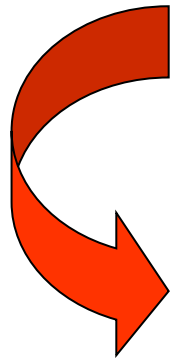


Il mondo microbico è il prodotto di 3.7 miliardi di anni di evoluzione

I microrganismi hanno quindi esplorato :



→ Una moltitudine di nicchie ecologiche

→ tutte le varie combinazioni di condizioni climatiche

• ENORME SFRUTTAMENTO DELLE CAPACITA' BIOCHIMICHE DI UNA CELLULA

• ENORME DIVERSITA' DI SEQUENZA

Una delle maggiori differenze con gli eucarioti è costituita dalla

DIVERSITA' DELLA SEQUENZA PER LA STESSA FUNZIONE GENICA

E' proprio questa diversità di sequenza che fornisce diverse proprietà

• cinetica

• regolazione

• stabilità delle macromolecole (proteine, enzimi etc) che sono importanti per lo sfruttamento globale degli elementi della terra

Tutti i composti organici naturali e molti di quelli sintetici possono essere degradati da uno o più gruppi microbici.

L'energia è ottenuta per ossidazione dei composti e viene conservata sotto forma di molecole ad alta energia come ATP

Energia in presenza di ossigeno  **AEROBI**

Energia in assenza di ossigeno  **ANAEROBI**

Energia da composti **ORGANICI** **CHEMIOORGANOTROFI**
Energia da composti **INORGANICI** **CHEMIOLITOTROFI**
(unica ai Batteri ed Archea)

Energia dalla **LUCE** **FOTOTROFI**

CARBONIO come **NUTRIENTE** : **ETEROTROFE** se richiedono una o più fonti di carbonio

AUTOTROFE se richiedono solo **CO₂** (produttori primari)

Energia

Fototrofi : Alcuni Batteri ed Archea ricavano energia dalla luce come le piante ed alghe

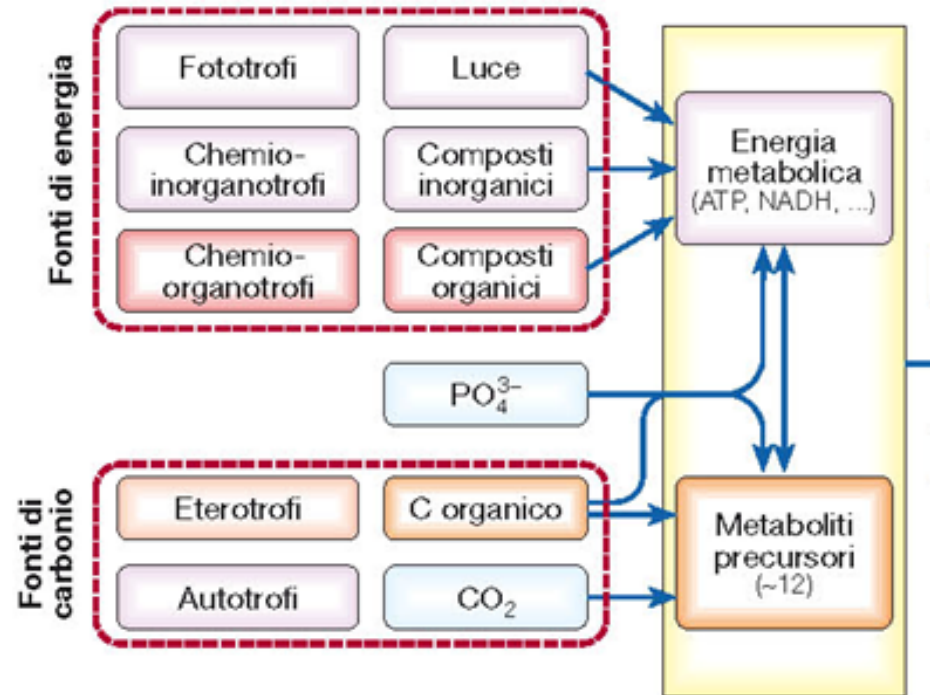
Chemiotrofi: sfruttano l'energia libera delle reazioni chimiche

1. Chemioinorganotrofi (o chemiolitotrofi) utilizzano energia rilasciata da reazioni tra composti inorganici (ossidazioni di solfuro, ferro ferroso ammonio) (**solo Batteri ed Archea**)
2. chemiorganotrofi ricavano energia da composti organici

Carbonio

- capaci di ridurre CO_2 in materiale organico autotrofi
- necessitano di molecole organiche eterotrofi

Come si classificano i batteri in base alle fonti di energia e di carbonio

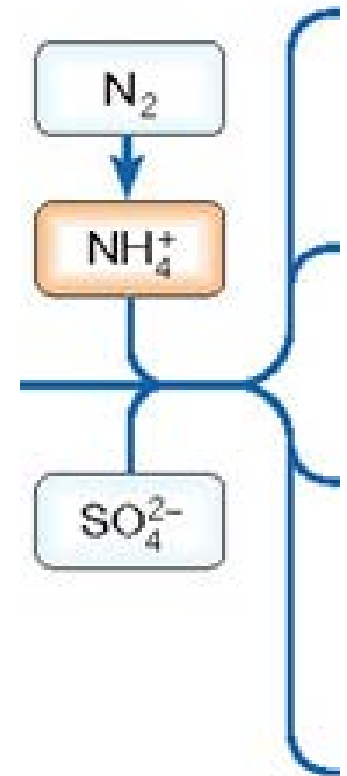


Azoto

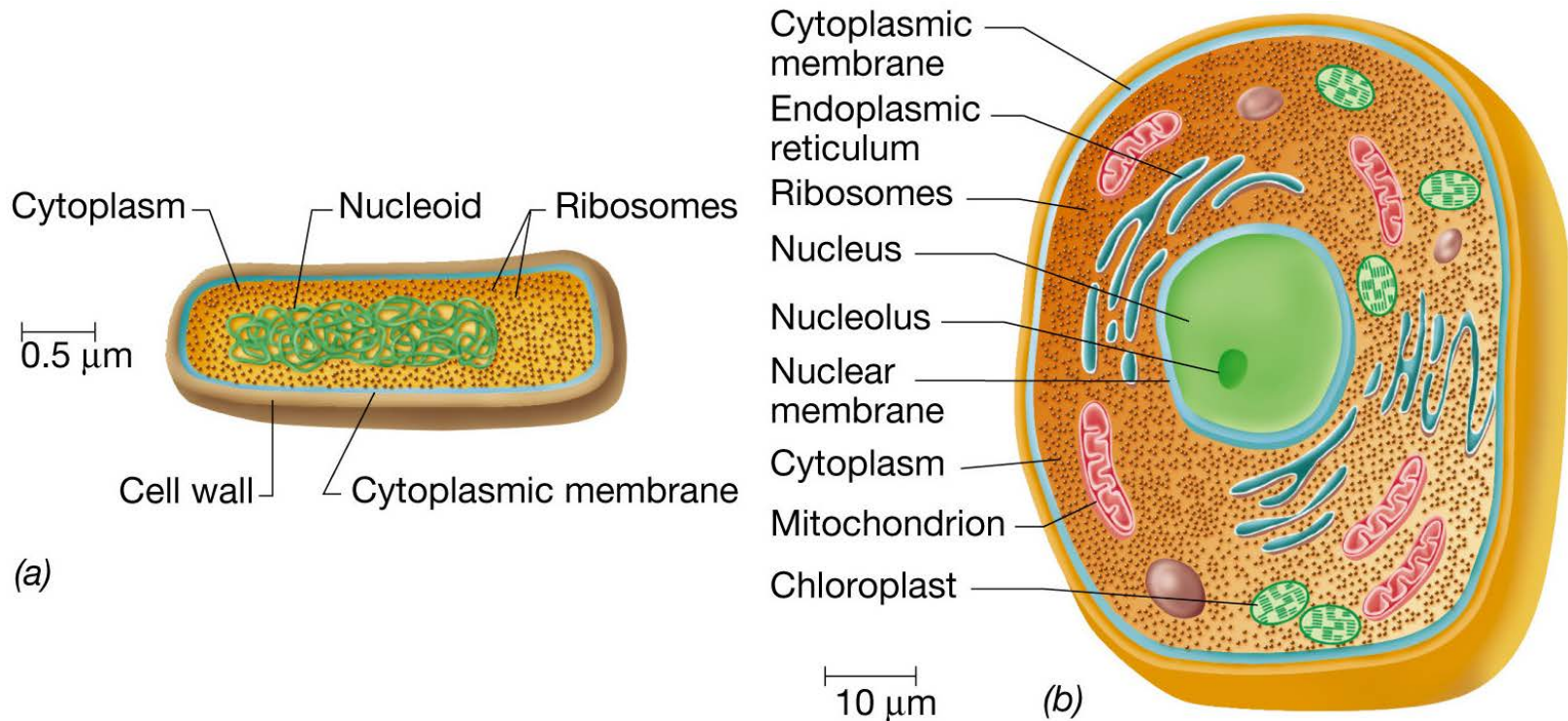
- Molti organismi possono assumere azoto come ammonio per poi inserirlo nei composti organici
- capaci di ridurre ad ammonio altre forme di azoto presente nei nitriti o nitrati

Azoto combinato viene gradualmente trasformato in N_2 (azoto molecolare) gas inerte

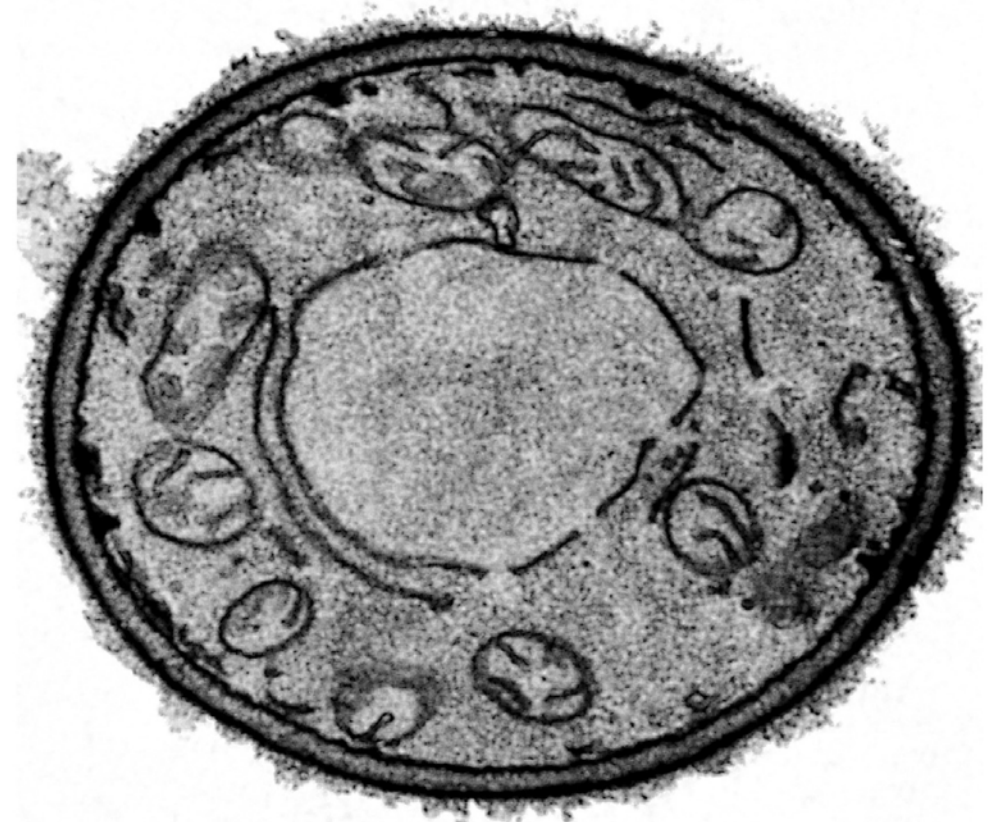
Molti procarioti sono capaci di ridurre N_2 ad **ammonio** ripristinando la disponibilità di azoto combinato per tutti gli organismi viventi. **AZOTOFISSAZIONE** processo unico dei procarioti



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



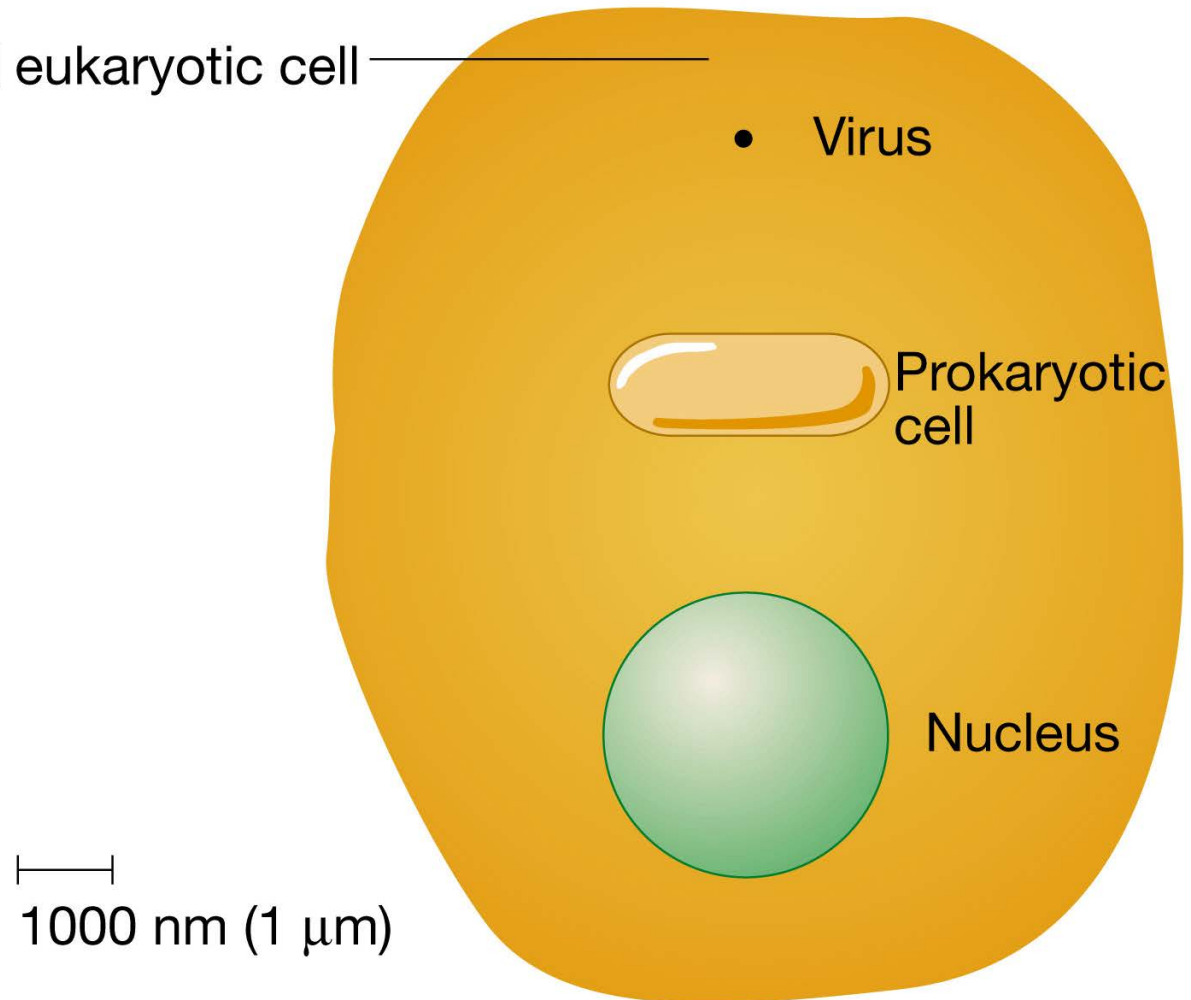
Cellula procariotica e cellula eucariotica a confronto



Ma quali sono le dimensioni di una cellula batterica ?

Un batterio bastoncellare è generalmente lungo da 1 a 5 μm e largo 1 μm
la testa di una particella virale è circa 0.065 μm

Typical eukaryotic cell

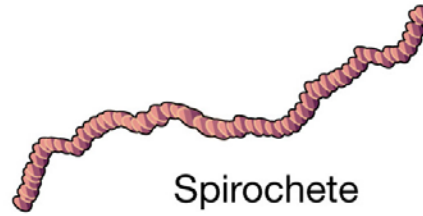


Morfologie caratteristiche dei batteri

Cocco $d=1.5\mu\text{m}$



Coccus



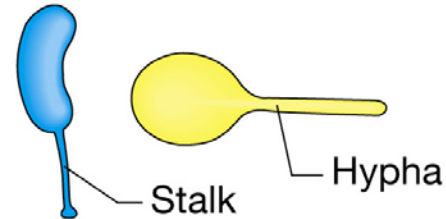
Spirochete

Spirocheta
 $d = 0.25 \mu\text{m}$

Bastoncello $d=1.\mu\text{m}$



Rod



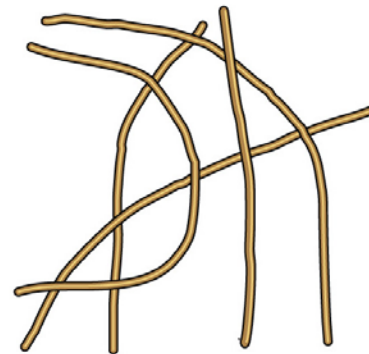
Budding and appendaged bacteria

Forma
gemmante e
pedunculata
 $d=1.2 \mu\text{m}$

Spirillo= $1.\mu\text{m}$

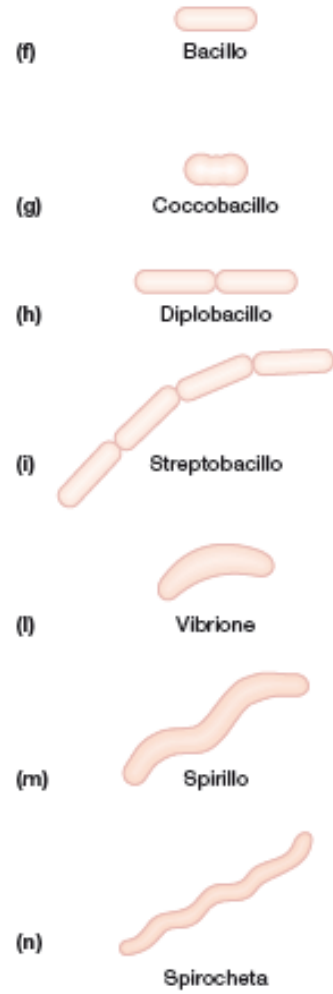
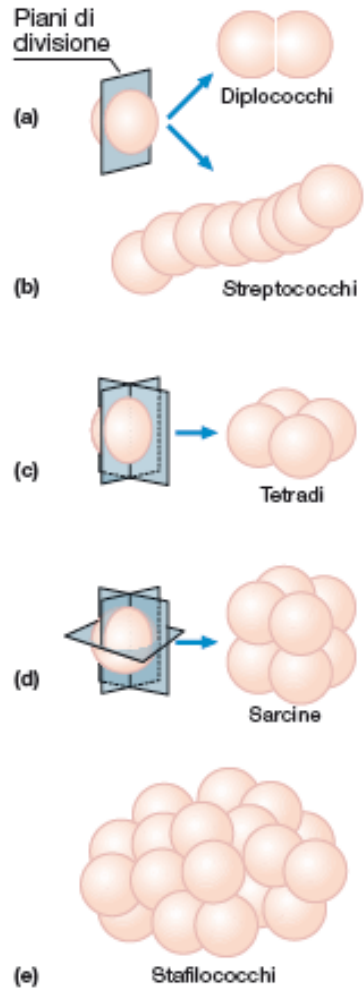


Spirillum



Filamentous

Forma
filamentosa
 $d=0.8\mu\text{m}$





Deinococcus radiodurans è un batterio altamente resistente a elevate radiazioni.

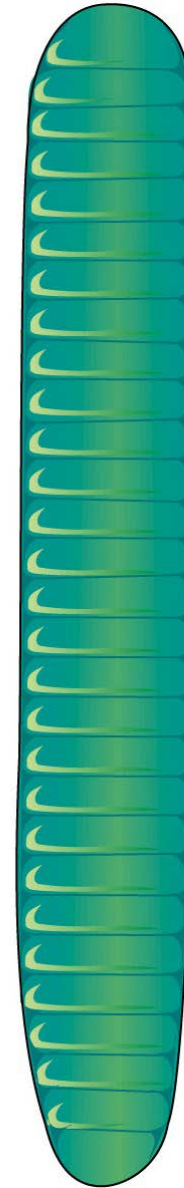
Sopravvive a dosi di radiazioni letali per l'uomo. E può riassembleare il proprio cromosoma dopo che è stato distrutto dalle radiazioni. Si divide secondo due piani formando aggregati.

Ma le piccole dimensioni talvolta non bastano per definire una cellula procariotica

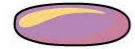
La gran parte dei batteri ha dimensioni comprese tra 0.5 e 2 μm

Epulopiscium fishelsoni,
microorganismo simbiote
dei pesci ha una lunghezza
di 600 μm ed è 4 volte più
grande di cellule di
Paramecium un protozoo di
150 μm

Oscillatoria (a cyanobacterium)
8 \times 50 μm



Bacillus megaterium
1.5 \times 4 μm



Escherichia coli
1 \times 3 μm



Streptococcus pneumoniae
0.8 μm diameter



Haemophilus influenzae
0.25 \times 1.2 μm



Thiomargarita è un enorme solfobatterio chemiolitotrofo visibile ad occhio nudo! Vantaggio selettivo delle dimensioni non è chiaro: indubbiamente riesce ad immagazzinare molti granuli di zolfo utilizzato come fonte di energia.

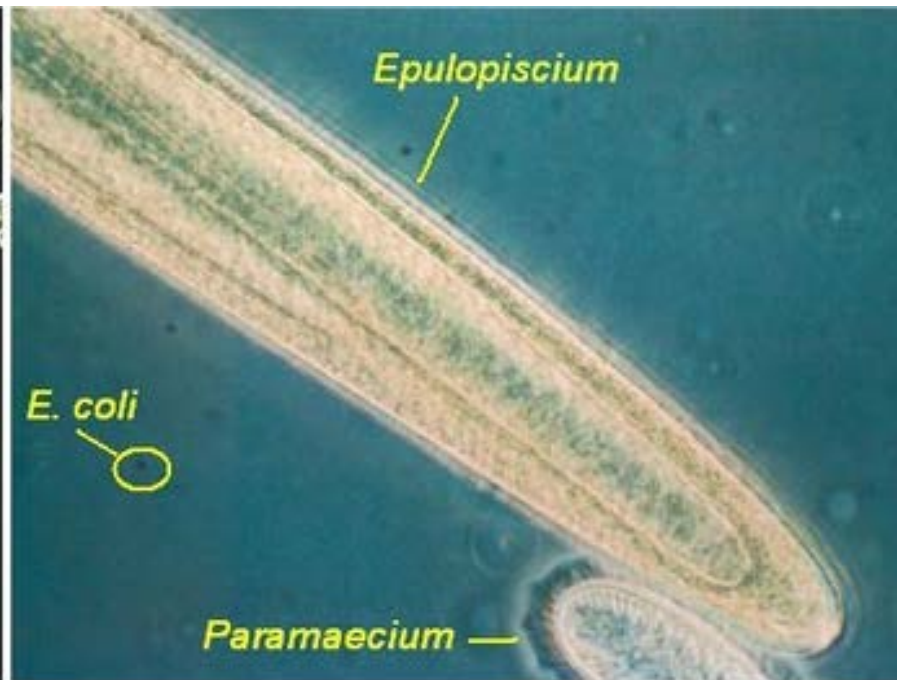
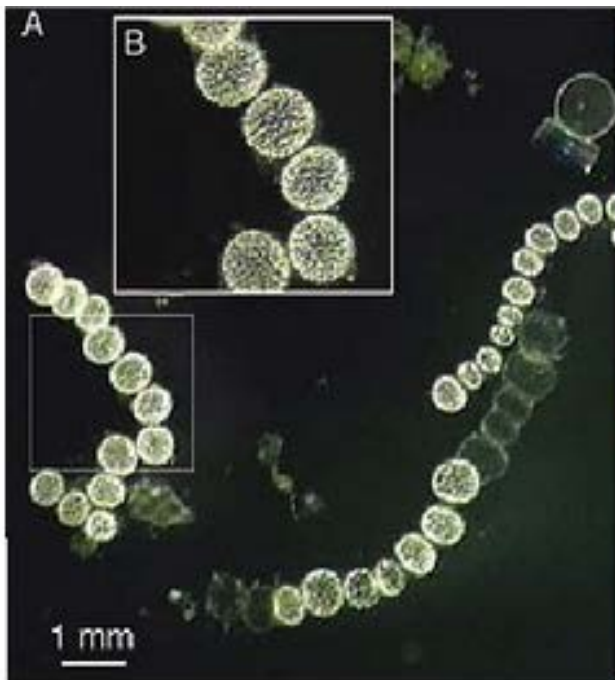


Diametro di 750um
volume 10^8 volte
superiore a E.coli



Batteri giganteschi ..
Thiomargarita (0.75mm) ed
Epulopiscium (0.6mm)

Thiomargarita vs Drosophila



A. Picture of *Thiomargarita namibiensis*, of about 750 micrometers. B. comparison between *Epulopiscium fishelsoni* and *E. coli*. (Photos: Science Policy)

Dimensioni delle cellule batteriche : da 750 μm a 0.2 μm !!

Tabella 3.1 Dimensioni e volume delle cellule di alcuni procarioti, dalle più grandi alle più piccole

Organismo	Caratteristiche	Morfologia	Dimensioni ^a (μm)	Volume cellulare (μm^3)	Volumi di <i>E. coli</i>
<i>Thiomargarita namibiensis</i>	Chemiolitotrofo sulfureo	Cocchi raggruppati in catenelle	750	200 000 000	100 000 000
<i>Epulopiscium fishelsoni</i> ^a	Chemiorganotrofo	Bastoncelli con estremità affusolate	80 × 600	3 000 000	1 500 000
<i>Beggiatoa</i> sp. ^a	Chemiolitotrofo sulfureo	Filamenti	50 × 160	1 000 000	500 000
<i>Achromatium oxaliferum</i>	Chemiolitotrofo sulfureo	Cocchi	35 × 95	80 000	40 000
<i>Lyngbya majuscula</i>	Cianobatterio	Filamenti	8 × 80	40 000	20 000
<i>Thiovolum majus</i>	Chemiolitotrofo sulfureo	Cocchi	18	3000	1500
<i>Staphylothermus marinus</i> ^a	Ipertermofilo	Cocchi in raggruppamenti irregolari	15	1800	900
<i>Magnetobacterium bavaricum</i>	Batterio magnetotattico	Bastoncelli	2 × 10	30	15
<i>Escherichia coli</i>	Chemiorganotrofo	Bastoncelli	1 × 2	2	1
<i>Pelagibacter ubique</i> ^a	Chemiorganotrofo marino	Bastoncelli	0,2 × 0,5	0,014	0,007
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Batterio patogeno	Pleomorfico ^b	0,2	0,005	0,0025

^aUn numero singolo rappresenta il diametro di una cellula sferica. I valori si riferiscono alle dimensioni cellulari più grandi osservate in ciascuna specie. Per esempio, le cellule di *T. namibiensis* hanno mediamente un diametro di circa 200 μm , ma occasionalmente si osservano cellule giganti di 750 μm . Analogamente, le cellule di *S. marinus* hanno mediamente un diametro di circa 1 μm . Non è chiaro quale sia la specie di *Beggiatoa* qui considerata; *E. fishelsoni* e *P. ubique* non sono nomi formalmente riconosciuti in tassonomia.

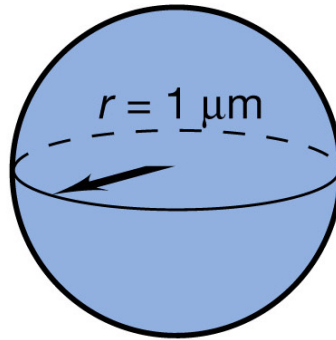
^b*Mycoplasma* è un batterio privo di parete cellulare e può assumere diverse forme (pleomorfico significa "molte forme").

Fonte: Schulz, H.N. e B.B. Jorgensen. 2001. *Ann. Rev. Microbiol.* 55:105-137.

Vantaggi delle piccole dimensioni

Relazione tra
superficie e volume:

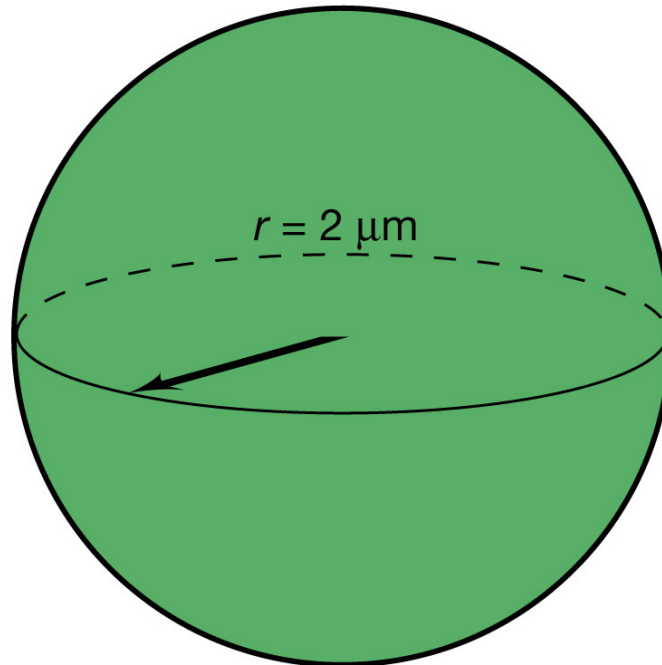
aumentando le
dimensioni
diminuisce il
rapporto



$$\text{Surface area } (4\pi r^2) = 12.6 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Volume } \left(\frac{4}{3}\pi r^3\right) = 4.2 \mu\text{m}^3$$

$$\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}} = 3$$



$$\text{Surface area} = 50.3 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Volume} = 33.5 \mu\text{m}^3$$

$$\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}} = 1.5$$

Quanti geni possiede una cellula batterica ?

Escherichia coli ha un genoma di 4.600 kb(4.6 Mb)

Circa 4300 geni

Bacillus subtilis 4.214 kb

Circa 4100 geni

Vi è variabilità nelle dimensioni del genoma

15 Mb a 0.5 Mb (mini genomi nei batteri simbiotici obbligati 0.2 Mb)

Alta capacità codificante

Una cellula umana ha un contenuto

in DNA 1000 volte superiore

In numero di geni 7 volte superiore

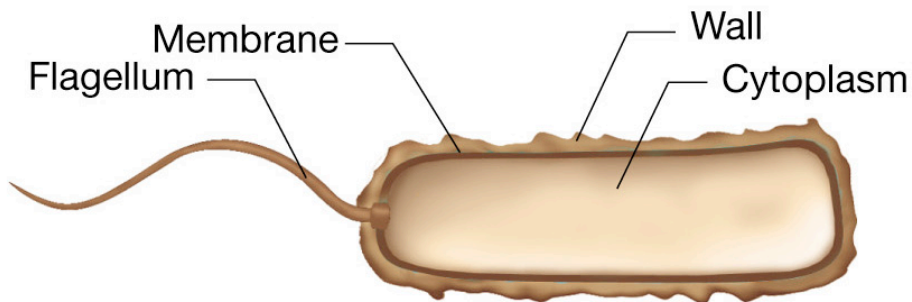
Localizzazione delle macromolecole nella cellula

Le proteine sono presenti ovunque sia come componenti cellulari che come enzimi

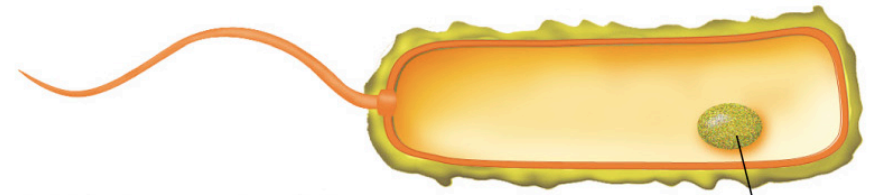
Gli acidi nucleici sono localizzati nel nucleotide, RNA nel citoplasma e nei ribosomi

I polisaccaridi nella parete e nei granuli d'accumulo

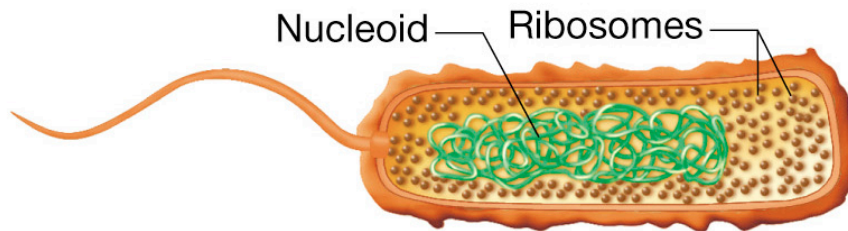
I lipidi nella membrane citoplasmatica, nella parete e nei granuli d'accumulo



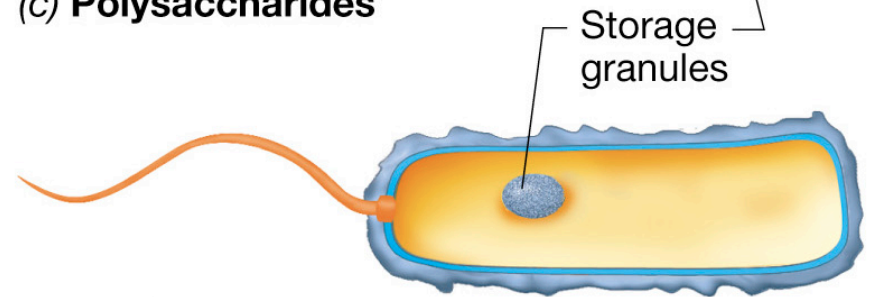
(a) **Proteins**



(c) **Polysaccharides**



(b) **Nucleic Acids**



(d) **Lipids**

Ma tutti i procarioti hanno la parete cellulare ?

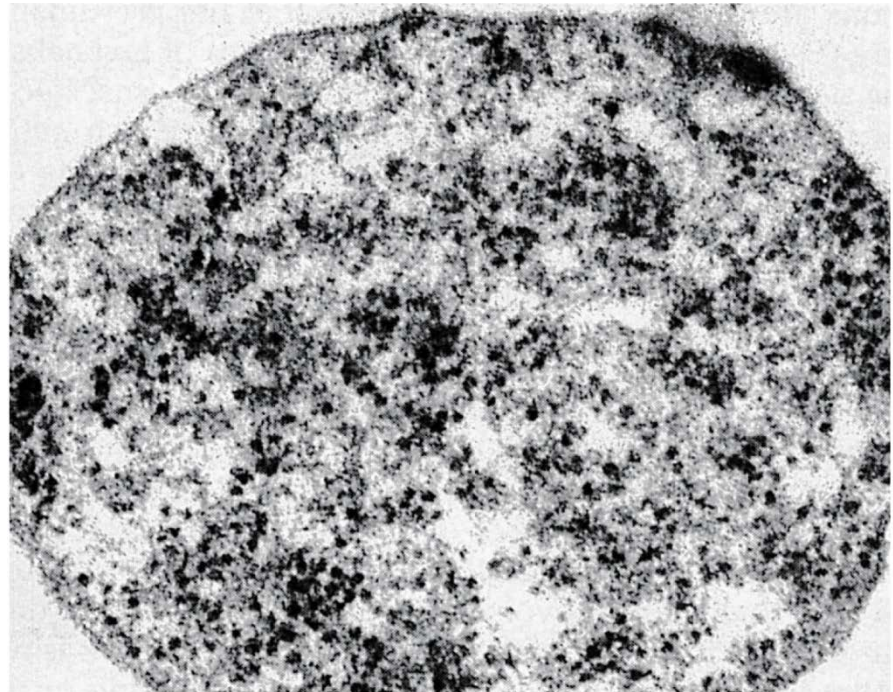
Le eccezioni :

Mycolasma Batteri

Clamidio Batteri

Thermoplasma Archea

Psicrophilus Archea



Quante specie di procarioti ci sono?

Per gli animali e le piante viene considerata una specie una popolazione di individui che può riprodursi dando origine ad individui riproducibili

I batteri sono aploidi e si riproducono asessualmente .
Come si definisce quindi una specie?

Concetto di specie nei procarioti:

due ceppi appartengono alla stessa specie quando la percentuale di ibridazione DNA -DNA è uguale o superiore al 70%

due ceppi appartengono alla stessa specie quando le sequenze di RNA 16S hanno un omologia del 97% (meno del 3% di divergenza)

Specie ---Generi---Famiglie---Ordini---Classi---Phyla---- Dominio


```
graph TD; Dominio --> Batteri; Dominio --> Archea; Dominio --> Eucarioti;
```

Gli orologi evolutivi

Alcuni **geni** ed alcune **proteine** possono servire come **orologi evolutivi** ovvero come misura dei cambiamenti che sono avvenuti nel corso dell'evoluzione

Le differenze di sequenza nucleotidica o aminoacidica di macromolecole simili da un punto di vista funzionale (quindi omologhe) ci possono indicare la distanza evolutiva

.

Criteri per la scelta di una molecola ideale come orologio evolutivo

deve essere distribuita universalmente nel gruppo in esame

- deve essere funzionalmente omologa
- deve contenere regioni di sequenza conservate
- non deve aver subito troppi cambiamenti di sequenza

I migliori candidati:

RNA ribosomiale (componenti chiave del processo di traduzione)

•
Le proteine con attività ATPasi (i componenti enzimatici che idrolizzano ATP)

•
RecA (la proteina chiave della ricombinazione)

Geni utilizzati per ricostruzione filogenetica nei microrganismi oltre al gene per RNA ribosomiale 16S

GENE/FAMIGLIA/FUNZIONE

DNA polimerasi

Sintesi purine e pirimidine

Ciclo TCA

Fattori d'inizio e di allungamento della traduzione

RNA ribosomali

Proteine ribosomali

Aminoacil-t-RNA sintetasi

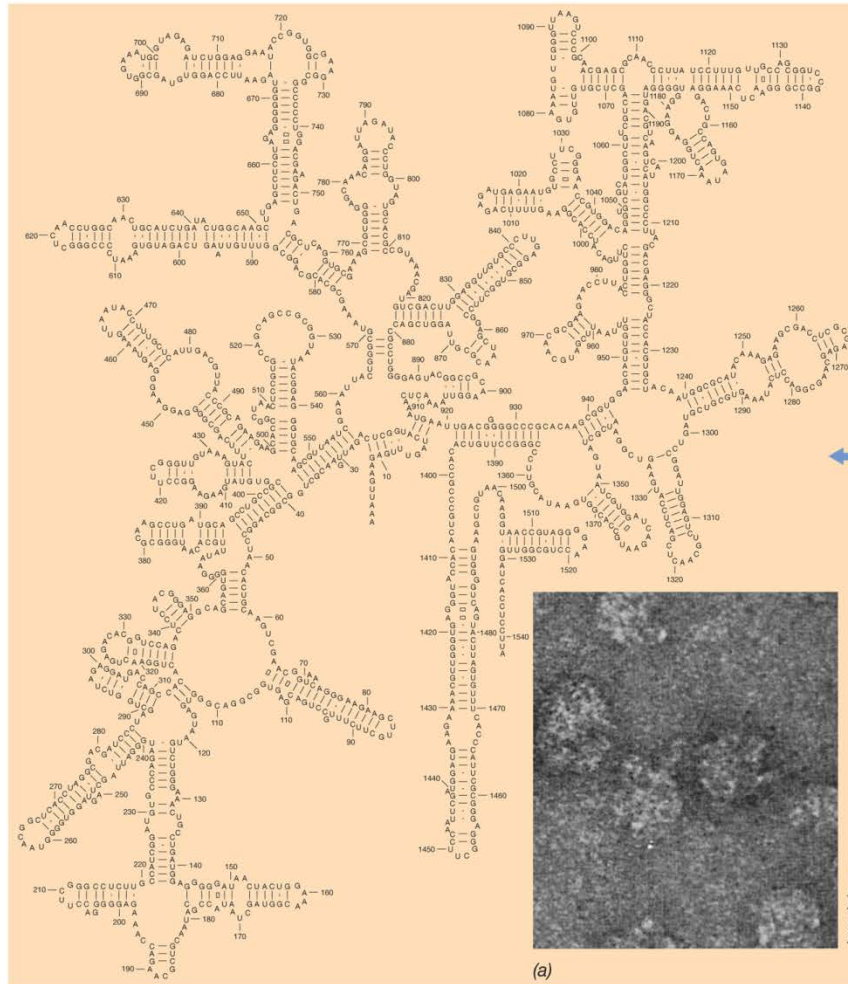
Biosintesi degli aminoacidi

Proteine *heat-shock*

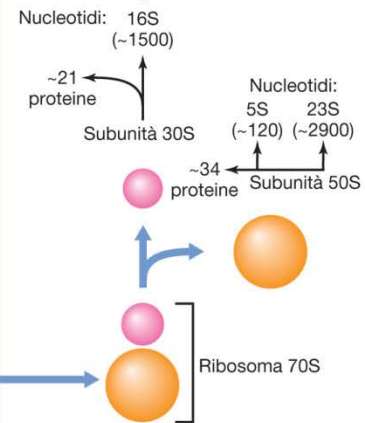
Biosintesi di cofattori

Parete cellulare

RNA ribosomiale



rRNA 16S



(c)

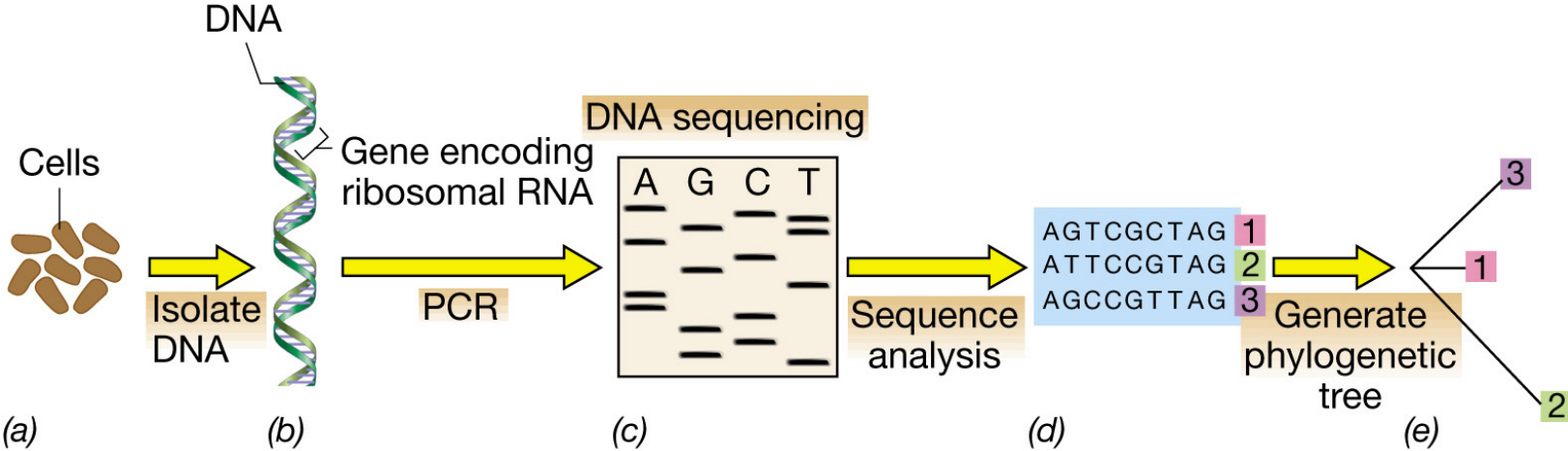
RNA 16S e filogenesi

L'intuizione di Carl Woese di utilizzare il gene che codifica per RNA16S per la costruzione degli alberi filogenetici è ancora valida e resta un'analisi necessaria per stabilire la filogenesi tra gruppi tassonomici.

La struttura dell'RNA ribosomiale è tale che alcune regioni implicate nella formazione delle strutture tridimensionali complesse sono estremamente conservate e le loro sequenze si sono evolute lentamente differenziandosi molto poco tra gruppi filogeneticamente distanti

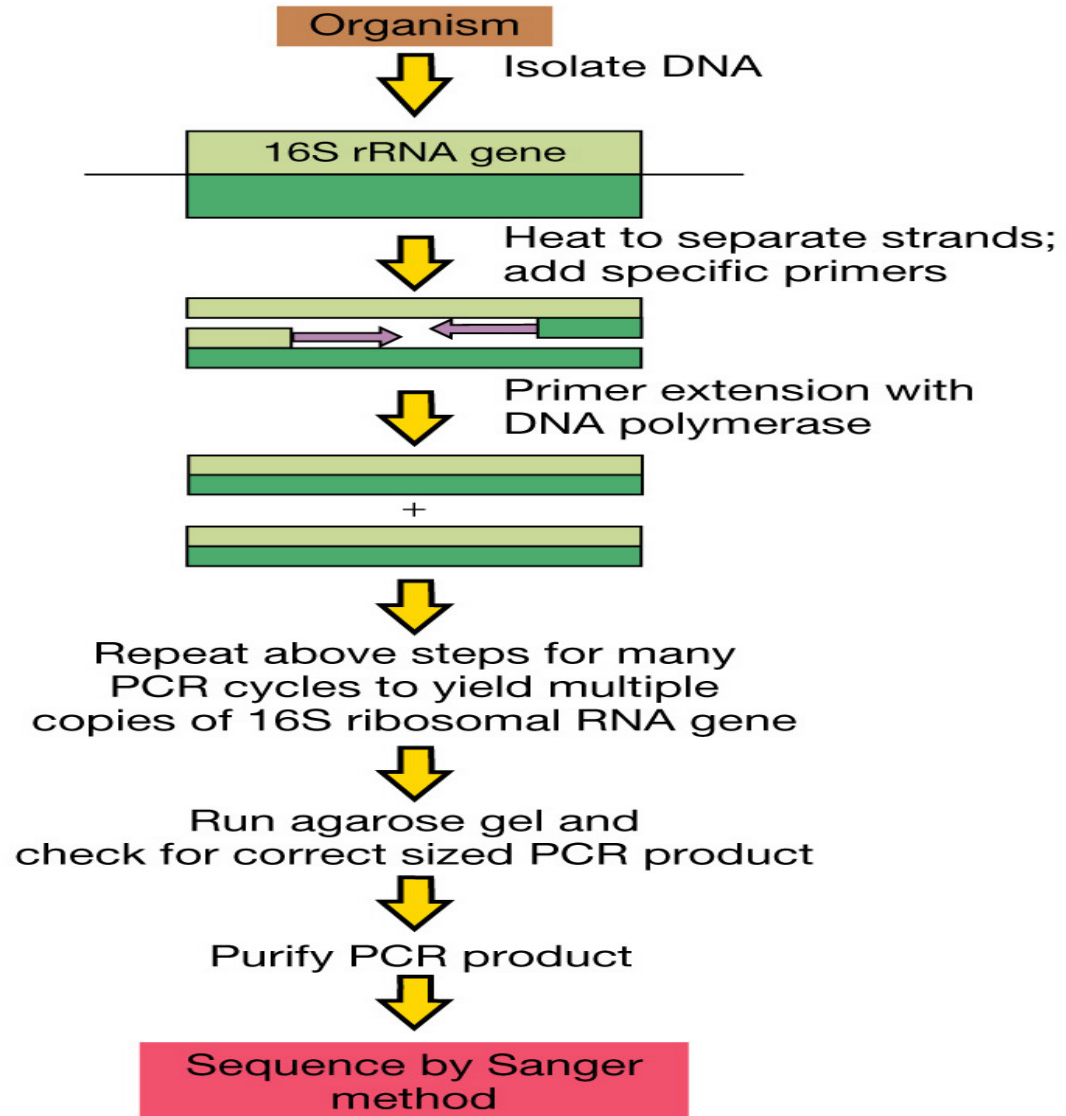
Costruzione di alberi filogenetici tramite sequenziamento dell'RNA ribosomiale.

Utilizzando primer oligonucleotidici specifici per le sequenze conservate rRNA di un organismo di uno o l'altro dominio è possibile amplificare i geni per l'RNA ribosomiale della subunità 30S



Quali sono le principali tecniche molecolari per l'identificazione dei microrganismi?

Sequenziamento dell'RNA ribosomiale 16S (SSU RNA)



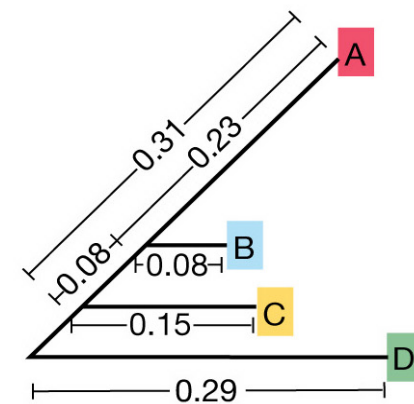
Alberi filogenetico basato sulle distanze evolutive tra sequenze di RNA ribosomiale SSU

Organism	Sequence	Analysis
A	C G U A G A C C U G A C	For A → B, three differences occur out of a total of twelve; thus $\frac{3}{12} = 0.25$
B	C C U A G A G C U G G C	
C	C C A A G A C G U G G C	
D	G C U A G A U G U G C C	

(a) Sequence alignment and analysis

Evolutionary distance	Corrected evolutionary distance
E_D A → B 0.25	0.30
E_D A → C 0.33	0.44
E_D A → D 0.42	0.61
E_D B → C 0.25	0.30
E_D B → D 0.33	0.44
E_D C → D 0.33	0.44

(b) Calculation of evolutionary distance



(c) Phylogenetic tree

Quante specie ci sono? Qualche numero....molto provvisorio
Bergey's, Manual 2001

	Batteri	Archea	Totale
Dominio	1	1	2
Phyla	23 (+7) *	3 (+10) *	26 (40)
Classe	32	8	40
Ordine	77	12	89
Familia	182	21	203
Genere	871	69	941
Specie	5007	217	5224

* si sono identificati oltre 15 nuova Phyla tramite sequenziamento batteri NON COLTIVABILI

Soltanto una piccola frazione della comunità microbica coltivabile
0.5-1 %

Possono esserci

- in un campione di suolo fino a 8×10^3 specie diverse
- in un campione d'acqua fino a 8×10^2 specie diverse

Tenendo conto dei parametri di associazione tra comunità diverse del suolo si calcola vi possano essere 10^9 specie di procarioti nel suolo

La differenza nel numero di specie tra suolo ed acqua può essere spiegata:

- alta diversità delle risorse del suolo
- isolamento della specie che ne riduce la competizione

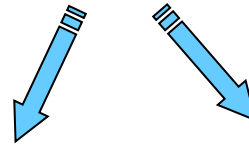
La gran parte del mondo microbico rimane **NON COLTIVABILE**

Tramite l'estrazione e l'analisi del DNA dall'ambiente ci si è resi conto che questo mondo è molto più ampio di quanto si potesse pensare:

Phyla da 12 (1987)



40



Identificati
prevalentemente tra gli
Archea negli ambienti
estremi

10 presenti solo come
SSU rRNA

LIMITI dell'identificazione di microrganismi non COLTIVABILI

le conoscenze rimangono limitate alla sequenza ma sulla fisiologia , biochimica regolazione ??????

POSSIAMO grazie alla sequenza sapere

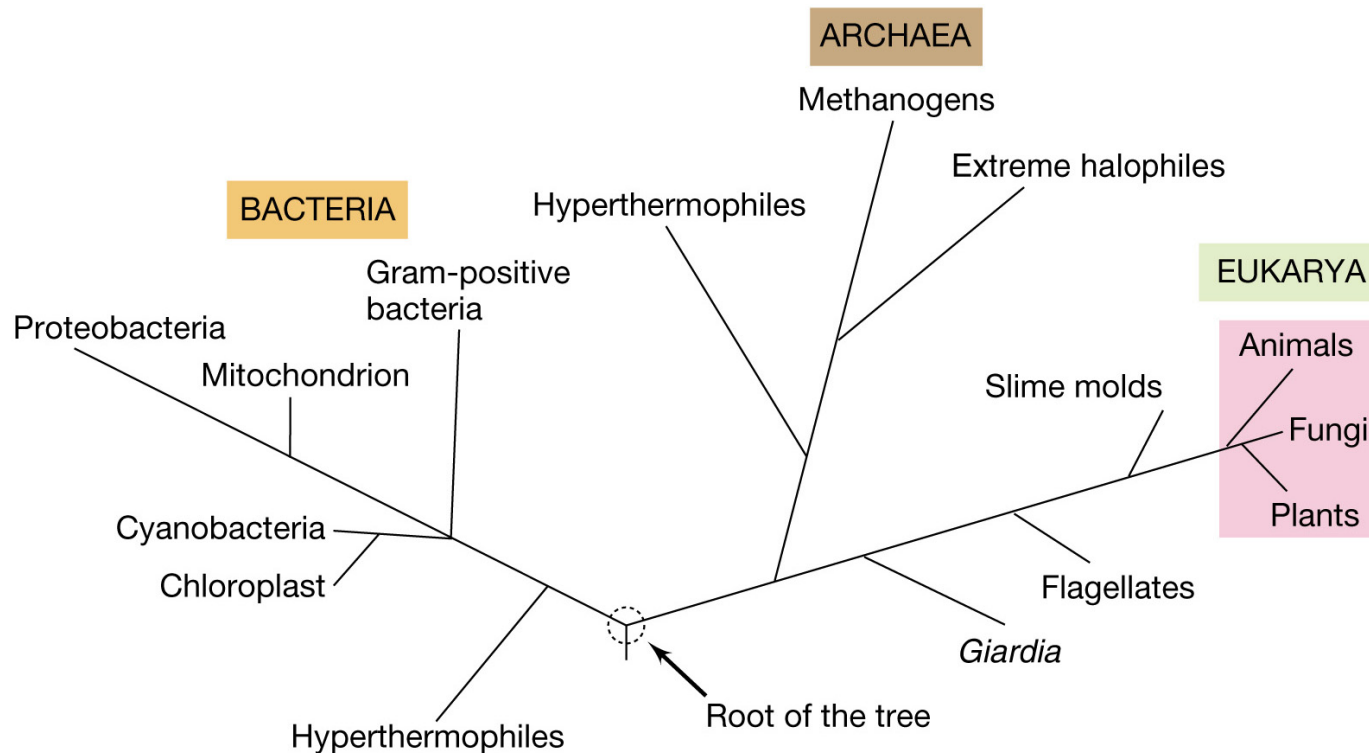
- quali geni siano dominanti in un certo ambiente
- quali specie siano predominanti
- progettare degli strumenti idonei allo studio dei microrganismi non coltivabili

Albero filogenetico definito sulla base della sequenza dell' RNA ribosomiale

Tre domini di organismi :

Batteri ed Archea con un'organizzazione cellulare di tipo **procariotico** (solo microrganismi)

Eucarioti comprende microrganismi e macrorganismi

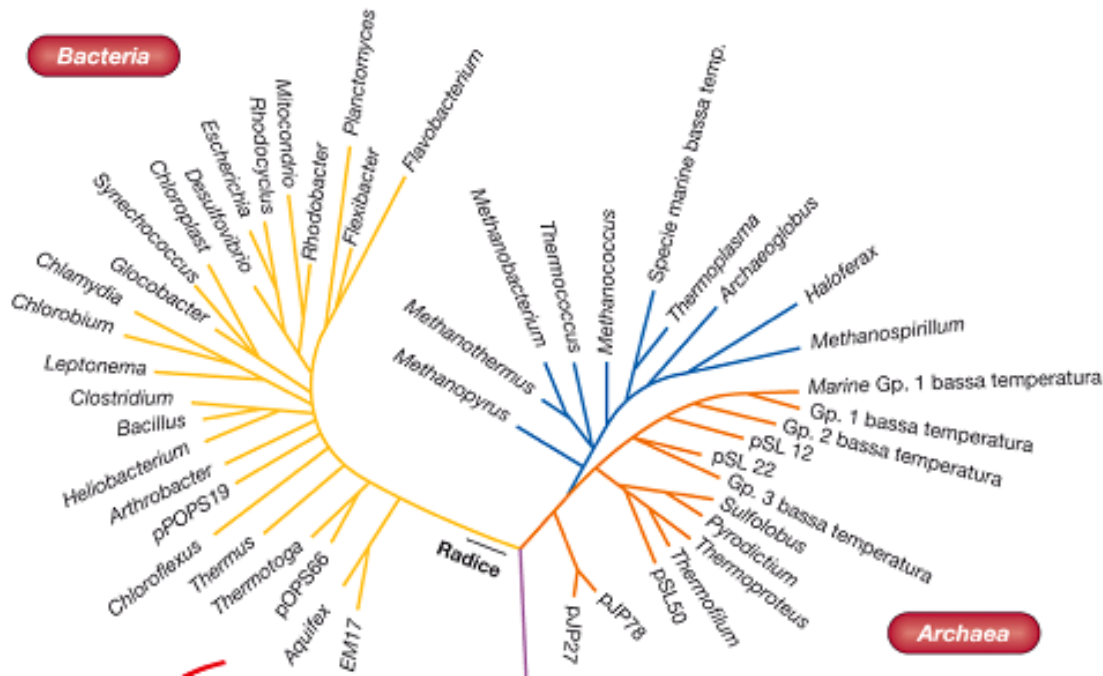


L'albero della vita



Quando l'analisi filogenetica viene effettuata sull'intero albero della vita includendo animali, piante e microrganismi si vede che è basato su procarioti: la grandissima maggioranza della diversità genetica è microbica ed in particolare a carico dei microrganismi procarioti. In tutto l'albero gli esseri viventi **MACROSCOPICI** costituiscono solo una piccola parte e la loro diversità è molto limitata comparata a quella dei microrganismi

Diversità nei batteri



La preponderanza dei batteri non riguarda soltanto l'ampiezza della diversità genetica ma anche il numero di specie

Il numero di specie batteriche ipotizzate dovrebbe essere 10^{12} contro il numero di artropodi p.e. intorno al milione (10^6)

I dati sono dedotti da calcoli basati su campioni ambientali. Fino ad oggi il numero di specie identificate è dell'ordine delle decine di migliaia 10^4 - 10^5

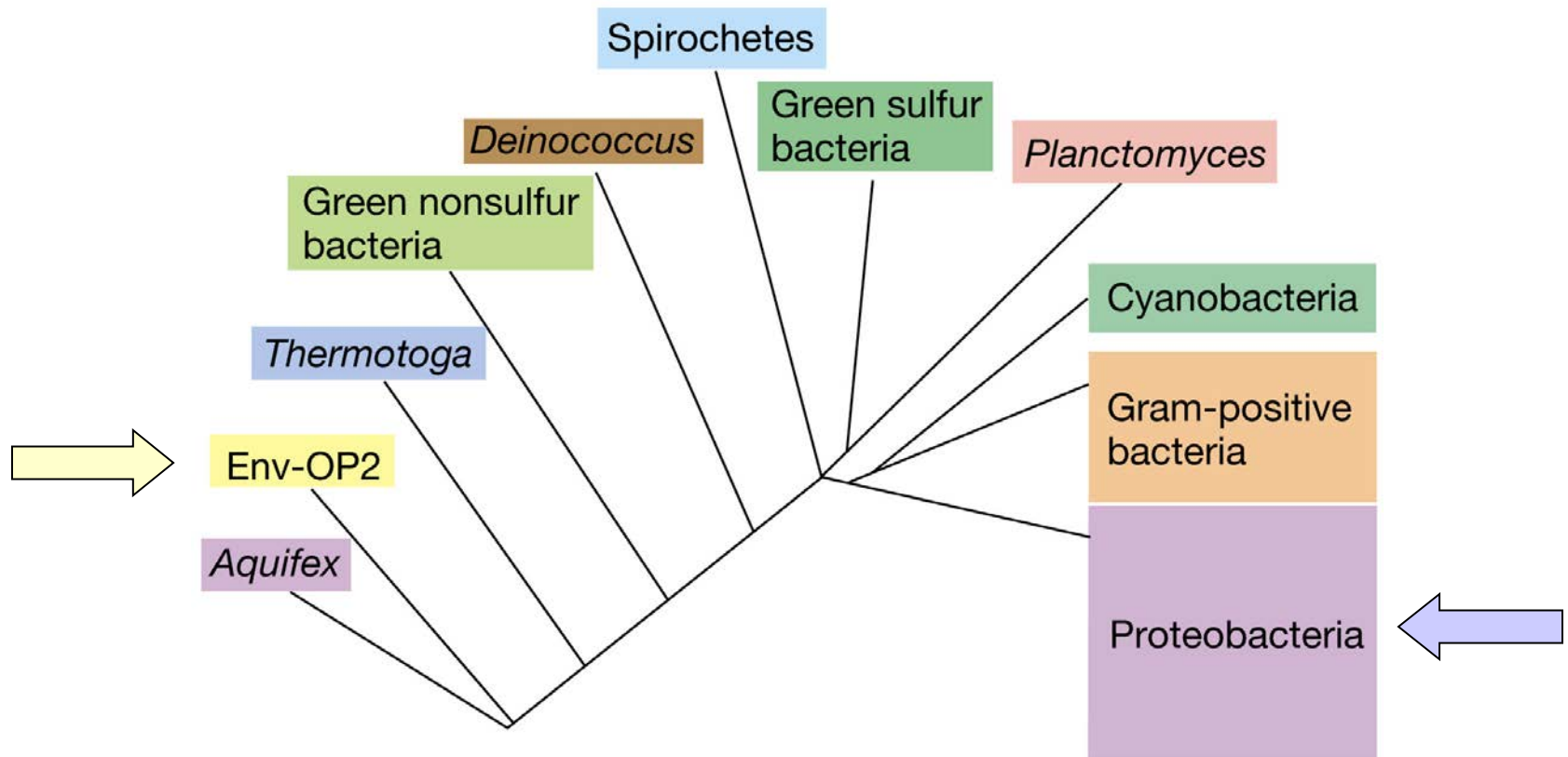
Questa diversità può essere spiegata tenendo conto che i batteri hanno:

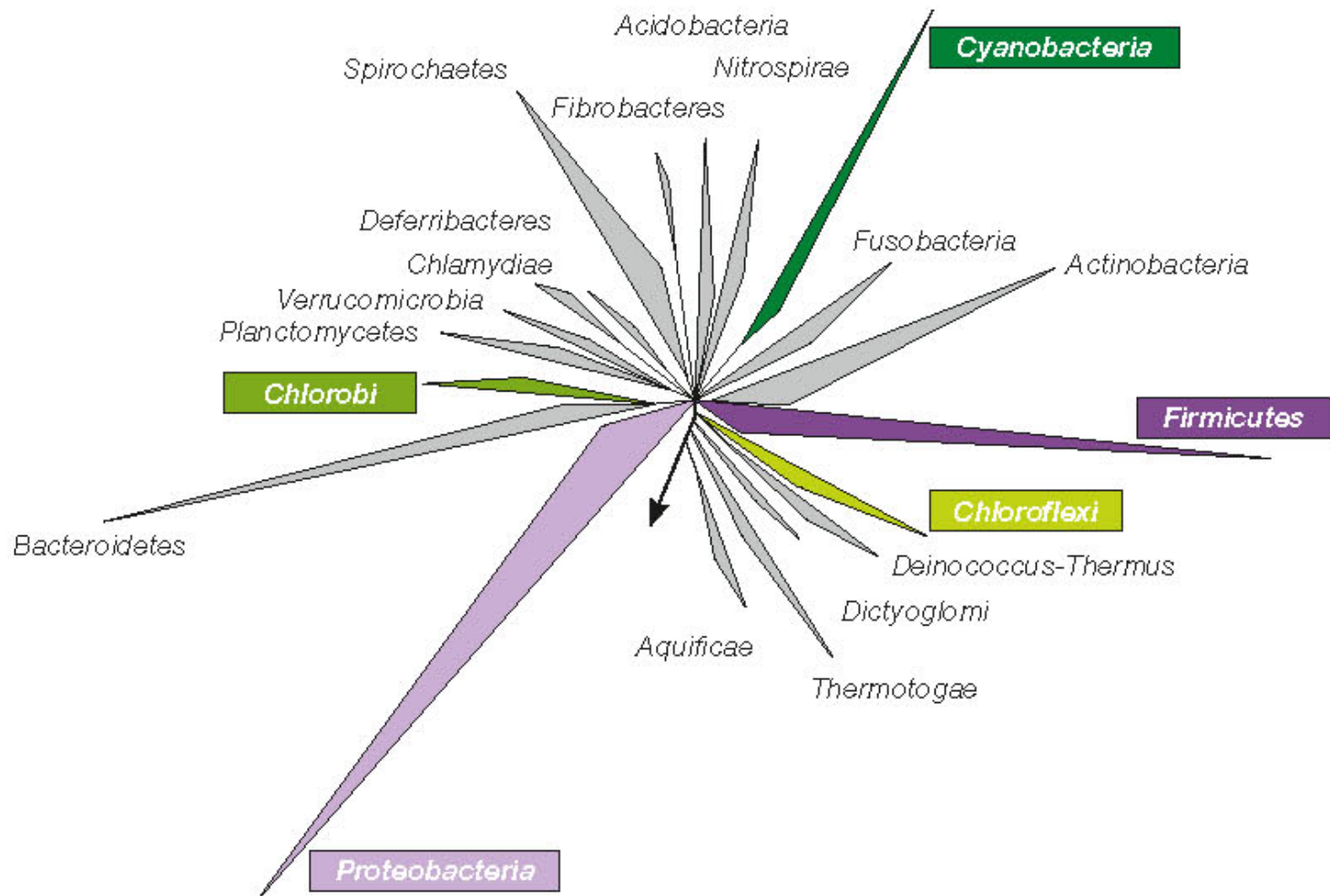
- iniziato ad evolvere 3.5 miliardi di anni fa
- con un tasso di riproduzione estremamente veloce
- Con un tasso di estinzione molto basso.

Albero filogenetico dei Batteri costruito tramite sequenziamento dell'RNA 16 S

Proteobatteri(suddivisi in $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) sono finora il gruppo più rappresentato

Env sono batteri non coltivabili identificati solo per sequenza





Proteobatteri sono il più grande gruppo di Batteri conosciuti

Comprende microrganismo Chemiorganotrofi (come *E.coli*),
organismi Fototrofi e Chemiolitotrofi.

Molti organismi utilizzano l'idrogeno solforato (H_2S) che può
essere immagazzinato all'interno della cellula. Lo zolfo può
essere utilizzato per fornire energia e nei processi di
fissazione azoto.

Pseudomonas degradano composti tossici

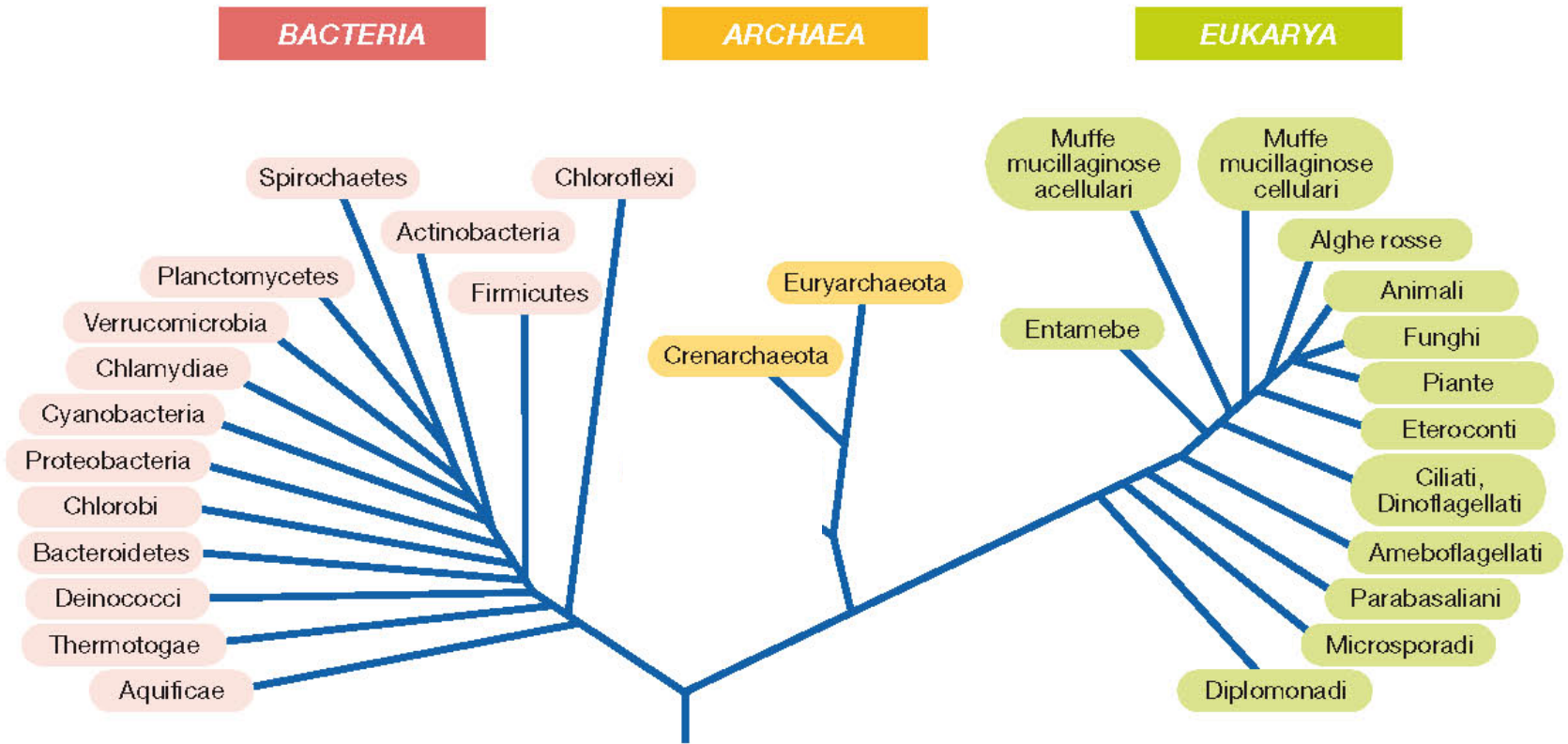
Azobacter batterio fissatore dell'azoto

:

Alcune linee evolutive si diramano molto precocemente nell'albero dei Bacteria. Sebbene questi gruppi siano distinti sono accumulati dalla loro capacità di crescere a temperature molto alte.

Organismi come *Aquifex* e *Thermotoga* crescono nelle sorgenti calde a temperature vicine all'ebollizione di H₂O

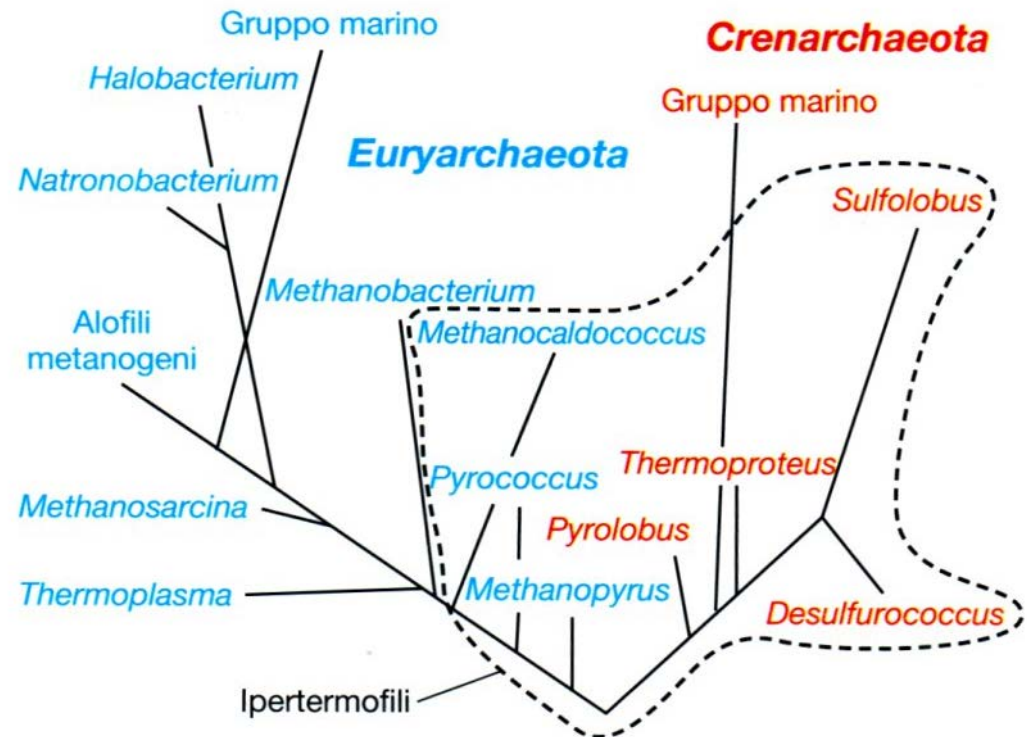
E' interessante notare che gli alberi filogenetici dei Batteri ed Archea sono coerenti :le diramazioni di gruppi ipertermofili (*Aquifex*, *Methanopyrus*, *Pyrolobus*) sono molto vicine alla radice dei rispettivi alberi filogenetici confermando l'ipotesi che sulla Terra fosse presente un ambiente molto caldo



Albero filogenetico degli Archea: 2 Phyla

1. Euryarcheota: contiene 4 gruppi di organismi diversi da un punto di vista funzionale: metanogeni, alofili estremi, termoacidofili e alcuni ipertermofili. I metanogeni sono essenziali per la degradazione anaerobica di materiale organico e gas naturale prodotto sulla Terra deriva dal loro metabolismo

2. Crenarchaeota: molti ipertermofili, prevalentemente anaerobi utilizzano H₂ come fonte energetica. Oltre a questi vi sono batteri marini che vivono in presenza di ossigeno e bassa T.



Gruppo marino sono microrganismi non coltivabili identificati per sequenziamento

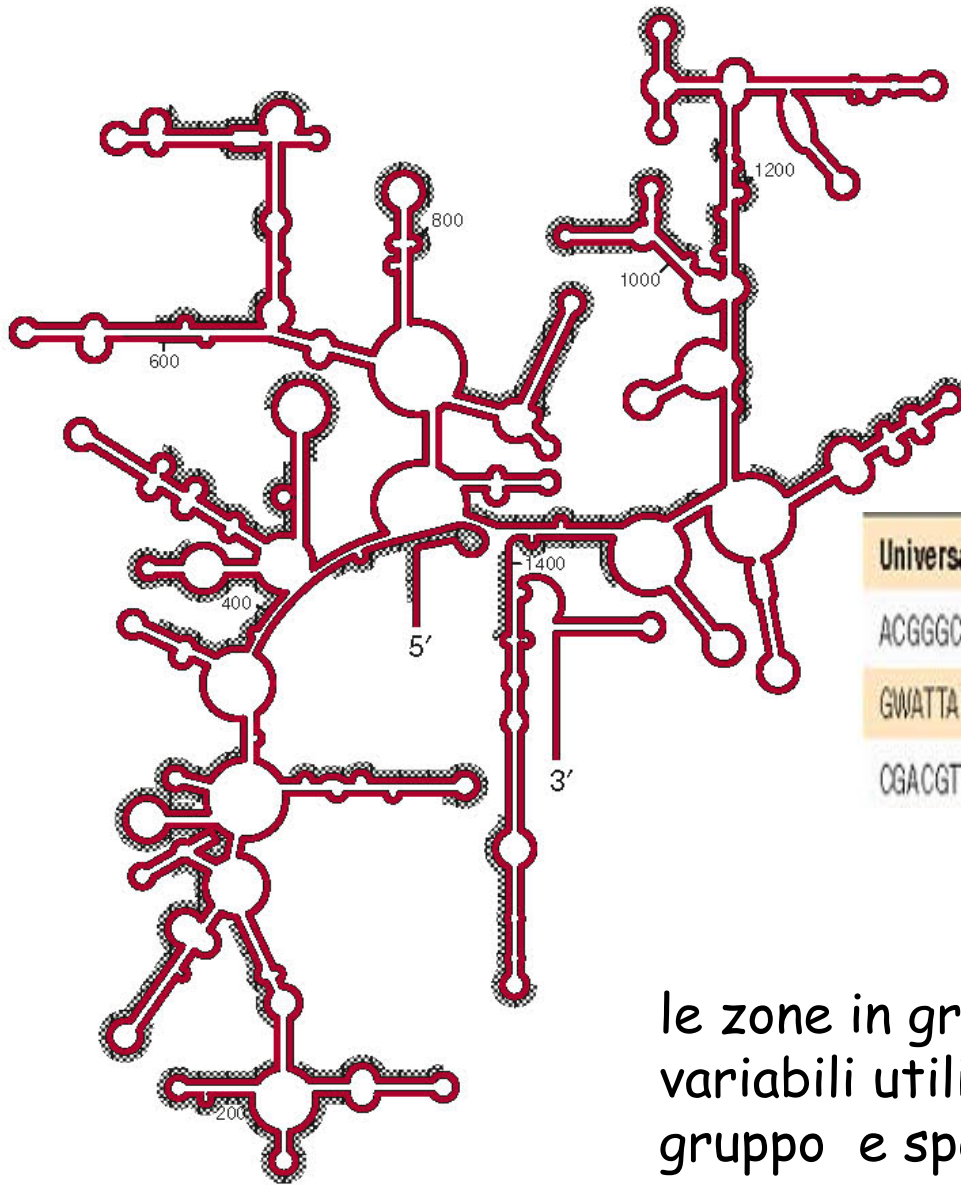
Tabella 2.1 Caratteristiche che differenziano batteri, archei ed eucarioti*.

CARATTERISTICA	BACTERIA	ARCHAEA	EUKARYA
Struttura cellulare procariota	+	+	-
Membrana nucleare	-	-	+
DNA cromosomale circolare	+	+	-
Operoni	+	+	-
RNA polimerasi	1	> 1	3
Mureina nella parete cellulare	+	-	-
Sensibilità ad antibiotici β -lattamici	+	-	-
Lipidi di membrana: legame	Estere	Etere	Estere
Ribosomi	70S	70S	80S
t-RNA di inizio traduzione	fMet	Met	Met
Sensibilità alla tossina difterica	-	+	+
Sensibilità a cloramfenicolo, streptomina, kanamicina	+	-	-
Chemiolitotrofia	+	+	-
con produzione di metano	-	+	-
con ossidazione di ammonio	+	-	-
Respirazione con ossigeno	+	+	+
Respirazione con altri accettori di elettroni	+	+	-
Fissazione di azoto elementare	+	+	-
Fotosintesi senza produzione di O_2	+	+	-
Fotosintesi con produzione di O_2	+	-	+
Crescita a $T > 80\text{ }^\circ\text{C}$	+	+	-
Crescita a $T > 100\text{ }^\circ\text{C}$	-	+	-

a) + indica presenza della caratteristica in una parte o nella totalità dei componenti del raggruppamento; - indica che di norma la caratteristica è assente.

Struttura dell'RNA 16S .

Alcune sequenze del DNA x RNA 16S sono così conservate che sono state utilizzate per designare primer universali



Universale

ACGGGCGGTGTGTRC

16S, 1392-1406

GWATTACCGCGGCKGCTG

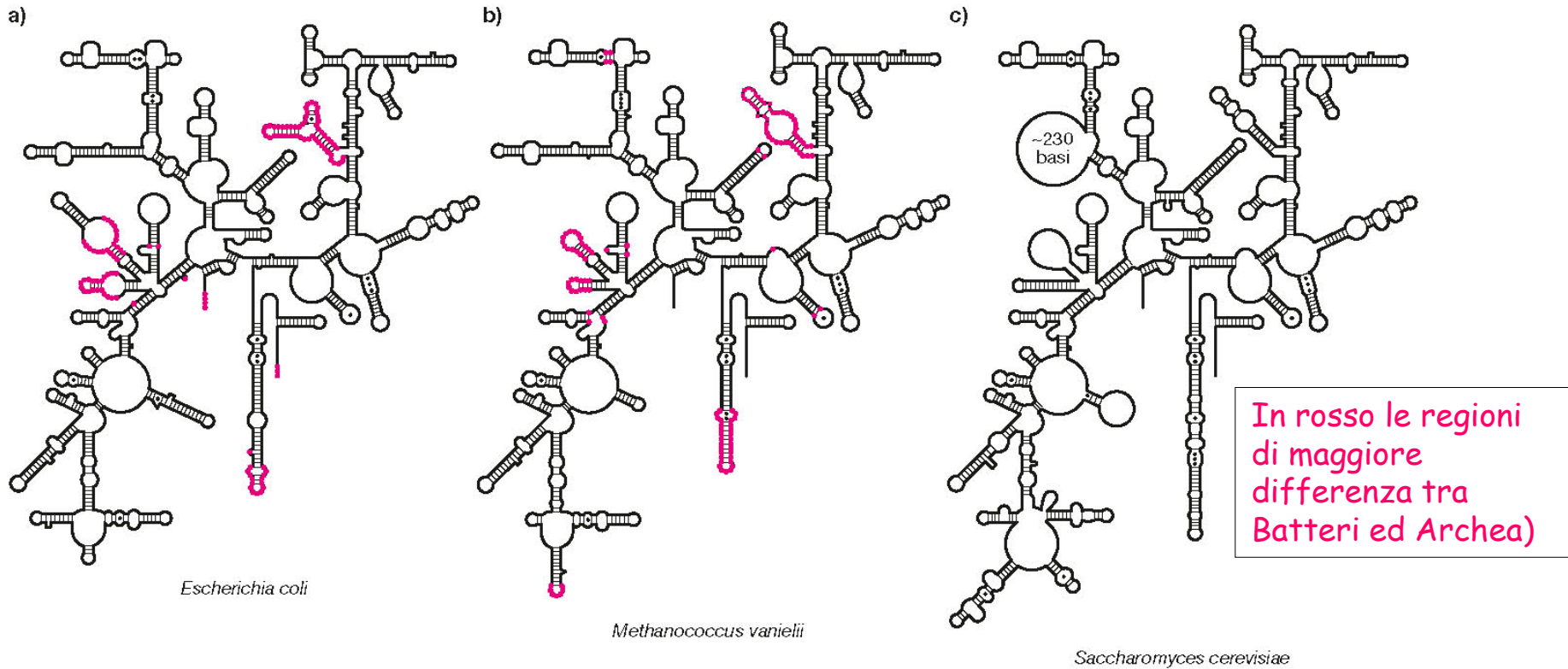
16S, 522-536

CGACGTTYTAAACCCAGTC

23S, 2576-2596

le zone in grigio indicano le sequenze variabili utilizzate per disegnare sonde gruppo e specie specifiche.

Confronto tra RNA 16S di Batteri, Archea ed Eucarioti



Sequenze signatures utilizzate per distinguere microrganismi dei 3 Domini.

Dominio	Sequenza	Posizione	Gruppo
	GTGCTCCCCGCCAATTCT	16S, 915-934	Archaea
	TCCGGCRGGATCAACGGAA	16S, 2-21	Archaea
	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Bacteria
	ACCGCTTGTGCGGGCCC	16S, 927-942	Bacteria
	ACCAGACTGCCCTCC	16S, 502-516	Eukarya
	GGGCATCACAGACCTG	16S, 1195-1209	Eukarya

SEQUENZE TIPIZZANTI

L'analisi in silico ha rivelato la presenza di SIGNATURE SEQUENCES brevi oligonucleotidi caratteristici di un determinato gruppo di organismi

Alcune signature sequences possono definire uno specifico gruppo all'interno di un Dominio, o un particolare genere o una specie

Sequenze tipizzanti negli rRNA 16S (o 18S) nei tre Domini

Oligonucleotide tipizzante ^a	Posizione approssimativa ^b	Frequenza di comparsa ^c		
		Archea	Batteri	Eucarioti
CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAA	910	3	100	0
AAACUAAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

^a Y, qualsiasi pirimidina; R, qualsiasi purina.

^b Fare riferimento alla figura 11.11c per lo schema di numerazione dell'rRNA 16S.

^c La comparsa si riferisce alla percentuale di organismi esaminati in ciascun dominio contenente la sequenza.