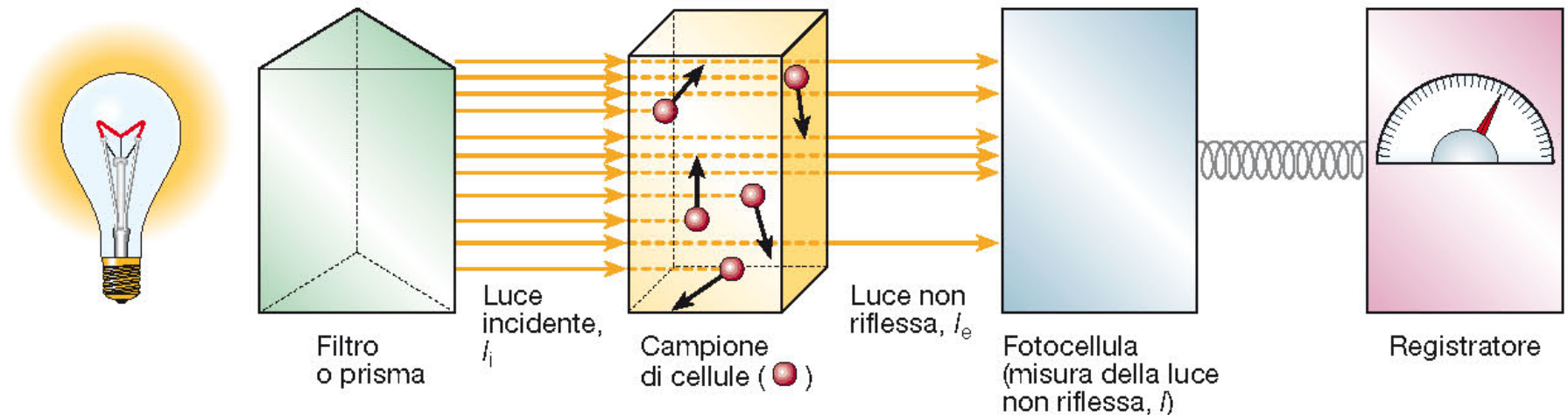
Per misurare la torbità di una coltura si usa una lunghezza d'onda nel campo visibile dello spettro 440 e 660 nm

Si definisce **Trasmissione T** (o trasmittanza) il rapporto tra l'intensità del raggio emergente (I_e) e quella del raggio incidente (I_i)

$$T = I_e / I_i$$

Quindi la Trasmissione è inversamente proporzionale all'assorbimento.

Quindi all'aumentare della numerosità batterica diminuirà la trasmissione.



La densità ottica (OD)

OD viene ricavata dalla Trasmissione effettuando i

$$OD = -\log T \text{ ovvero } \log (I_i/I_e)$$

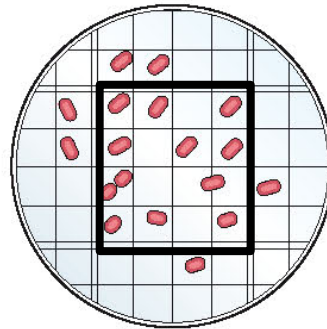
OD è in genere direttamente proporzionale al numero di cellule presenti, ovvero aumenta con l'aumentare del numero di batteri presenti nella coltura.

I_i = intensità raggio incidente
 I_e = intensità raggio emittente

Conta totale al microscopio



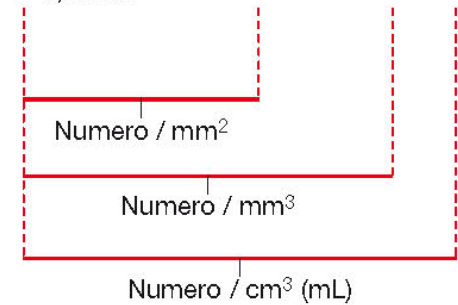
Il campione è depositato sul vetrino, facendo attenzione a non superare la capacità della camera; lo spazio tra il reticolo e il vetrino coprioggetto è di 0,2 mm ($\frac{1}{50}$ mm). Il reticolo è formato da 25 quadrati grandi con un'area totale di 1 mm² e un volume totale di 0,02 mm³.



Osservazione microscopica; si contano le cellule presenti in un quadrato grande (in questo esempio 12). Dopo aver contato diversi quadrati si determina la media dei valori ottenuti.

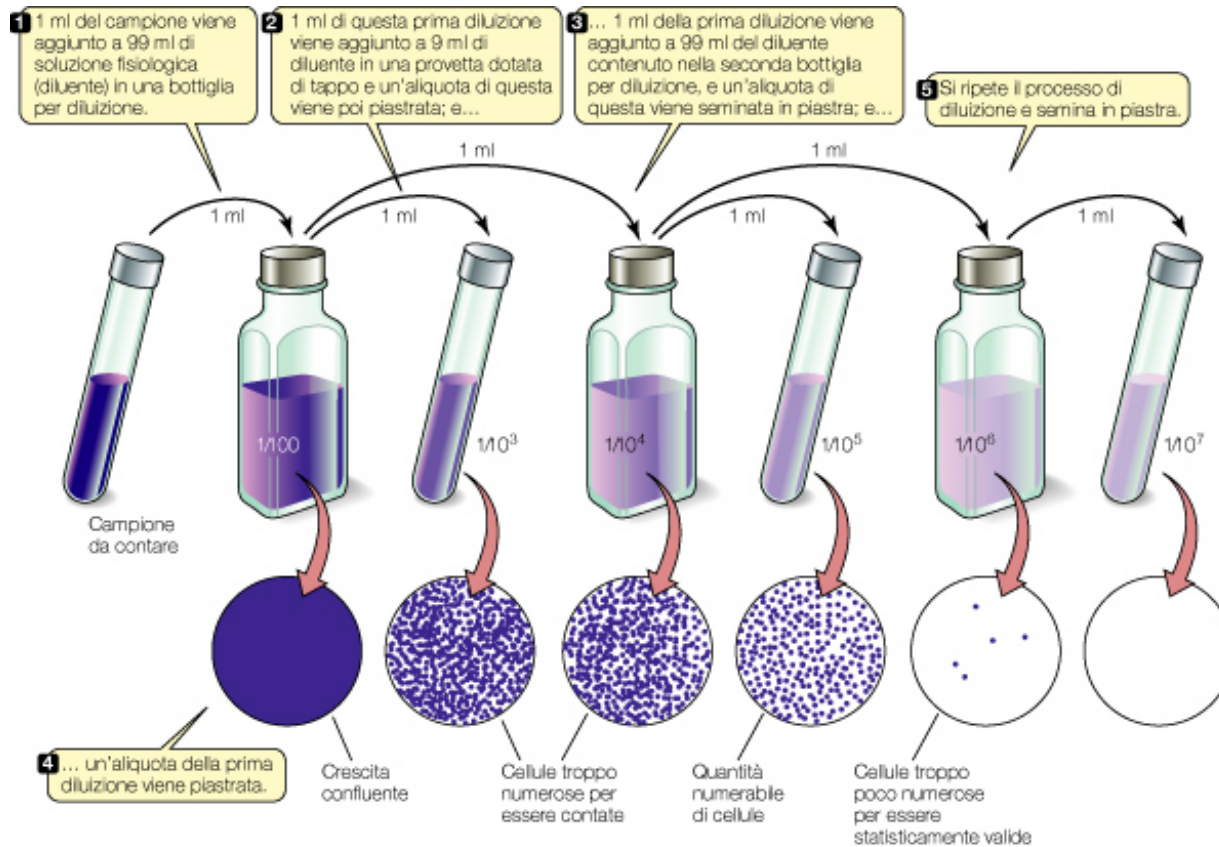


Calcolo del numero di cellule per millilitro di campione;
12 cellule × 25 quadrati grandi × 50 × 10³
= 1,5 × 10⁷

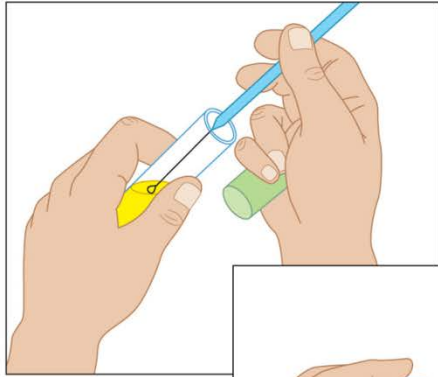


La camera di conta più comune è quella di Petroff Hausser costituita da un vetrino speciale suddiviso in tanti quadrati di area definita

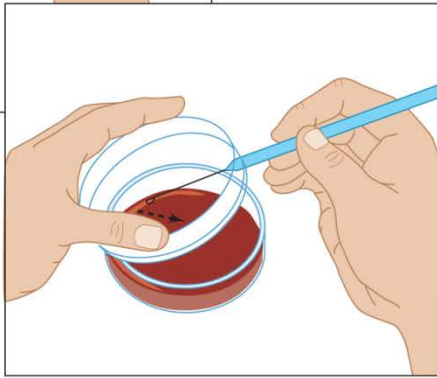
La conta vitale per piastramento



La diluizione di fattore 10 in 10



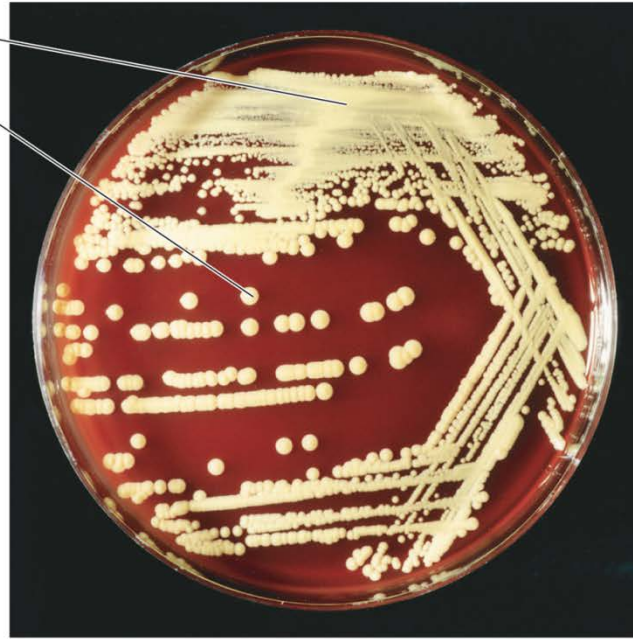
(a)



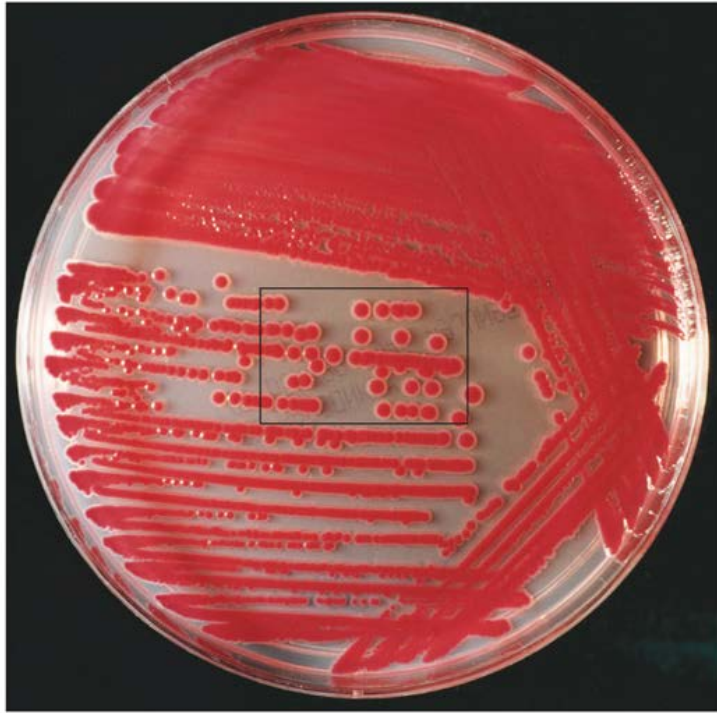
(b)

Crescita confluenta
all'inizio dello striscio

Colonie isolate alla
fine dello striscio

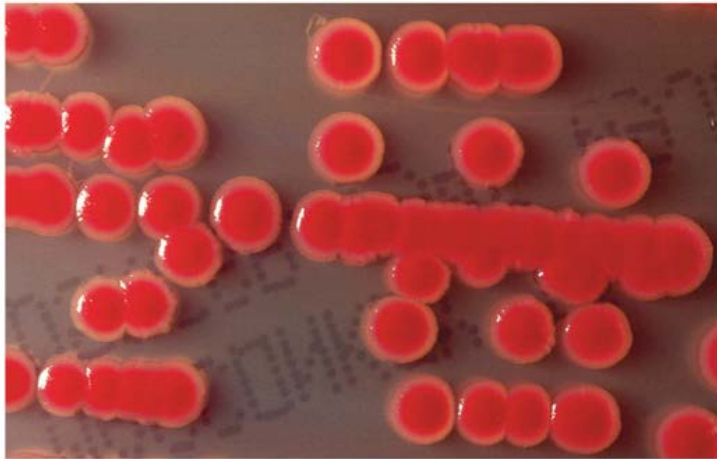


(c)



James A. Shapiro, University of Chicago

(a)



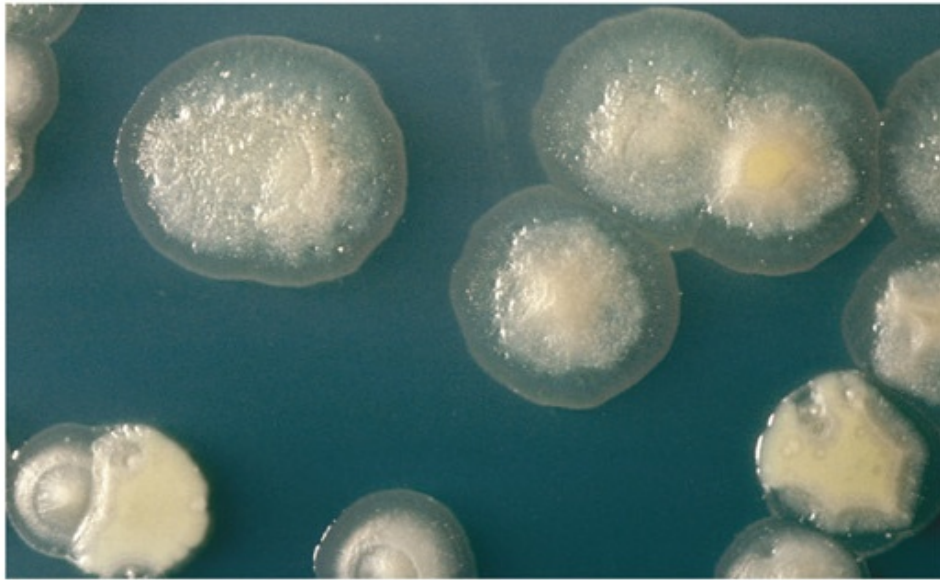
James A. Shapiro, University of Chicago

Le colonie sono masse di cellule batteriche originatesi per divisioni successive di una cellula

Si calcola che una colonia abbia 1-10 milioni di cellule generatesi a partire dalla medesima cellula batterica

Serratia marcescens cresciuta su Terreno MacConkey specifico per identificare batteri

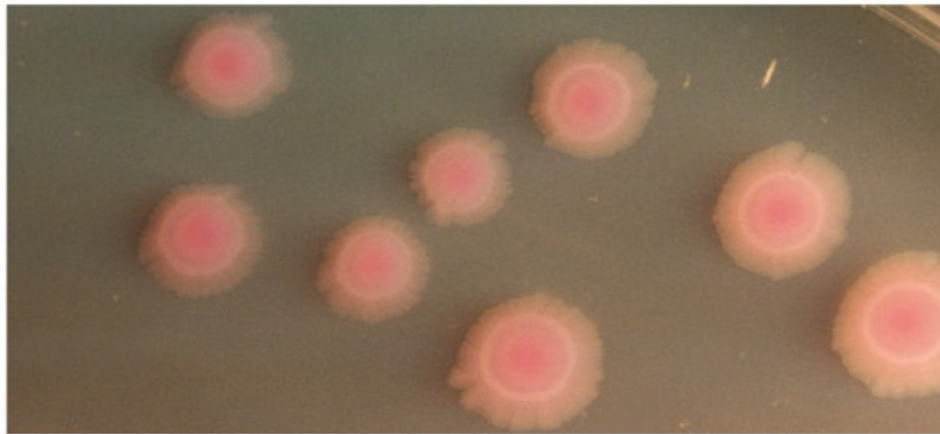
Lac⁺ rossi Lac⁻ bianchi



James A. Shapiro, University of Chicago

Colonie di
Pseudomonas
aeruginosa su terreno
ricco

(c)



James A. Shapiro, University of Chicago

Shigella cresciuta su
terreno MacConkey ,
le colonie sono Lac- (
bianco /rosa)

(d)

Terreni di coltura

Terreni coltura sono costituiti da un insieme di nutrienti necessari per la crescita batterica.

Basandosi sulla fisiologia e le capacità biochimiche di ogni specie batterica è possibile realizzare dei terreni che ne permettano la crescita.

Tappa fondamentale sia per la ricerca che per l'identificazione (clinica/ambientale)

I Batteri ed Archea coltivabili costituiscono solo 1% di quelli identificati per sequenziamento del RNA 16S

Terreni di coltura possono essere

Terreni chimicamente definiti



Terreni minimi contengono

- Il minimo numero di sostanze indispensabili per la crescita
- Sono concepiti in base alle capacità metaboliche di una specie
- Permettono di determinare le richieste nutrizionali di un microrganismo

Terreni chimicamente indefiniti



Terreni complessi

- Vengono preparati a partire da estratti animali , vegetali o da cellule di lievito
- La composizione esatta non è nota
- Permette la coltivazione di più specie insieme
- Si può utilizzare anche con batteri dei quali non si conosce esattamente il profilo metabolico

Terreni minimi

I batteri crescono più lentamente

perché

la gran parte delle molecole organiche vitamine, aminoacidi basi azotate devono essere sintetizzate ex novo.

Per Escherichia coli

la crescita in terreno minimo può variare da 45- 60 minuti a secondo della fonte di carbonio

Terreni complessi

I batteri crescono più velocemente

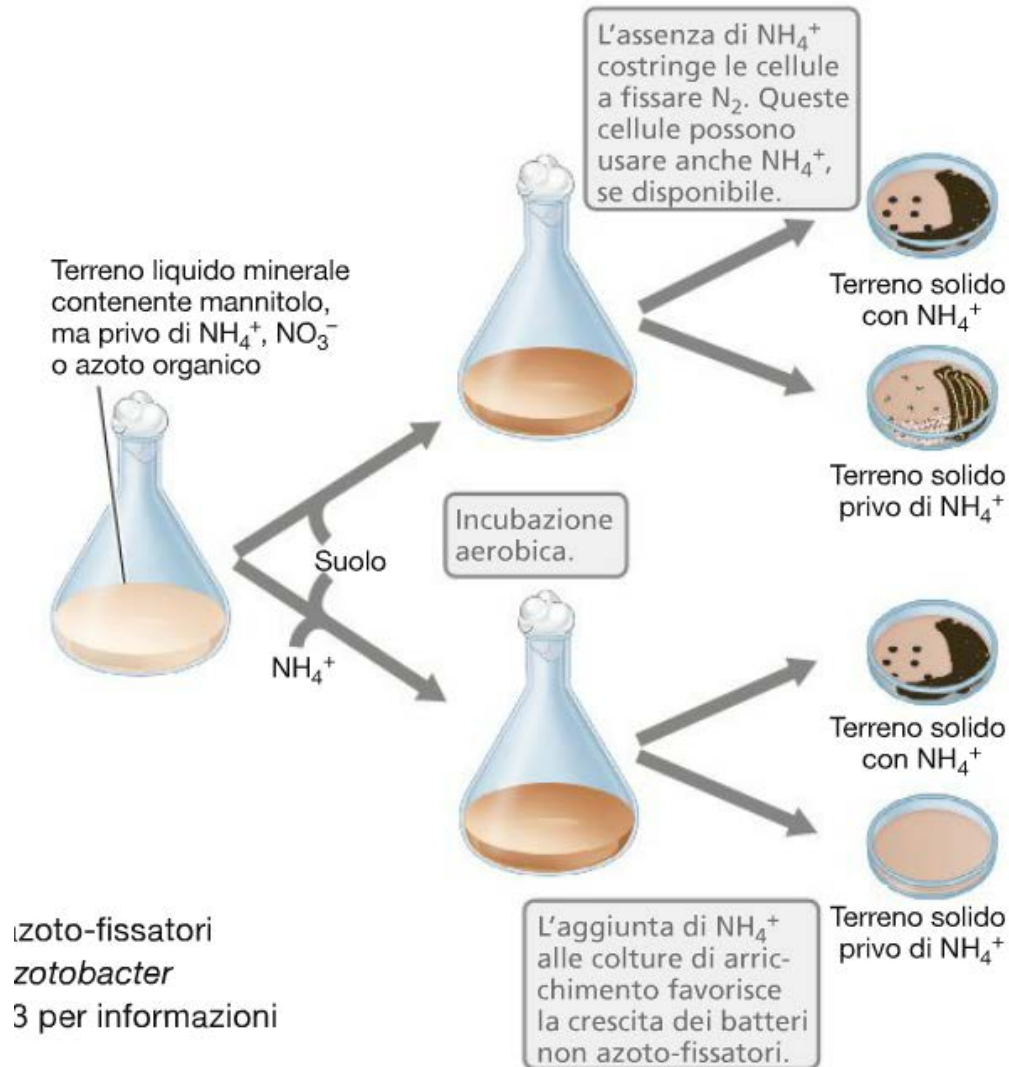
perché

Vitamine, aminoacidi, basi azotate sono disponibili nel terreno e possono venir trasportate all'interno della cellula senza necessità di sintesi .

Per Escherichia coli

la crescita in terreno complesso è di 20 -30 minuti

L'isolamento di *Azotobacter*



azoto-fissatori
azotobacter
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

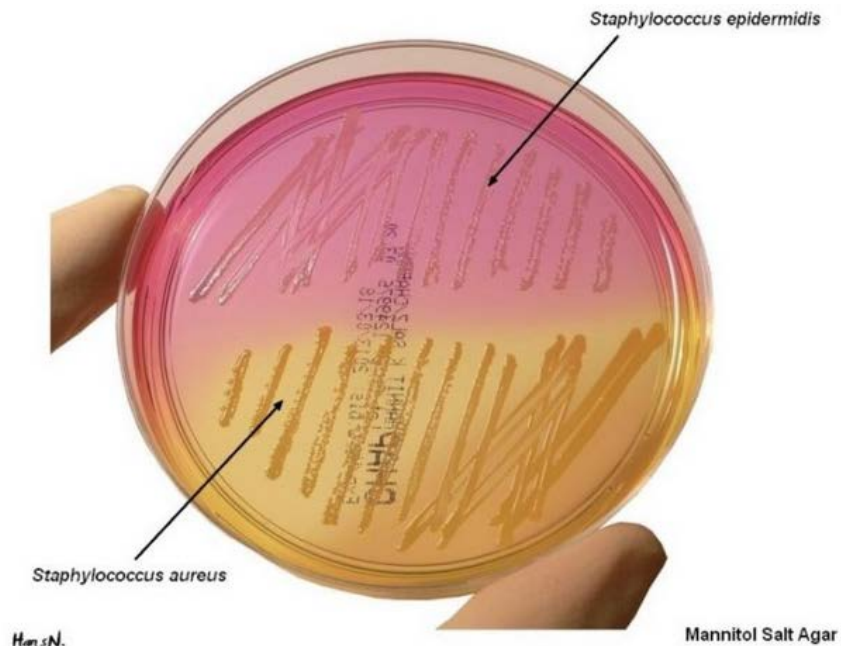
Se si aggiunge un composto azotato (ammoniacca, nitrato) si favorisce la crescita di batteri non azotofissatori e quindi non si riuscirà ad isolare *Azotobacter*

Altri tipi di terreno

Terreni arricchiti: sono terreni complessi ai quali vengono aggiunte miscele complesse come sangue o siero per far crescere batteri particolarmente esigenti

Terreni selettivi: sono terreni che permettono la crescita solo di particolari specie. Per esempio se in un terreno aggiungiamo solo una fonte di carbonio solo i microrganismi in grado di utilizzarla cresceranno (oppure nessuna fonte di carbonio solo gli autotrofi)

Terreni differenziali permettono di distinguere i microrganismi in base ad alcune caratteristiche morfologiche o metaboliche. In genere contengono una sostanza indicatore (colorante) che permette di distinguere le colonie in capaci o incapaci di effettuare una particolare reazione chimica



Tipico terreno selettivo e differenziale è il Mannitol Salt Agar specifico per l'identificazione di *Staphylococcus aureus*..

La capacità selettiva è data dall'alta concentrazione di NaCl (7.5%) che inibisce la crescita di molti microrganismi, esclusi gli stafilococchi.

La fermentazione del D-Mannitolo, ad opera di *Staphylococcus aureus*, causa un abbassamento del pH che viene mostrato dal viraggio del Rosso fenolo che da rosso diventa giallo.

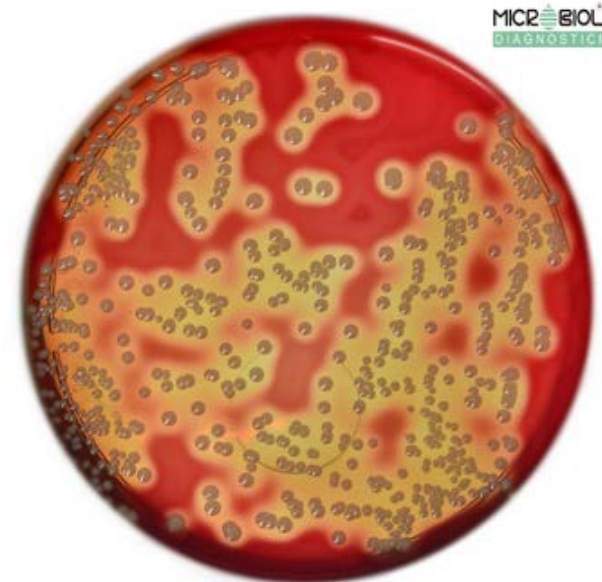
Terreno Mac Conkey: selettivo e differenziale

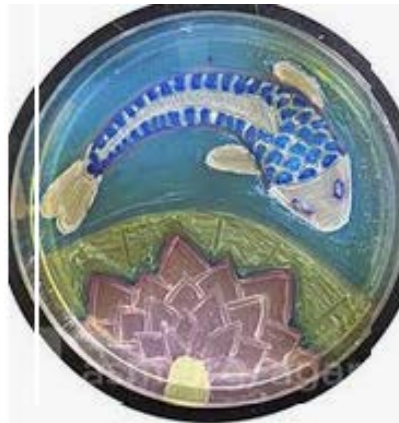
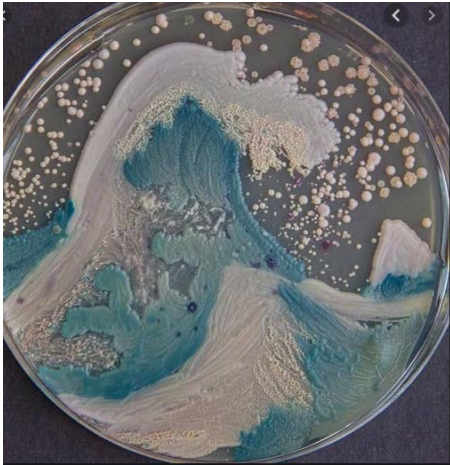
Selettivo perché contenente i Sali biliari inibisce la crescita dei Gram+

Differenziale perché contenente il lattosio e un colorante rosso neutro che a pH acido vira al rosso
I fermentanti saranno rosso
I non fermentanti bianchi



Terreno agar sangue: **arricchito**
terreno ricco che contiene una soluzione al 5% di sangue defibrinato. Permette di osservare l'attività emolitica dei batteri





Agar art!!!



Small Things Considered: Agar Art Cont...
schaechter.asmblog.org

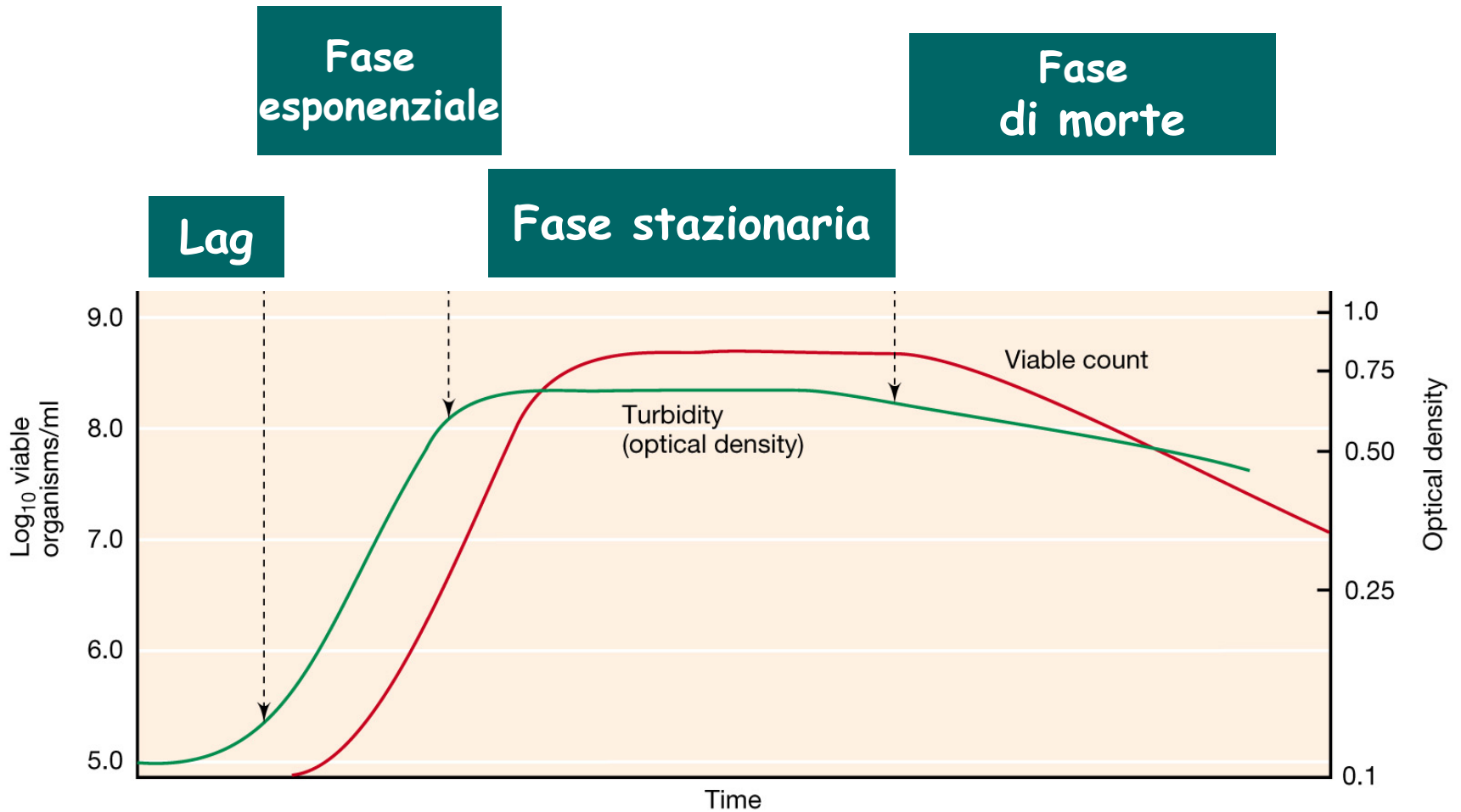


Agar Art Is Magnificent
eludofeed.com

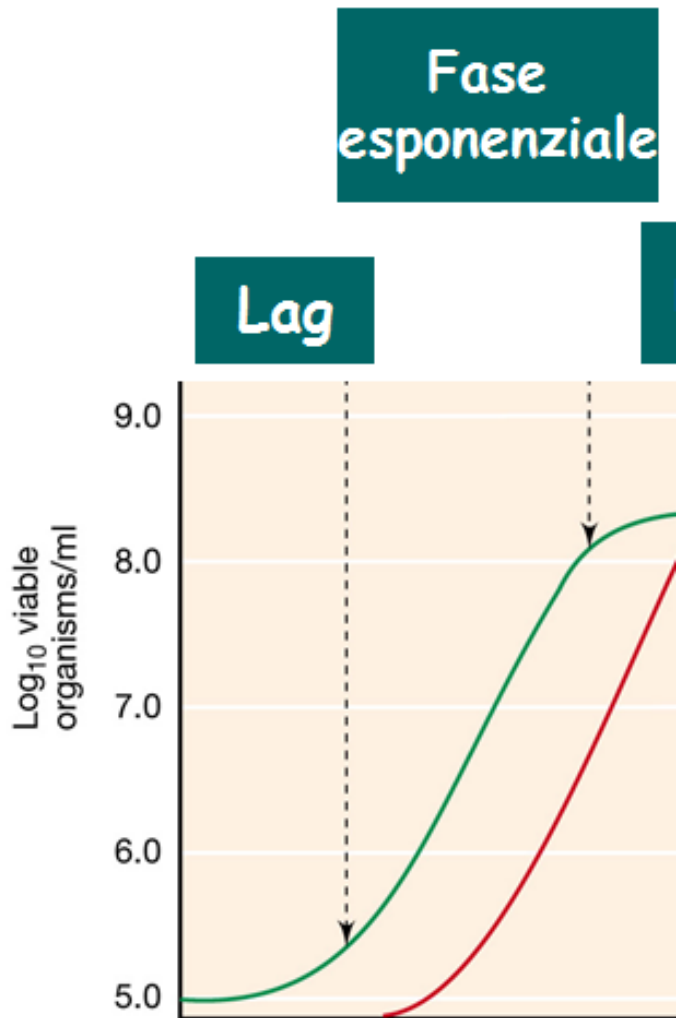
Alcune definizioni essenziali :

- **Crescita** si definisce l'aumento del numero di cellule batteriche in una popolazione batterica (può essere misurato anche come aumento della massa)
- **Velocità di crescita** si intende la variazione del numero di cellule (o della massa) nell'unità di tempo
- **Generazione** l'intervallo di tempo che intercorre perché da singola cellula si formino due cellule figlie
- **Tempo di generazione** tempo necessario ad una popolazione per duplicarsi

Fasi della crescita batterica



Confronto tra OD e numero di cellule vitali calcolato x piastramento

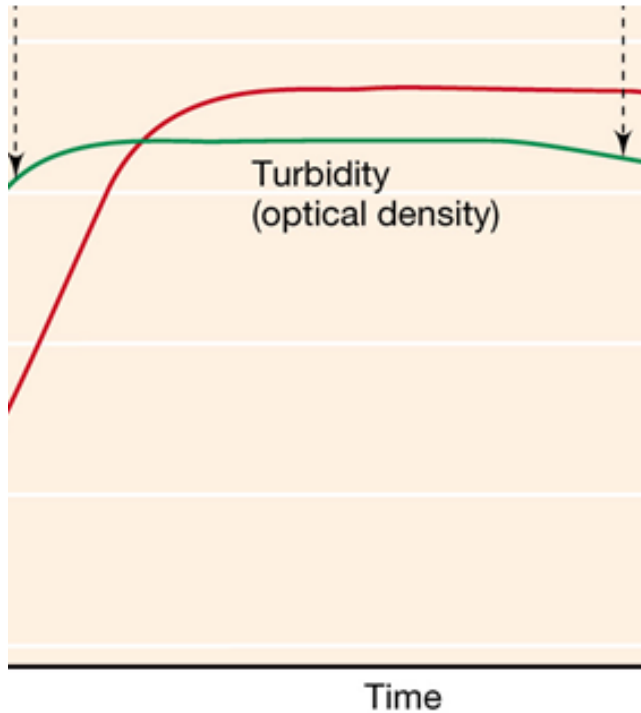


Fase esponenziale: le cellule aumentano alla massima velocità considerando parametri importanti quali terreno, temperatura, nutrienti. Si dice che è una fase di crescita bilanciata in quanto le proporzioni tra tutti i componenti macromolecolari sono invariate.

In genere verso la fine della fase esponenziale si può assistere alla produzione di molecole segnale o di capacità della cellula di acquisire DNA (competenza) o di produrre metaboliti

ale

Fase stazionaria



Fase stazionaria : il numero di cellule non aumenta

Perché si raggiunge un equilibrio tra cellule che si dividono e cellule che muoiono

Perché le cellule non si dividono più?

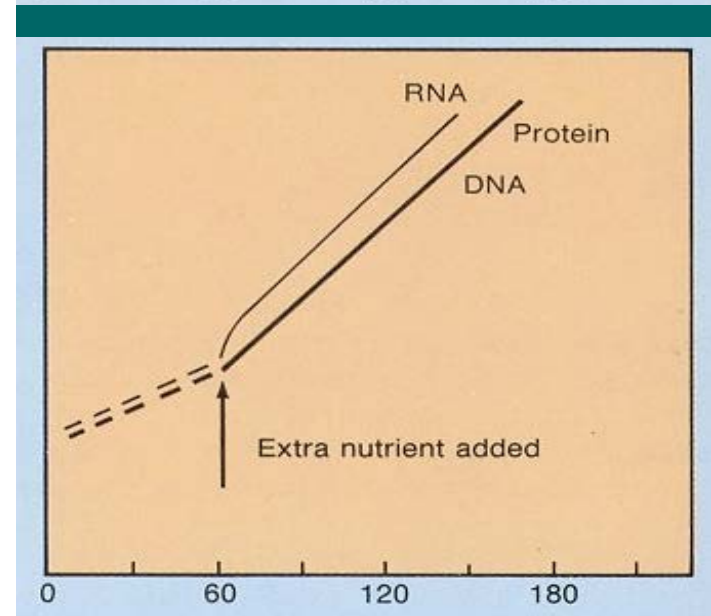
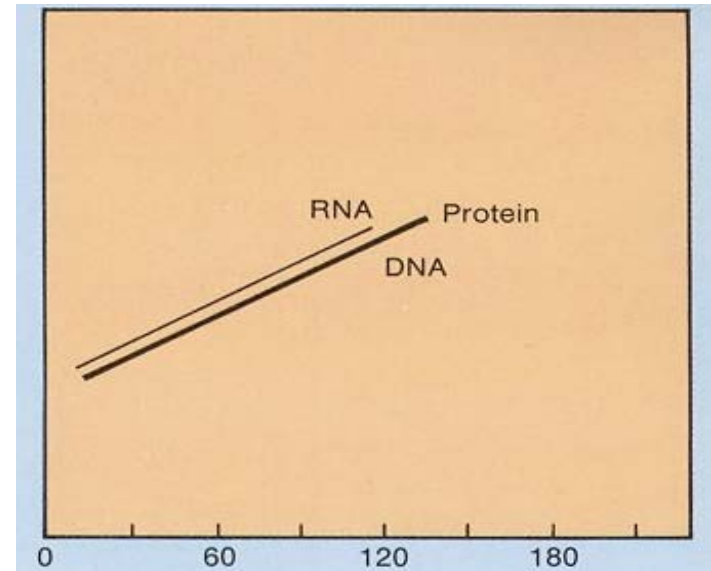
- Esaurimento di nutrienti
- Limitazione di O_2
- Accumulo di molecole segnale o sostanze di rifiuto
- Eccessiva densità cellulare

Si tratta di uno stato fisiologico ben definito con produzione di fattori sigma-specifici (sigma S in *E. coli*) per l'espressione di geni per la sintesi di chaperonine anti- stress o di altri fattori necessari alla vita in questa fase

Cambiamenti nel contenuto in RNA
DNA e proteine in una coltura in
fase esponenziale.

si definiscono **condizioni di crescita
bilanciata** in quanto tutti i
componenti sono sintetizzati con la
medesima efficienza

Esempio di crescita sbilanciata:
l'aggiunta di nutrienti determina
dapprima **un aumento della sintesi
di RNA** seguito da un aumento della
sintesi di proteine e DNA



tempo

Tempo di generazione è estremamente variabile da specie a specie (da 6 min a ore o giorni)

Può variare :

- in funzione delle condizioni di incubazione,
- del terreno di crescita,
- di fattori ambientali

Crescita esponenziale : il numero di cellule raddoppia in un determinato intervallo di tempo

Come si misura la crescita di una popolazione batterica ?

SEGUENDO NEL TEMPO:

- la variazione del numero di cellule
- la variazione di alcuni elementi della massa cellulare
- la variazione del peso secco della coltura.

Il numero di cellule può essere determinato

in modo diretto mediante :

Conta totale ovvero conta diretta al microscopio

Conta vitale capacità di formare colonie delle cellule batteriche

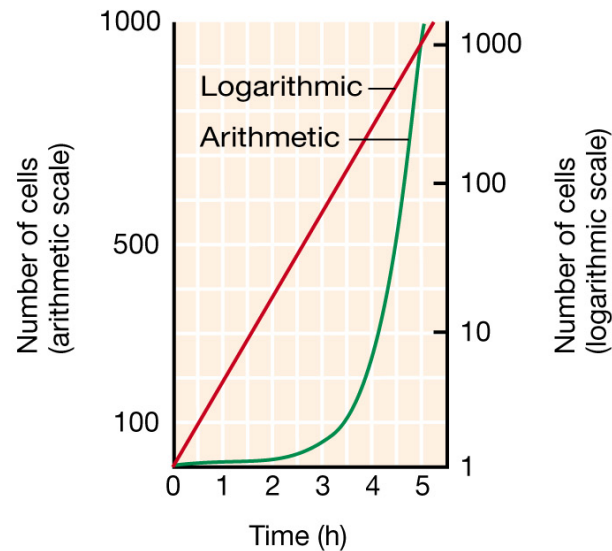
in modo indiretto mediante :

Misura della torbidità tramite colorimetro o uno spettrofotometro

Velocità di crescita di una coltura batterica che si duplica ogni 30 minuti

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)



(b)

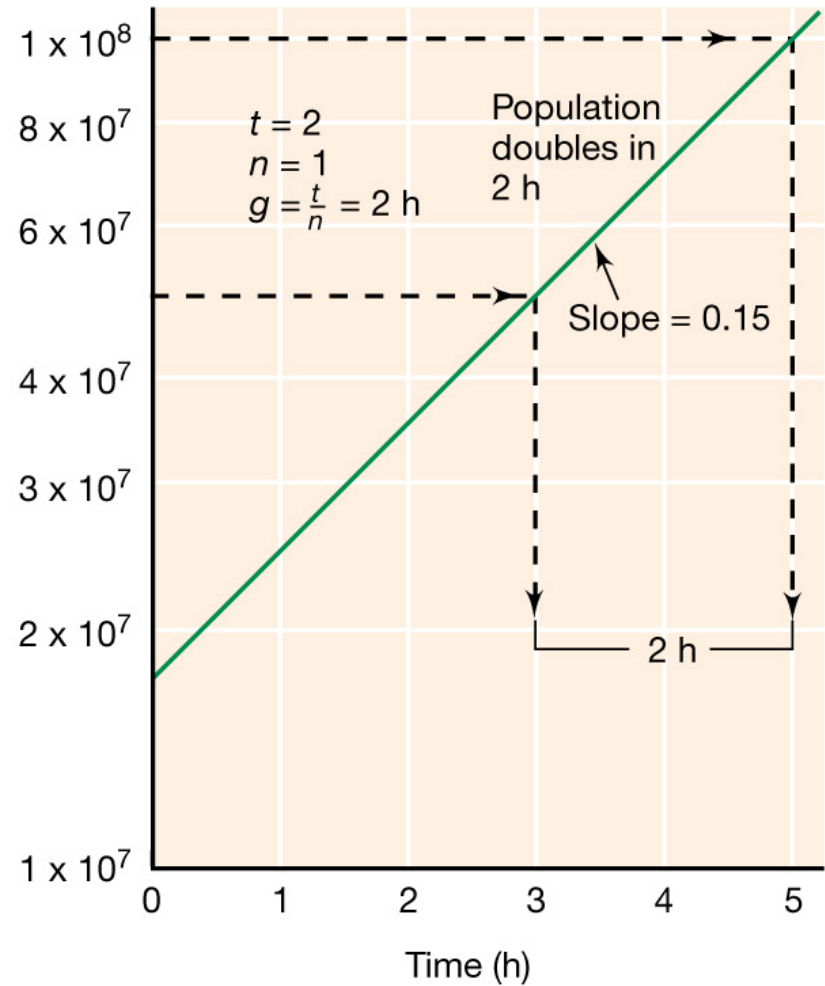
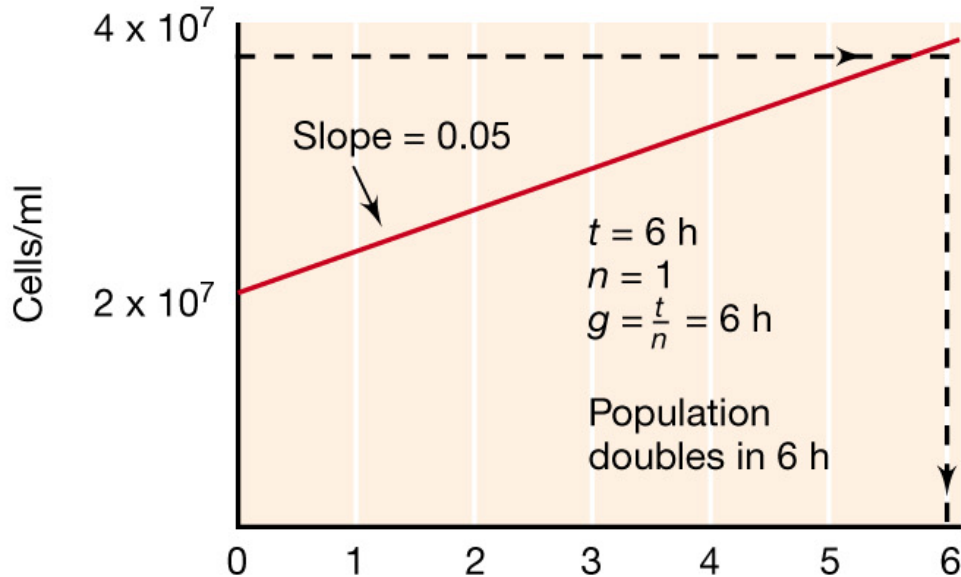
Metodo grafico per valutare il tempo di generazione di due colture

$$N = N_0 2^n$$

N = n. finale di cellule

N_0 = n. iniziale di cellule

n = n. di generazioni



Il tempo di generazione g della popolazione viene calcolato come

t/n dove t è il tempo in ore /minuti

Conoscendo il n.iniziale di cellule(N_0) ed il n. di cellule finale(N)

Si può ricavare n

$$N=N_02^n$$

$$\log N= \log (N_02^n)$$

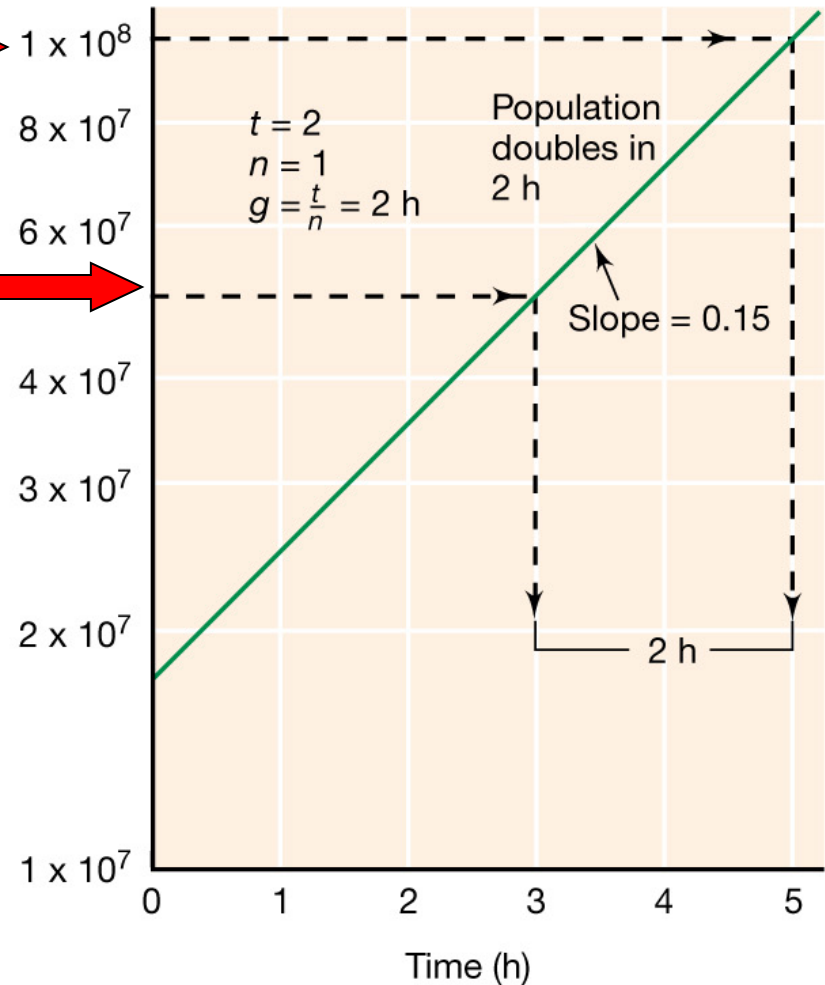
$$\log N= \log N_0+ \log 2^n$$

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

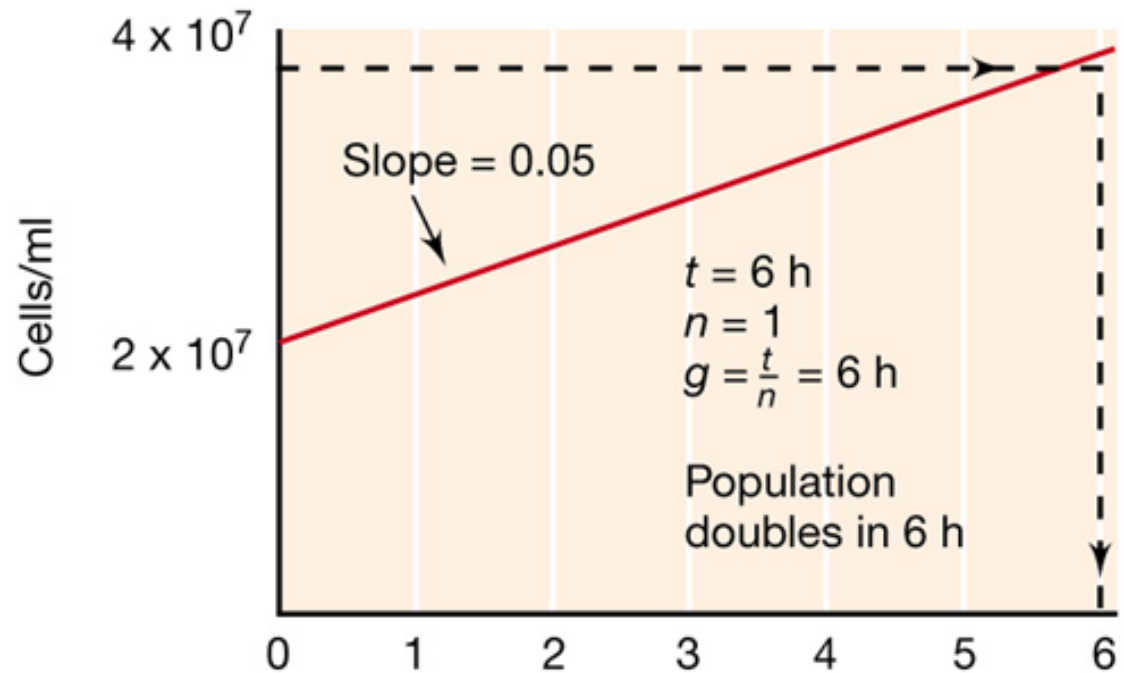
$$n= \frac{\log N-\log N_0}{\log 2} = \frac{\log N-\log N_0}{0.301} = 3.3(\log N-\log N_0)$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0.3} = 3.3(\log N - \log N_0)$$

$$n = 3.3 [(\log 10^8 - \log (5 \times 10^7))] = 3.3 (8 - 7.69) = 3.3(0.301) = 1$$



$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0.3} = 3.3(\log N - \log N_0)$$



Tempo di generazione si intende il periodo richiesto per duplicare il n.° di batteri.

Le cellule di *E.coli* possono crescere con un tempo di generazione variabile tra 18 e 180 min.

Nel caso dei batteri che contengono un singolo cromosoma la frequenza dei cicli di replicazione è controllata dal numero di eventi di **INIZIO** all'origine di replicazione.

Si definisce come I l'intervallo di tempo che intercorre tra due cicli di divisione

IL TEMPO DI GENERAZIONE di una cellula dipende da due costanti

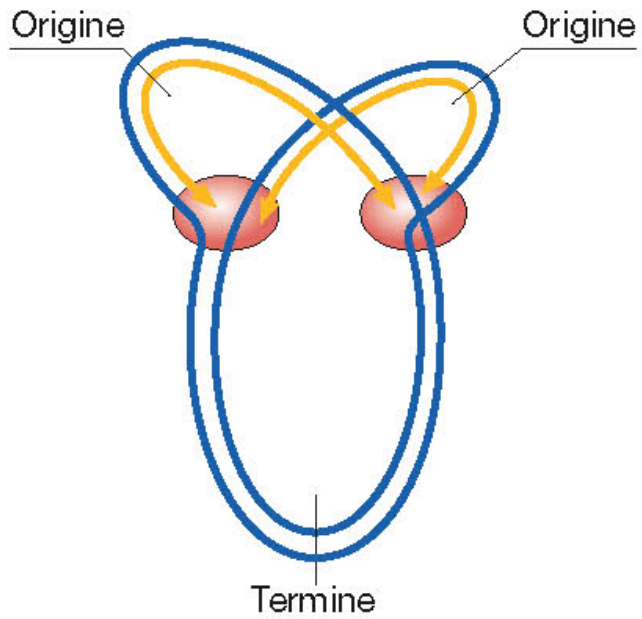
C che è il tempo fisso di 40 minuti richiesto per replicare l'intero cromosoma batterico. La sua durata corrisponde al movimento di ogni singola forca di replicazione 50.000 basi /minuto (Cromosoma *E.coli* 4.600.000 basi = 46 min.)

D è il tempo fisso di 20 minuti che intercorre tra la fine di un ciclo di replicazione e la successiva divisione cellulare: questo periodo è il T necessario per assemblare i componenti della cellula.

$$C+D = 60 \text{ minuti}$$

$$I \geq C + D$$

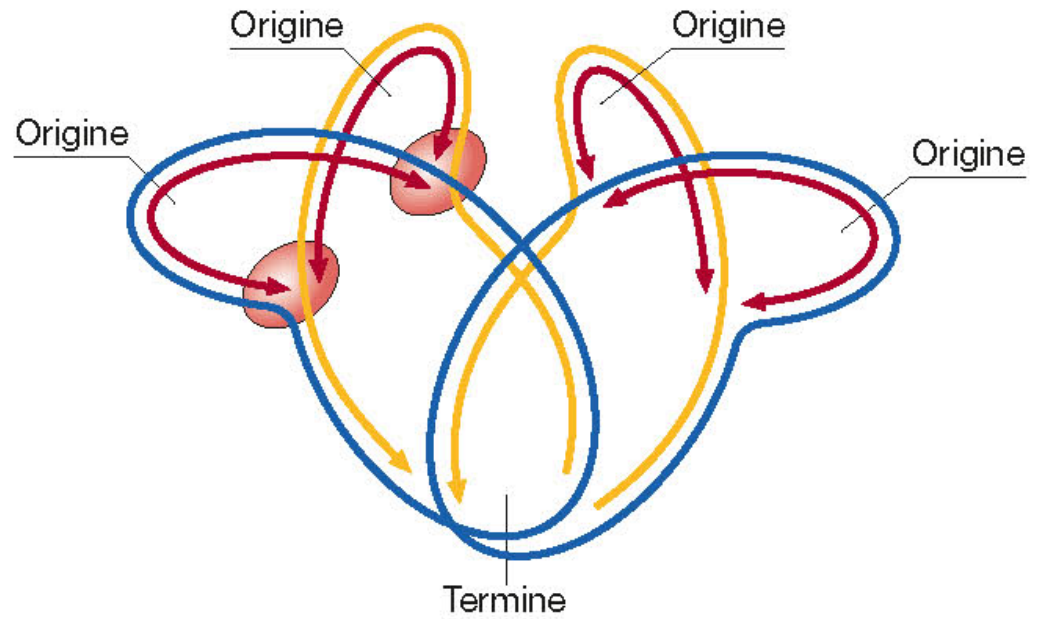
Tempo di generazione
 \geq di 60 min



Cellula a crescita lenta

$$I < C + D$$

Tempo di generazione
< di 60 min



Cellula a crescita rapida

Quindi per i batteri che si dividono più frequentemente di 60 min. **il ciclo di replicazione** deve iniziare prima della fine del precedente ciclo di divisione .

Quindi vi sono **più eventi di inizio della replicazione** durante un ciclo cellulare : **questa è la risposta di una cellula alla sua incapacità di ridurre i periodi C e D in modo da abbreviare il ciclo cellulare.**

Le cellule che crescono rapidamente posseggono un numero maggiore di forche replicative del cromosoma.

Metodi di sincronizzazione

Normalmente in una coltura in accrescimento esponenziale le cellule si dividono in modo **NON SINCRONO** quindi in ogni istante sono presenti cellule in tutti gli stadi del ciclo cellulare.

Per poter studiare le variazioni biochimiche, morfologiche e fisiologiche che avvengono tra 2 divisioni cellulari si cerca di

SINCRONIZZARE la coltura in modo che **TUTTE LE CELLULE** in una coltura siano allo **STESSO PUNTO** del **CICLO CELLULARE**.

1. Metodi che agiscono sul **metabolismo cellulare** portando le cellule tutte allo stesso punto del ciclo
2. **Metodi fisici** che permettono di separare nella popolazione le cellule allo stesso punto

1. Metodi che agiscono sul metabolismo cellulare portando le cellule tutte allo stesso punto del ciclo

Sincronizzazione con la TEMPERATURA

un abbassamento della temperatura da 37°C a 25°C per 15 min induce divisione sincrona in *Pneumococco*. L'uso di sbalzi termici ad intervalli fissi è applicato anche ad altri microrganismi. Viene sfruttata la termodipendenza di qualche passaggio della divisione cellulare che avviene solo a T più elevata

Sincronizzazione per CARENZA NUTRITIVA

i microrganismi vengono posti in un terreno in cui mancano metaboliti essenziali (aminoacidi, vitamine basi azotate) : in questo modo le cellule raggiungono una condizione di blocco della crescita e non appena poste in terreno nutritivo completo presentano divisione sincrona

Sincronizzazione per DILUIZIONE

le cellule vengono fatte crescere fino alla fase stazionaria (5×10^9 cellule/ml) poi diluite in terreno fresco

2. Metodi fisici che permettono di separare nella popolazione le cellule allo stesso punto

Sincronizzazione per CENTRIFUGAZIONE

in gradiente di saccarosio le cellule sedimentano con una velocità proporzionale alle loro dimensioni: si raccolgono le cellule con le medesime dimensioni che presentano un buon grado di sincronia

Sincronizzazione per FILTRAZIONE

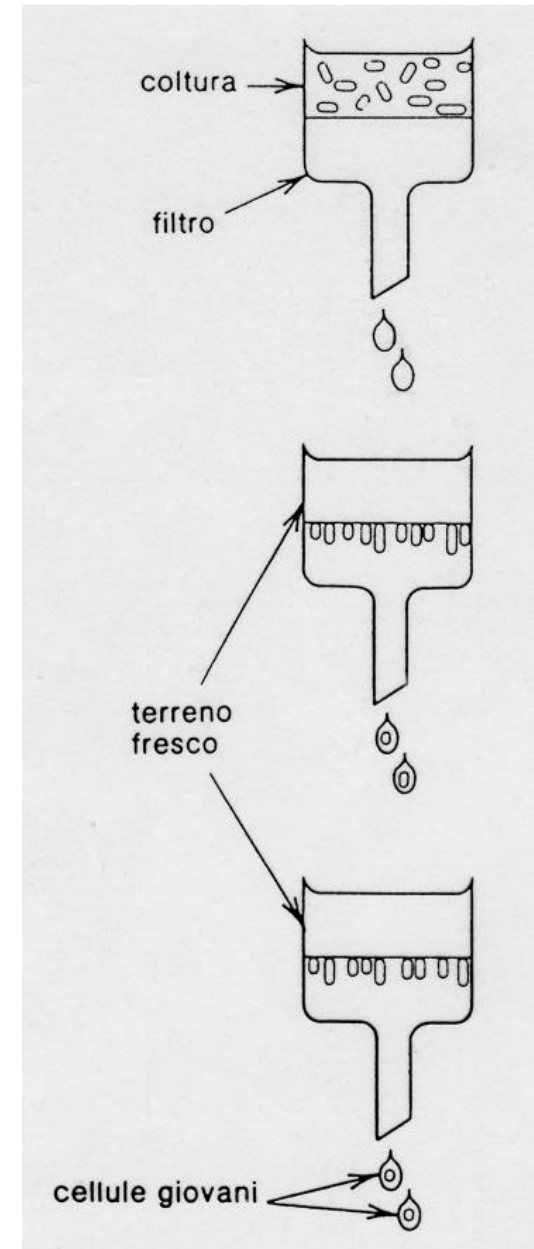
le cellule vengono filtrate attraverso filtri sovrapposti in grado di trattenere cellule di diverse dimensioni

Le tecniche di sincronizzazione che agiscono sul metabolismo cellulare hanno il vantaggio di portare tutta la popolazione allo stato di sincronia mentre i metodi fisici hanno il difetto di allontanare le cellule dal mezzo di coltura con possibilità di alterarne il metabolismo.

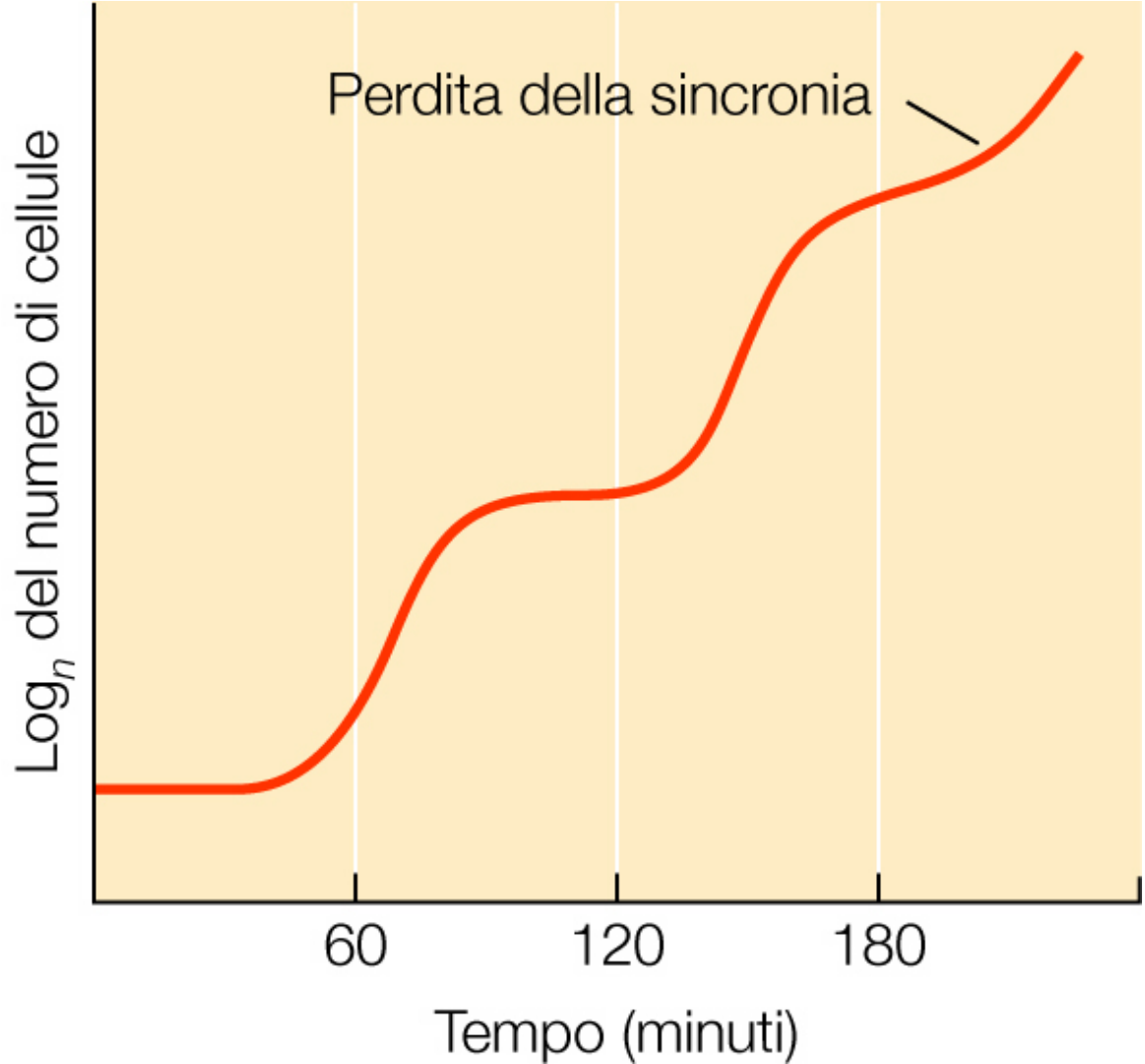
Sincronizzare le colture di cellule batteriche :

Baby machine

(ideata da Helmstetter-Cummings)

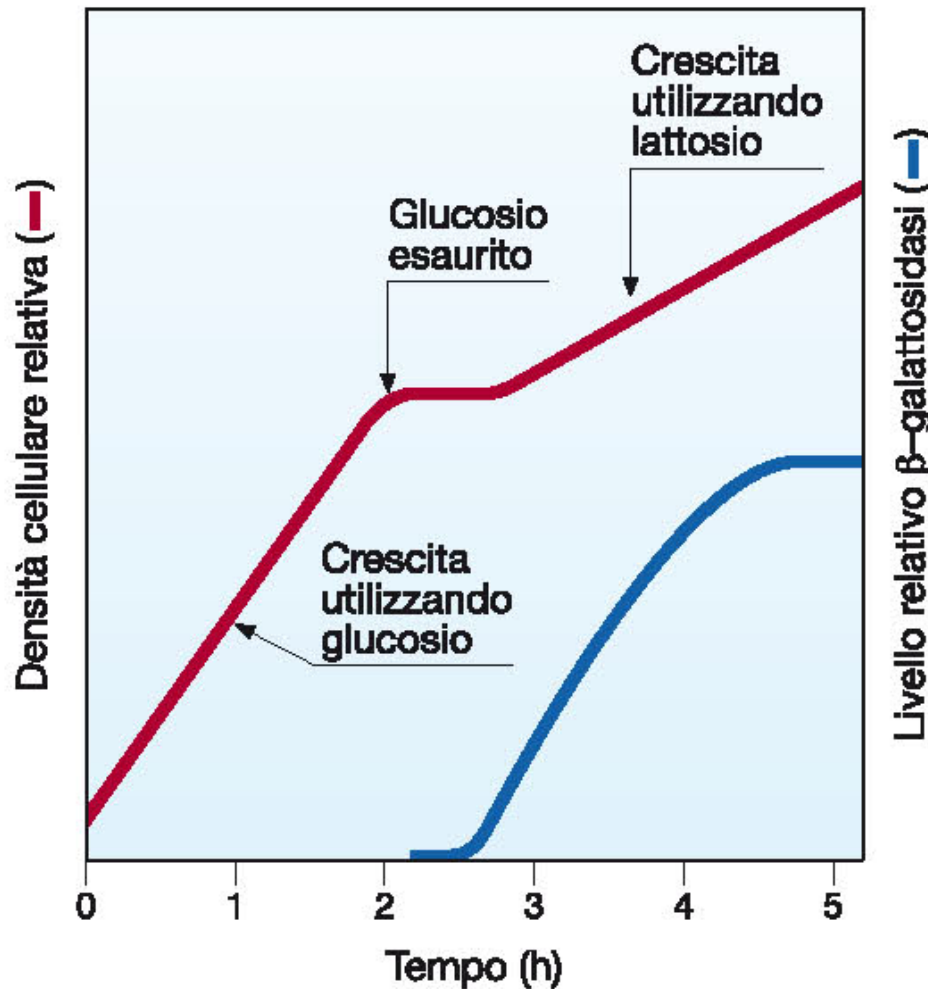


Tipica curva di crescita di un microrganismo in una coltura sincrona.
Le colture tendono a perdere la sincronia dopo alcune generazioni



La crescita diauxia

Si distinguono due distinte fasi di crescita esponenziale

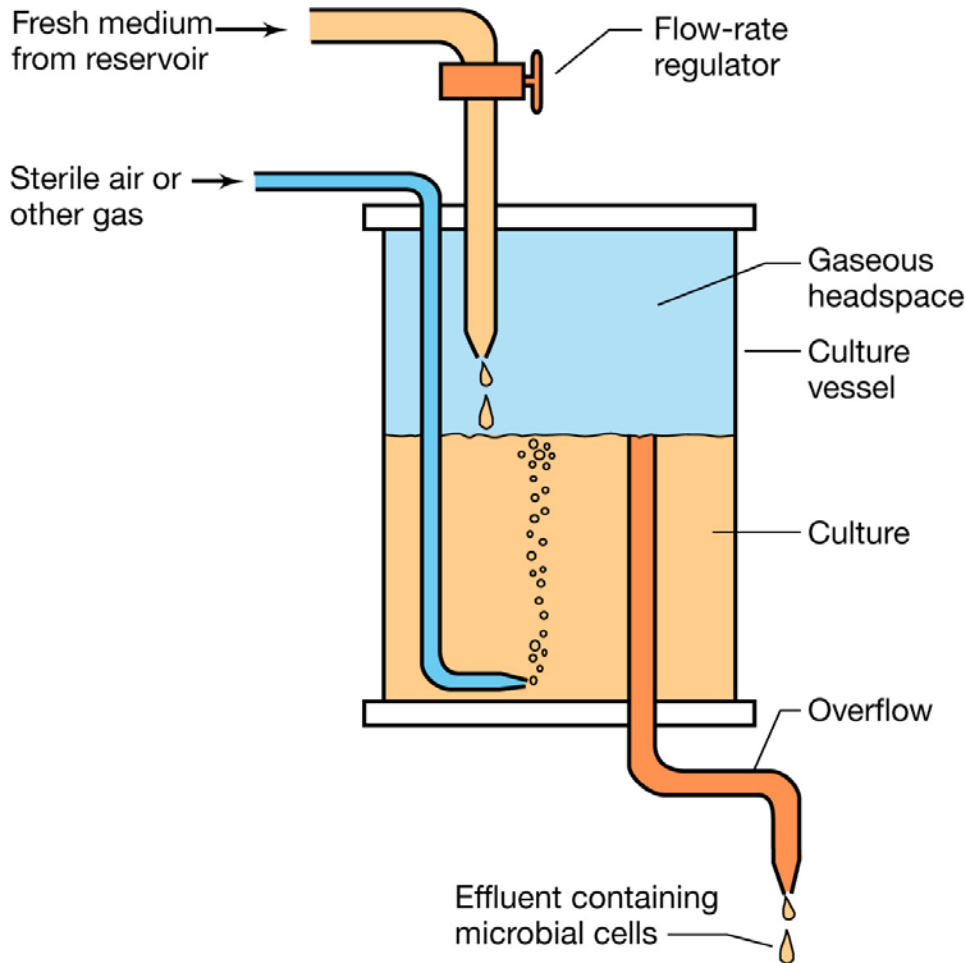


Ruolo del trasporto del glucosio tramite traslocazione di gruppo nel modulare i livelli di AMPc necessario per l'utilizzazione del lattosio

Fattori che svolgono un ruolo chiave nel controllo della crescita microbica

- Temperatura
- pH
- disponibilità di acqua
- disponibilità di ossigeno

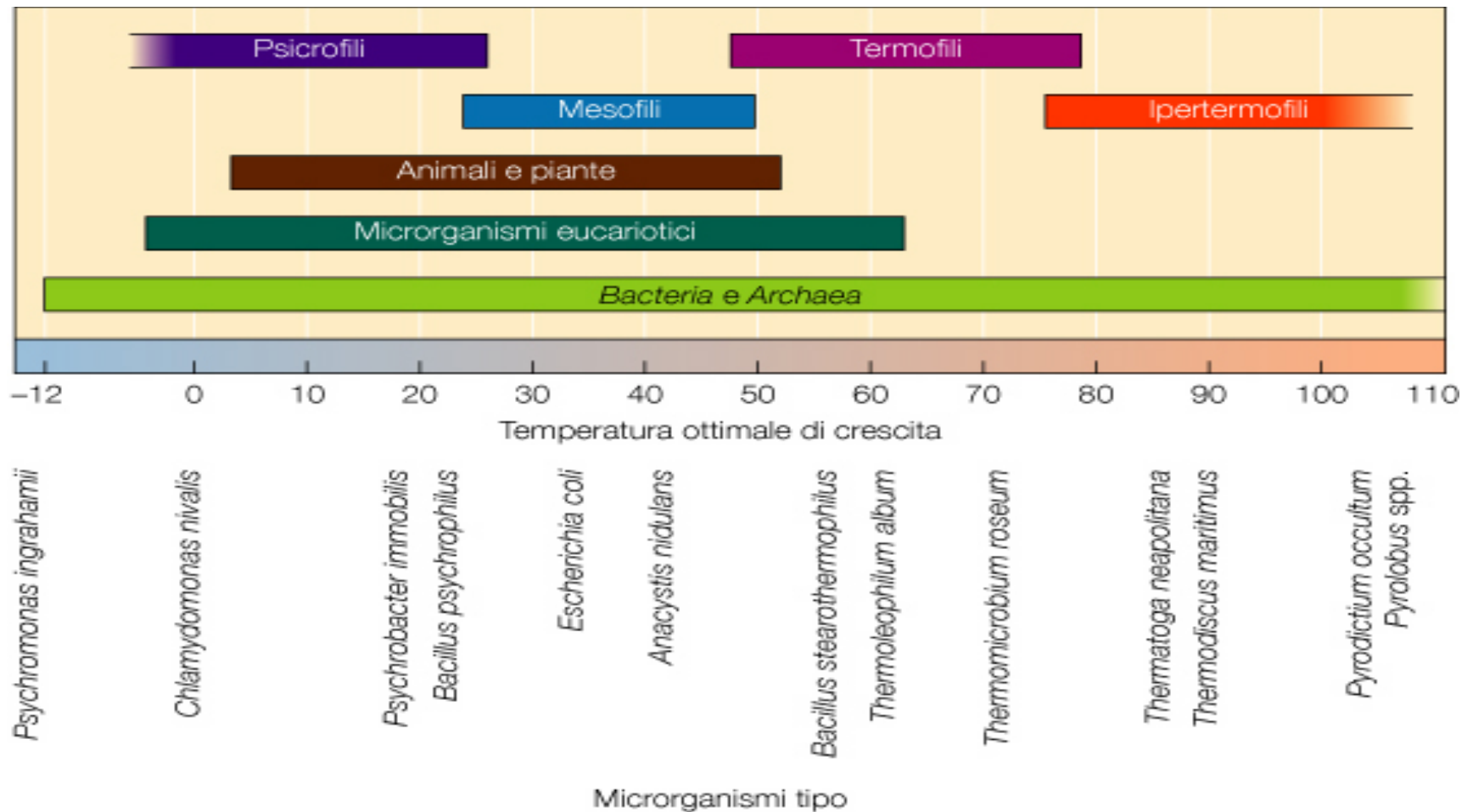
Fermentatori per le crescite industriali: viene immesso nuovo terreno, ossigeno e viene monitorato il pH



Intervalli di temperatura di crescita di alcune forme di vita.

I Batteri e gli Archea sono gli organismi con uno spettro di T° più ampio (-0°C a $+115^{\circ}\text{C}$).

I soli microrganismi che possono crescere sopra 92°C sono gli Archea

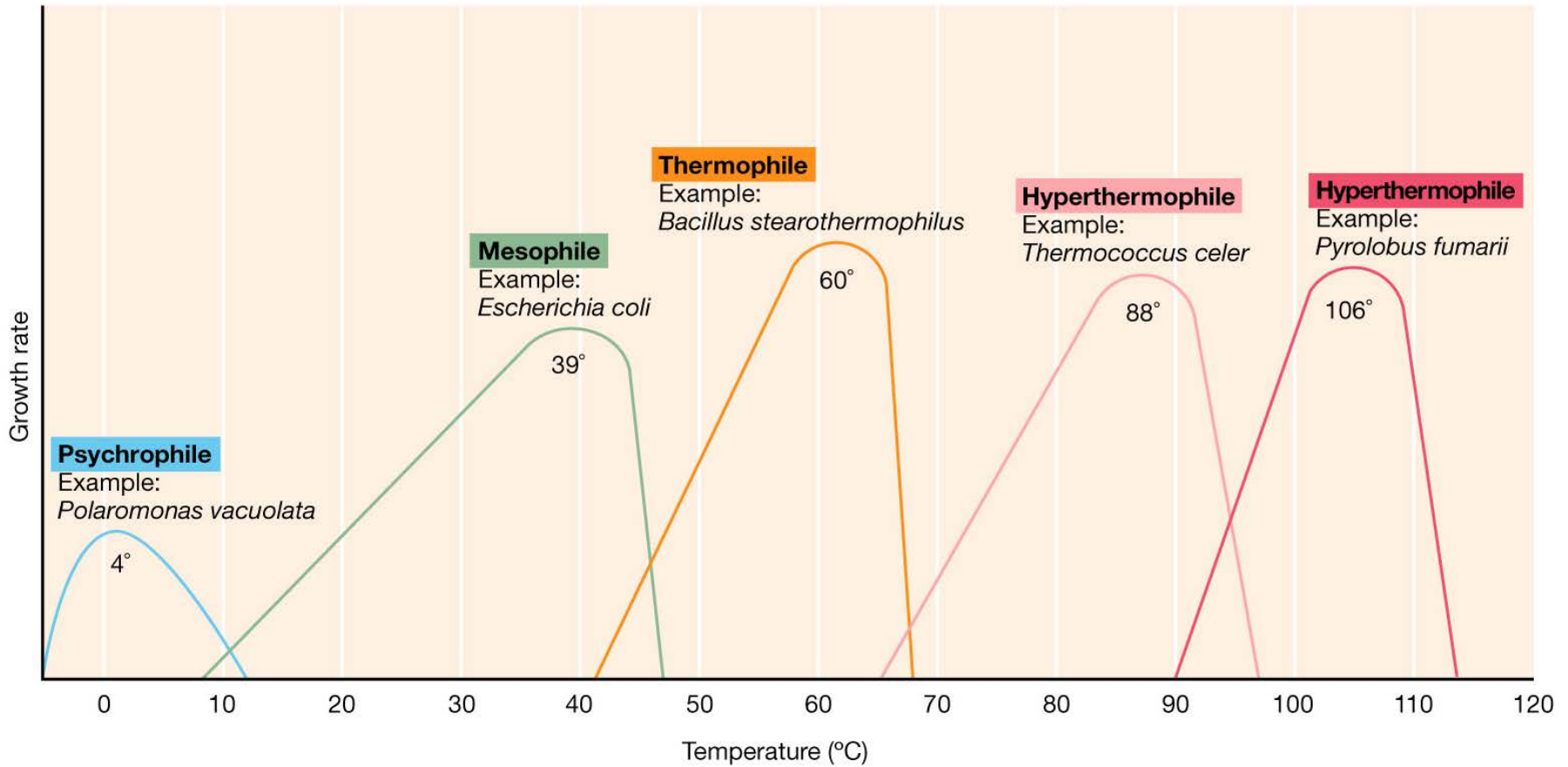


Tab. 6.1**Limiti superiori di temperatura per la crescita di diversi organismi**

Gruppo	Limiti superiori di temperatura (°C)
Animali	
Pesci e altri vertebrati acquatici	38
Insetti	45-50
Ostracodi (crostacei)	49-50
Piante	
Piante vascolari	45
Muschi	50
Microrganismi eucariotici	
Protozoi	56
Alghe	55-60
Funghi	60-62
Procarioti	
<i>Batteri</i>	
Cianobatteri	70-74
Fototrofi anossigenici	70-73
Chemiorganotrofi/chemiolitotrofi	95
<i>Archea</i>	
Chemiorganotrofi/chemiolitotrofi	113 ^a

^a Limite superiore di temperatura per la crescita dell'organismo *Pyrolobus fumarii*. Specie correlate di *Pyrodictium* possono crescere fino a 121 °C.

Relazione tra temperatura e velocità di crescita dai 4°C ai 106°C

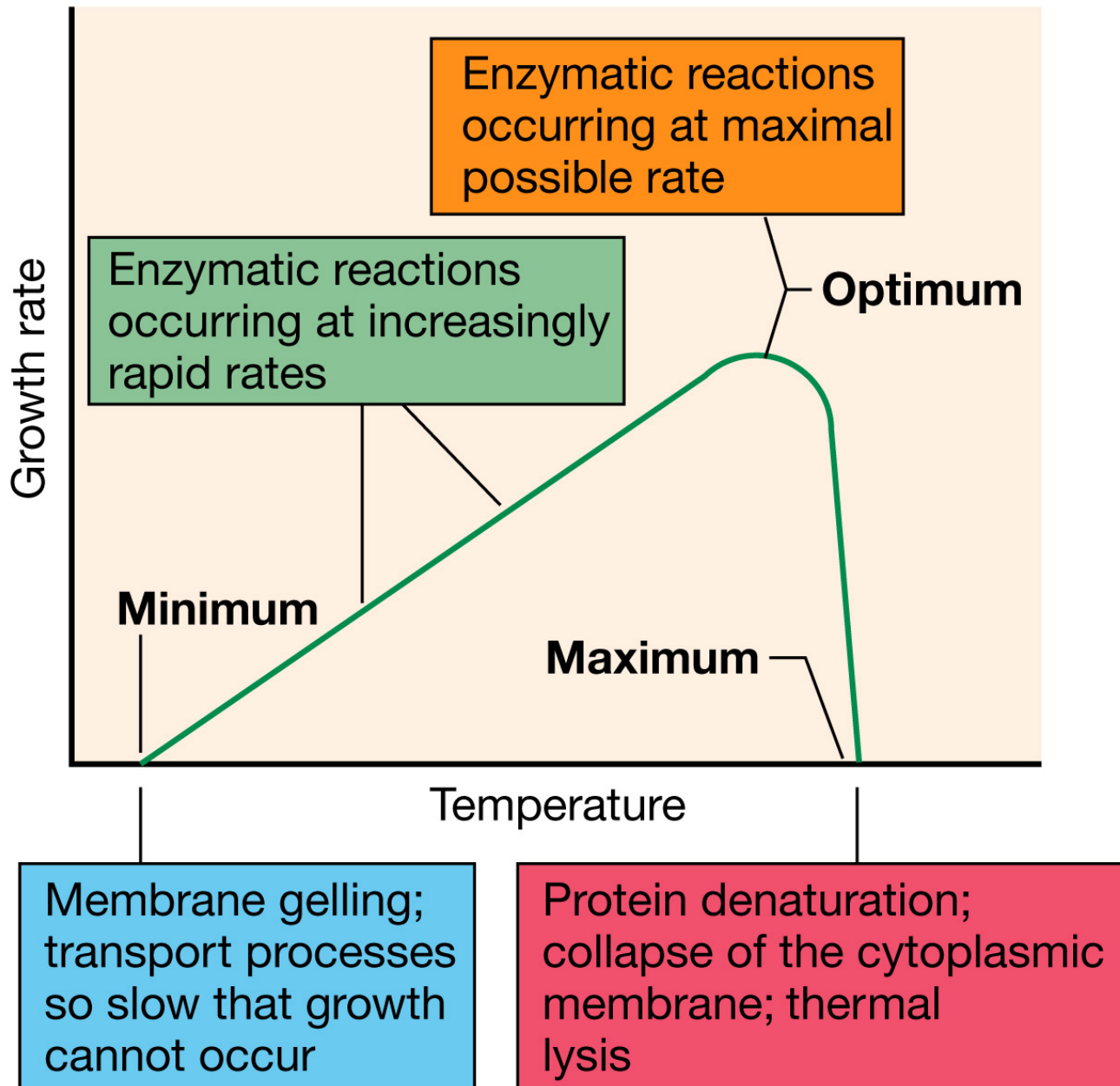


Influenza della temperatura

All'aumentare della temperatura le reazioni chimiche ed enzimatiche della cellula procedono ad una velocità maggiore. Oltre una certa temperatura le proteine vengono danneggiate

Per ogni organismo è possibile definire le temperature cardinali

- 1) Temperatura minima al disotto della quale non si ha crescita
- 2) Temperatura ottimale alla quale si ha la massima velocità di crescita
- 3) Temperatura massima al disopra della quale non si ha crescita



Adattamento molecolare alla psicrofilia

Gli psicrofili si dividono in obbligati e facoltativi

Obbligati crescono tra 15°C e 0°C con una T ottimale intorno a 10°C

Facoltativi possono crescere a 0°C ma hanno una T ottimale intorno a $20-25^{\circ}\text{C}$ e possono crescere in ambienti temperati.

Sono contaminanti di alimenti conservati a bassa T°

Gli psicrofili producono enzimi che funzionano in modo ottimale in ambiente freddo e che spesso vengono denaturati a temperatura moderata.

Gli enzimi attivi a bassa temperatura

1) hanno una maggiore quantità di α eliche ed una minore quantità di strutture a β -foglietto : questo consente una maggiore flessibilità in ambiente freddo

2) un maggiore contenuto in AA polari e un minore contenuto di AA idrofobici che contribuisca a mantenere la proteina maggiormente flessibile (e attiva)

GLI **PSICROFILI** per mantenere funzionale la membrana citoplasmatica a bassa temperatura

hanno una membrana con un alto contenuto di **ACIDI GRASSI INSATURI** che permette di restare **SEMIFLUIDA**.

(membrane contenenti acidi grassi saturi tenderebbero ad irrigidirsi e a perdere la funzionalità)

I lipidi di alcuni batteri contengono acidi grassi polinsaturi e lunghe catene carboniose con numerosi doppi legami

Congelamento

Qual è il limite inferiore per la crescita di un microorganismo?

La crescita è possibile fino a quando è disponibile acqua allo stato liquido.

0°C o -2.5°C (acqua marina)

Il congelamento impedisce la crescita ma non determina necessariamente la morte

Sostanze criopreservanti se aggiunte ad una concentrazione del 10% (glicerolo o DMSO) possono permettere di conservare le cellule per lunghi periodi tempo a -70 o -196°C)

Adattamento molecolare alla TERMOFILIA

L'analisi di enzimi termostabili dimostra che la sequenza aminoacidica differisce di poco da quella di enzimi con funzione simile

STABILITA' al Calore attribuita alla **sostituzione di pochi aminoacidi** critici situati in uno o più punti dell'enzima che determinano una differente struttura quaternaria più resistente agli effetti denaturanti del calore

- **Aumento dei legami ionici tra le cariche positive e negative dei vari AA**
- forte compattamento delle porzioni interne delle proteine che non si distendono nel citoplasma
- alcuni composti prodotti in quantità significative per stabilizzare le proteine
 - di inositolo fosfato
 - diglicerol fosfato
 - mannosilglicerato

Stabilità della membrana nei Termofili

La membrana dei termofili è ricca di **ACIDI GRASSI SATURI** che consentono di rimanere stabile e funzionale alle alte temperature

Gli acidi grassi saturi formano legami idrofobici molto più forti rispetto a quelli degli acidi grassi insaturi contribuendo così alla stabilità della membrana.

Negli Archea che sono termofili estremi gli acidi grassi nella membrana sono sostituiti dagli idrocarburi legati con legame etere al glicerolfosfato.

Parete cellulare degli Archea può essere costituita da

- polisaccaridi
- glicoproteine
- proteine

Methanosarcina contiene una spessa parete polisaccaridica formata da

Glucosio, acido glucuronico, galattosamina e acetato.

La struttura della parete di è simile a lla

CONDROITINA, uno dei componenti principali del tessuto connettivo ma non contiene solfato

Non si ritrovano pareti costituite da pseudopeptidoglicano o solo polisaccaridi nei termofili estremi

La parete di glicoproteine

Alcuni metanogeni, alofili e termofili estremi hanno una parete cellulare costituita da glicoproteine

I carboidrati presenti sono esoso come glucosio, glucosammina, galattosio e mannosio , pentosi come ribosio e arabinosio

La disponibilità di acqua è espressa in termini fisici come ATTIVITA' dell'ACQUA.

A_w rappresenta il rapporto tra la pressione di vapore dell'aria in equilibrio con una sostanza (o soluzione) e la pressione di vapore dell'acqua pura.

I valori di a_w sono compresi tra 0 e 1

Nella maggior parte dei casi il citoplasma ha una concentrazione di soluti più elevata di quella dell'ambiente e l'acqua tende a penetrare nella cellula

Equilibrio idrico positivo

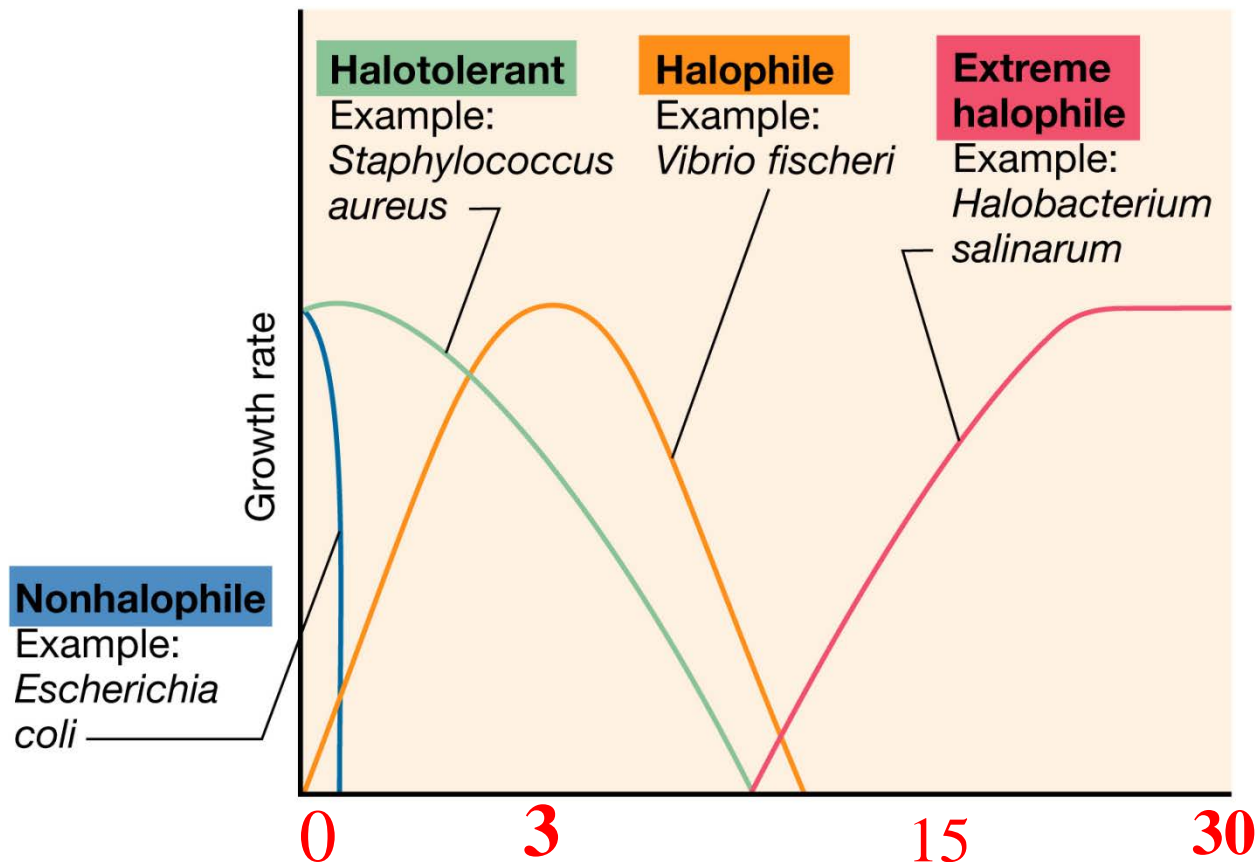
Se la cellula si trova in un ambiente in cui l'attività dell'acqua è bassa e non riesce a fronteggiare la fuoriscita di acqua va incontro a morte

Tab. 6.2**Attività dell'acqua in alcune sostanze**

Attività dell'acqua (a_w)	Materiale	Esempi di organismi^a
1,000	Acqua pura	<i>Caulobacter, Spirillum</i>
0,995	Sangue umano	<i>Streptococcus, Escherichia</i>
0,980	Acqua marina	<i>Pseudomonas, Vibrio</i>
0,950	Pane	La maggior parte dei bastoncini Gram-positivi
0,900	Sciroppo d'acero, prosciutto	Cocchi Gram-positivi come <i>Staphylococcus</i>
0,850	Salame	<i>Saccharomyces rouxii</i> (lievito)
0,800	Torte alla frutta, marmellate	<i>Saccharomyces bailii, Penicillium</i> (fungo)
0,750	Laghi salati, pesci salati	<i>Halobacterium, Halococcus</i>
0,700	Cereali, dolci, frutta secca	<i>Xeromyces bisporus</i> e altri funghi xerofili

^a Esempi di procarioti o funghi capaci di crescere in un terreno di coltura con una determinata attività dell'acqua.

Effetto della concentrazione di ioni sodio sulla crescita di microrganismi con diversa tolleranza alla salinità



Quando un microrganismo cresce in ambienti a bassa disponibilità d' H_2O può ottenere H_2O aumentando la concentrazione di soluti al proprio interno

L' incremento può avvenire per

1. Trasferimento di ioni inorganici dall'ambiente esterno
2. Sintesi di un soluto organico

I soluti che vengono utilizzati per regolare l'entrata di acqua vengono definiti

- **soliti compatibili**
- **zuccheri altamente solubili,**
- **alcoli**
- **aminoacidi**

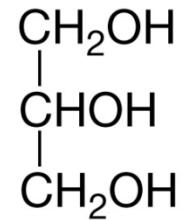
possono essere sintetizzati o acquisiti dall'ambiente (betaina)

In taluni Archea alofili estremi il soluto è rappresentato da ioni K

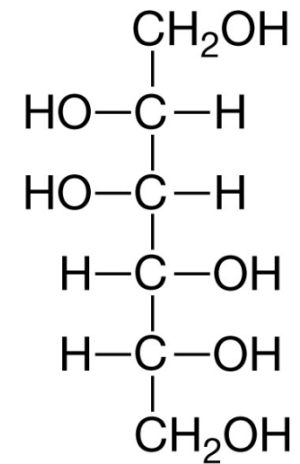
Il tipo e la quantità accumulato è tipico di ogni microrganismo.

3. Alcohol-type solutes:

Glycerol

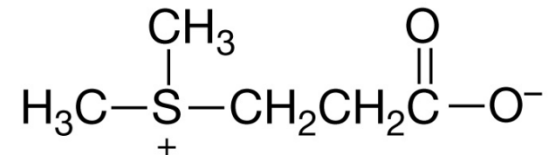


Mannitol



4. Other:

Dimethylsulfoniopropionate:

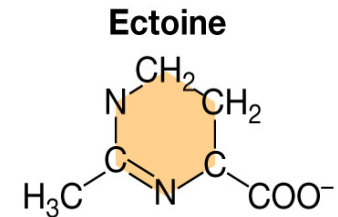
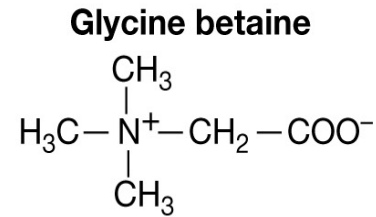


La **betaina** è un derivato dell'AA glicina i cui protoni del gruppo aminico sono sostituiti con 3 gruppi metilici creando carica + su N che aumenta la solubilità

Staphylococcus batterio alotollerante (7.5%) utilizza la **prolina**

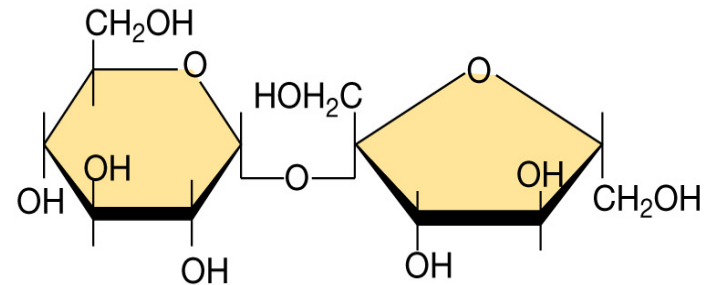
Ectoina è un derivato ciclico dell'Acido aspartico

1. Amino acid-type solutes:

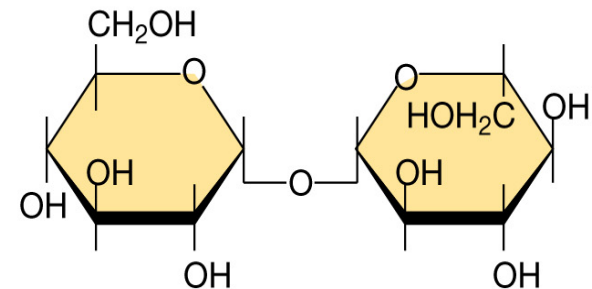


2. Carbohydrate-type solutes:

Sucrose



Trehalose



L'acqua marina contiene il 3% di cloruro di sodio

I microrganismi marini hanno specifica richiesta di ioni sodio **ALOFILI**

Alofilo basso (1-6%)

Alofilo medio (6-15%)

Alotolleranti possono sopportare qualche riduzione dell'aw nel loro ambiente ma generalmente crescono meglio in assenza di soluti aggiunti

Tab. 6.3 Soluti compatibili nei microrganismi

Organismo	Principale soluto accumulato	α_w minima per la crescita
Batteri, non fototrofi	Glicina betaina, prolina (principalmente Gram-positivi), glutamato (principalmente Gram-negativi)	0,97-0,90
Cianobatteri d'acqua fresca	Saccarosio, trealosio	0,98
Cianobatteri marini	α -glucosilglicerolo	0,92
Alghe marine	Mannitolo, vari glicosidi, prolina, dimetilsulfoniopropionato	0,92
Cianobatteri dei laghi salati	Glicina betaina	0,90-0,75
Batteri alofili anossigenici fototrofi (specie di <i>Hectothiorhodospira</i> / <i>Halorhodospira</i> e <i>Rhodospirillum</i>)	Glicina betaina, ectoina, trealosio	0,90-0,75
Archea estremamente alofili (per esempio <i>Halobacterium</i>) e alcuni Batteri (per esempio <i>Haloanaerobium</i>)	KCl	0,75
<i>Dunaliella</i> (alga verde alofila)	Glicerolo	0,75
Lieviti xerofili	Glicerolo	0,83-0,62
Funghi filamentosi xerofili	Glicerolo	0,72-0,61

Classificazione dei batteri in base alla capacità di crescere a pH diversi

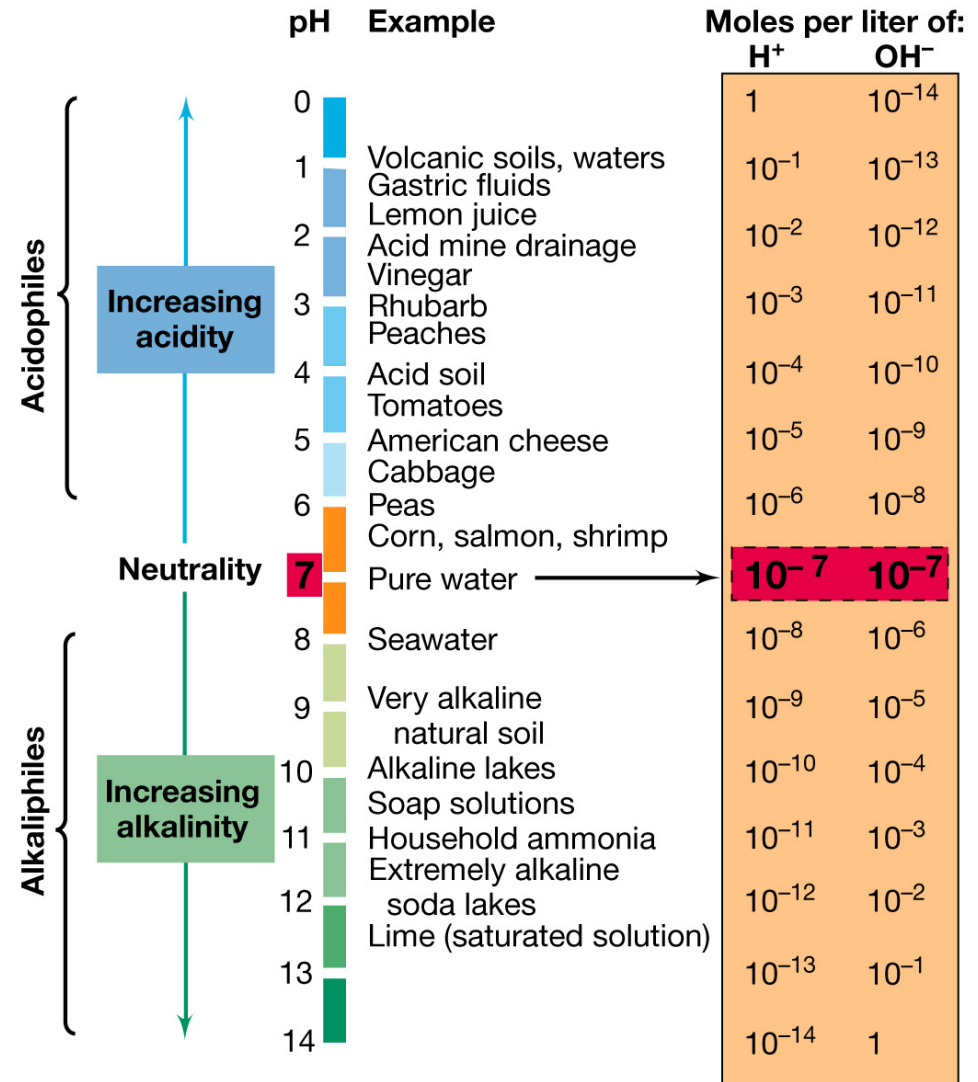
Acidofili (da 0 a 6)

Neutralofili (da 6 a 8)

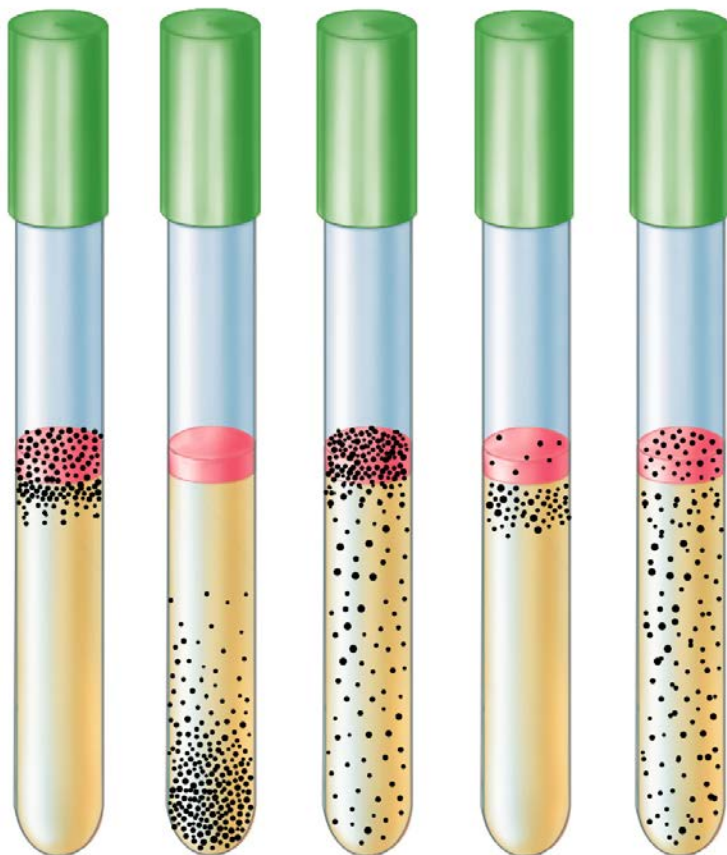
Alcalinofili (da 8 a 14)

Ci riferisce in ogni caso al pH dell'ambiente extracellulare:

il pH intracellulare rimane vicino alla neutralità



1 2 3 4 5



1. AEROBI OBBLIGATI

2. ANAEROBI

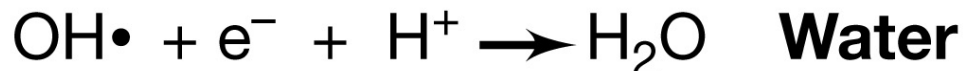
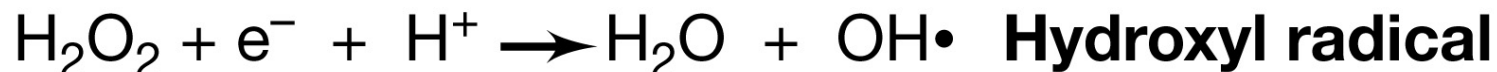
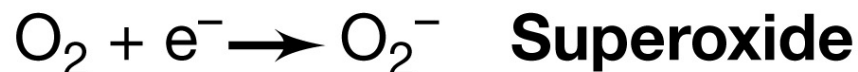
3. AEROBI FACOLTATIVI

4. MICROAEROFILI

5. ANAEROBI
AEROTOLLERANTI

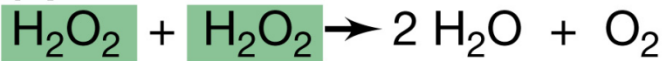
Processo di riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua mediante addizione successiva di quattro elettroni.

Tutti gli intermedi che si formano sono molto reattivi e tossici per la cellula

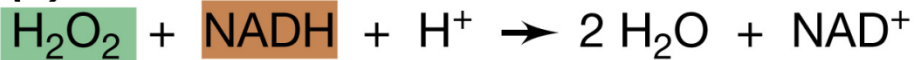


I microrganismi hanno evoluto diversi enzimi che agiscono sui composti tossici dell'ossigeno catalasi e perossidasi agiscono sul perossido d'ossigeno (perossidasi in presenza di NADH come riducente

(a) Catalase:



(b) Peroxidase:



(c) Superoxide dismutase:



(d) Superoxide dismutase/catalase in combination:



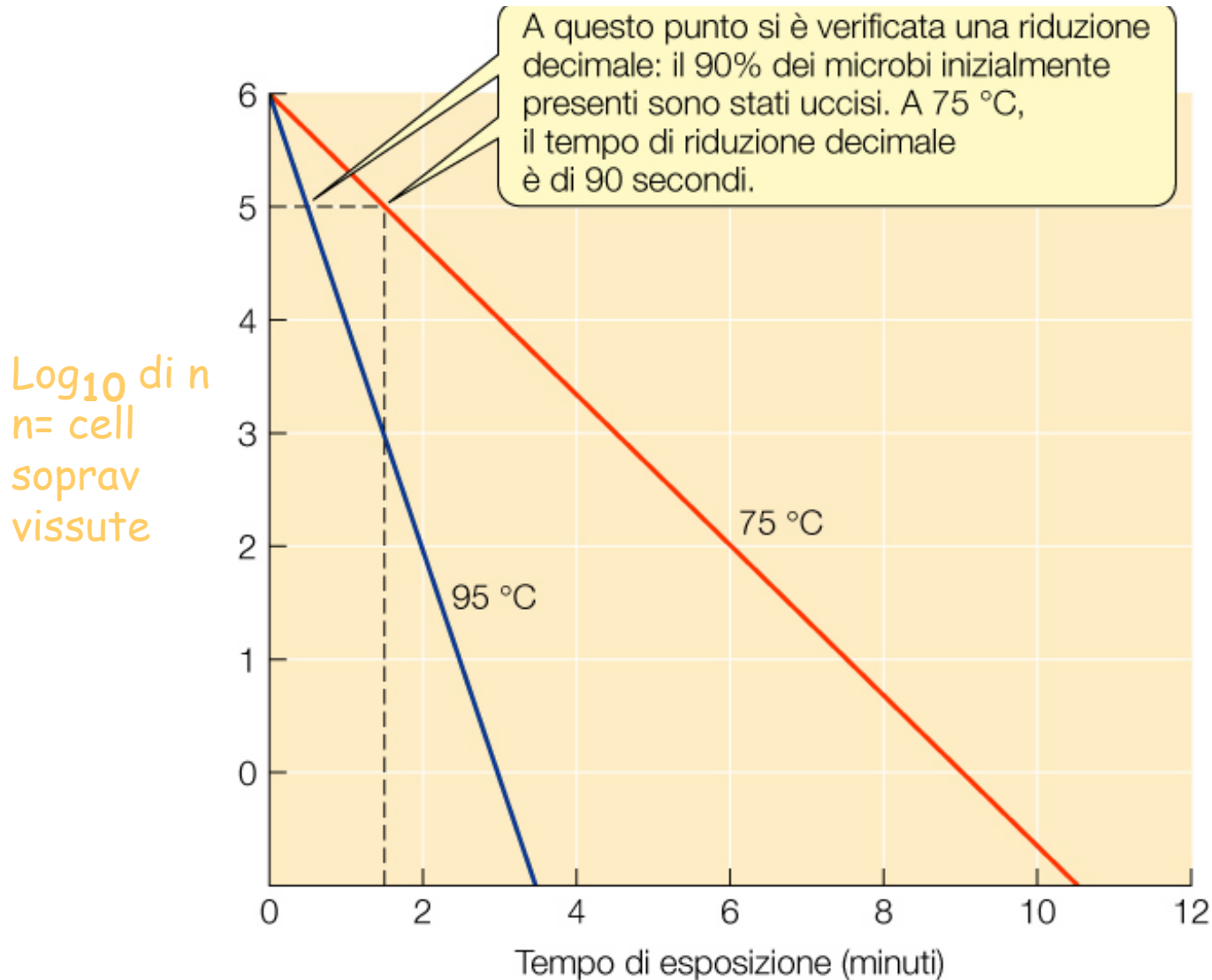
(e) Superoxide reductase:



L'anione O_2^- viene scisso dalla superossido dismutasi che catalizza la conversione di due molecole di O_2^- in una molecola di H_2O_2 e H_2O

Effetto della temperatura sulla vitalità delle cellule batteriche .

Batterio mesofilo sottoposto a due diverse temperature



Tab. 6.4 Relazioni dei microrganismi con l'ossigeno

Gruppo	Relazione con l'O₂	Tipo di metabolismo	Esempio^a	Habitat^b
Aerobi				
Obbligati	Richiesta	Respirazione aerobica	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Pelle, polvere
Facoltativi	Non richiesta, ma crescono meglio in presenza di O ₂	Respirazione aerobica, anaerobica, fermentazione	<i>Escherichia coli</i> (B)	Intestino dei mammiferi
Microaerofili	Richiesta ma a livelli inferiori rispetto a quelli atmosferici	Respirazione aerobica	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Acqua lacustre
Anaerobi				
Aerotolleranti	Non richiesta, e non crescono meglio in presenza di O ₂	Fermentazione	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Tratto respiratorio superiore
Obbligati	Dannosa o letale	Fermentazione o respirazione anaerobica	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Impianti di trattamento delle acque luride, sedimenti lacustri anossici

^a Le lettere tra parentesi indicano lo stato filogenetico (B, Batteri; A, Archea). In ciascuna categoria sono noti rappresentanti di entrambi i domini di procarioti. La maggior parte degli eucarioti sono aerobi obbligati, ma si conoscono aerobi facoltativi (per esempio i lieviti) e anaerobi obbligati (per esempio alcuni protozoi e funghi).

^b Sono elencati i tipici habitat dell'organismo preso ad esempio.

Pasteurizzazione

Pasteurizzazione è un processo che impiega calore a temperatura non troppo elevata per sterilizzare cibi o materiali termosensibili.

Inizialmente veniva effettuato scaldando a 60-63°C per 30 min. (vino birra latte)
(uccisione dal 79 al 99% dei microrganismi)

Pasteurizzazione flash: si fa passare il latte attraverso serpentine dove è velocemente riscaldato alla T°C di 71.6 °C per soli 15 sec.

Temperatura °C

Effetti sui Microrganismi

