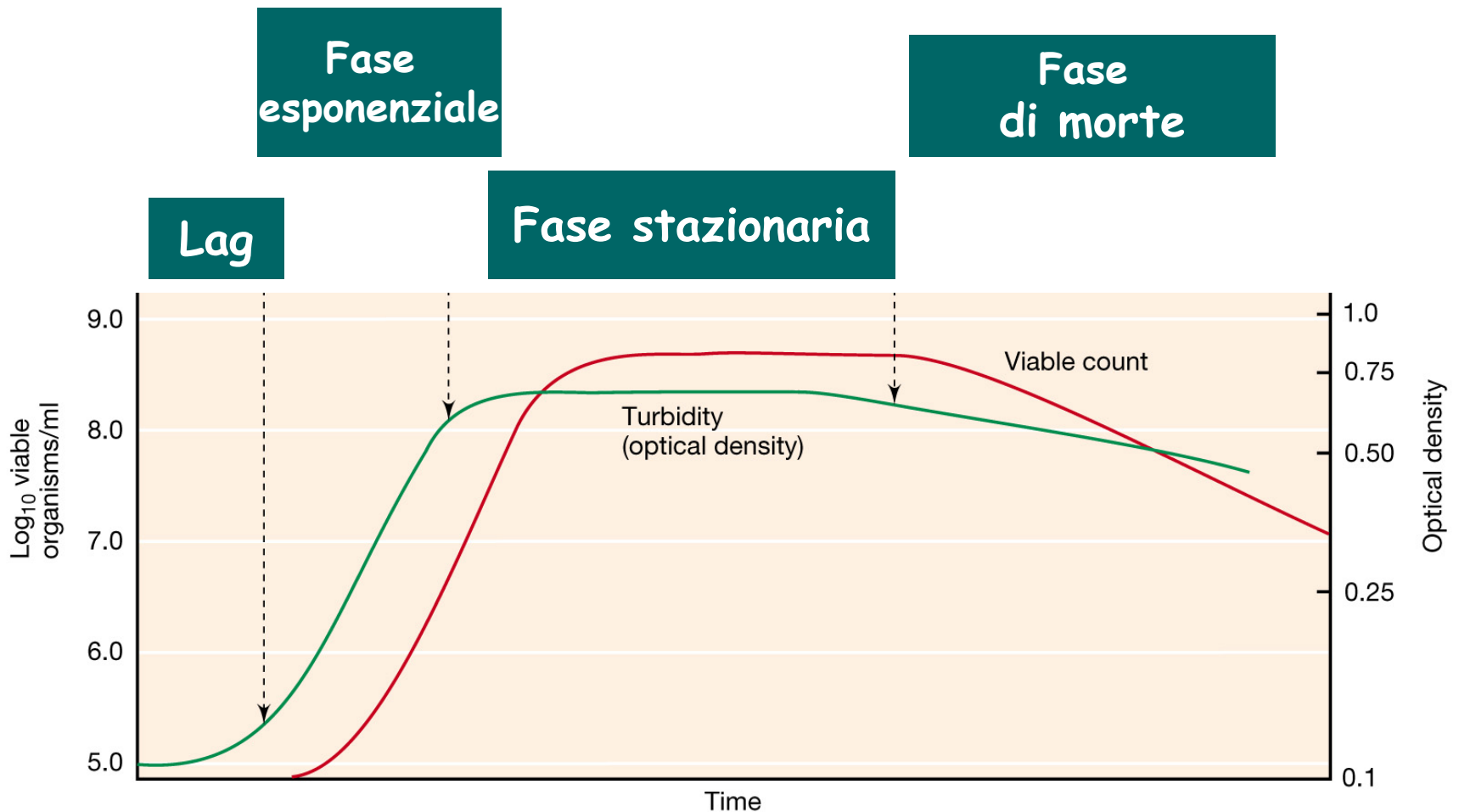


# Fasi della crescita batterica: ma come si contano i batteri??



# 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.

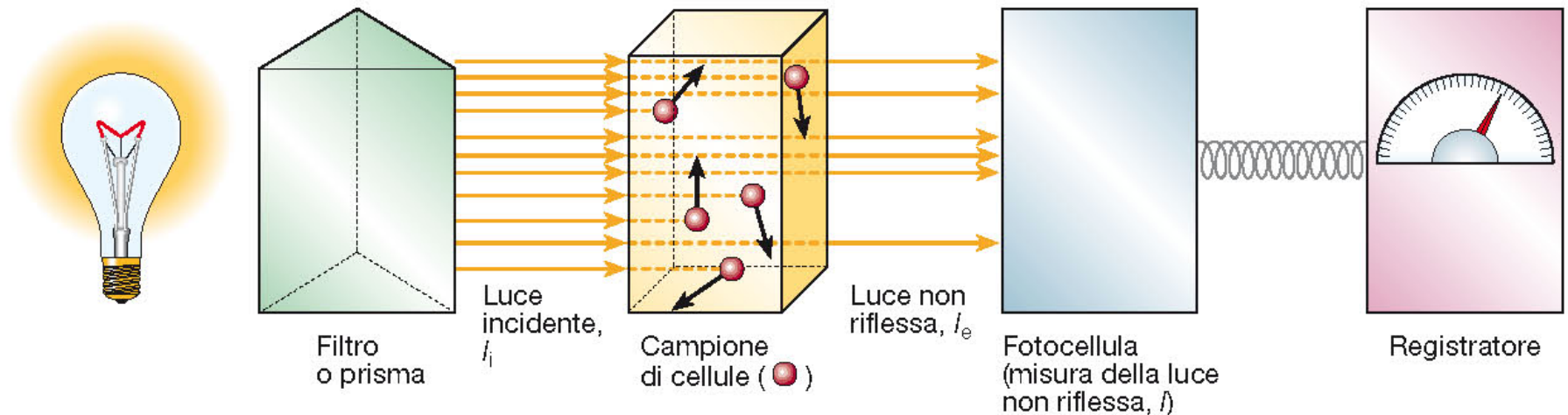
Per misurare la torbità di una coltura si usa una lunghezza d'onda nel campo visibile dello spettro 440 e 660 nm

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

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

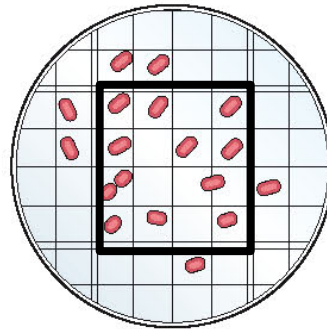
OD è in genere direttamente proporzionale al numero di cellule presenti, ovvero aumenta con l'aumentare del numero di batteri presenti nella coltura.

$I_i$  = intensità raggio incidente  
 $I_e$  = intensità raggio emittente

# Conta totale al microscopio



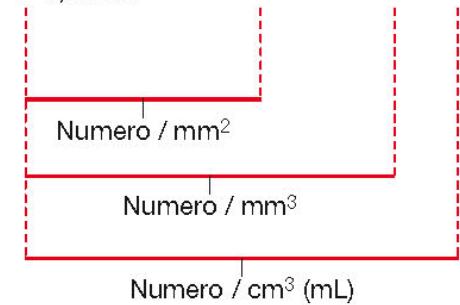
Il campione è depositato sul vetrino, facendo attenzione a non superare la capacità della camera; lo spazio tra il reticolo e il vetrino coprioggetto è di 0,2 mm ( $\frac{1}{50}$  mm). Il reticolo è formato da 25 quadrati grandi con un'area totale di 1 mm<sup>2</sup> e un volume totale di 0,02 mm<sup>3</sup>.



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.

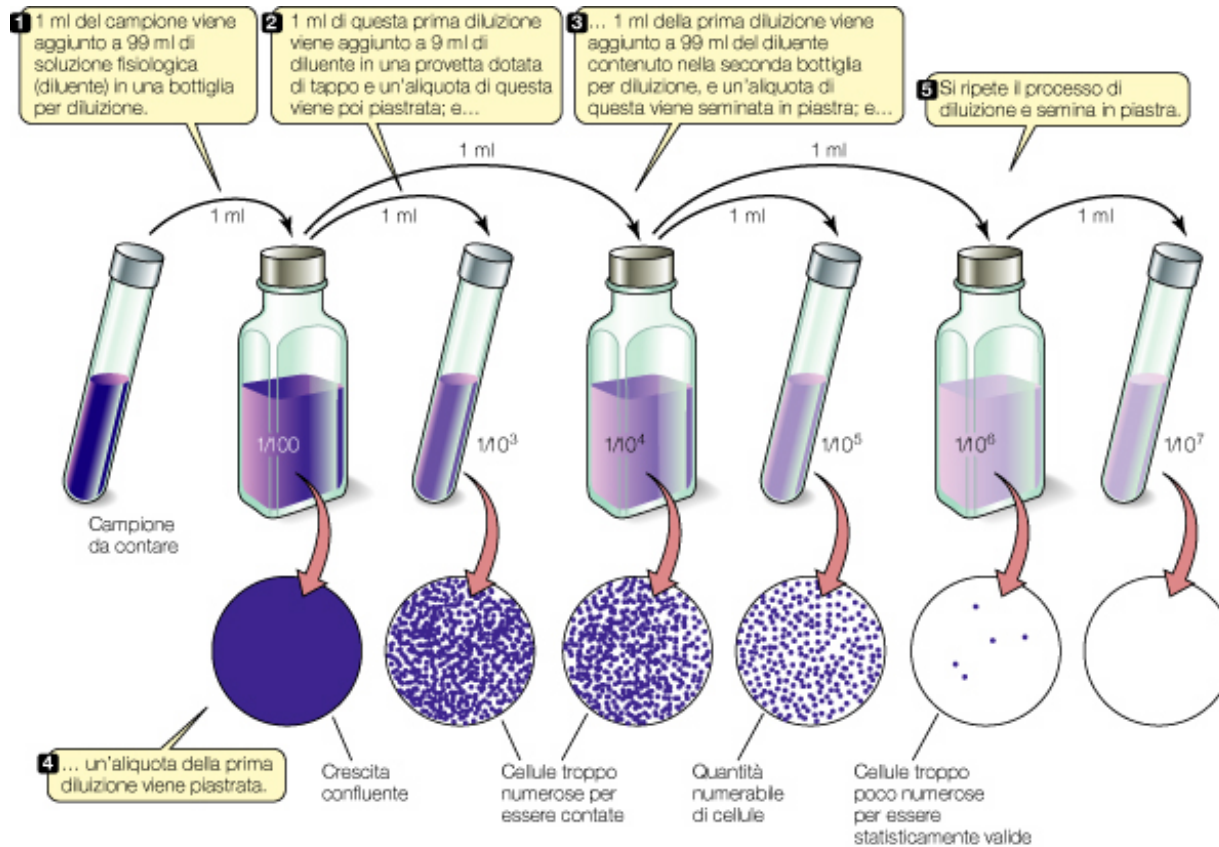


Calcolo del numero di cellule per millilitro di campione;  
12 cellule  $\times$  25 quadrati grandi  $\times$  50  $\times$  10<sup>3</sup>  
= 1,5  $\times$  10<sup>7</sup>

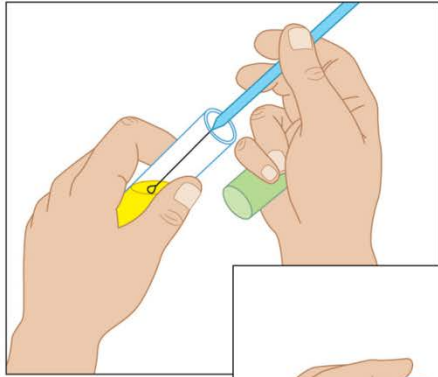


La camera di conta più comune è quella di Petroff Hausser costituita da un vetrino speciale suddiviso in tanti quadrati di area definita

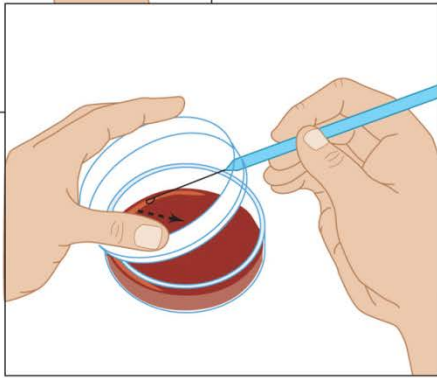
# La conta vitale per piastramento



La diluizione di fattore 10 in 10



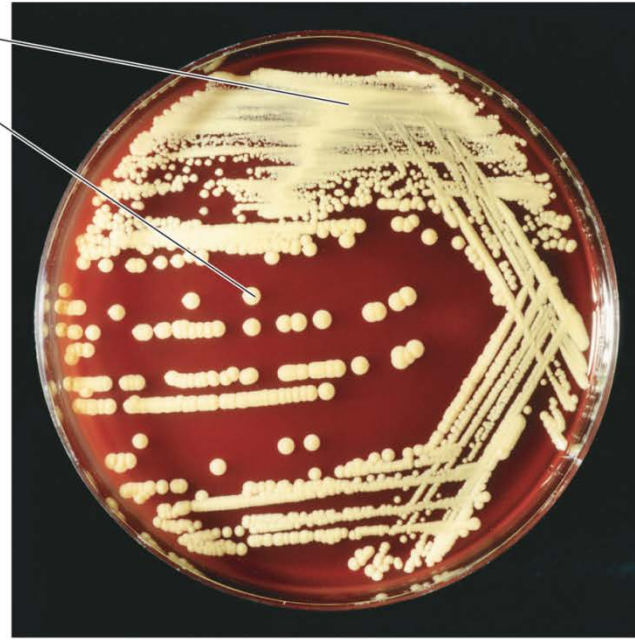
(a)



(b)

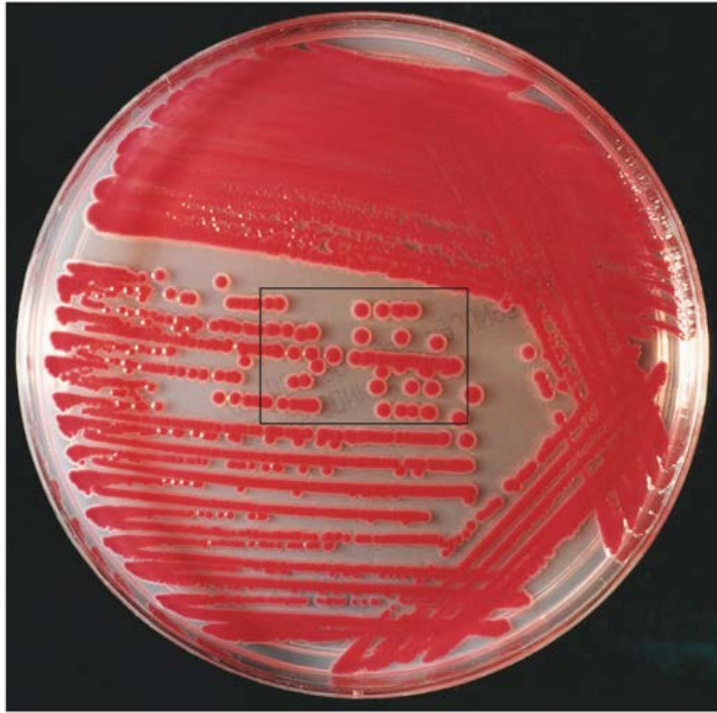
Crescita confluenta  
all'inizio dello striscio

Colonie isolate alla  
fine dello striscio



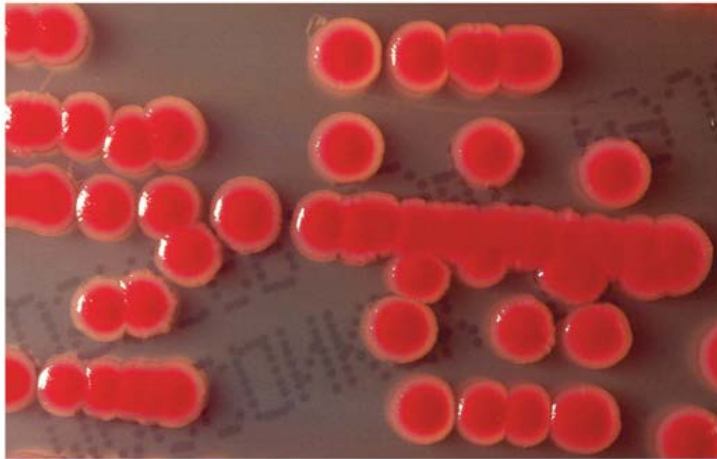
(c)





James A. Shapiro, University of Chicago

(a)



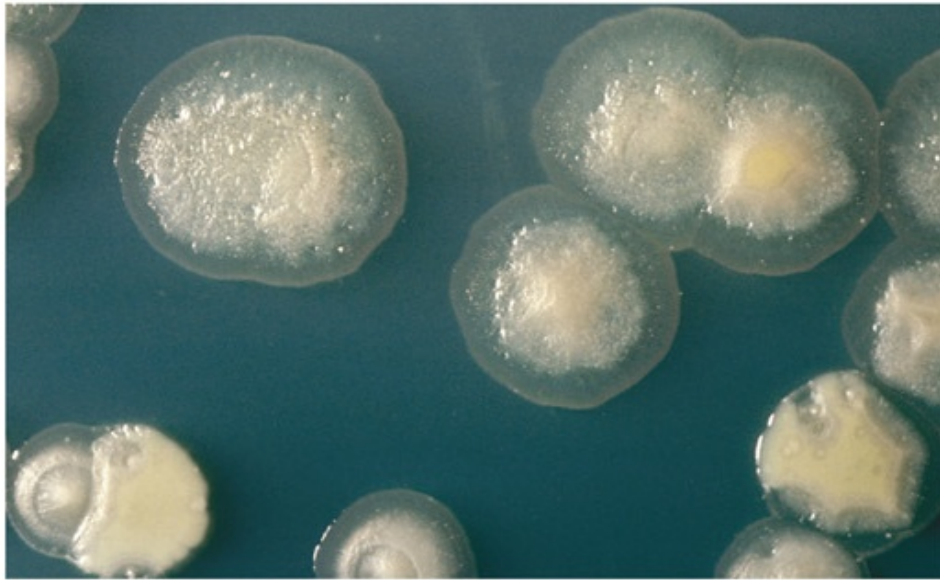
James A. Shapiro, University of Chicago

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

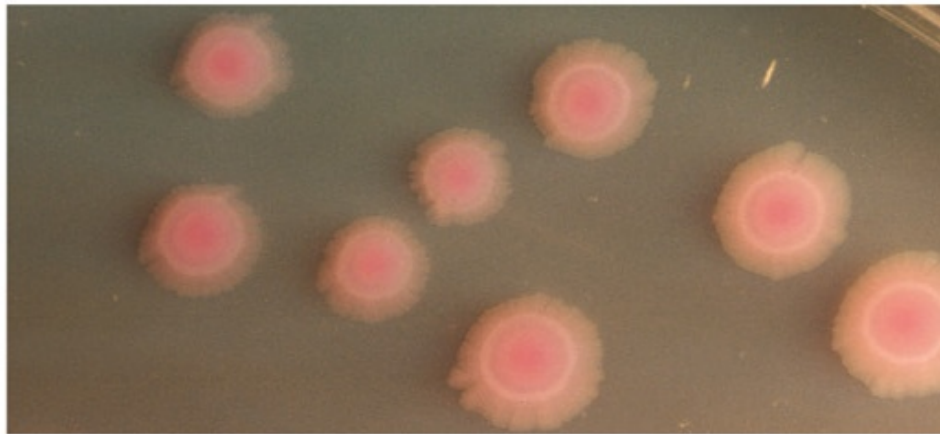
Lac<sup>+</sup> rossi Lac<sup>-</sup> bianchi



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

## 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

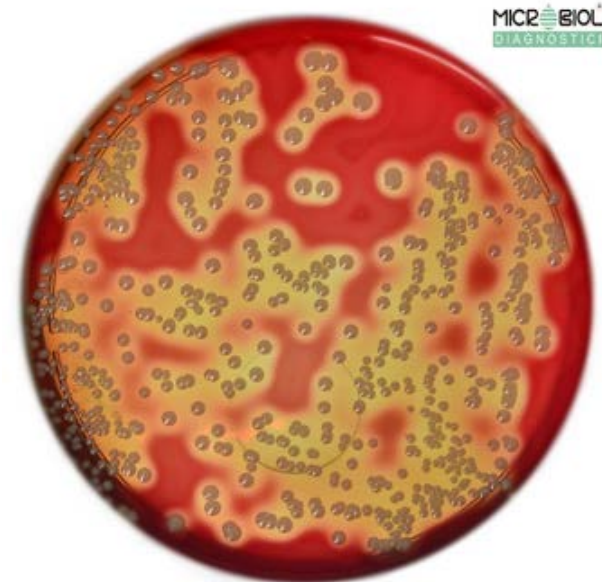
# Terreno Mac Conkey: selettivo e differenziale

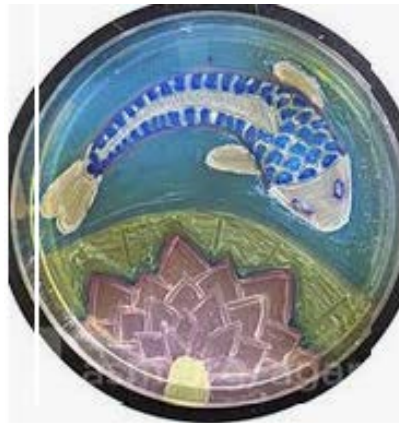
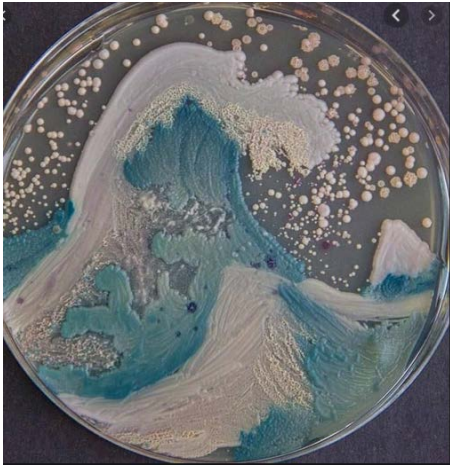
**Selettivo** perché contenente i Sali biliari inibisce la crescita dei Gram+

**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](http://schaechter.asmblog.org)



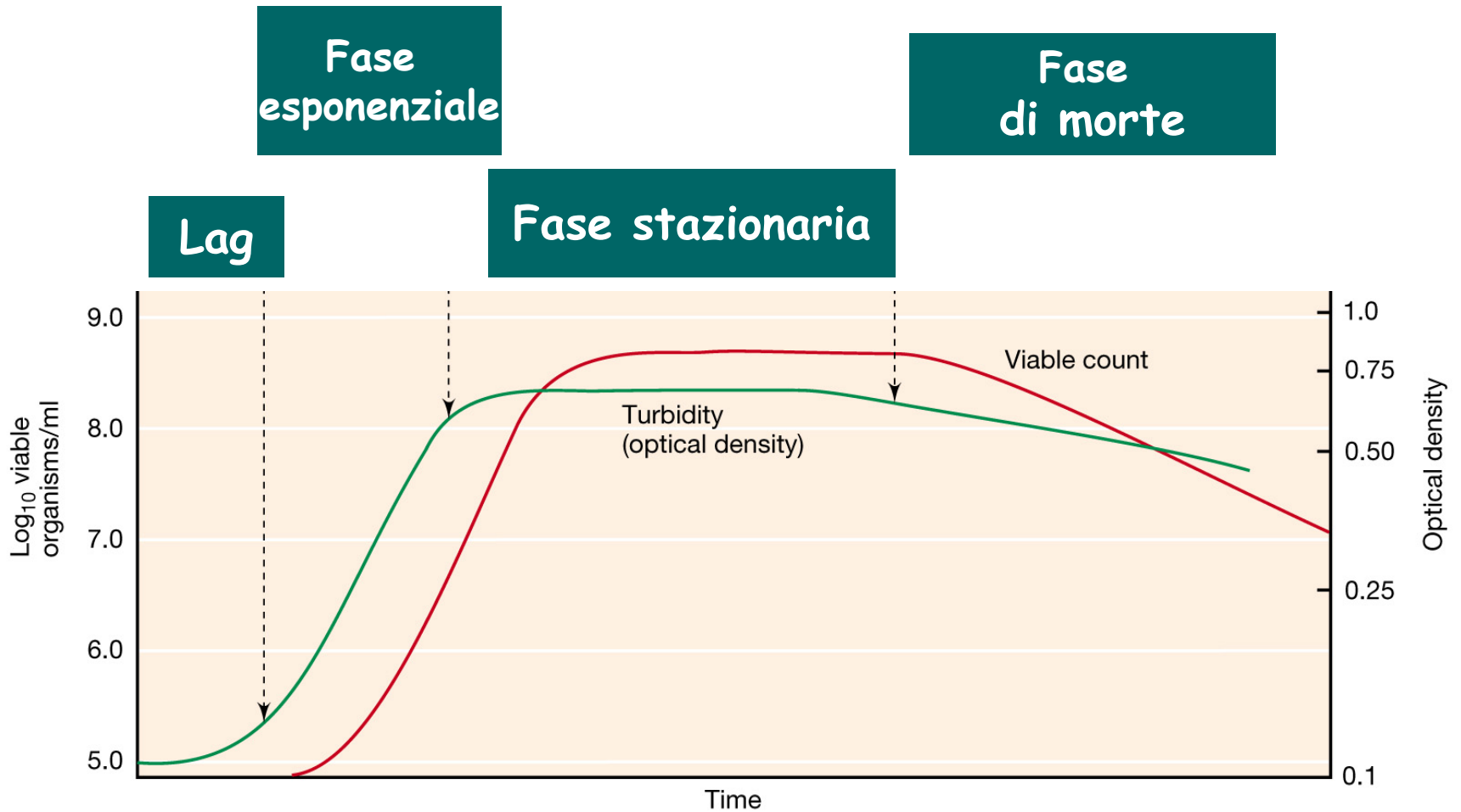
Agar Art Is Magnificent  
[eludofeed.com](http://eludofeed.com)



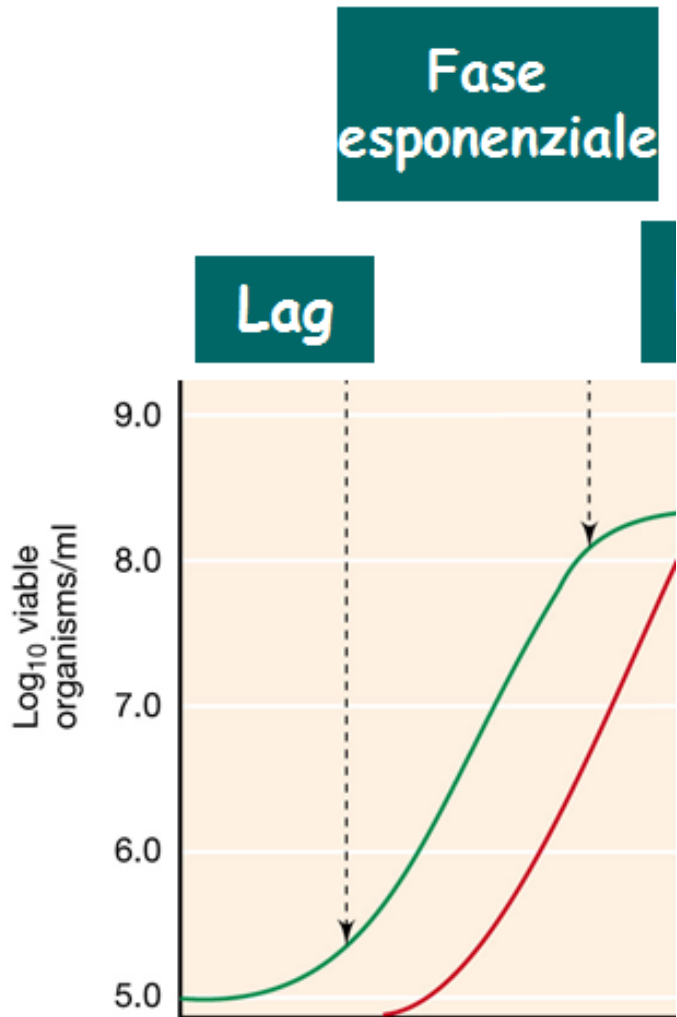
## Alcune definizioni essenziali :

- **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**

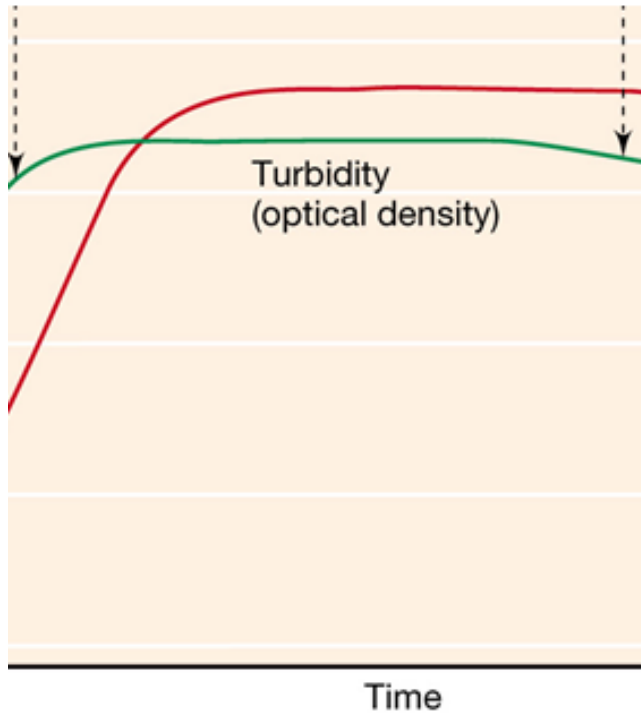


Fase esponenziale: le cellule aumentano alla massima velocità considerando parametri importanti quali terreno, temperatura, nutrienti. Si dice che è una fase di crescita bilanciata in quanto le proporzioni tra tutti i componenti macromolecolari sono invariate.

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

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

Può variare :

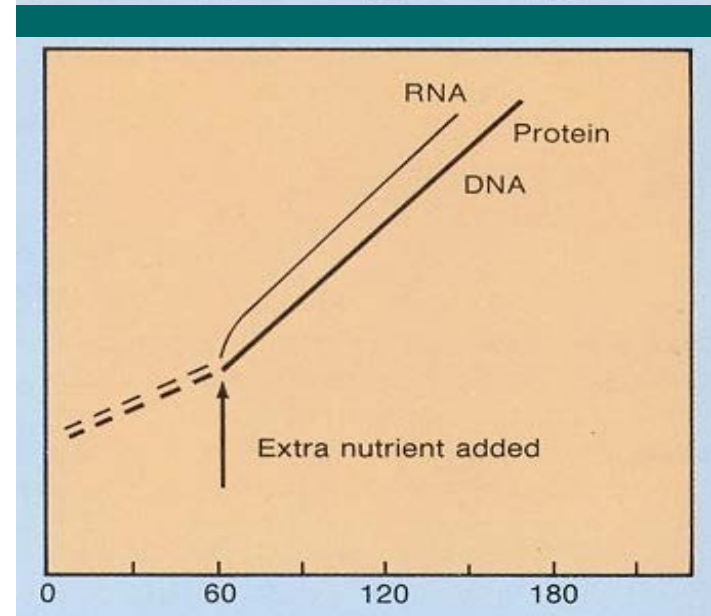
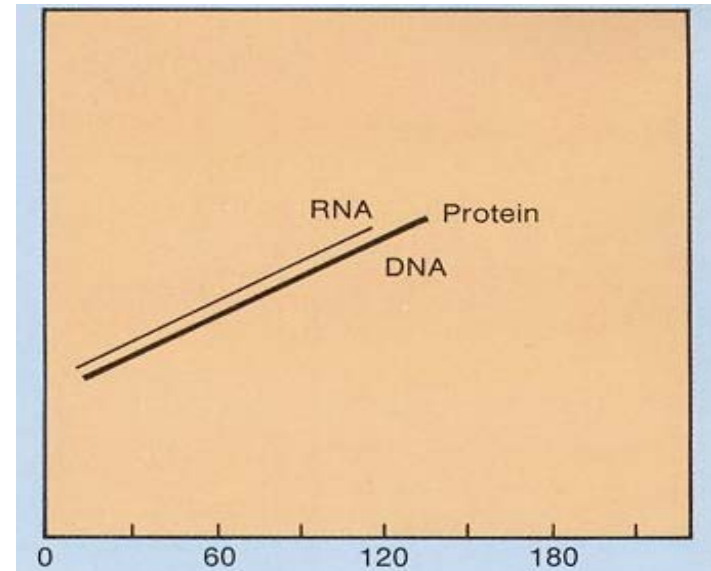
- in funzione delle condizioni di incubazione,
- del terreno di crescita,
- di fattori ambientali

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

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

**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 :**

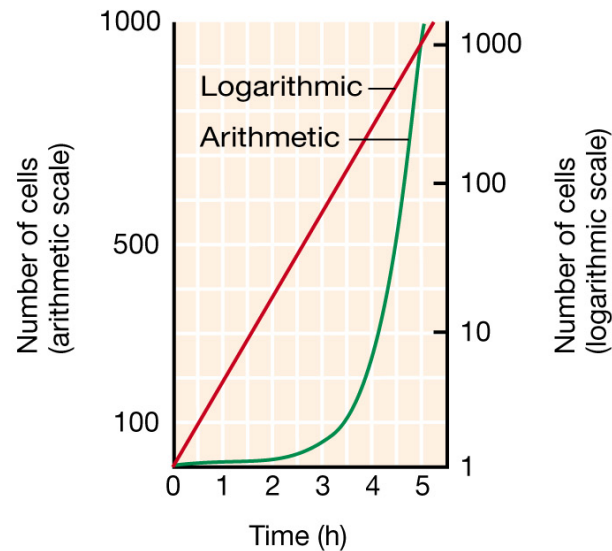
**Misura della torbidità tramite colorimetro o uno spettrofotometro**



# 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)

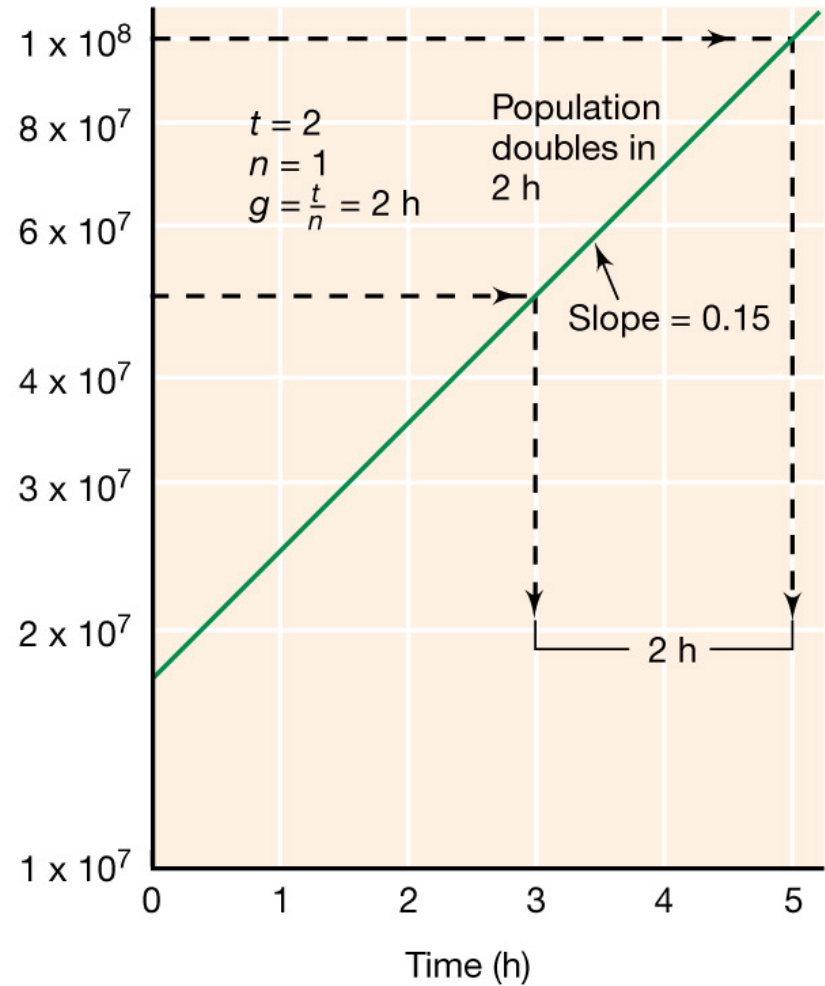
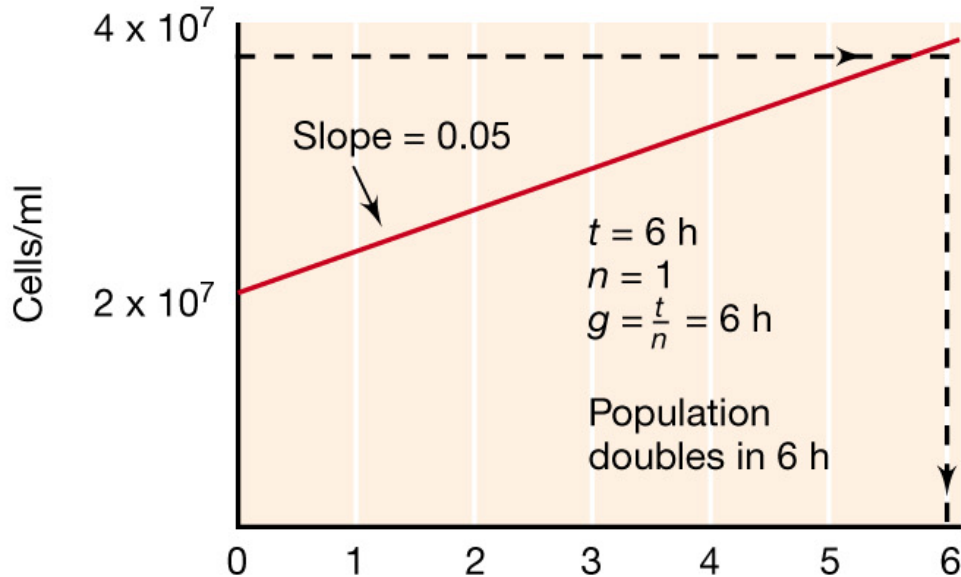
# Metodo grafico per valutare il tempo di generazione di due colture

$$N = N_0 2^n$$

$N$  = 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  $n$

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log (N_0 2^n)$$

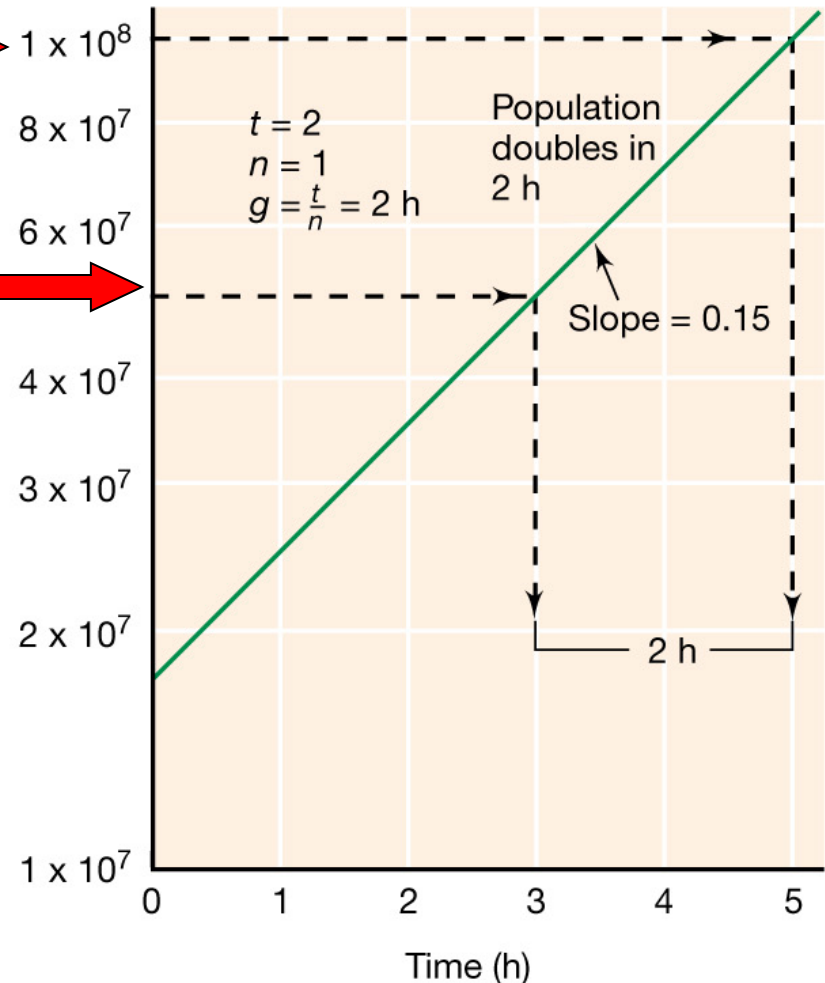
$$\log N = \log N_0 + \log 2^n$$

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

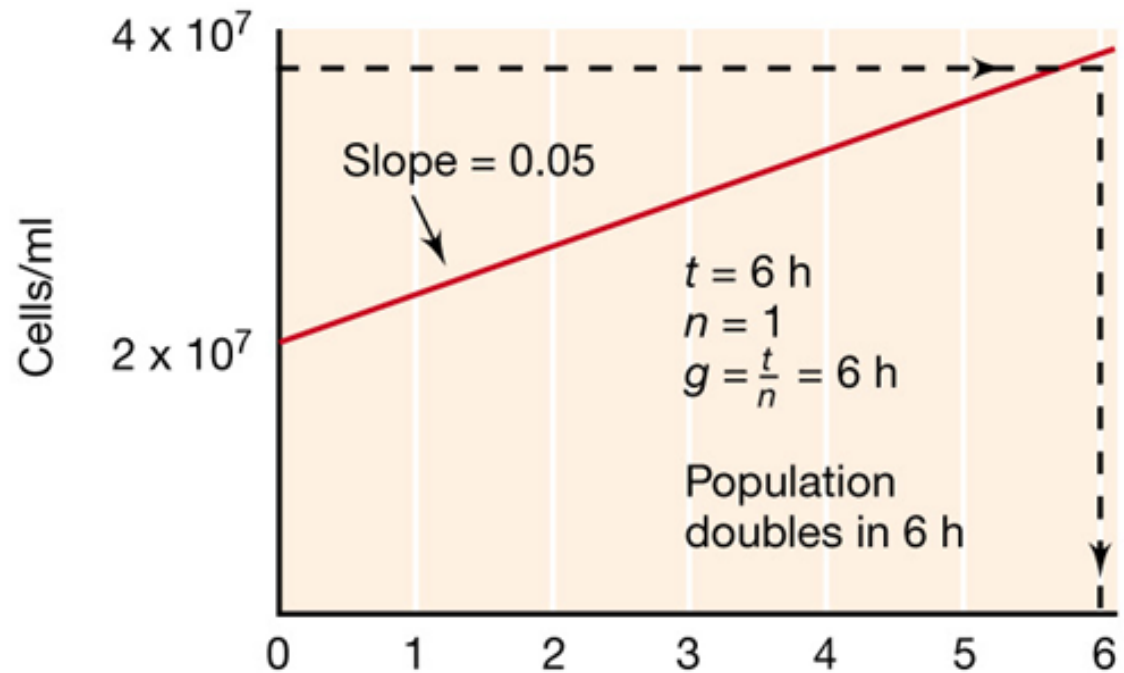
$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0.3} = 3.3(\log N - \log N_0)$$

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

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



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



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

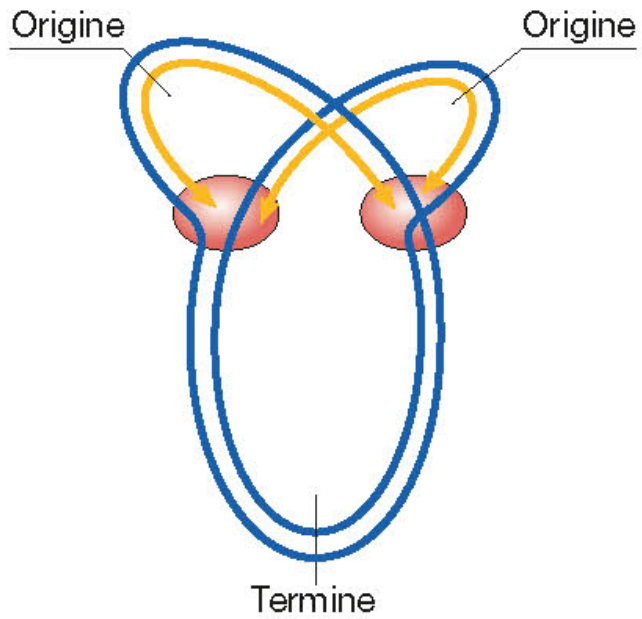
**C** che è il tempo fisso di 40 minuti richiesto per replicare l'intero cromosoma batterico. La sua durata corrisponde al movimento di ogni singola forca di replicazione 50.000 basi /minuto (Cromosoma *E.coli* 4.600.000 basi = 46 min.)

**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.

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

$$I \geq C + D$$

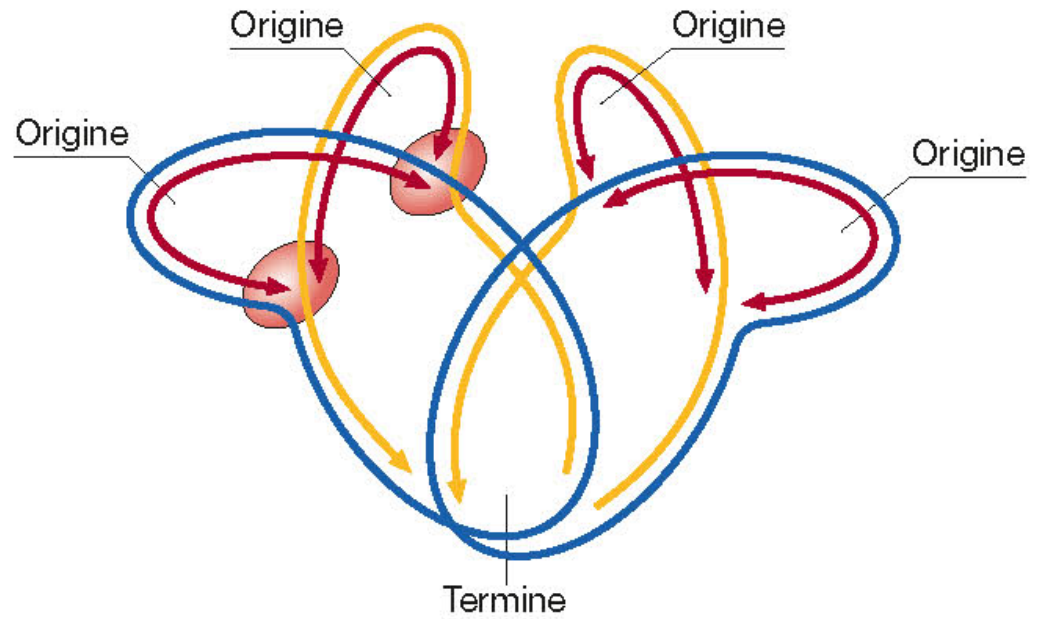
*Tempo di generazione*  
 $\geq$  di 60 min



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 ( $5 \times 10^9$  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**

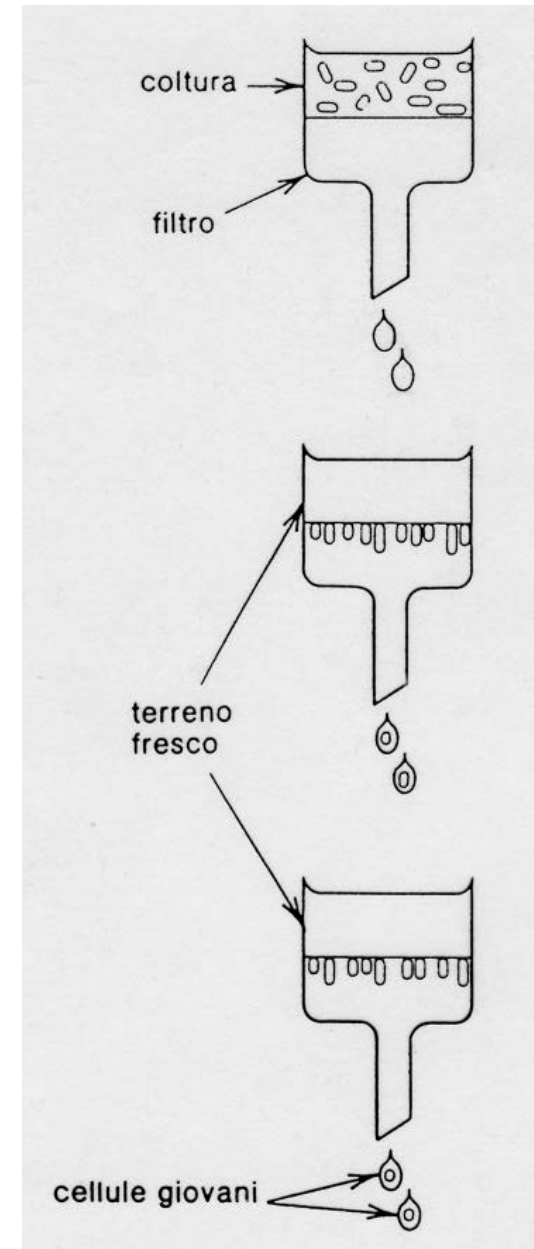
le cellule vengono filtrate attraverso filtri sovrapposti in grado di trattenere cellule di diverse dimensioni

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.

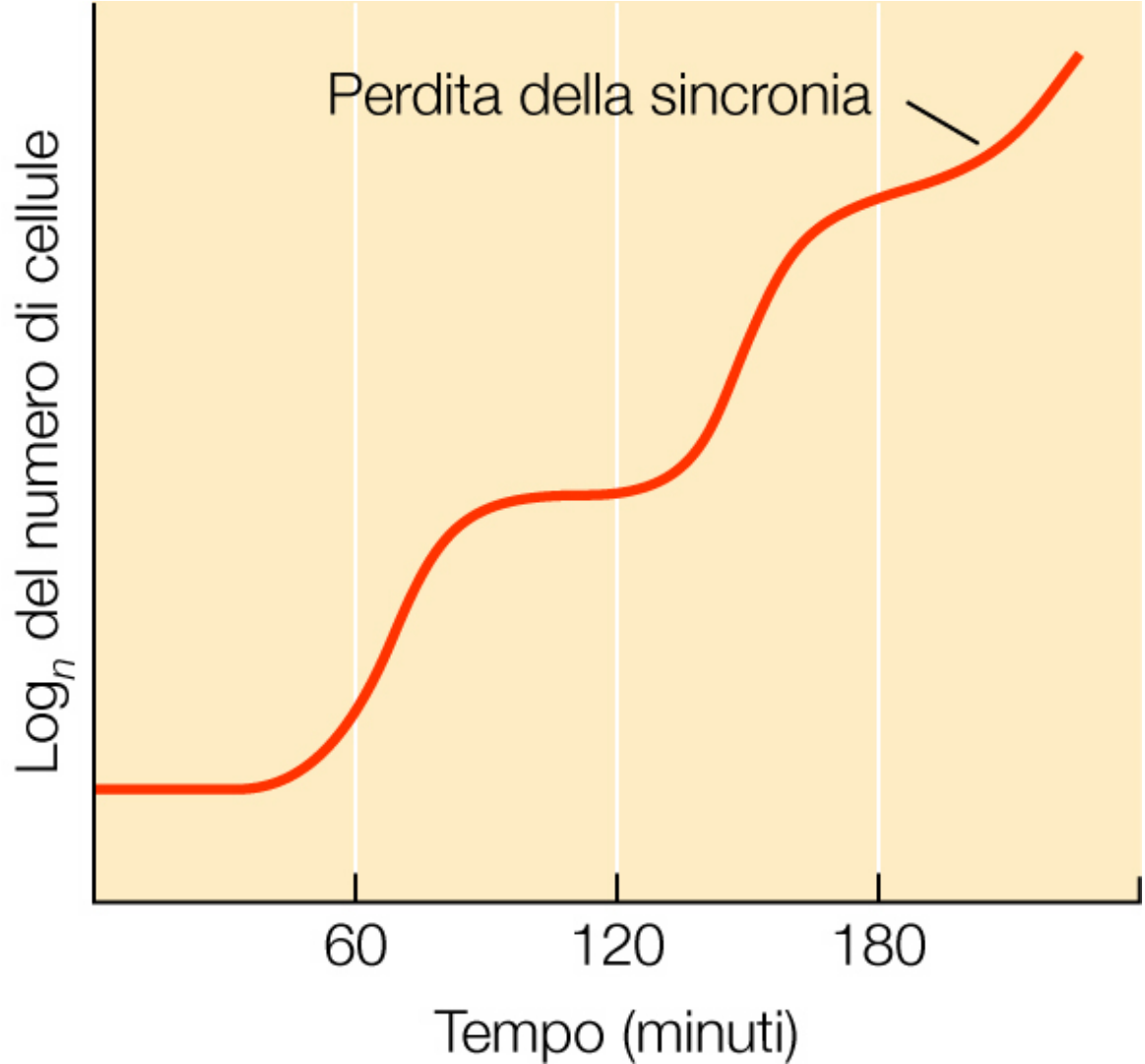
# Sincronizzare le colture di cellule batteriche :

Baby machine

(ideata da Helmstetter-Cummings)

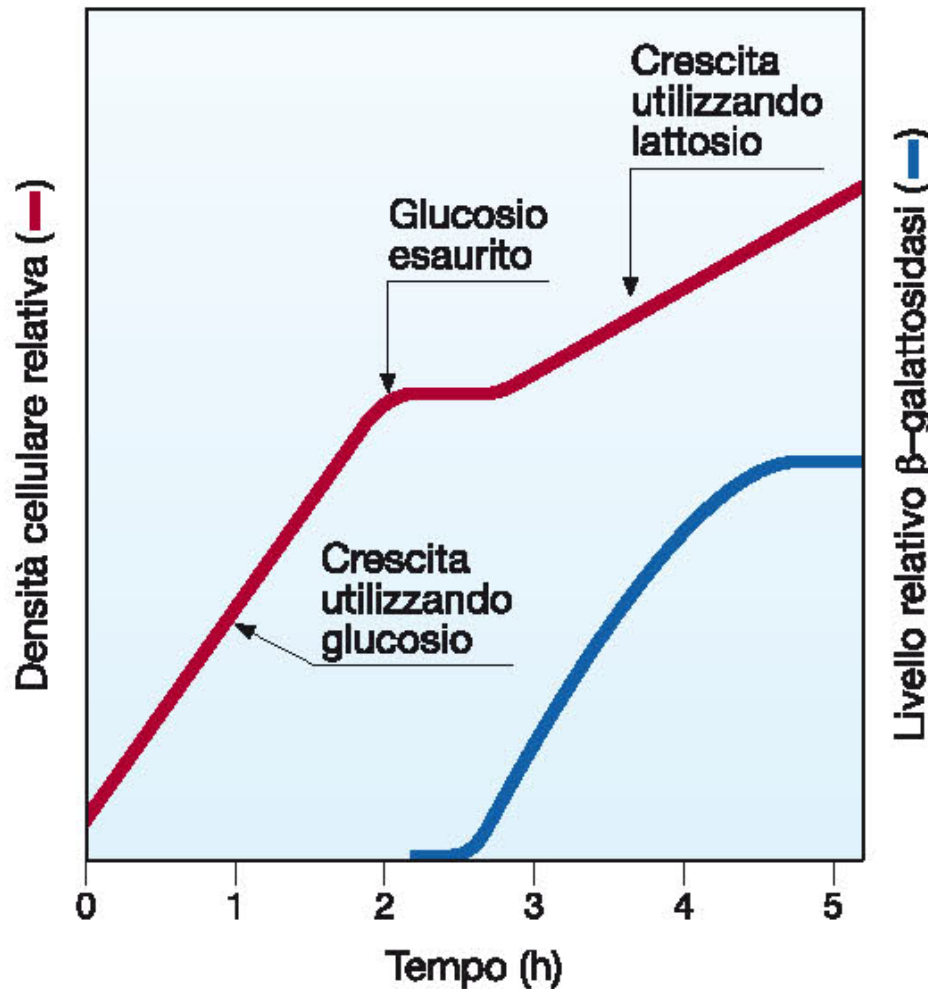


Tipica curva di crescita di un microrganismo in una coltura sincrona.  
Le colture tendono a perdere la sincronia dopo alcune generazioni



# La crescita diauxia

Si distinguono due distinte fasi di crescita esponenziale



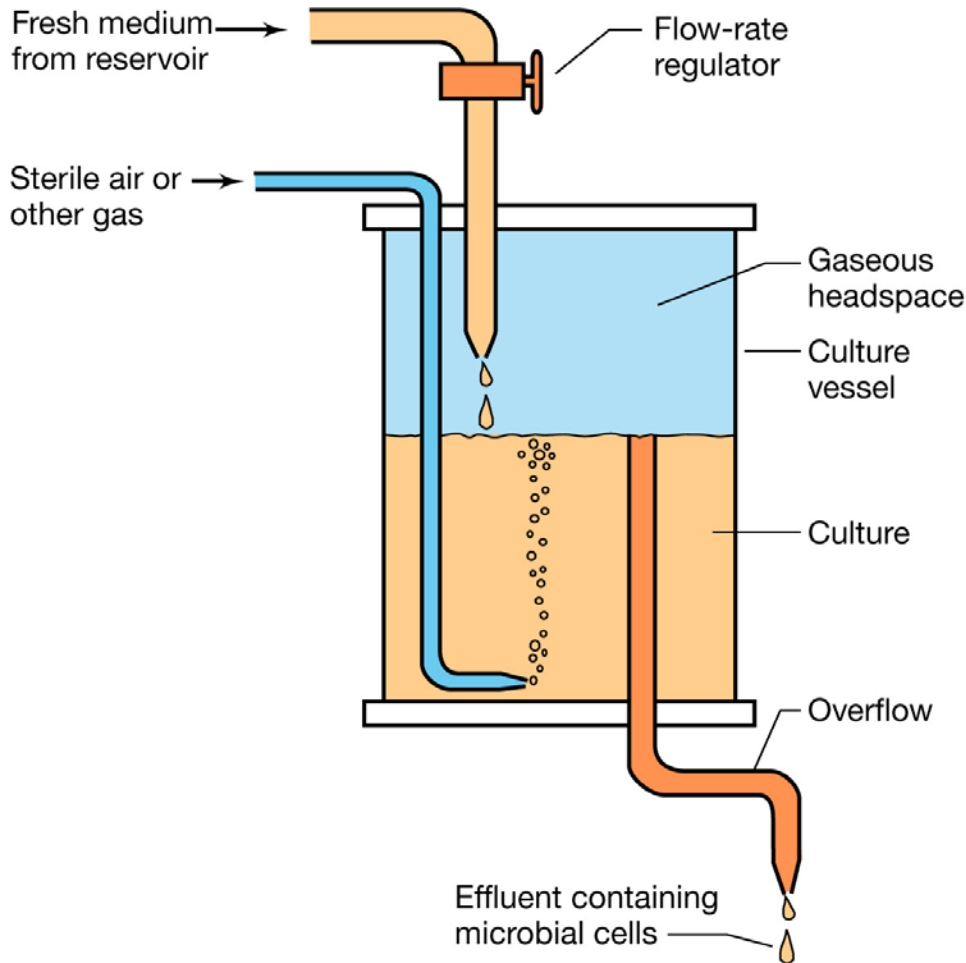
Ruolo del trasporto del glucosio tramite traslocazione di gruppo nel modulare i livelli di AMPc necessario per l'utilizzazione del lattosio

# Fattori che svolgono un ruolo chiave nel controllo della crescita microbica

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



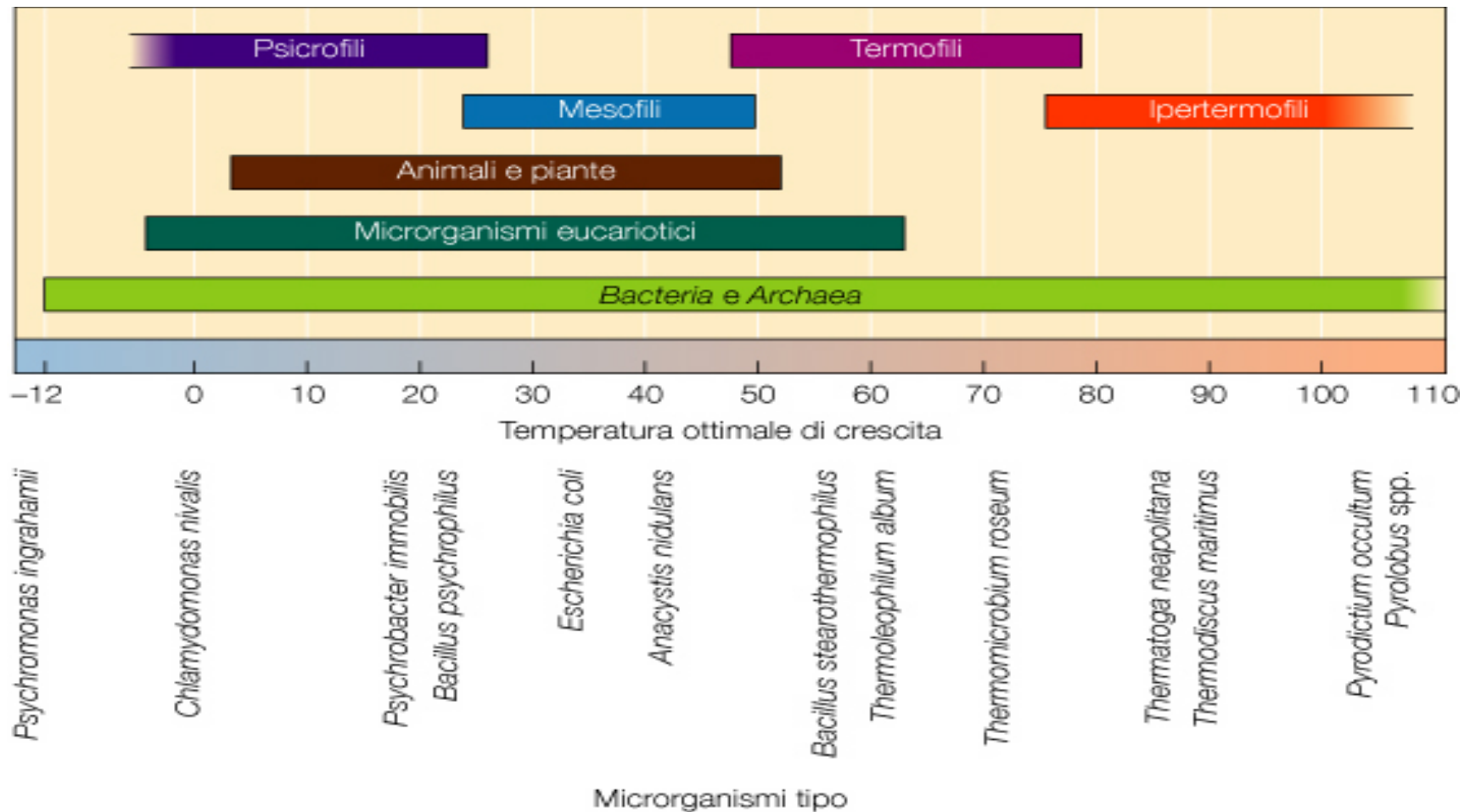
Fermentatori per le crescite industriali: viene immesso nuovo terreno, ossigeno e viene monitorato il pH



# Intervalli di temperatura di crescita di alcune forme di vita.

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

I soli microrganismi che possono crescere sopra  $92^{\circ}\text{C}$  sono gli Archea

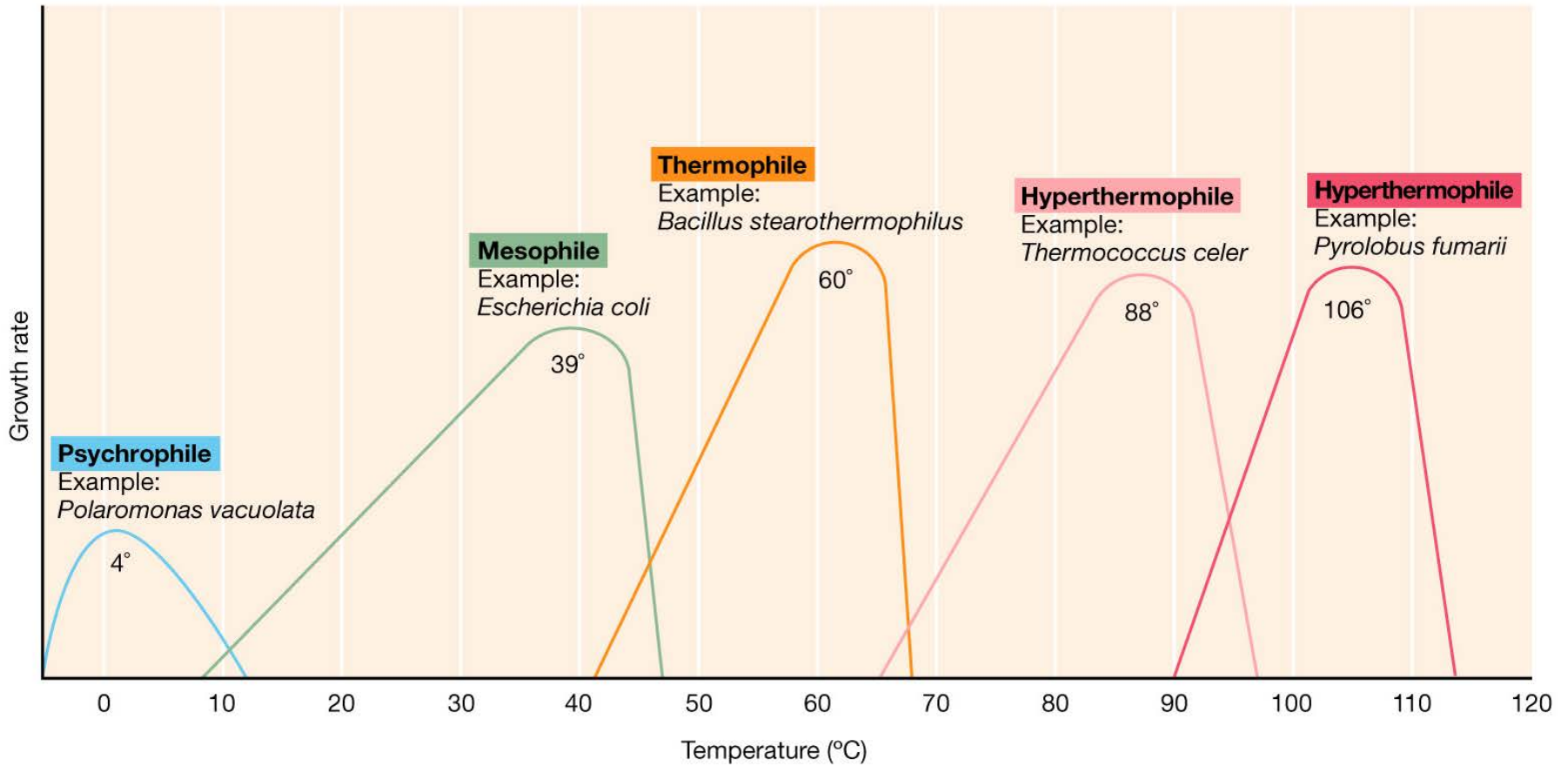


**Tab. 6.1****Limiti superiori di temperatura per la crescita di diversi organismi**

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

<sup>a</sup> 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

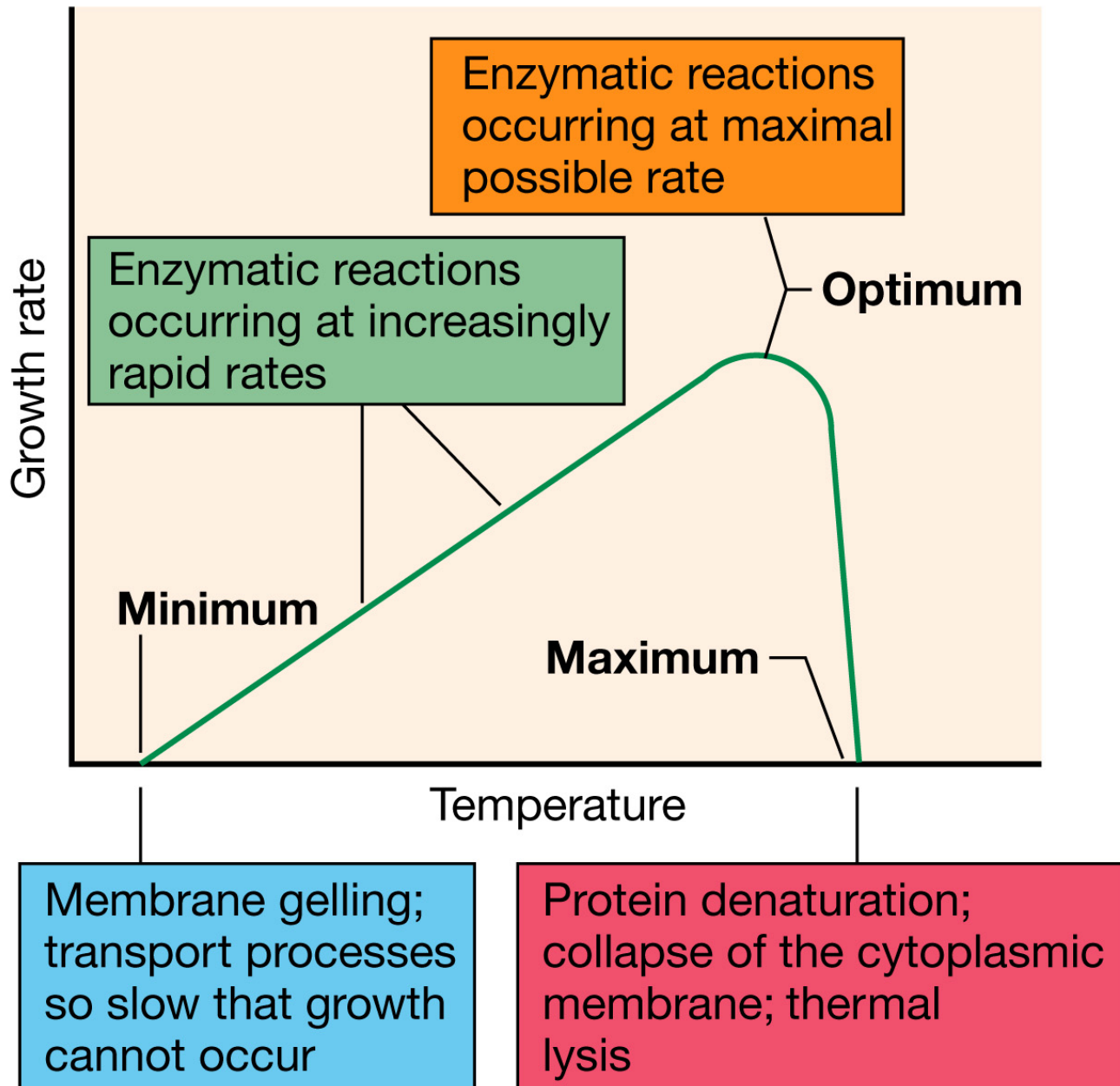


## Influenza della temperatura

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  $15^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$  con una  $T$  ottimale intorno a  $10^{\circ}\text{C}$

**Facoltativi** possono crescere a  $0^{\circ}\text{C}$  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  $T^{\circ}$

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  $\alpha$  eliche ed una minore quantità di strutture a  $\beta$ -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



## 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

## 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)

# 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**

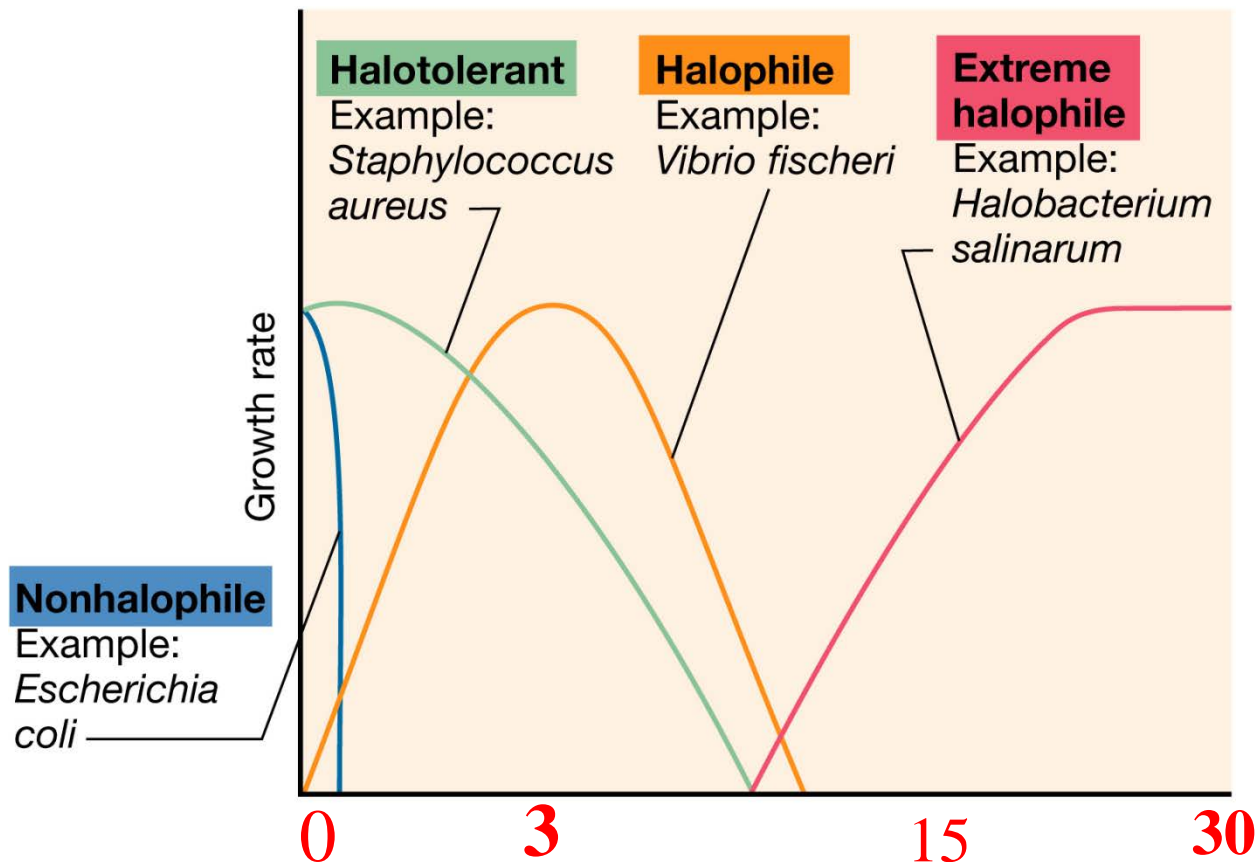
Se la cellula si trova in un ambiente in cui l'attività dell'acqua è bassa e non riesce a fronteggiare la fuoriscita di acqua va incontro a morte

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

| <b>Attività dell'acqua (<math>a_w</math>)</b> | <b>Materiale</b>              | <b>Esempi di organismi<sup>a</sup></b>            |
|---|-------------------------------|---|
| 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 bastoncelli 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 |

<sup>a</sup> 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**

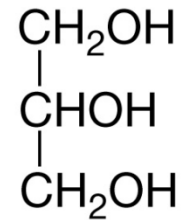
**possono essere sintetizzati o acquisiti dall'ambiente (betaina)**

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

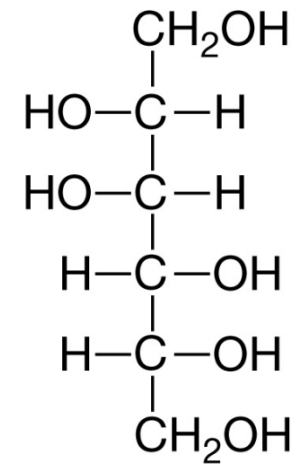
Il tipo e la quantità accumulato è tipico di ogni microrganismo.

### 3. Alcohol-type solutes:

#### Glycerol

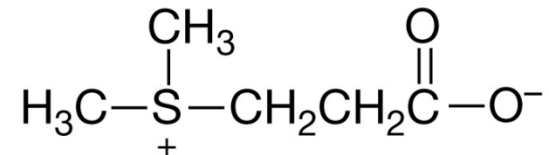


#### Mannitol



### 4. Other:

#### Dimethylsulfoniopropionate:

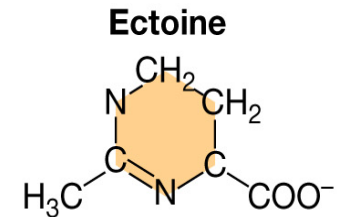
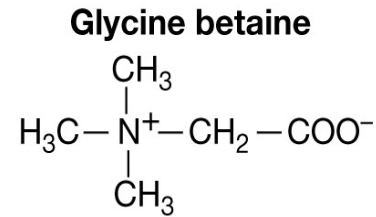


La **betaina** è un derivato dell'AA glicina i cui protoni del gruppo aminico sono sostituiti con 3 gruppi metilici creando carica + su N che aumenta la solubilità

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

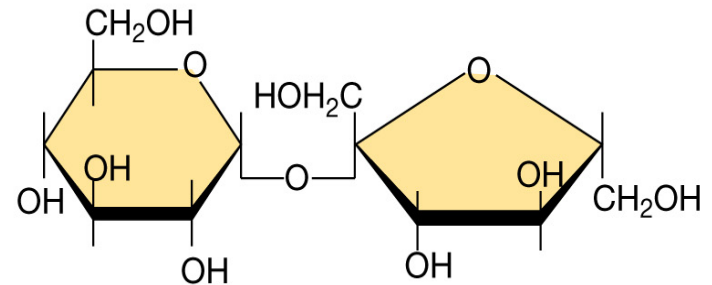
**Ectoina** è un derivato ciclico dell'Acido aspartico

## 1. Amino acid-type solutes:

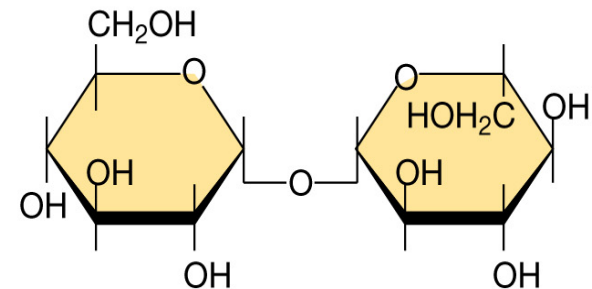


## 2. Carbohydrate-type solutes:

**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**

| <b>Organismo</b>  | <b>Principale soluto accumulato</b>   | <b><math>\alpha_w</math> minima per la crescita</b> |
|---|---|---|
| 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   | $\alpha$ -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<br>(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> )<br>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

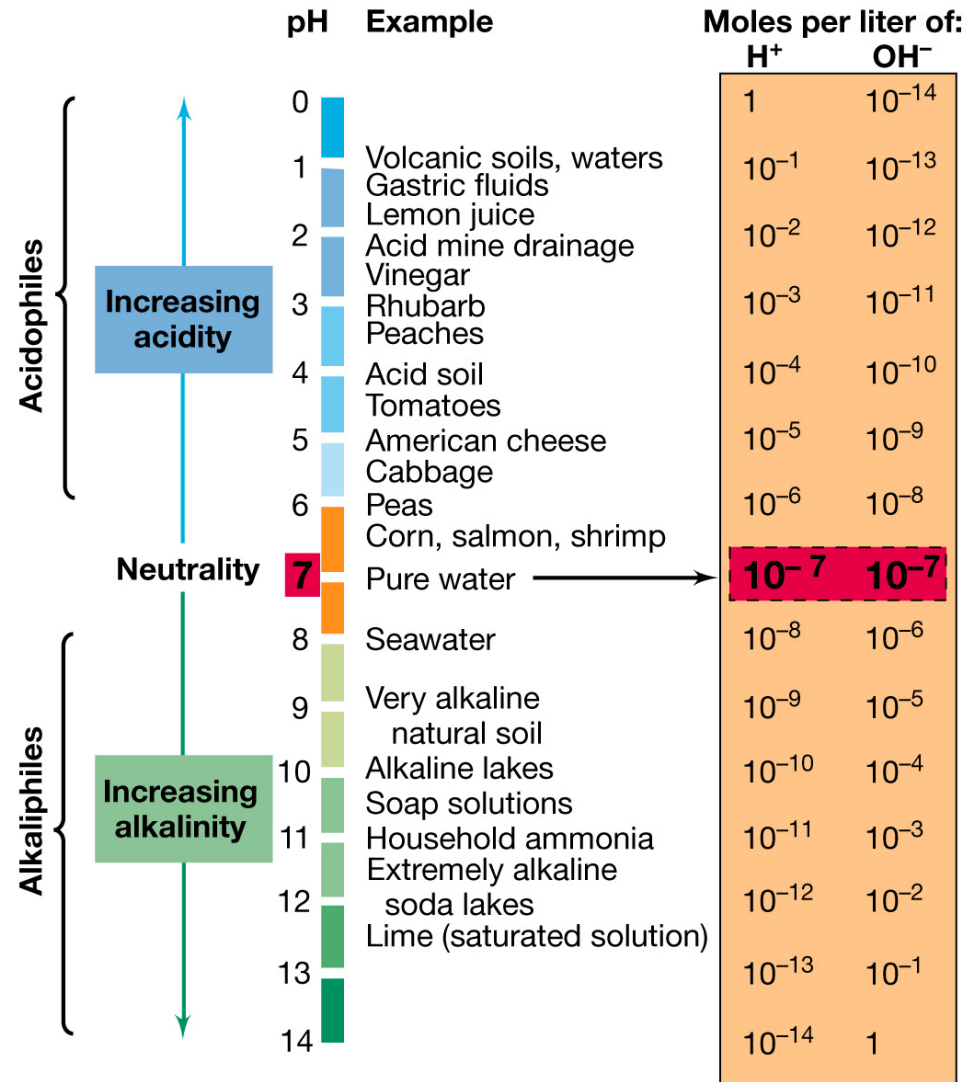
Acidofili (da 0 a 6)

Neutralofili (da 6 a 8)

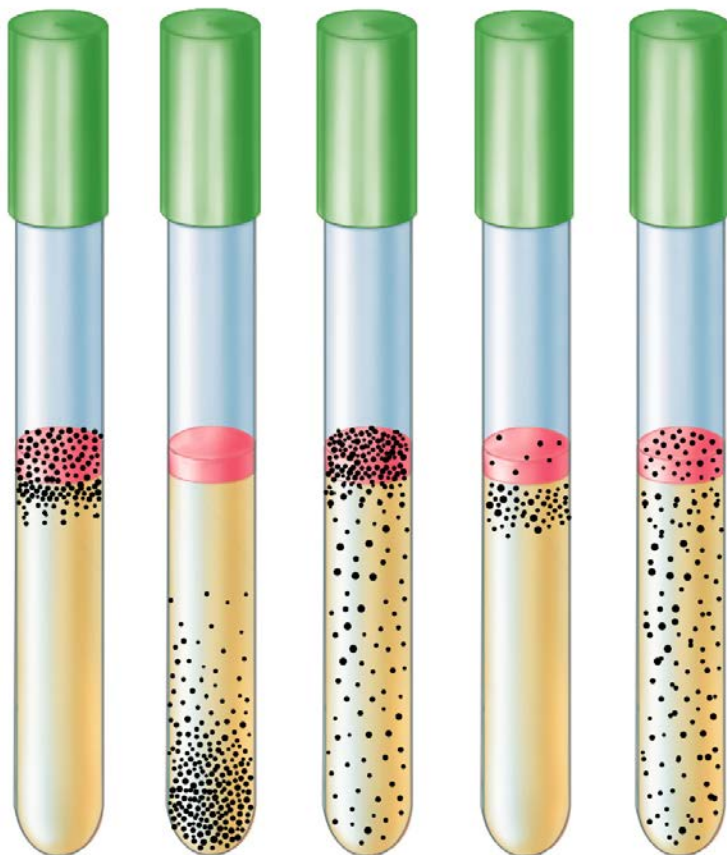
Alcalinofili (da 8 a 14)

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

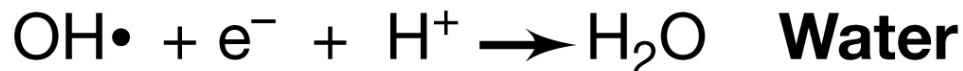
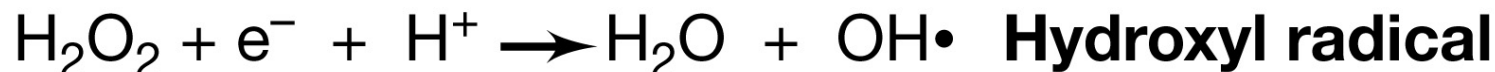
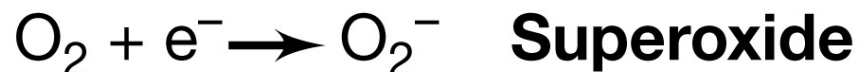
3. AEROBI FACOLTATIVI

4. MICROAEROFILI

5. ANAEROBI  
AEROTOLLERANTI

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

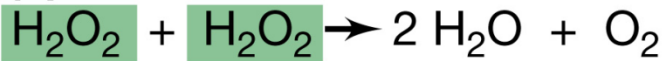
Tutti gli intermedi che si formano sono molto reattivi e tossici per la cellula



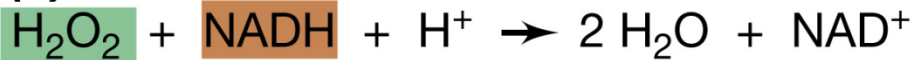


I microrganismi hanno evoluto diversi enzimi che agiscono sui composti tossici dell'ossigeno catalasi e perossidasi agiscono sul perossido d'ossigeno ( perossidasi in presenza di NADH come riducente

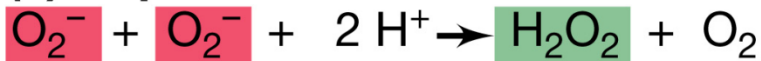
(a) Catalase:



(b) Peroxidase:



(c) Superoxide dismutase:



(d) Superoxide dismutase/catalase in combination:



(e) Superoxide reductase:

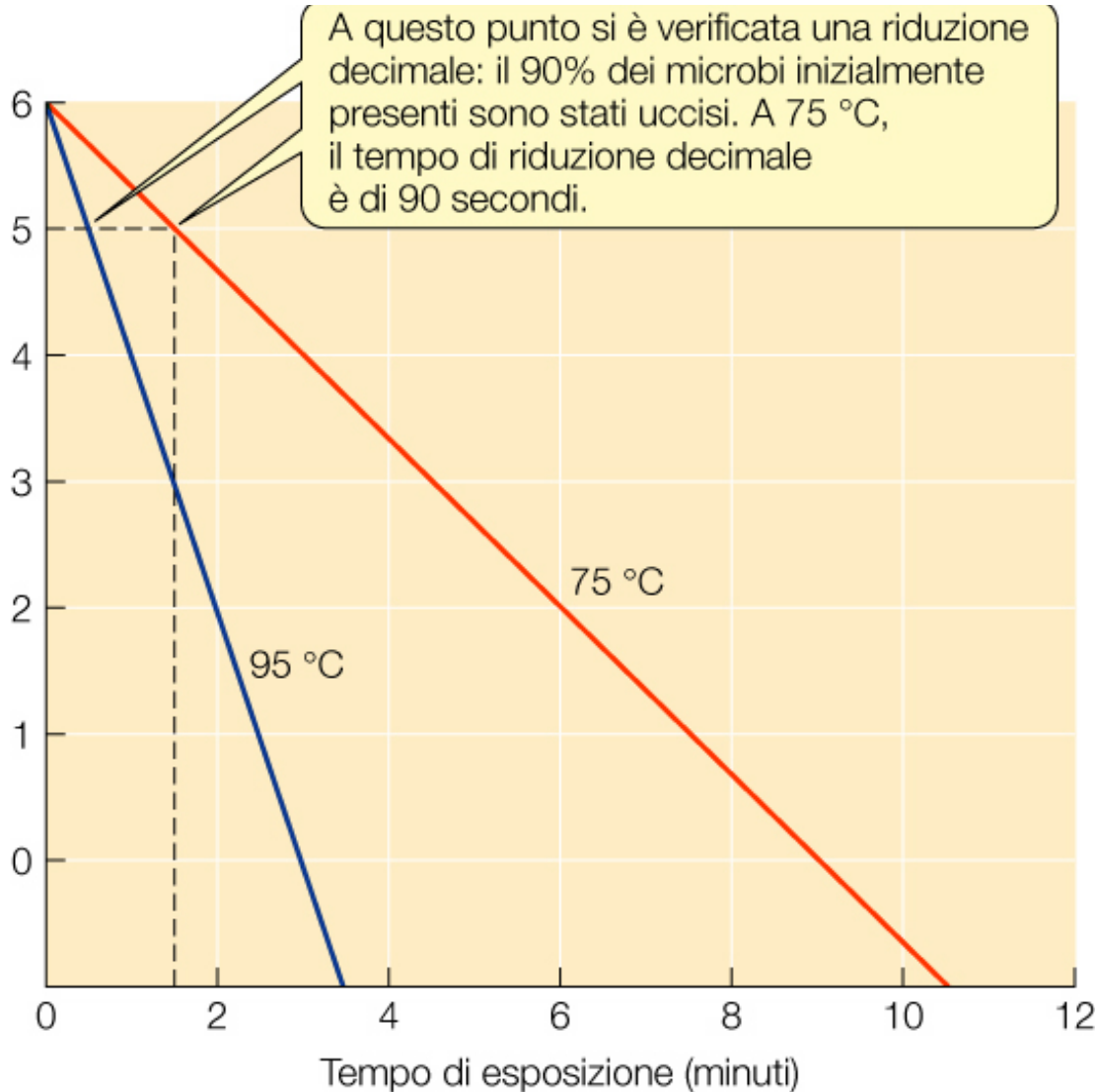


L'anione  $\text{O}_2^-$  viene scisso dalla superossido dismutasi che catalizza la conversione di due molecole di  $\text{O}_2^-$  in una molecola di  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$

# Effetto della temperatura sulla vitalità delle cellule batteriche .

Batterio mesofilo sottoposto a due diverse temperature

$\text{Log}_{10}$  di n  
n= cell  
soprav  
vissute



**Tab. 6.4 Relazioni dei microrganismi con l'ossigeno**

| <b>Gruppo</b>   | <b>Relazione con l'O<sub>2</sub></b>                               | <b>Tipo di metabolismo</b>                       | <b>Esempio<sup>a</sup></b>             | <b>Habitat<sup>b</sup></b>  |
|-----------------|--|--|--|---|
| <b>Aerobi</b>   |  |  |  |   |
| Obbligati       | Richiesta  | Respirazione aerobica                            | <i>Micrococcus luteus</i> (B)          | Pelle, polvere  |
| Facoltativi     | Non richiesta, ma crescono meglio in presenza di O <sub>2</sub>    | 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  |
| <b>Anaerobi</b> |  |  |  |   |
| Aerotolleranti  | Non richiesta, e non crescono meglio in presenza di O <sub>2</sub> | 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 |

<sup>a</sup> 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).

<sup>b</sup> 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

