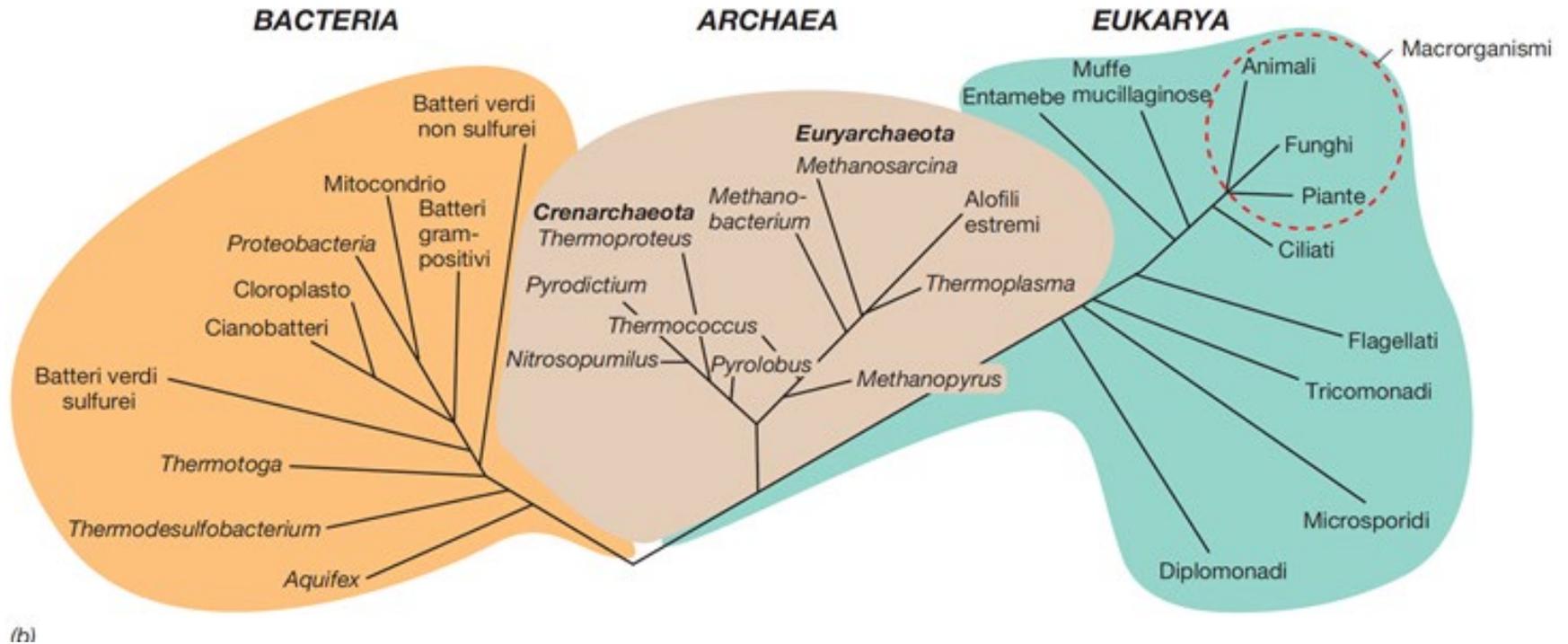
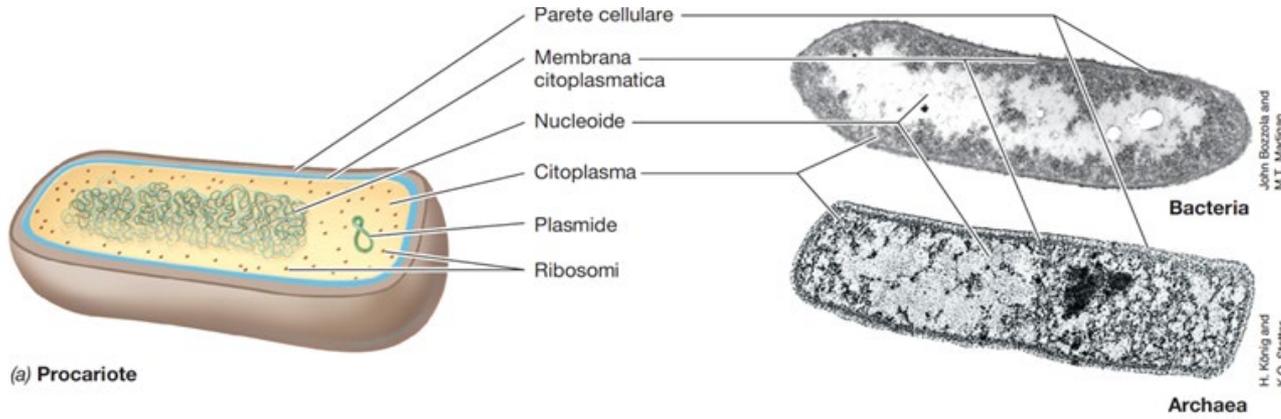


I tre Domini



In due dei tre Domini l'organizzazione della cellula è di tipo procariotico

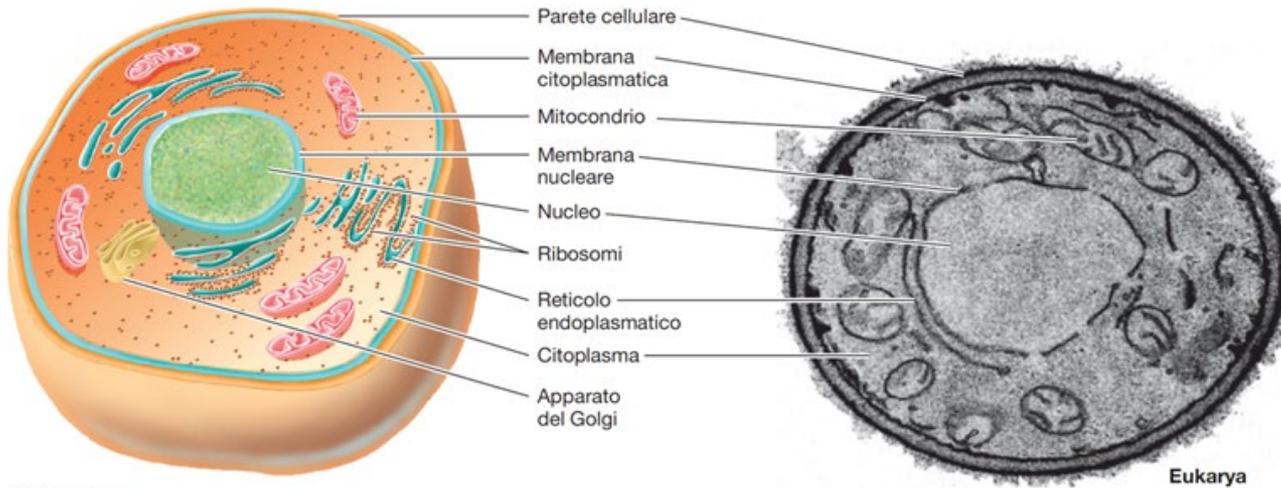
Organizzazione della cellula microbica



(a) Procariote

Heliobacterium
diametro 1 μm

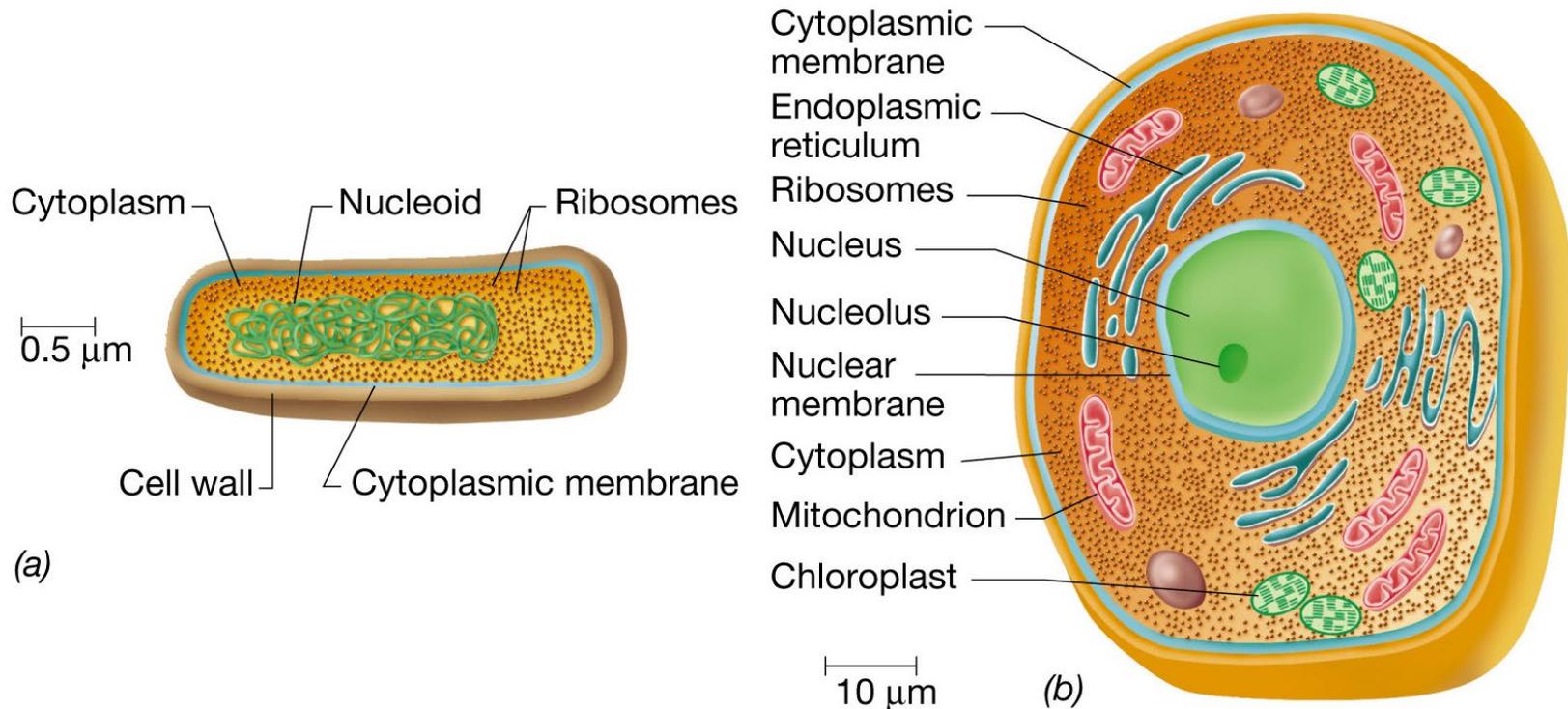
Thermoproteus
diametro 0.5 μm



(b) Eucariote

Saccharomyces
diametro 8 μm

Cellula procariotica e cellula eucariotica a confronto : è un problema di dimensioni o di organizzazione ?



La parete cellulare è uno strato piuttosto rigido situato all'esterno della membrana citoplasmatica.

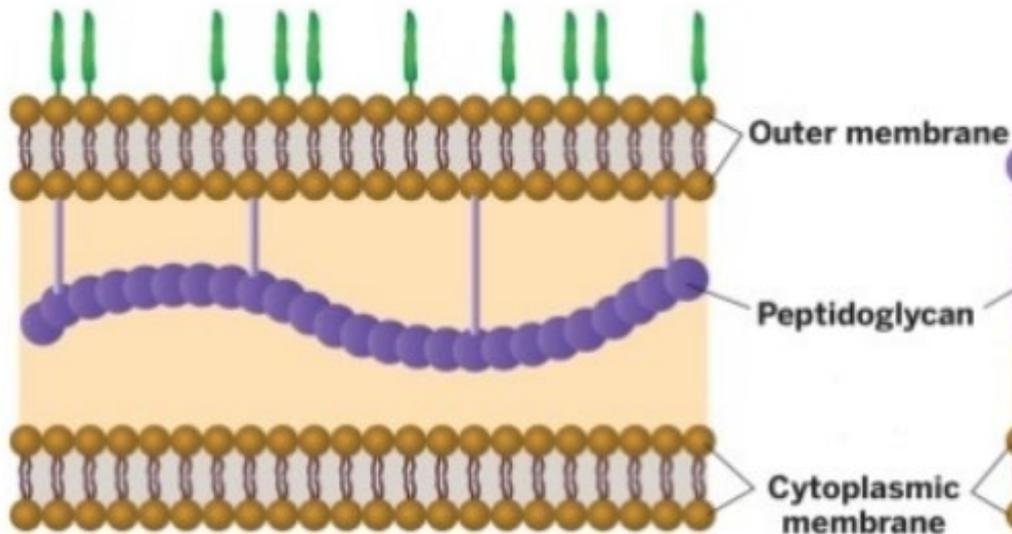
Presente in tutte le cellule procariotiche ad eccezione dei Micoplasmi le Chlamydiae e di alcuni Archea.

Funzioni:

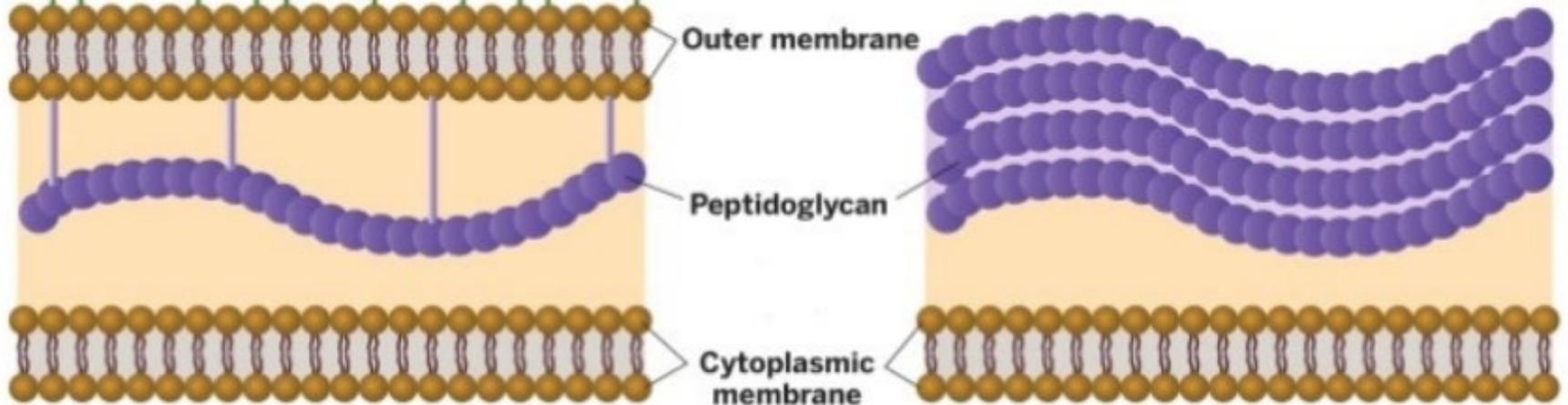
- **determina la forma del batterio**
- **protegge dalla lisi osmotica**
- **protegge la cellula da sostanze tossiche**
- **è il sito bersaglio di vari antibiotici**

La parete nei Batteri

GRAM-NEGATIVE



GRAM-POSITIVE





Google dedica un doodle allo scopritore della classificazione dei batteri.

Hans Christian Gram è stato il primo medico a distinguere le cellule batteriche in due categorie. Oggi 13 settembre Google ne ha ricordato la nascita.

La colorazione di GRAM

- messa a punto nel 1884 dal medico olandese Christian GRAM
- è una colorazione differenziale basata sull'uso di due coloranti

1° colorante **cristal violetto**

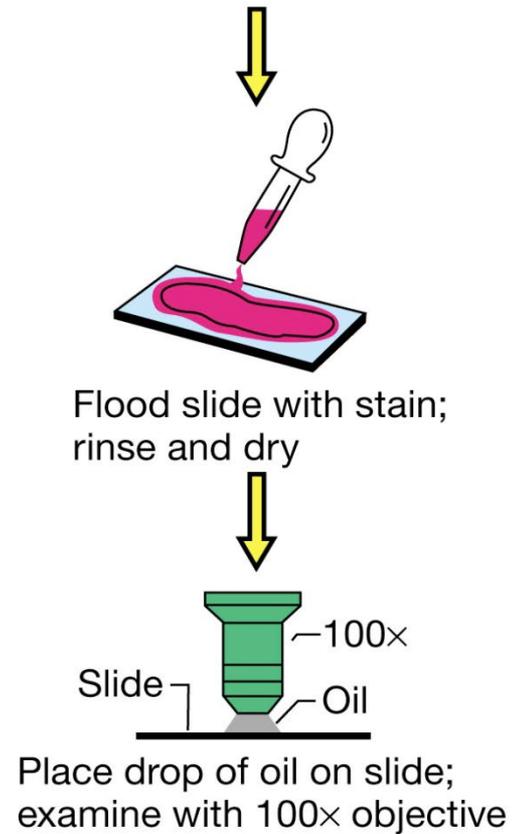
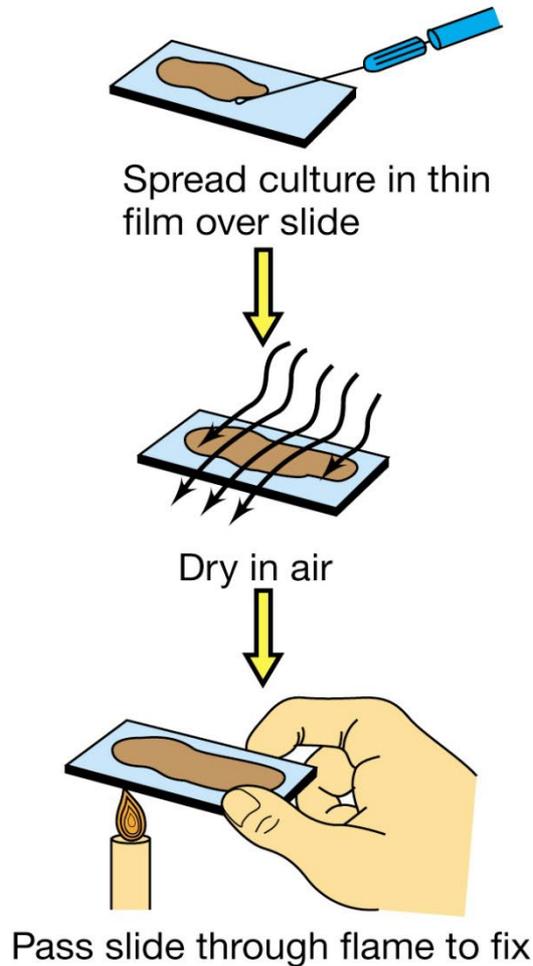
2° colorante **safranina**

Permette di suddividere i Batteri in

 **GRAM positivi**

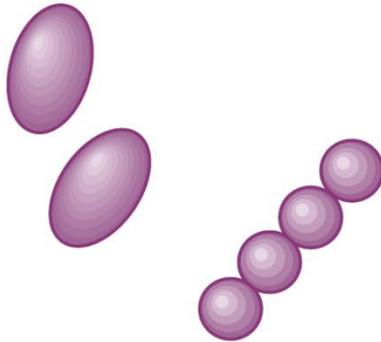
 **GRAM negativi**

Metodi di colorazione semplice per l'osservazione di cellule batteriche al microscopio ottico



Quali sono le fasi della colorazione di Gram?

Step 1

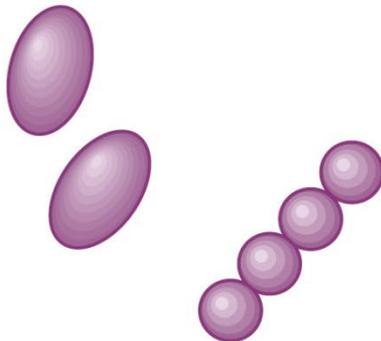


Flood the heat-fixed smear with crystal violet for 1 min

All cells purple

Colorazione semplice con cristal violetto

Step 2



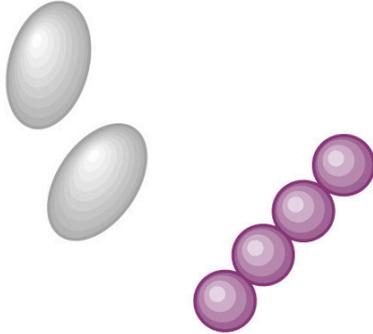
Add iodine solution for 3 min

All cells remain purple

Aggiunta della soluzione di Gram a base di iodo iodurato:
le cellule sono ancora violacee

Colorazione di Gram: la comparsa della differenza

Step 3



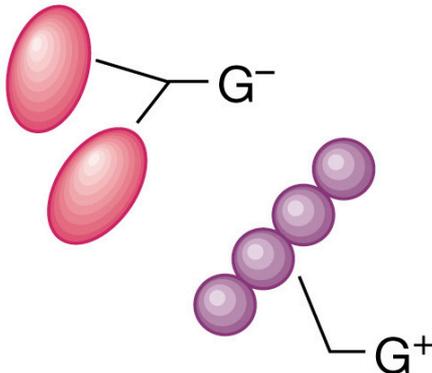
Decolorize with alcohol briefly — about 20 sec

Gram-positive cells are purple; gram-negative cells are colorless

La decolorazione con alcol decolora solo le cellule colorate

Gram negative

Step 4

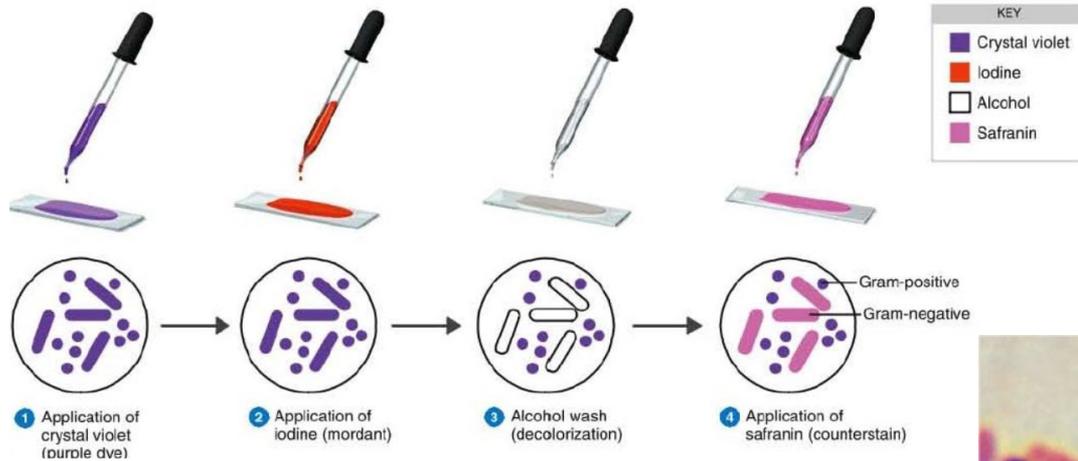


Counterstain with safranin for 1–2 min

Gram-positive (G^+) cells are purple; gram-negative (G^-) cells are pink to red

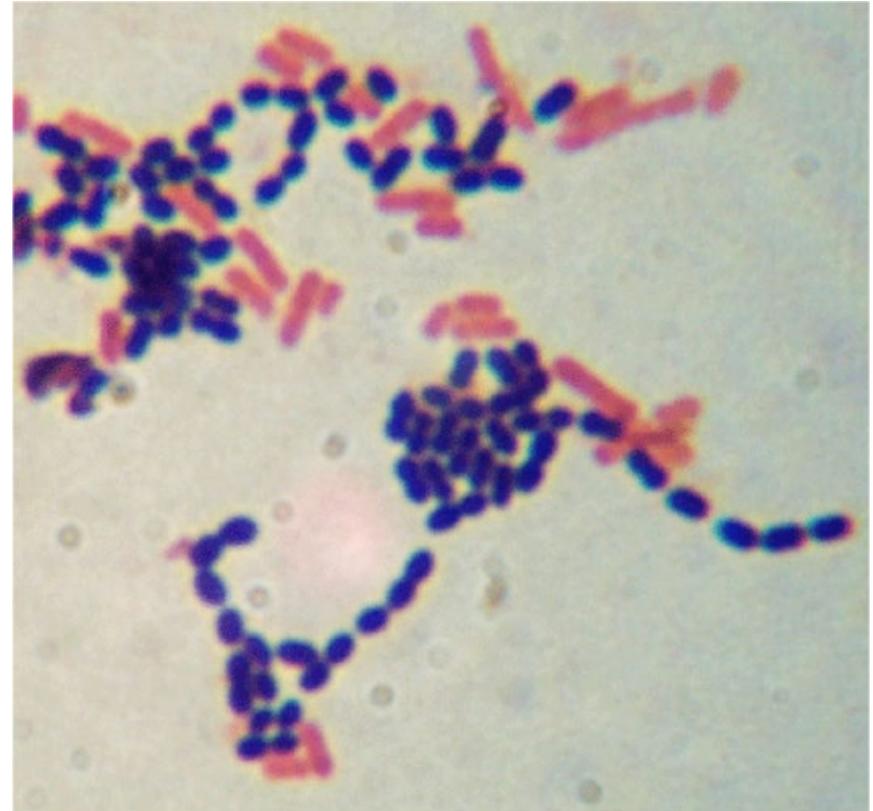
La colorazione di contrasto con **safranina** colora le cellule incolore (**Gram negative**) in **rosa-rosso**

Le tappe della colorazione di Gram



La colorazione di Gram permette di suddividere i batteri sulla base della struttura della parete cellulare.

La diversità nella risposta dipende dallo spessore del peptidoglicano che riesce a trattenere il complesso ioduro-cristalvioletto nei Gram+

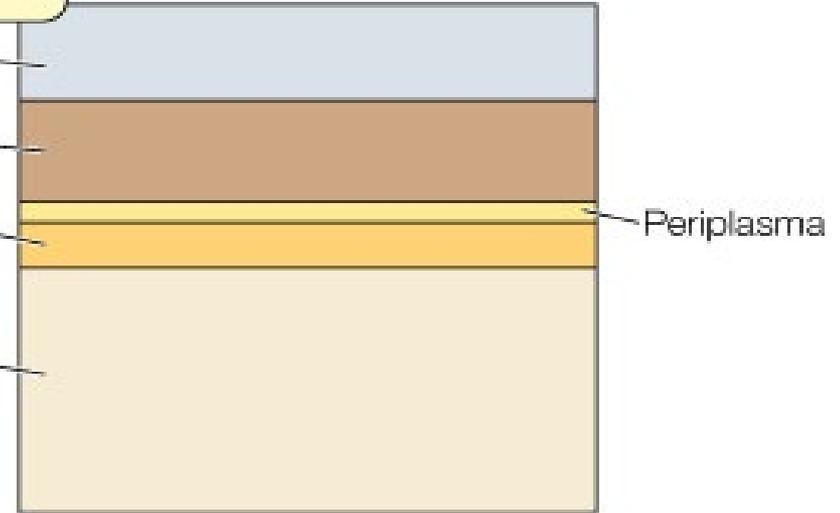


(A)

I batteri gram-positivi possiedono una parete cellulare monostrato, di densità uniforme formata soprattutto da peptidoglicano.

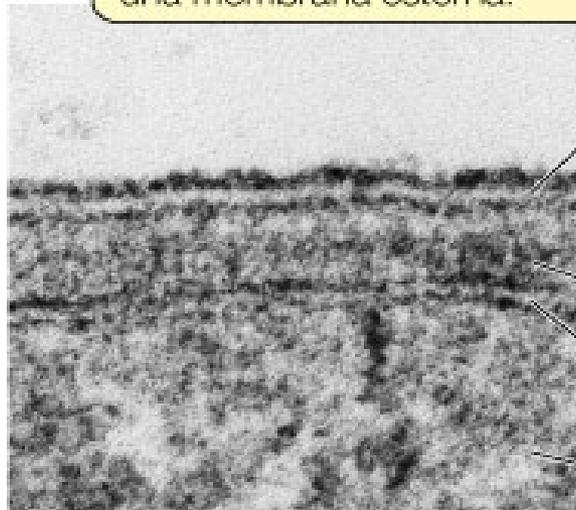


Esterno della cellula
Parete cellulare
Membrana cellulare
Citoplasma

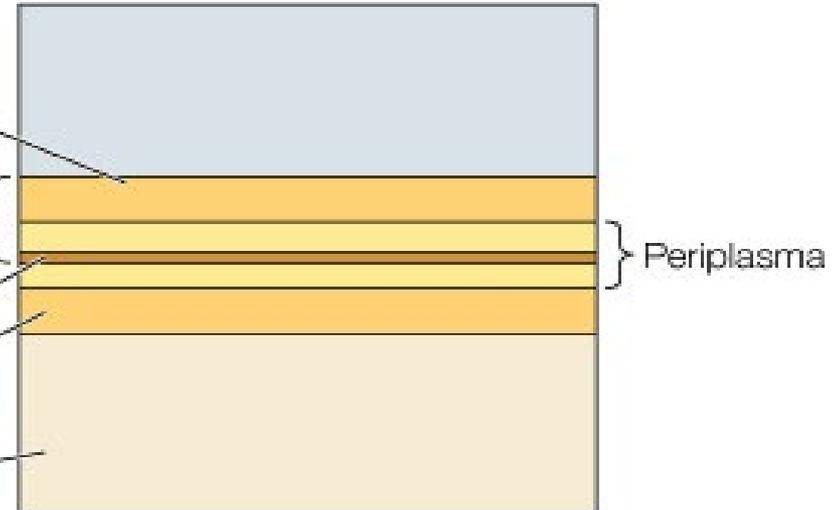


(B)

I batteri gram-negativi possiedono una parete cellulare a doppio strato formata da uno strato molto sottile di peptidoglicano e da una membrana esterna.



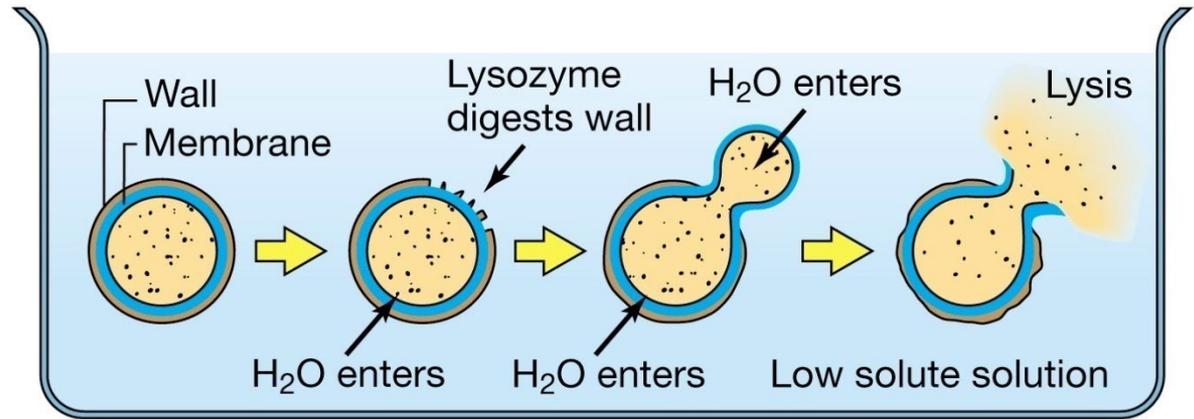
Membrana esterna
Parete cellulare
Peptidoglicano
Membrana cellulare
Citoplasma



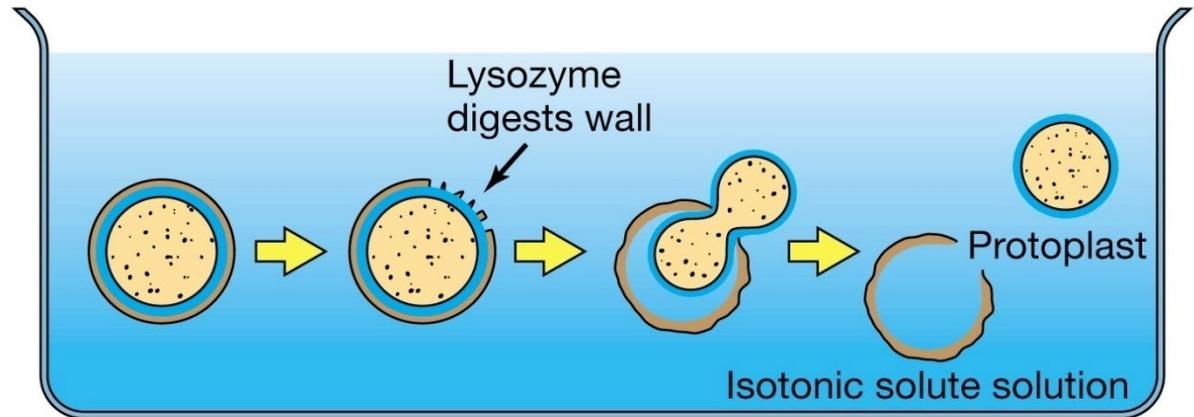
La digestione della parete cellulare induce la morte della cellula

Il lisozima è un enzima presente in molte secrezioni naturali, lacrime, saliva etc capace di rompere il legame B-1,4 tra NAM e NAG

Formazione di protoplasti in mezzo isotonic



(a)



(b)

Ma tutti i procarioti hanno la parete cellulare ?

Le eccezioni :

Mycoplasma

Clamydie

Thermoplasma

Picrophilus

Batteri (Gram+)

Batteri (Gram-)

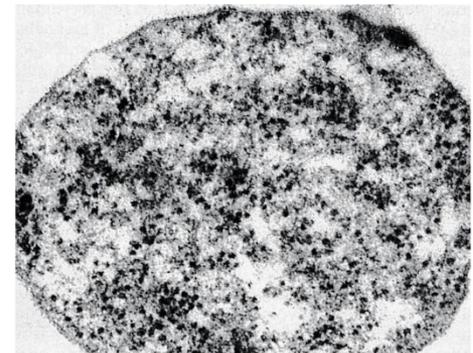
Archea

Archea

I micoplasmi ricordano i protoplasti ma sono più resistenti alla lisi osmotica

La maggiore resistenza è dovuta alla presenza di **steroli** nella membrana citoplasmatica

In alcuni micoplasmi sono presenti anche **Lipoglicani**, eteropolisaccaridi legati covalentemente ai lipidi di membrana.



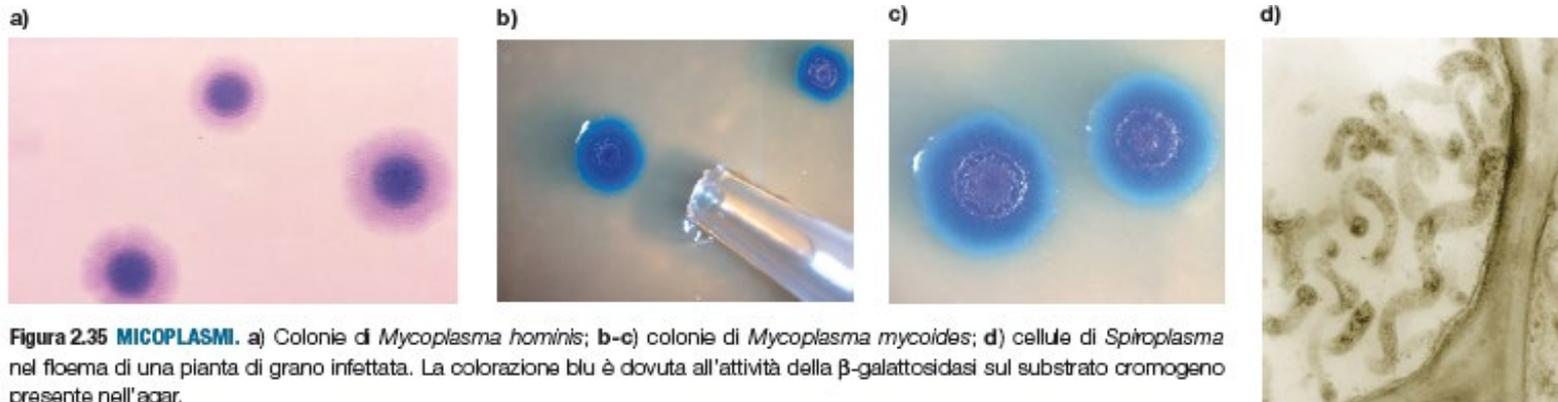


Figura 2.35 **MICOPLASMI**. a) Colonie di *Mycoplasma hominis*; b-c) colonie di *Mycoplasma mycoides*; d) cellule di *Spiroplasma* nel floema di una pianta di grano infettata. La colorazione blu è dovuta all'attività della β -galattosidasi sul substrato cromogeno presente nell'agar.

I micoplasmi batteri senza parete caratterizzati da un genoma molto piccolo (meno di 1 megabase), molte richieste nutrizionali.

Dal RNA16S appartengono ai Gram+, sono tutti commensali parassiti o patogeni, infezioni difficili da trattare con antibiotici

Le Clamydie , sono Batteri Gram - senza parete.

In base all'analisi dell'RNA16S sono una linea evolutiva nel dominio dei Batteri. Sono intracellulari parassiti e patogeni per l'uomo.

Clamidia trachomatis agente del tracoma

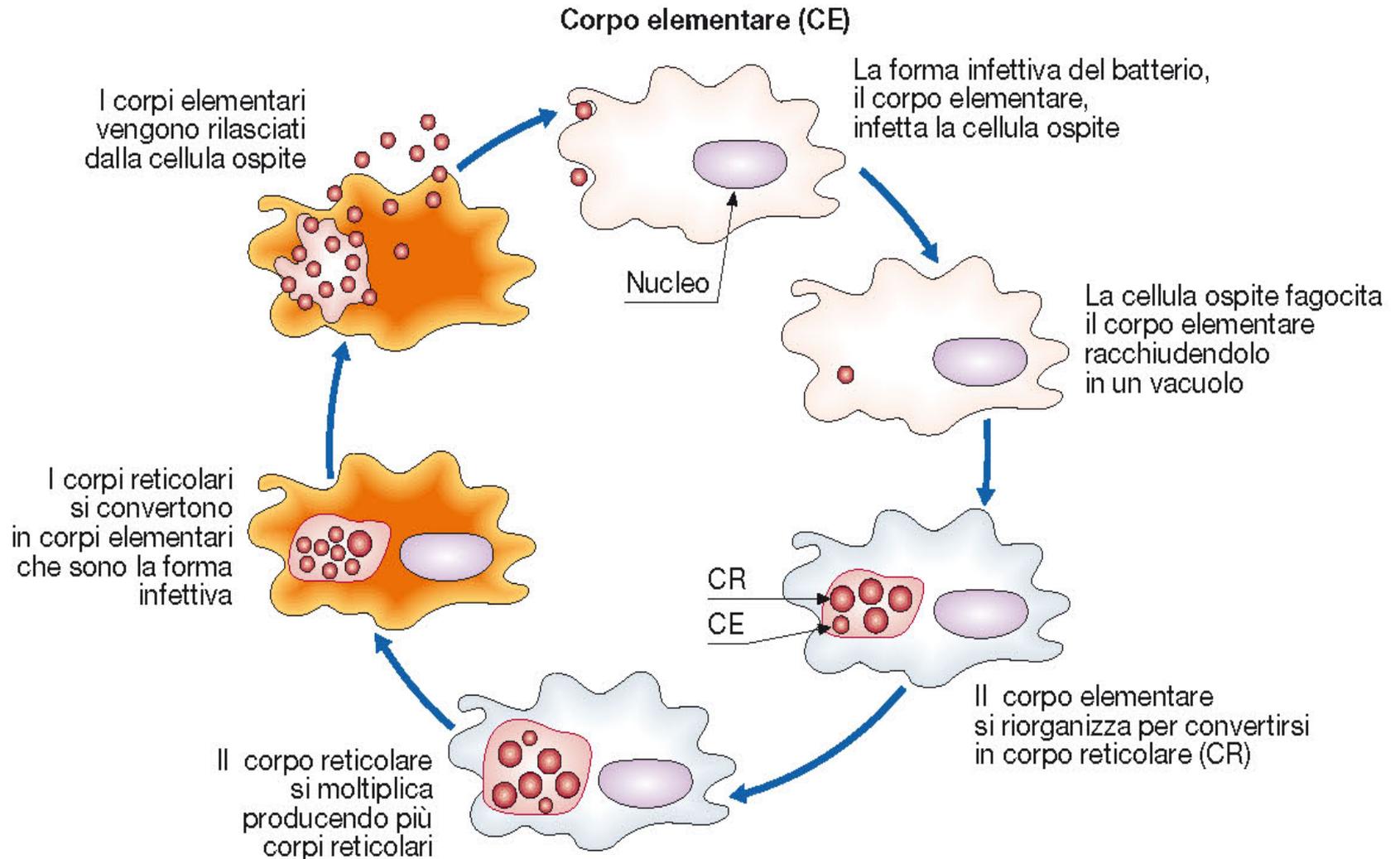
Clamidia pneumoniae agente della polmonite

Dotati di un genoma estremamente piccolo (1-1.3 Mb)
Hanno un ciclo vitale molto particolare caratterizzato dalla presenza di due forme

Elementary Body (EB) forma infettiva

Reticular Body (RB) forma replicativa

Ciclo vitale delle Clamidio , batteri senza parete parassiti obbligati intracellulari



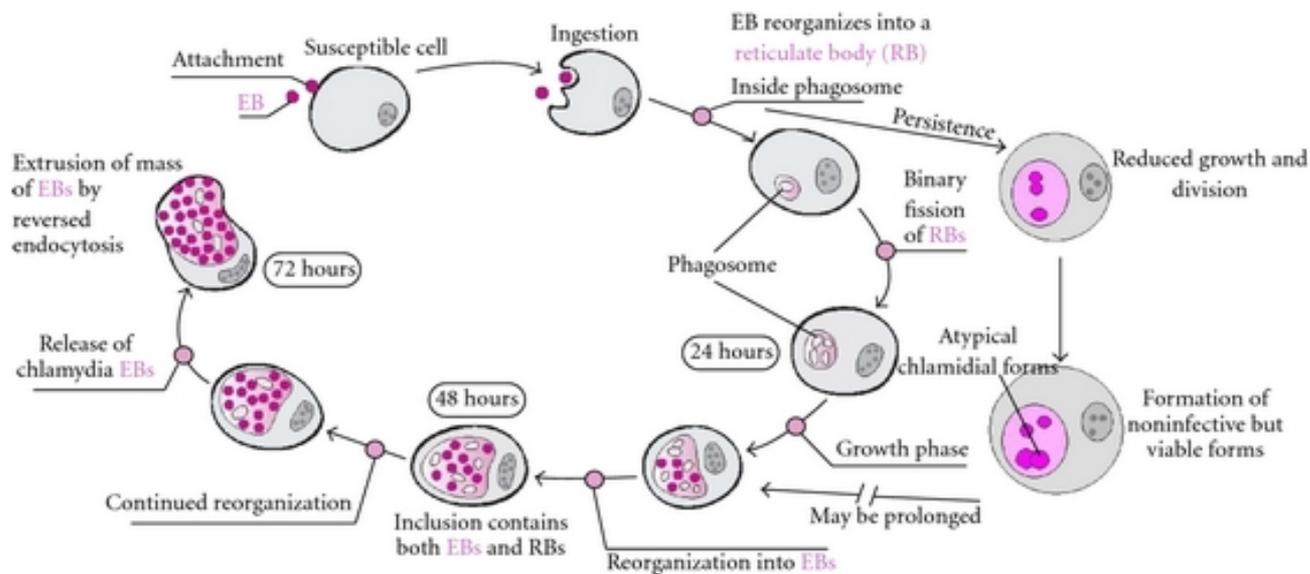


Figure 2: The life cycle of genital serovars of *C. trachomatis*. The chlamydial growth cycle involves transformation between distinct forms: the elementary body (EB) and the reticulate body (RB). The highly infectious EB attaches to nonciliated columnar or cuboidal epithelial cells and induces ingestion by the host cell. EB are metabolically inactive and represent the extracellular *C. trachomatis* growth form. Once ingested into a phagosome, fusion of the phagosome with the host lysosome is prevented, a highly unusual occurrence that ensures EB survival. The EB reorganizes within the phagosome into a metabolically active RB. RBs are noninfectious but can replicate and do so by binary fission. Several stimuli, including antibiotic and IFN γ exposure, can drive chlamydia into a persistent state, which lasts in vitro until removal of the exogenous stressor. If persistence is avoided, or if infection is reactivated from persistence, the RB will ultimately reorganize back into EB, which will be released from the host cell to infect surrounding epithelial cells (reproduced with permission [17]).

Peptidoglicano (o mureina)

Componente fondamentale della parete cellulare
un enorme polimero composto da subunità identiche.

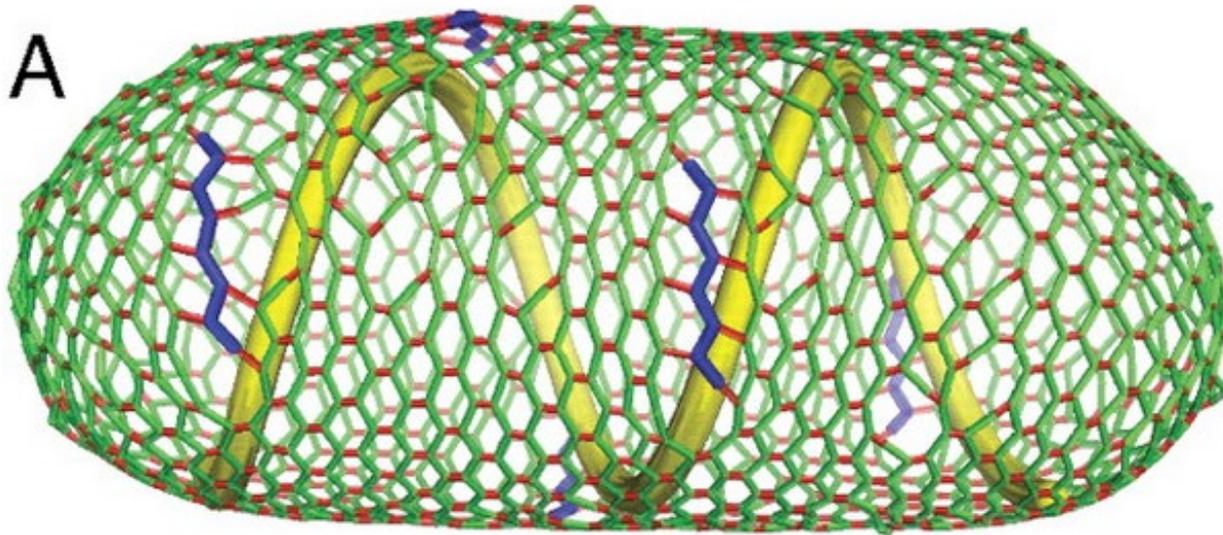
- due derivati polisaccaridici
N-acetilglucosamina e l'acido N-acetilmuramico

ed alcuni aminoacidi tra i quali

- acido D-glutammico
- D-alanina
- acido meso -diamminopimelico

che non si trovano mai nelle proteine.

I D-aminoacidi hanno un'azione protettiva contro l'attacco della maggior parte delle peptidasi

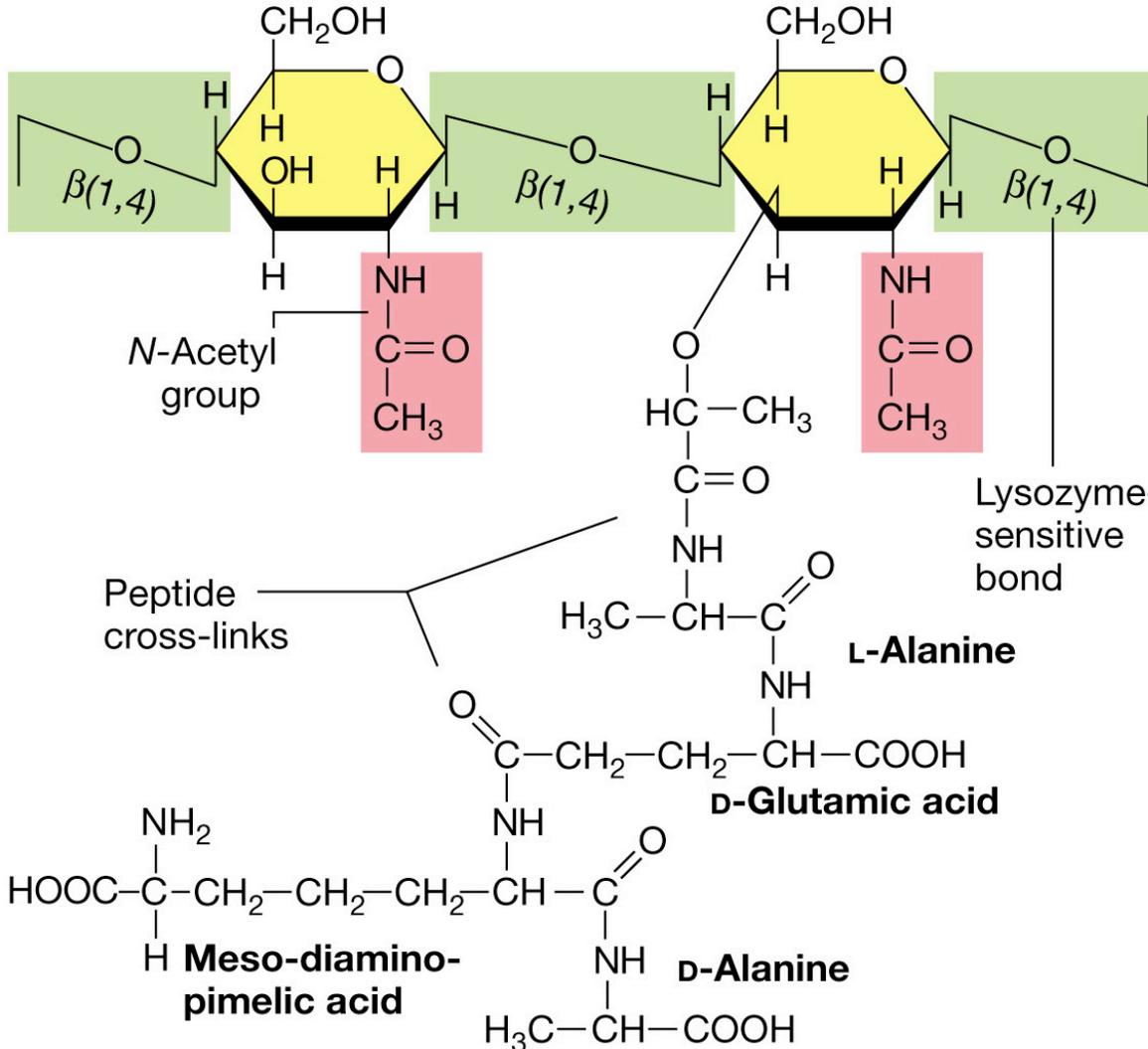


Il peptidoglicano può essere considerato come una struttura a rete che avvolge la cellula batterica
In blu messo in evidenza un pezzetto della catena di NAG e NAM
In rosso la componente peptidica

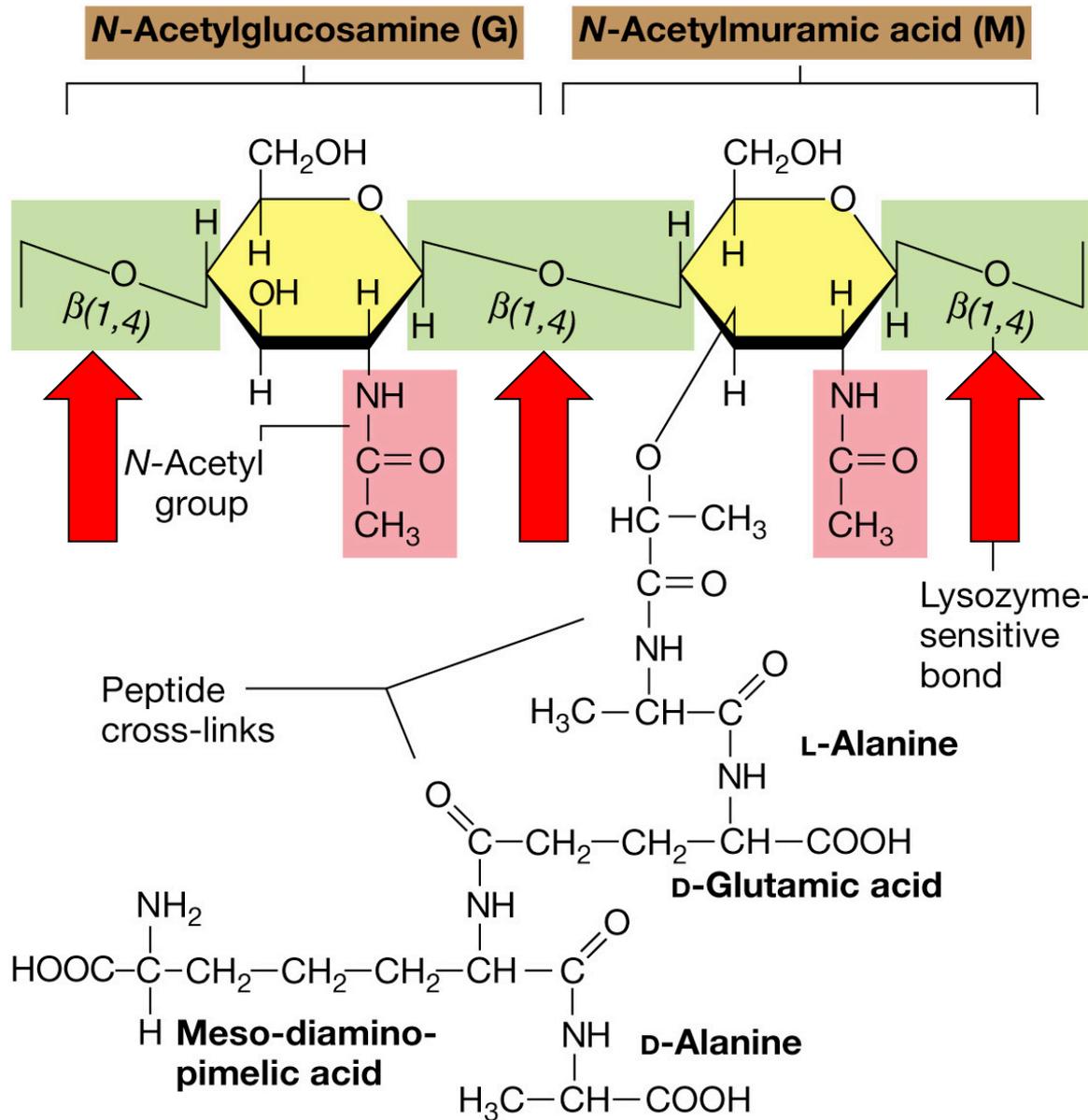
I componenti fondamentali del peptidoglicano

N-Acetylglucosamine (G)

N-Acetylmuramic acid (M)

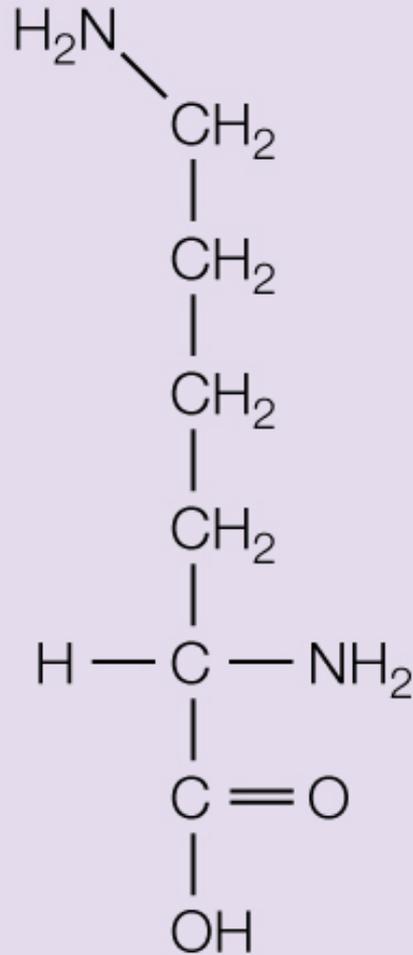


Il lisozima scinde il legame β 1-4 tra il NAM ed il NAG



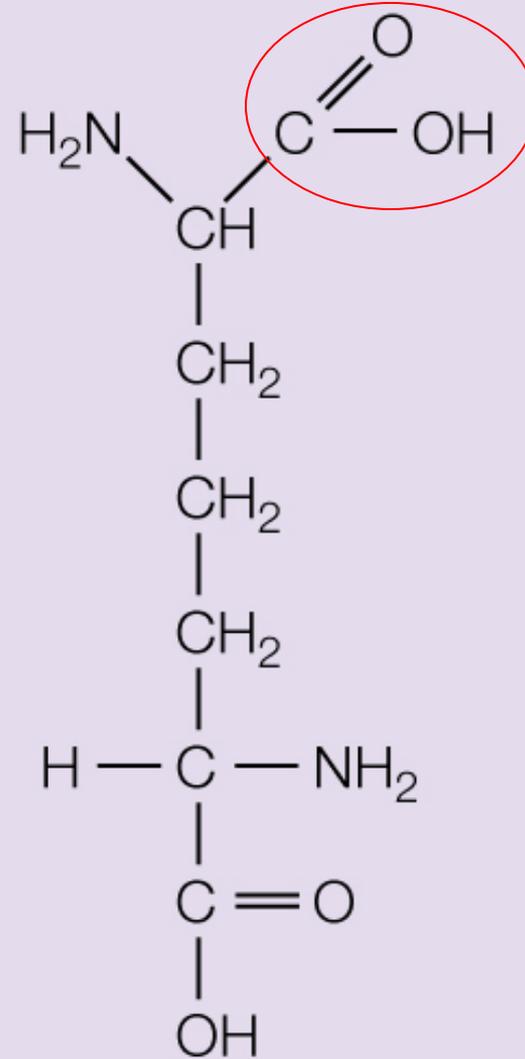
- NAM**
- L-alanina**
- Acido D-glutamico**
- Acido diaminopimelico o L-Lisina**
- D-Alanina**

GRAM+

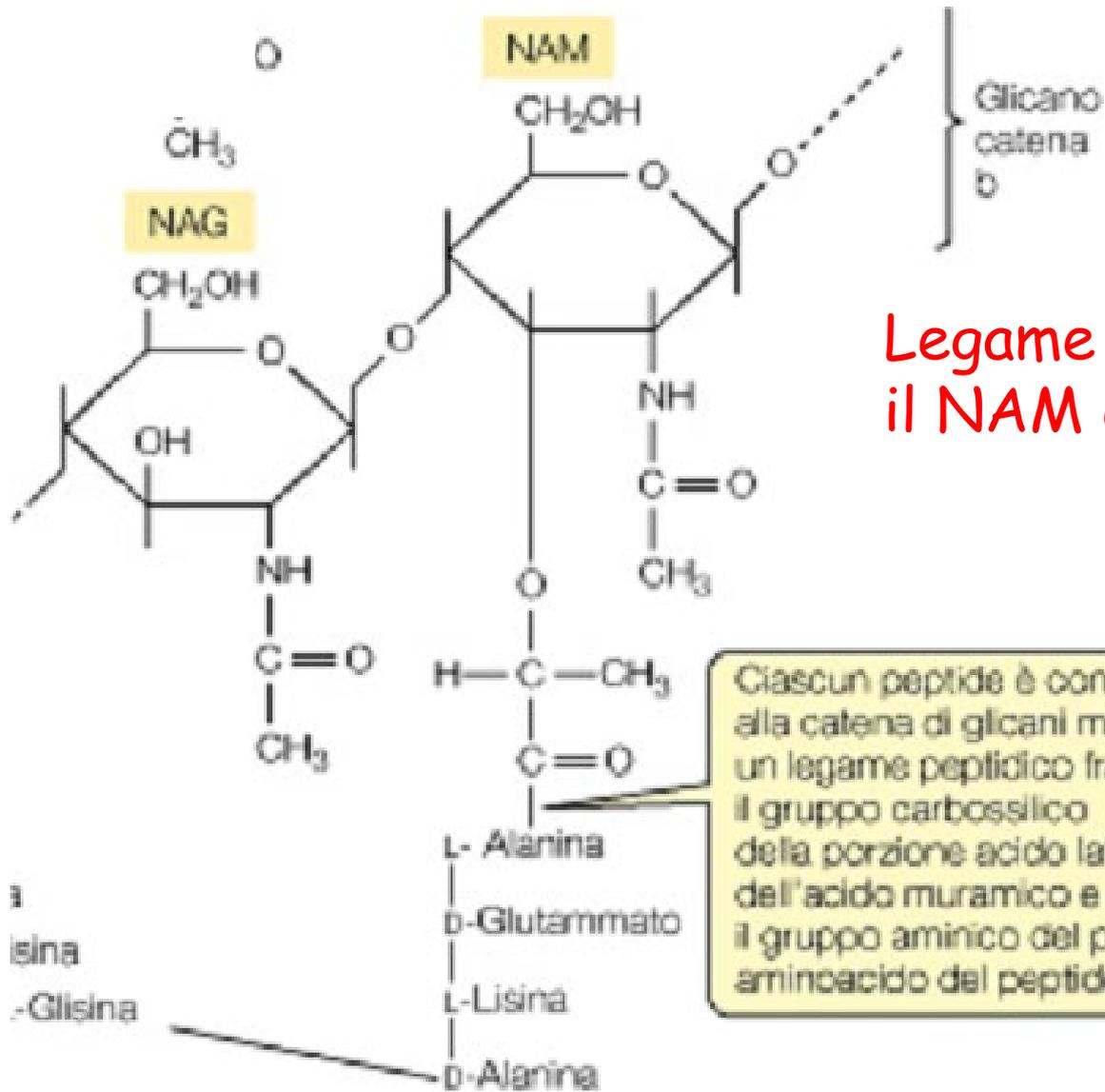


Lisina

GRAM-



Acido diaminopimelico



Legame peptidico tra il NAM e gli AA

Ciascun peptide è connesso alla catena di glicani mediante un legame peptidico fra il gruppo carbossilico della porzione acido lattico dell'acido muramico e il gruppo aminico del primo aminoacido del peptide.

isina
-Glicina

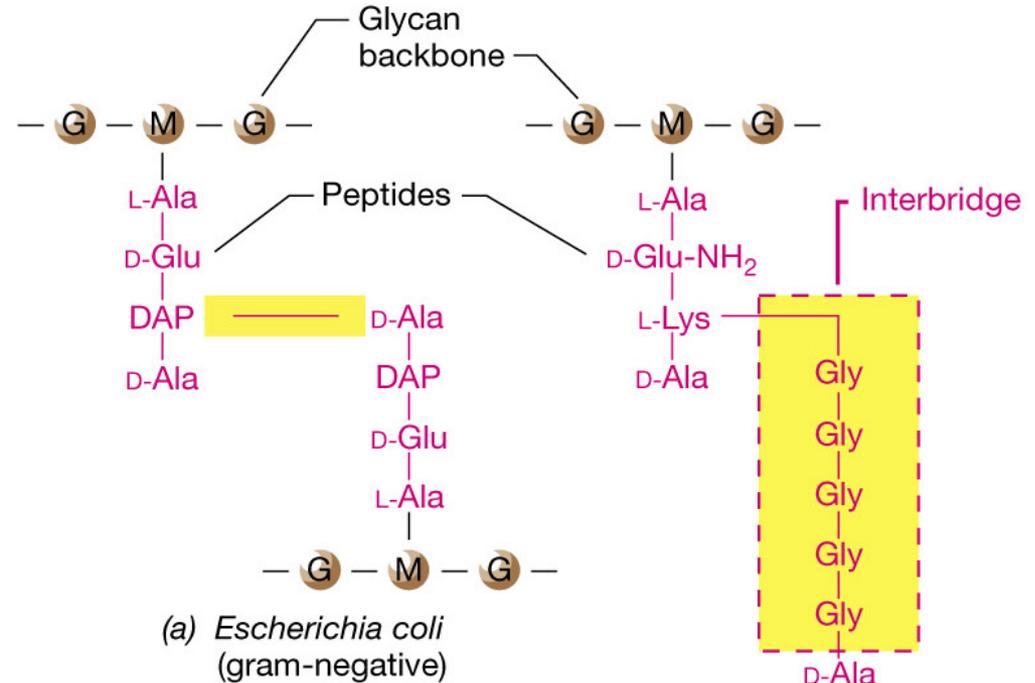
Il peptidoglicano è presente solo nei Batteri:

l'acido N acetilmuramico e l'acido diaminopimelico (DAP) sono assenti negli Archea e negli Eucarioti

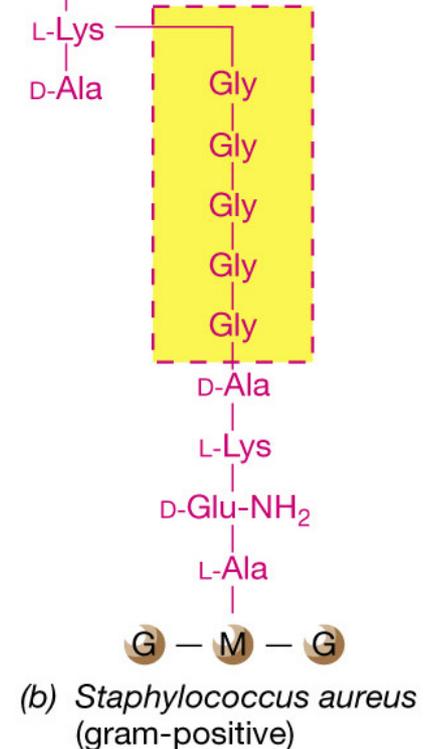
- DAP è presente in tutti i batteri Gram- e in alcuni Gram+
 - lisina sostituisce il DAP nei cocci Gram+
 - altri AA possono sostituire il DAP.
- La variabilità maggiore a livello del peptidoglicano si riscontra nel ponte peptidico .
A livello del tetrapeptide possiamo trovare :
- Acido D-glutammico in posizione 2 può trovarsi in forma idrossilata
 - Sostituzione degli AA in posizione 1 e 3

Il processo di transpeptidazione porta alla formazione di legami peptidico tra differenti AA presenti nelle catene laterali

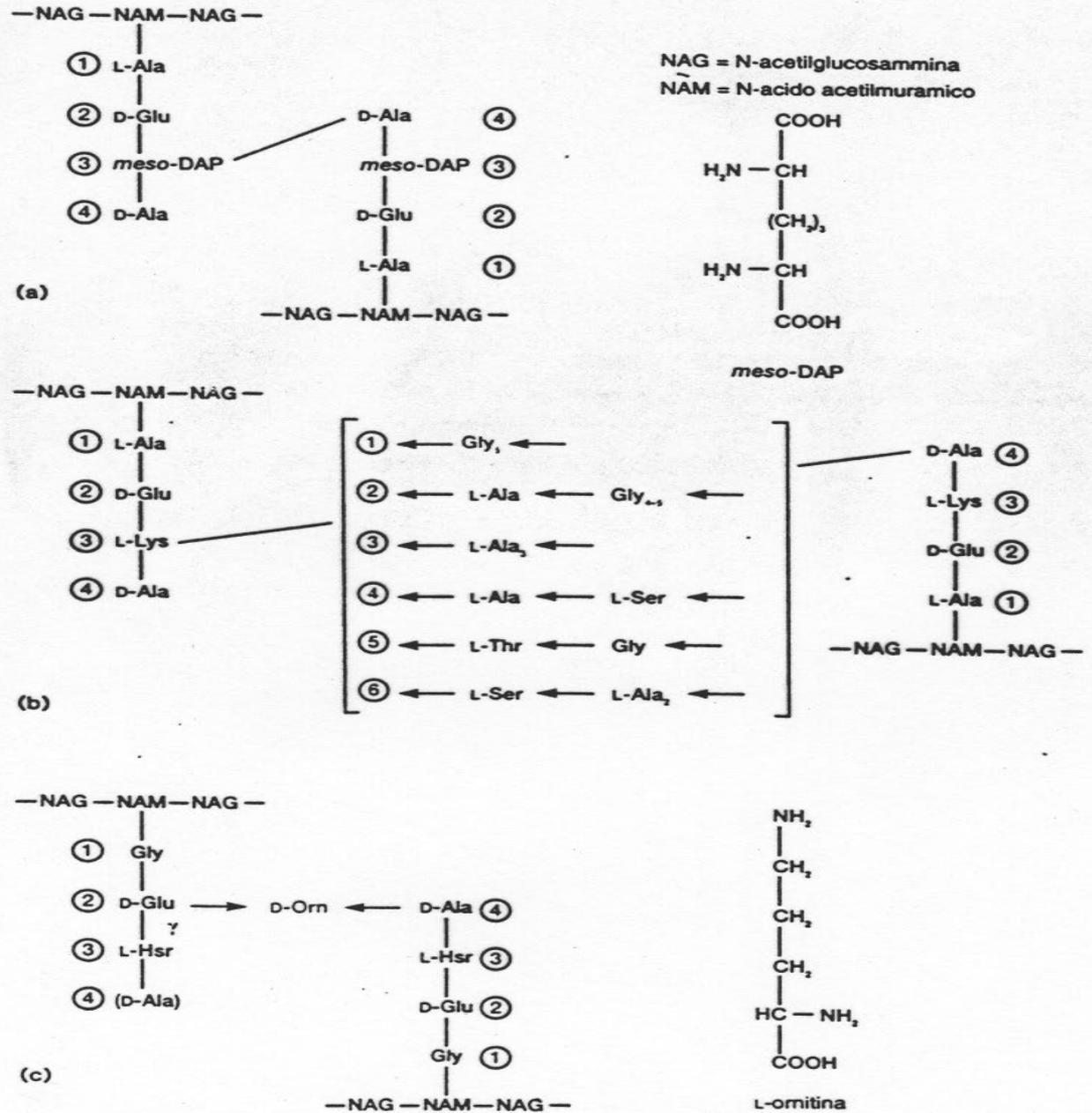
Nei Gram- il legame crociato avviene tra il DAP ed un peptide e la D-alanina del peptide adiacente

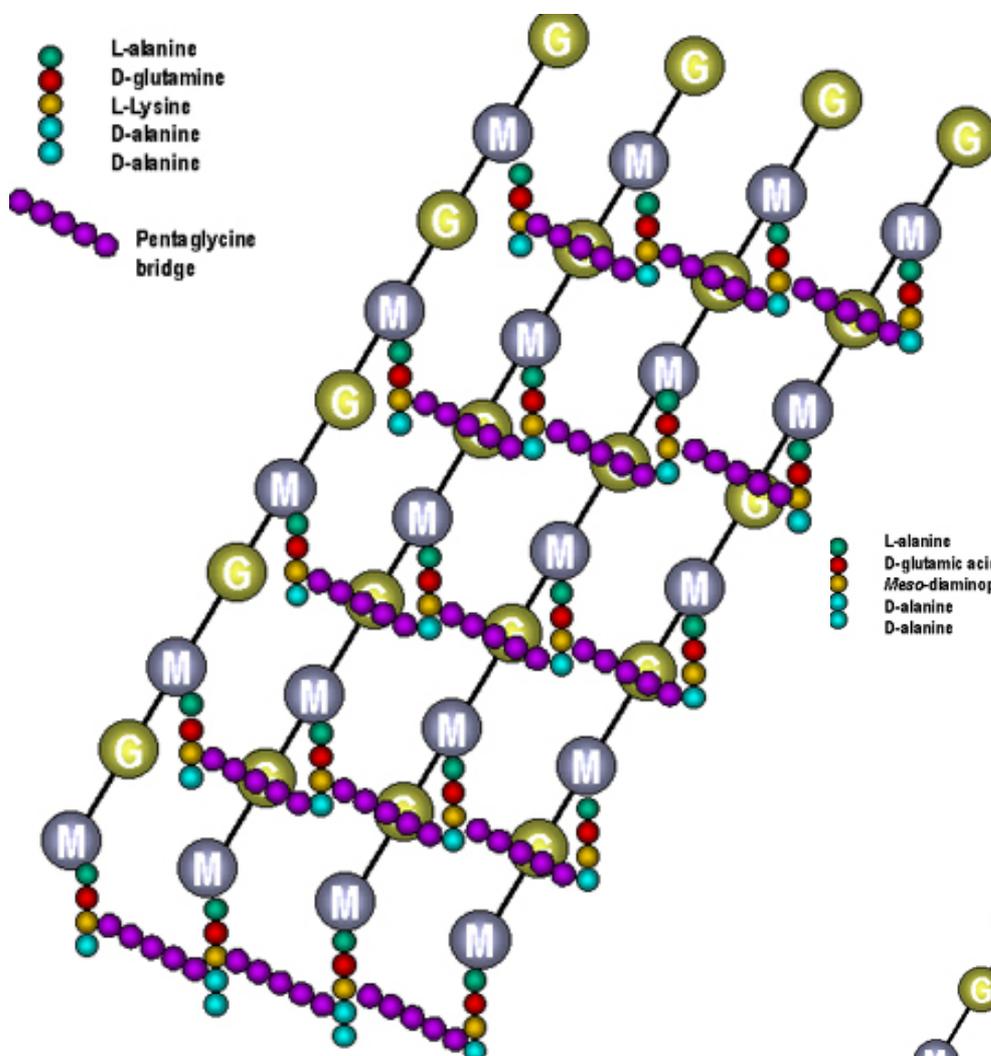


Nei Gram+ i legami avvengono attraverso i ponti penta glicinici tra la L-lisina di un peptide e la D-alanina di un altro



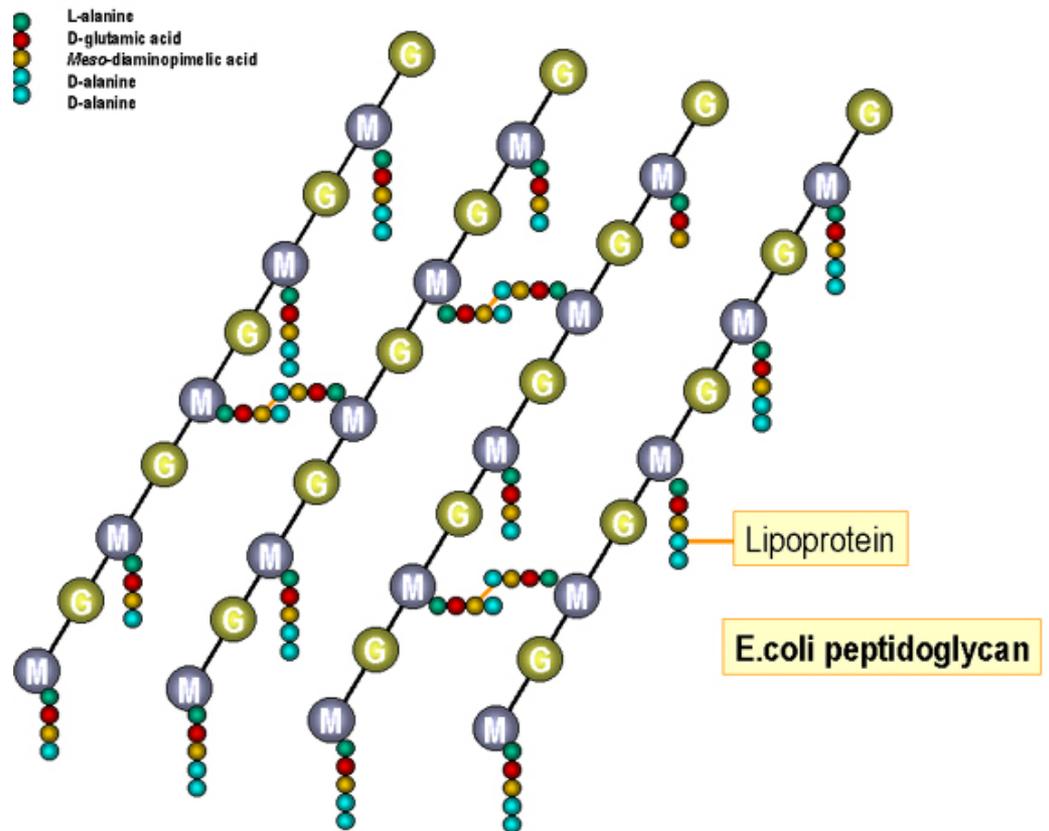
Nei batteri Gram+ è presente un ponte peptidico che collega le varie subunita di NAG-NAM.



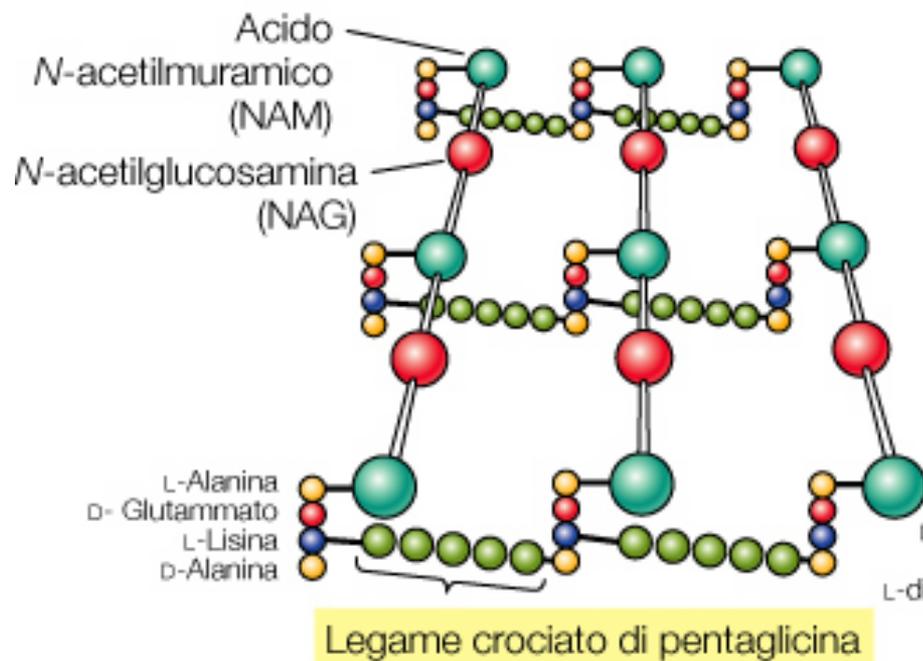


Peptidoglicano di
Staphylococcus aureus
 ← Gram+ e

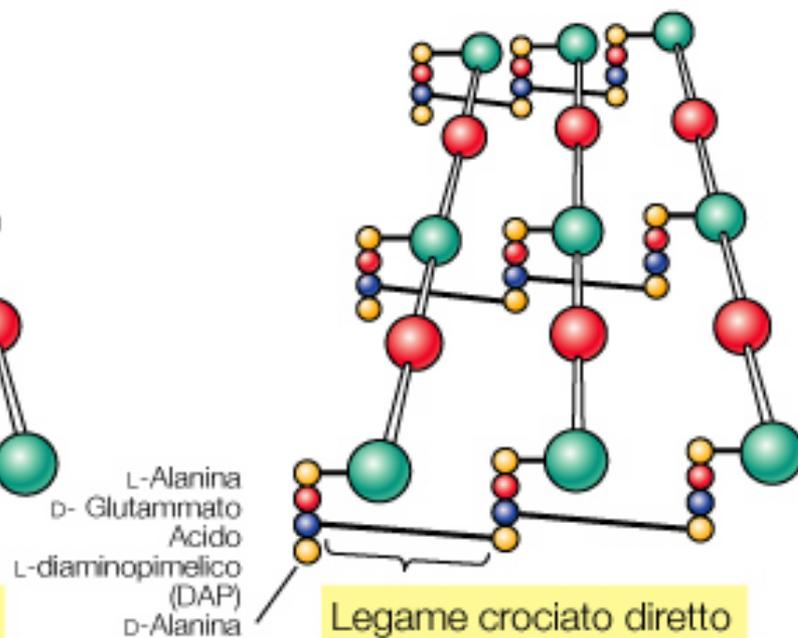
Escherichia coli
 Gram-



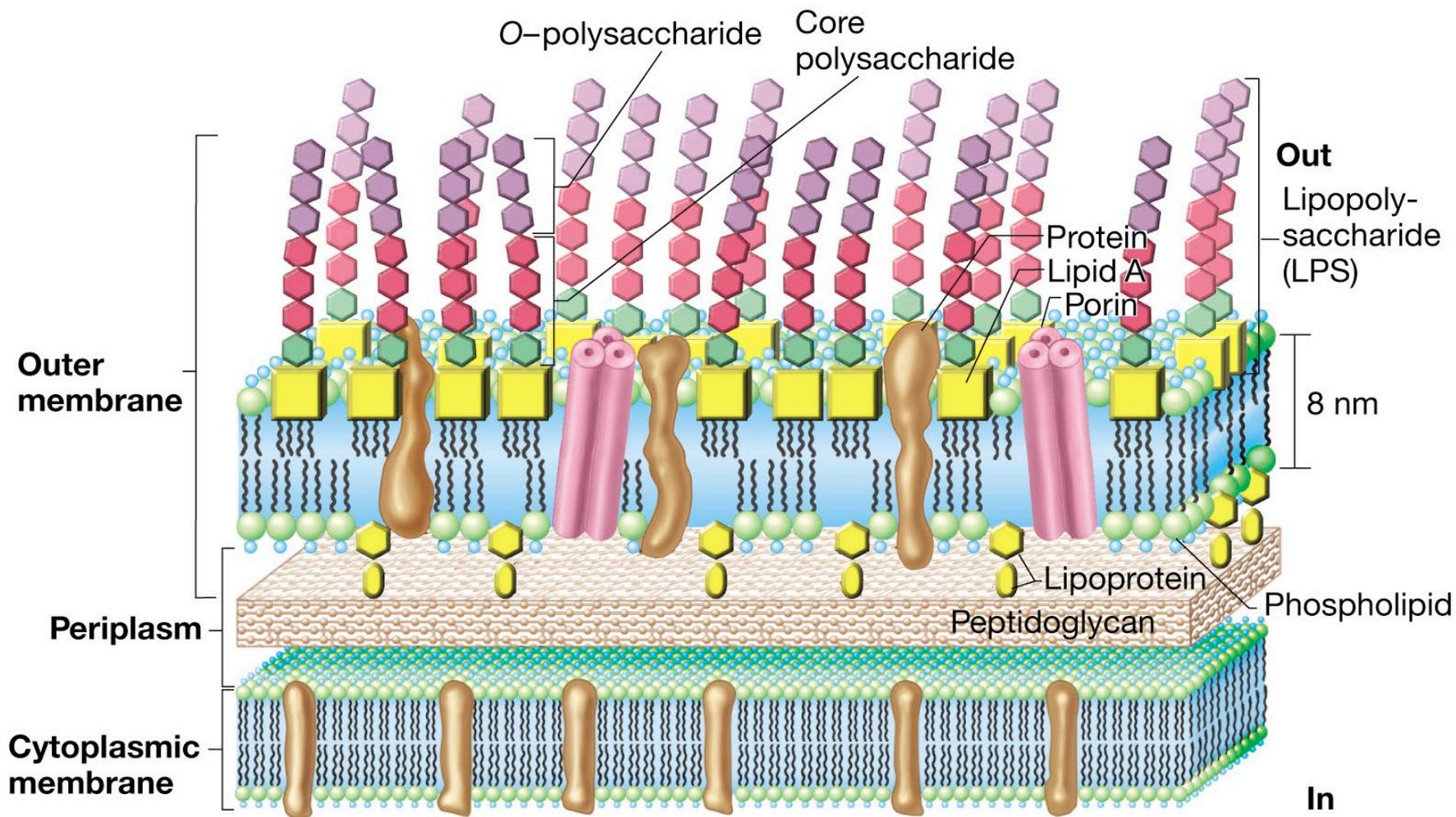
(A) Peptidoglicano dei gram-positivi



(B) Peptidoglicano dei gram-negativi



Complessità della parete cellulare dei Gram - : presenza della membrana esterna o LPS



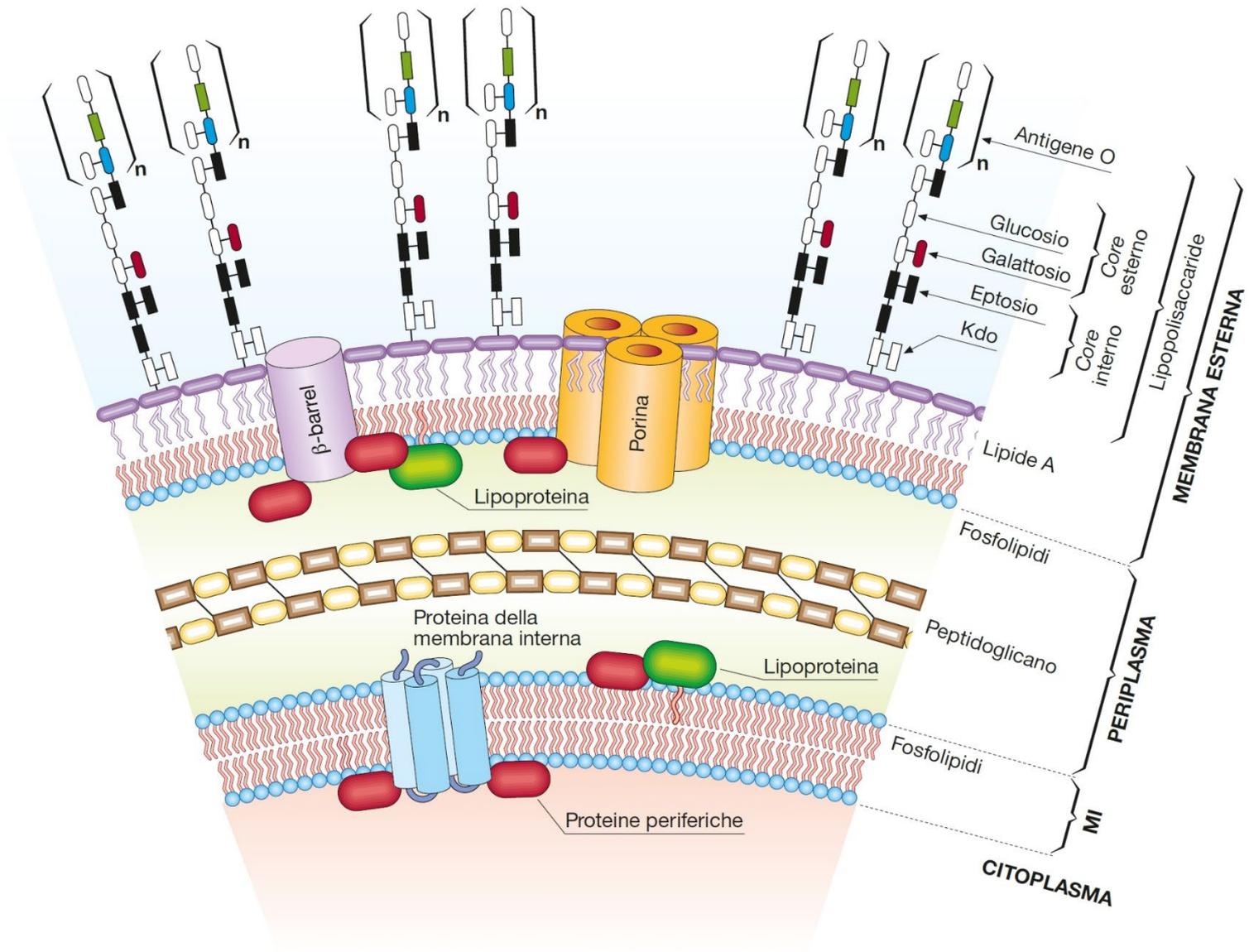
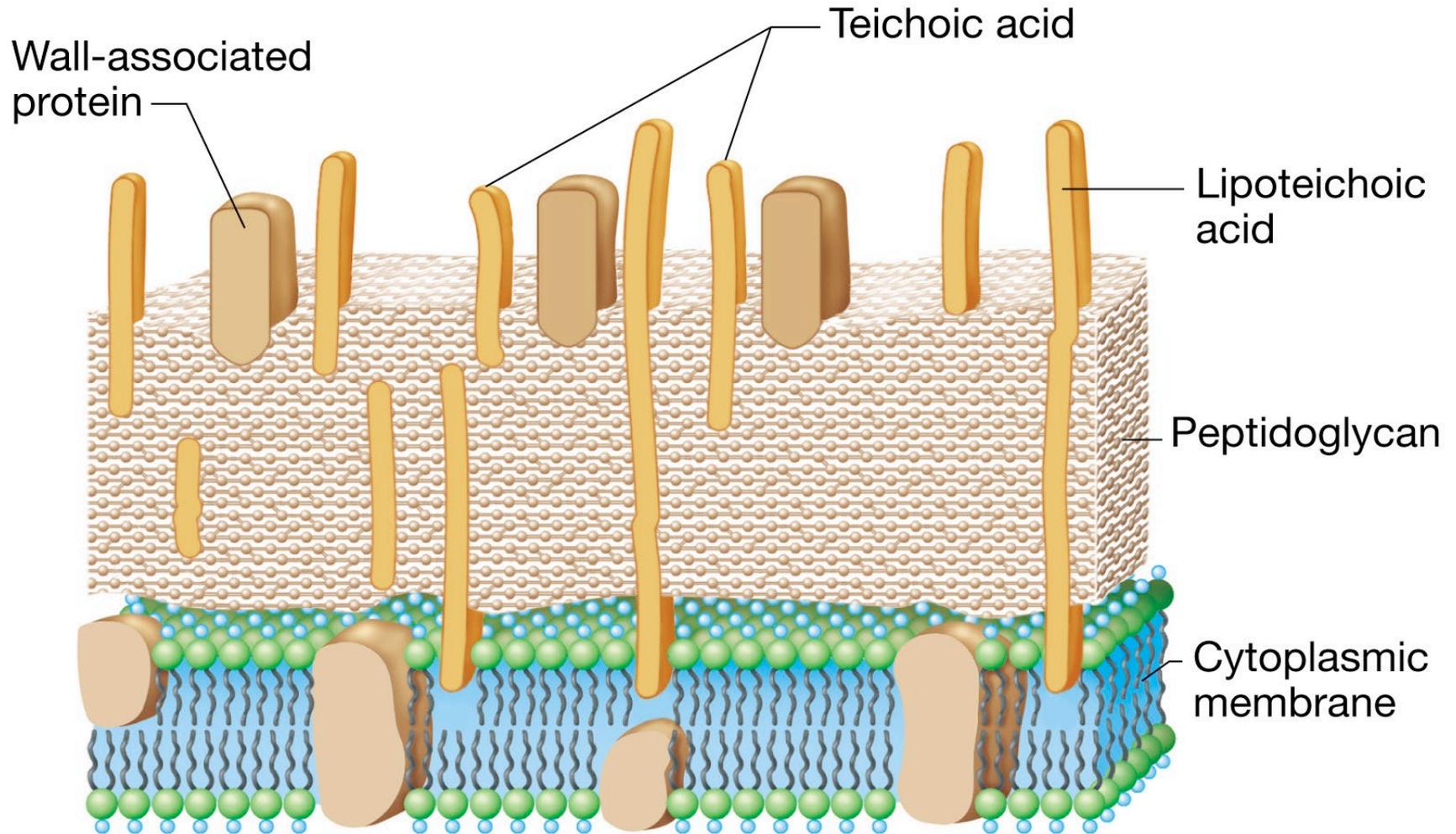


Figura 2.25 SCHEMA GENERALE DELLA PARETE DEI BATTERI GRAM NEGATIVI. La struttura dell'involucro cellulare del batterio Gram negativo *Escherichia coli*. I diversi monosaccaridi sono rappresentati da piccoli rettangoli e ovali di colori differenti. L'antigene O è costituito da un lungo polimero di una subunità tetra- o pentasaccaridica di cui è rappresentato un esempio. MI: membrana interna; Kdo: 2-cheto-3-deossiottonato.

La parete dei Gram+ possiede gli acidi teicoici



(b)

Batteri Gram positivi :

caratterizzati da una comune organizzazione della parete

Specie sporigene di *Clostridium* e di *Bacillus*

Specie di antibiotico-produttori di *Streptomyces*

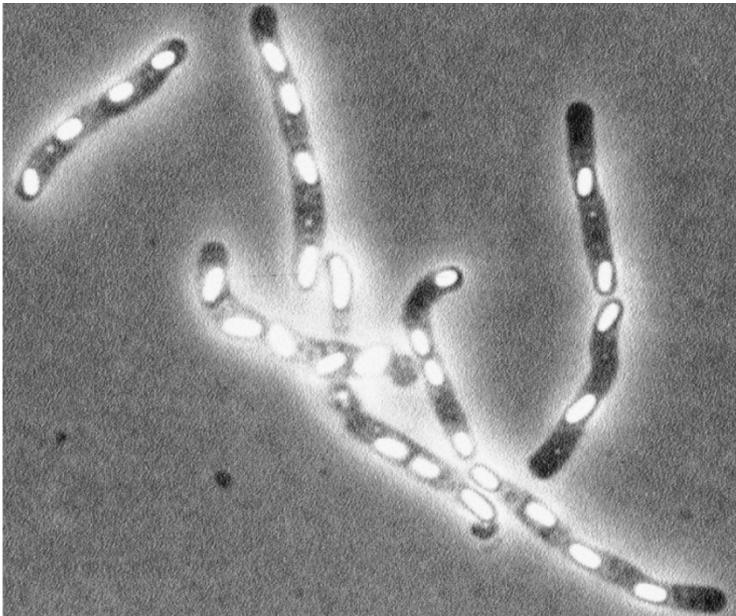
Produttori di acido lattico

Streptococcus

Lactobacillus

Bacillus: batterio Gram+ che può formare endospore forme di vita criptobiontica molto resistenti al calore

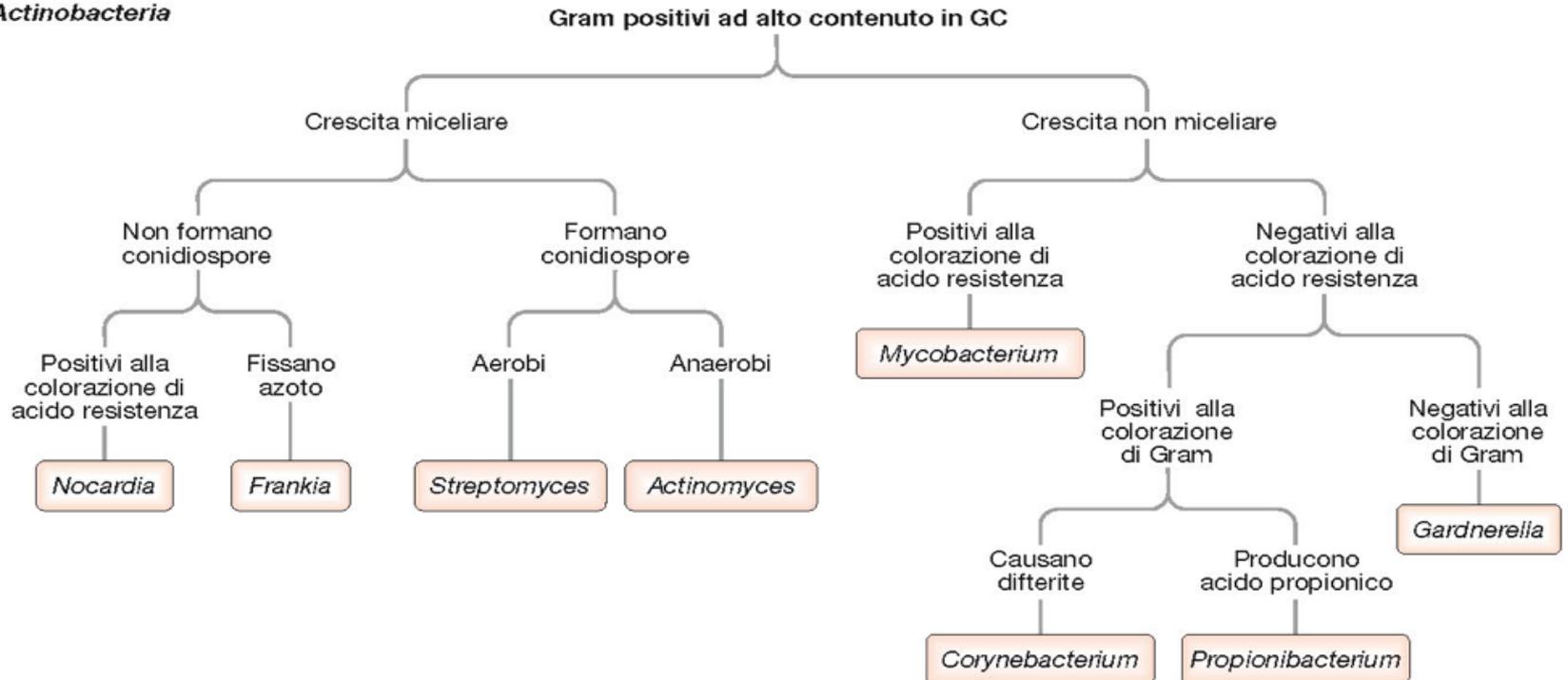
Streptococcus: batterio Gram+ di forma sferica che si aggrega a formare catene. Alcune specie. Diffusi nell'industria caseari e patogeni .



Firmicutes

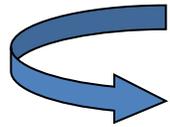


Actinobacteria

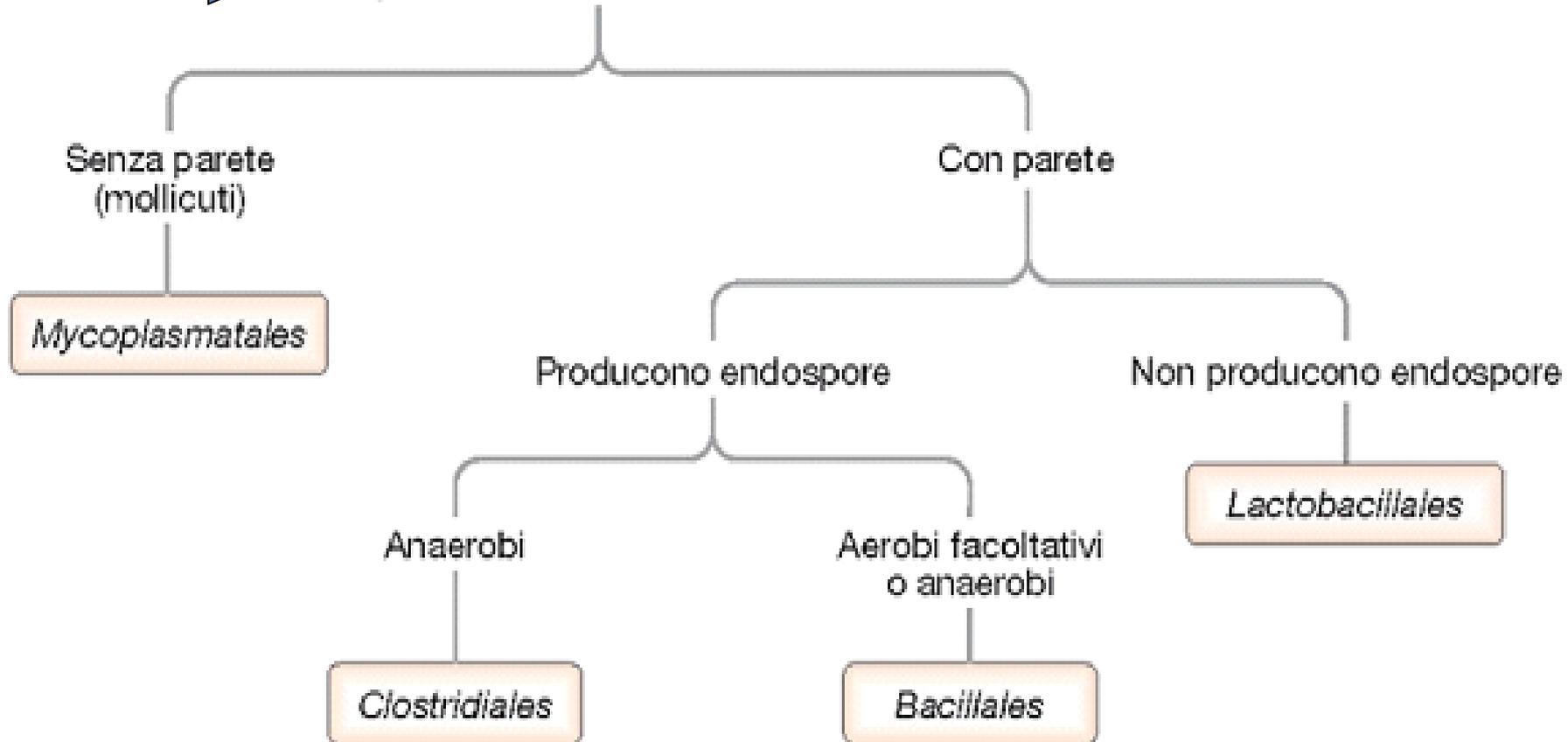


I Batteri Gram positivi si suddividono in Firmicutes e Actinobacteria

Firmicutes



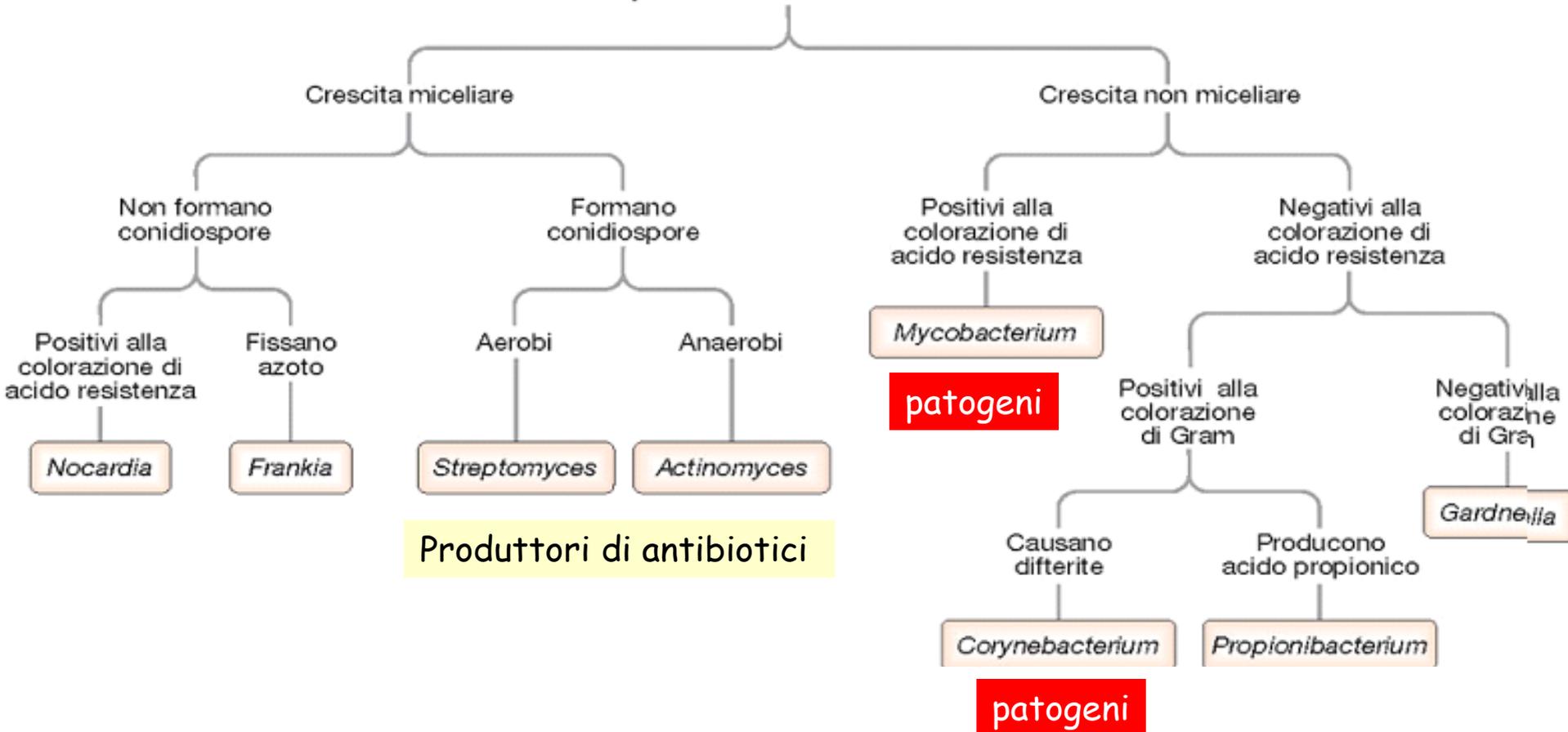
Gram positivi a basso contenuto in GC



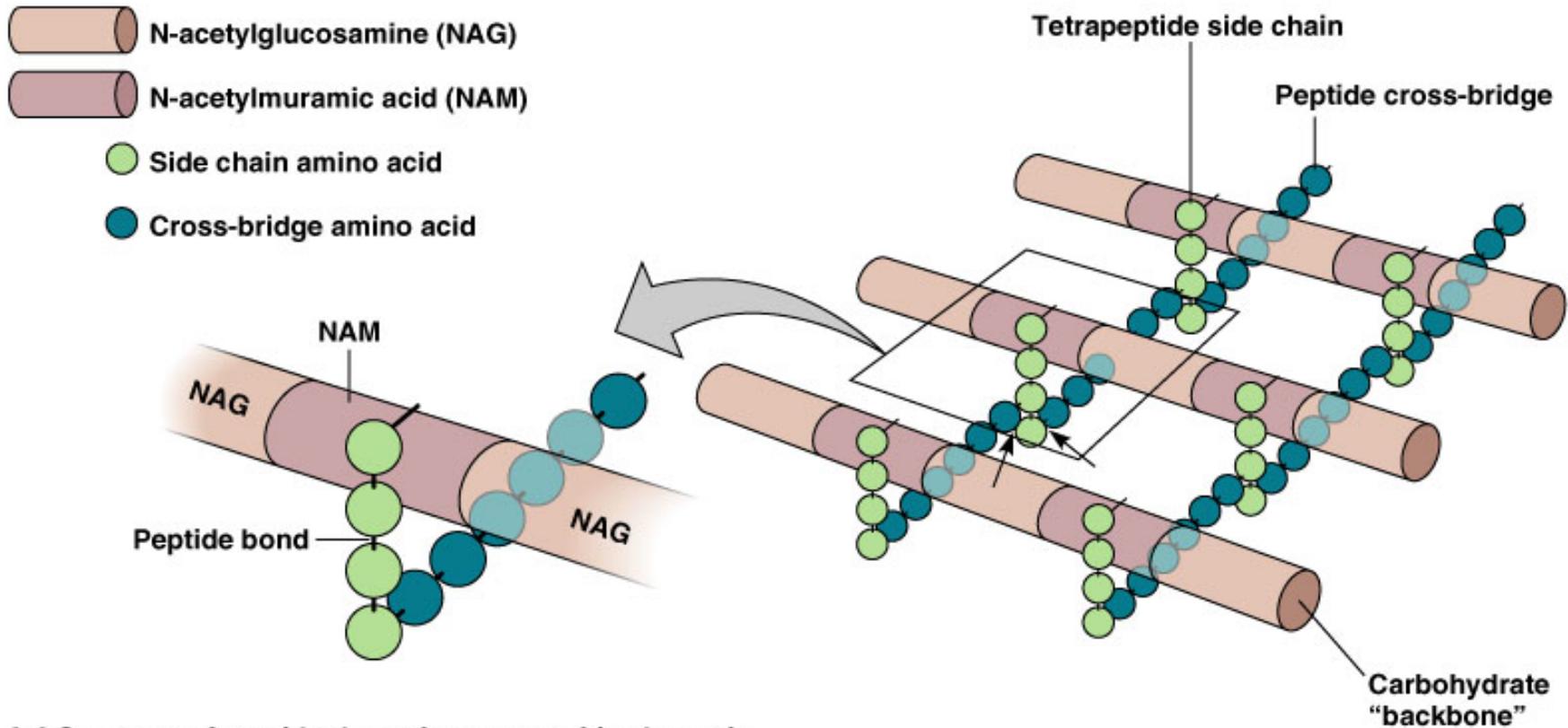
Actinobacteria



Gram positivi ad alto contenuto in GC



Struttura del peptidoglicano nei Gram+ : presenza del ponte peptidico



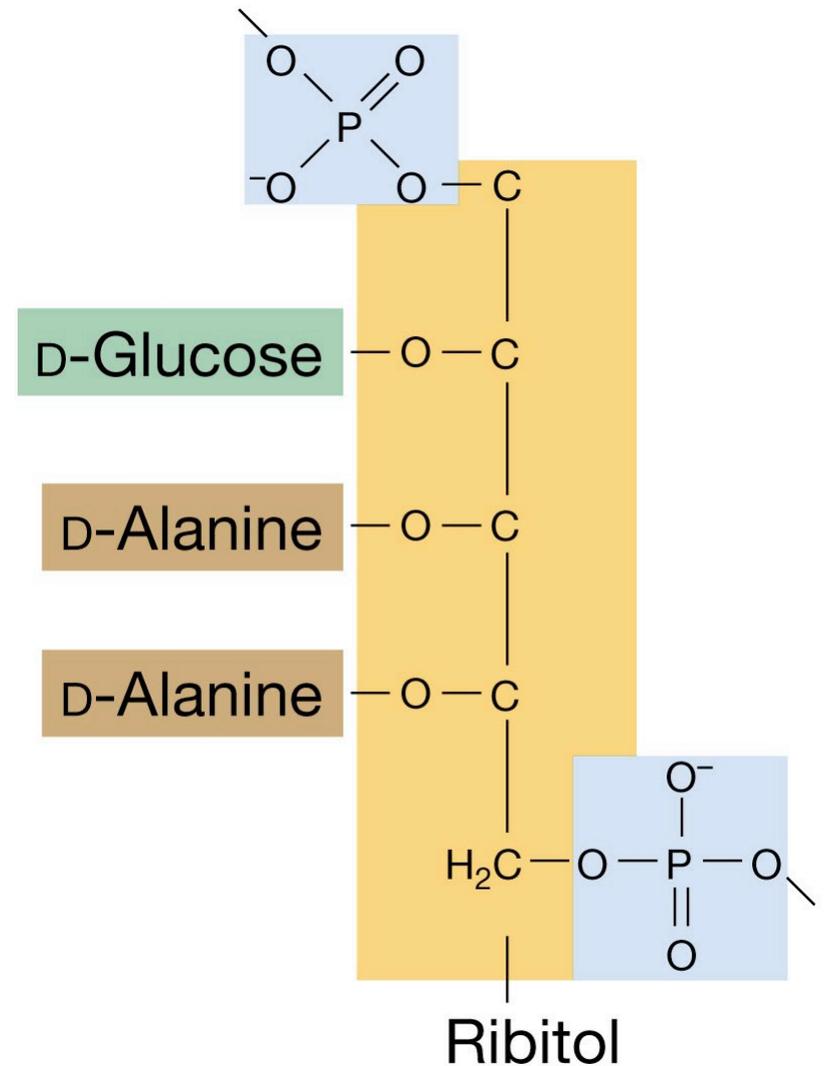
(a) Structure of peptidoglycan in gram-positive bacteria

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Ponte peptidico costituito da AA quali glicina, treonina, serina, acido aspartico oltre a quelli tipici del tetrapeptide. Assenza di AA a catena ramificata, aromatici, AA con zolfo istidina, arginina prolina

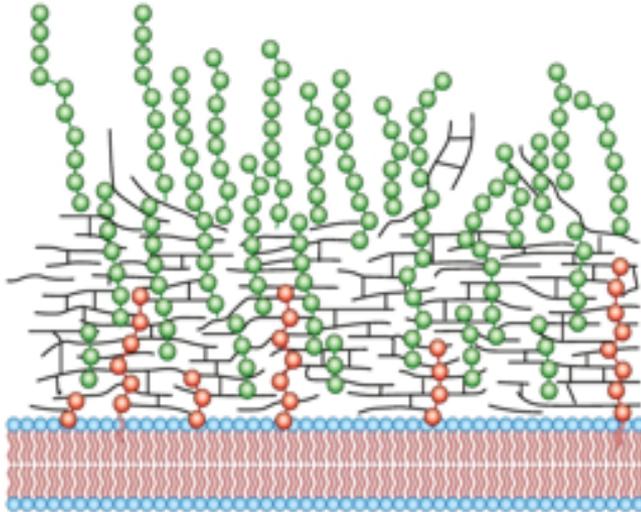
Gli acidi teicoci sono polimeri derivati dalla polimerizzazione di unità di ribitolo generalmente associati ad altri zuccherie alla D-alanina.

Alcuni acidi teicoici conteneti glicerolo sono strettamente legati ai lipidi della membrana e vengono detti lipoteicoci



(a)

a)

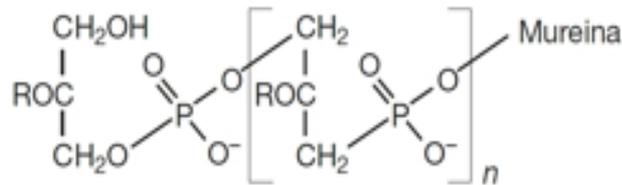


Gli acidi teicoici costituiscono fino al 60% della parete dei Gram+

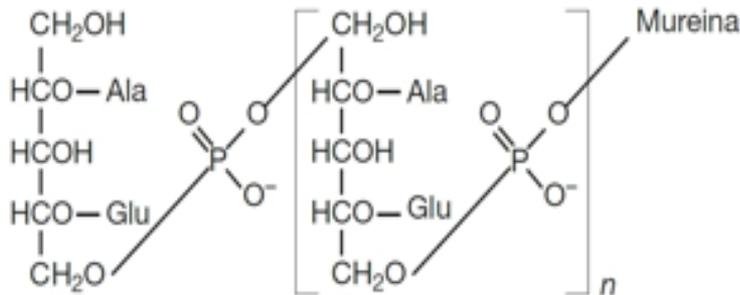
-sono polimeri polianionici ricchi in fosfati, carichi negativamente
fonte di fosfato in carenza di P

b)

Acido glicerol-teicoico



Acido ribitol-teicoico



- controllano il movimento degli ioni assimilazione cationi metallici e l'attività delle autolisine.

- Adesione dei batteriofagi

Gli acidi teicoici sono associati

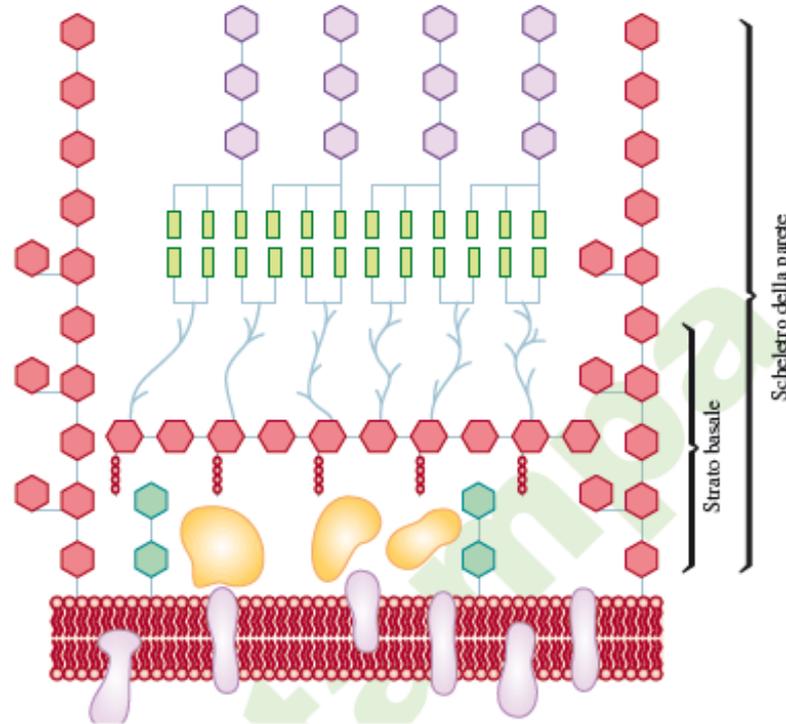
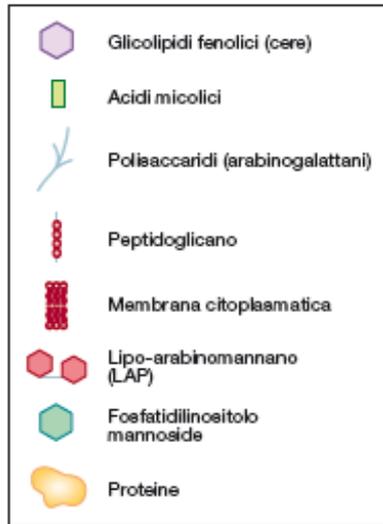
- o al peptidoglicano tramite un legame covalente con l'ossidrile in posizione 6 dell'acido N-acetilmuramico
- o ai lipidi di membrana citoplasmatica (acido lipoteicoico) .

Qual è il loro ruolo?

Non ancora pienamente chiarito ma oltre alle attività descritte

- essendo carichi negativamente contribuiscono a conferire carica negativa alla cellula batterica
- porosità elasticità e resistenza

Struttura della parete dei Micobatteri



40 L'INVOLUCRO CELLULARE IN MYCOBACTERIUM.

Caratterizzati da una parete particolare molto spessa ricca di sostanze cerosi che può essere suddivisa in

strato basale o core costituito da peptidoglicano, arabinogalattano e una struttura più esterna costituita da uno strato di acidi micolici e uno di cere glicolipidi fenolici.

La disposizione ricorda la M.E. dei Gram negativi ma la composizione è molto diversa

Lo strato basale

è costituito da un copolimero di peptidoglicano e arabinogalattano, un polisaccaride ramificato complesso dove gli zuccheri (arabinoso e galattosio) sono presente in forma furanosica (5 atomi di C) anziche piranosica (6 atomi C):

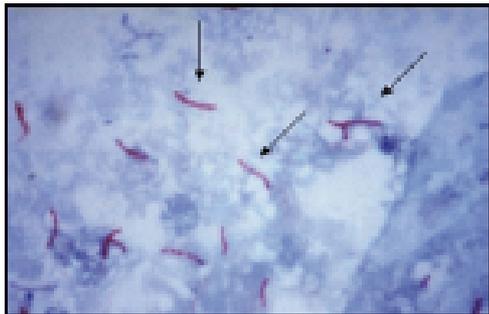
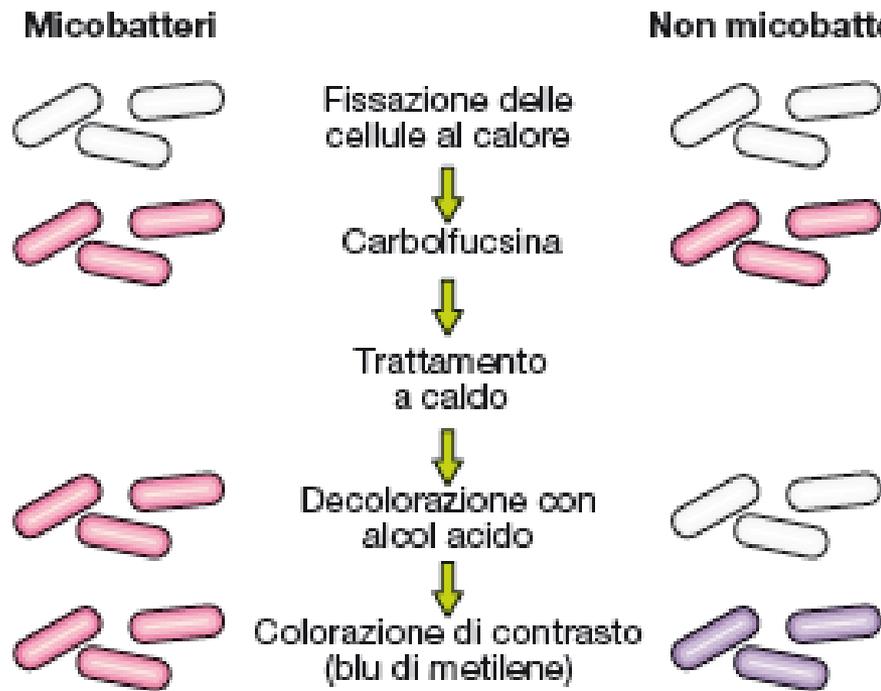
Lo strato esterno

Gli acidi micolici sono acidi grassi complessi a lunga catena (C60-90) alchiliati e idrossilati e sono ancorati al core contribuendo alla scarsa fluidità del rivestimento esterno.

le cere, glicolipidi complessi caratterizzati da catene di carbonio molto lunghe e ramificate che si legano agli acidi micolici .

Barriera impermeabile che non permette l'accesso agli antibiotici.
Recentemente trovati i benzotiazinoni che interagiscono con la sintesi degli arabinogalattani.

Colorazione Ziehl-Neelsen (acido resistenza)



Questa colorazione differenziale prevede, in primo luogo, dopo la fissazione al calore del campione

su un vetrino da microscopio, un trattamento a caldo dei batteri con una soluzione di fucsina e fenolo in etanolo (detta anche carbolo-fucsina): a

temperatura elevata questo colorante è solubile nei lipidi di parete dei micobatteri e può così penetrare

nel citoplasma. Si procede poi con una decolorazione con alcol acido (al 3%).

Questo trattamento non ha effetto sui micobatteri, ma decolora tutti gli altri batteri presenti sul Vetrino

