La crescita batterica

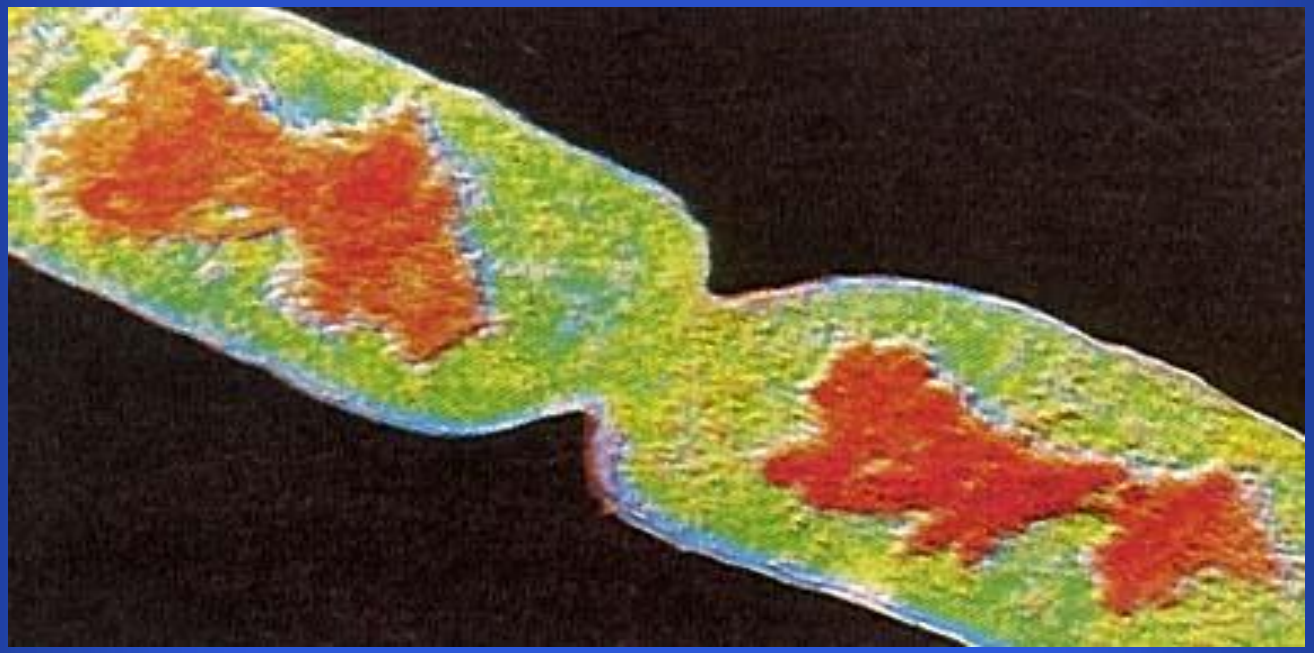
La scissione binaria

La riproduzione dei batteri è asessuata e avviene mediante la divisione di un individuo in due cellule figlie (CITOCHINESI) uguali tra loro e identiche alla progenitrice e viene definito scissione binaria, processo molto simile, ma molto più semplice della mitosi cellulare.

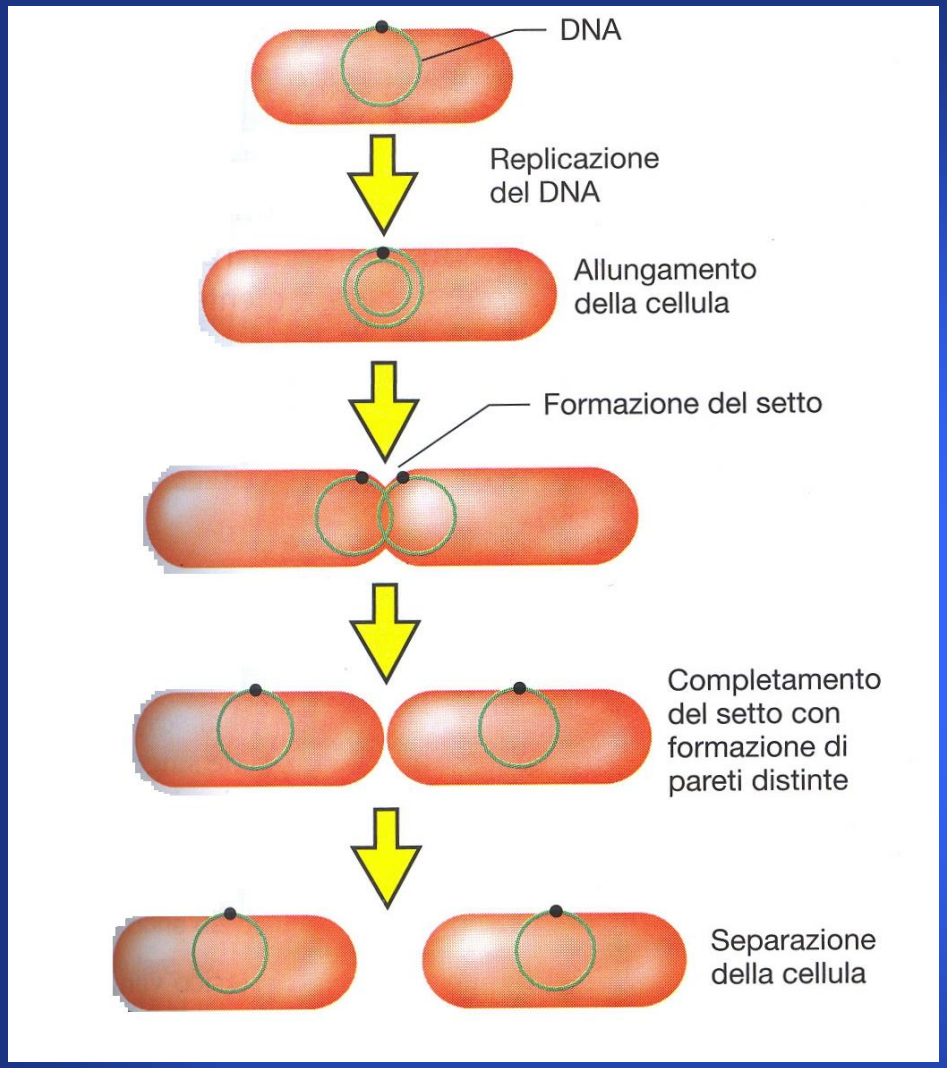
La scissione binaria, o in due parti, è comune negli organismi unicellulari, ma è rara nei pluricellulari perché richiederebbe la rigenerazione di parti specializzate in ciascuno degli organismi figli.

Scissione binaria di *Escherichia coli*:

in rosso il nucleoide e in verde il citoplasma



Il tempo richiesto da un batterio per svolgere un ciclo di crescita completo è variabile e dipende da diversi fattori nutrizionali e genetici. In condizioni nutrizionali ottimali, *E. coli* completa un intero ciclo in circa 20 minuti.



Dopo la duplicazione del DNA (genoforo) le due molecole si fissano in due punti diversi del plasmalemma che poi si discostano per accrescimento dell'area interposta.

Il plasmalemma quindi si introflette e separa le due molecole di DNA in due cellule figlie.

Nella scissione binaria la cellula si divide in seguito alla formazione di un setto divisorio formato dall'introflessione della membrana citoplasmatica e della parete cellulare.

Processo generale di riproduzione per scissione binaria di un batterio bastoncellare.

Il nucleoide è rappresentato dal cerchio verde.

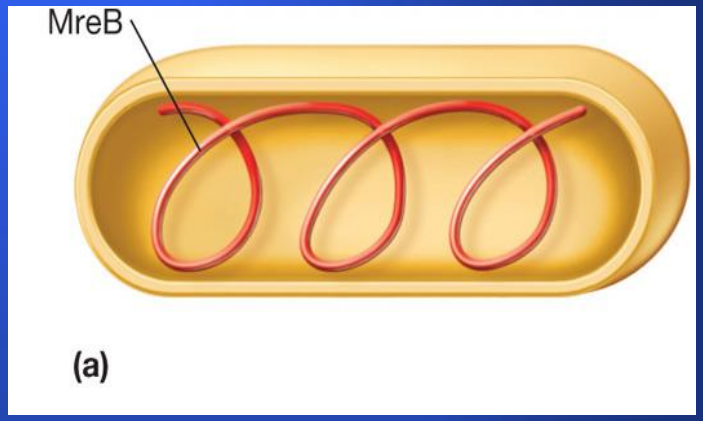
Il divisoma

La molecola di DNA replica rimanendo ancorata alla membrana, e grazie alla formazione del setto i due cromosomi sono ripartiti, uno per ogni cellula figlia

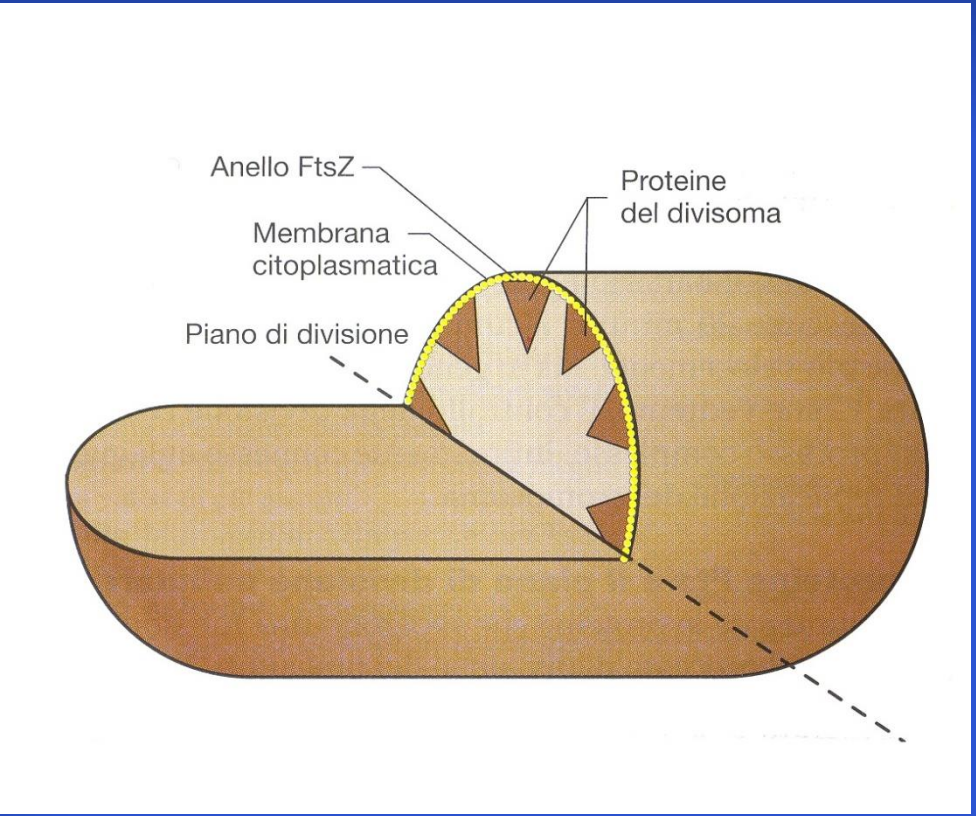
Un ruolo chiave nella migrazione e segregazione dei cromosomi è svolto da MreB (omologa all'actina)

Un ruolo chiave nel processo di divisione dei procarioti è svolto dalla **proteina FtsZ**, ben studiata in *E. coli* ed universalmente distribuita tra i procarioti compresi gli Archebatteri.

- Le FtsZ presentano analogie strutturali con la tubulina, una proteina fondamentale nel processo di divisione della cellula eucariotica.



Anello FtsZ
(proteine filamentose sensibili alla temperatura)

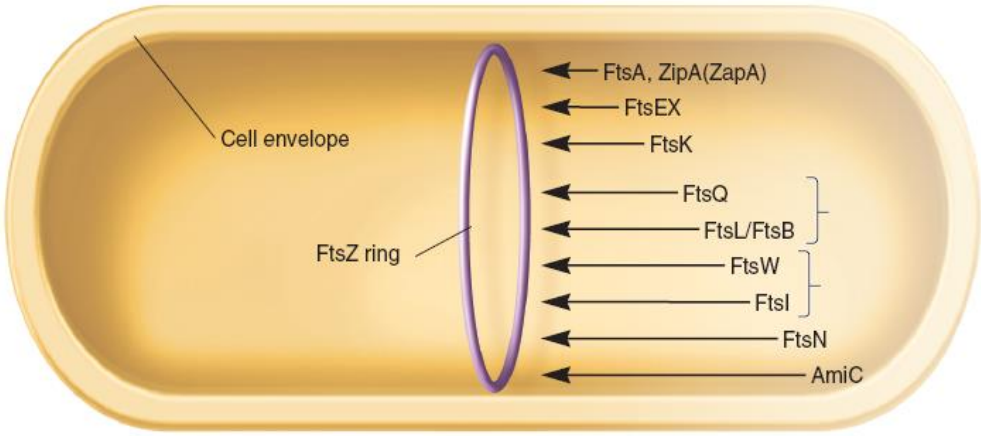


Sezione verticale di una cellula bastoncellare con evidenziazione dell'anello di molecole FtsZ.

Il divisoma

L'interazione delle proteine Fts porta alla formazione di un apparato di divisione chiamato divisoma.

- Il divisoma, oggetto di attiva ricerca, probabilmente dirige la sintesi di nuova membrana e materiale parietale in entrambe le direzioni finché la cellula non raggiunge il doppio della sua lunghezza iniziale, evento seguito dalla formazione di un restringimento con separazione delle due cellule figlie.

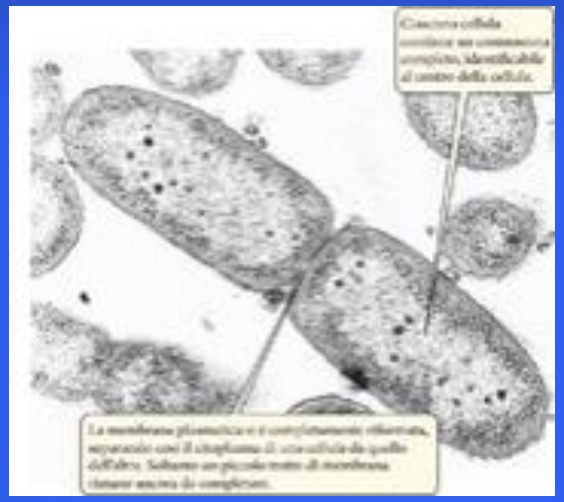


Funzione
Ancora l'anello Z alla membrana plasmatica
Sconosciuta
Coordina la formazione del setto con la segregazione cromosomica
Sconosciuta
Sintesi del peptidoglicano
Sconosciuta
Idrolisi del peptidoglicano per la separazione delle cellule figlie

in E. coli, cell division is mediated by a collection of proteins that localize to the division site, where they appear to assemble into a multiprotein complex called the septal ring (Figura)

The septal ring. GFP-FtsL visualized by deconvolution microscopy (modified from Ghigo et al., 1999)

Il ruolo delle autolisine nella scissione binaria



Le autolisine (mureino-idrolasi) sono enzimi che hanno una funzione simile al lisozima; durante la formazione del divisoma provocano piccole fessure nella parete a partire dall'anello di proteine FtsZ permettendo attraverso queste l'aggiunta di materiale di nuova sintesi, nuove unità di peptidoglicano.
Alcuni di questi enzimi attaccano le catene polisaccaridiche, mentre altri idrolizzano i legami crociati.
La loro attività è tenuta sotto controllo da inibitori specifici.

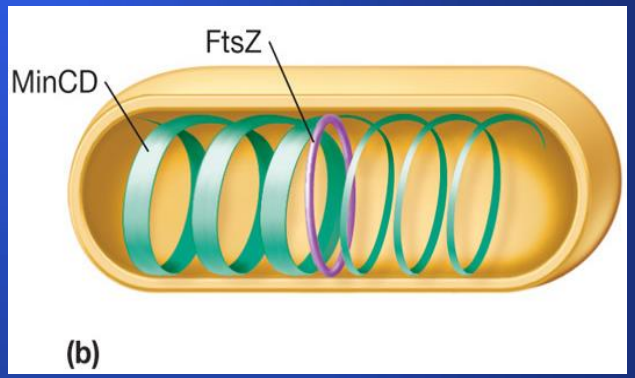
Il divisoma

- Il completamento della replicazione del DNA rappresenta il segnale per la formazione dell'anello di proteine FtsZ nello spazio tra i nucleoidi appena duplicati.

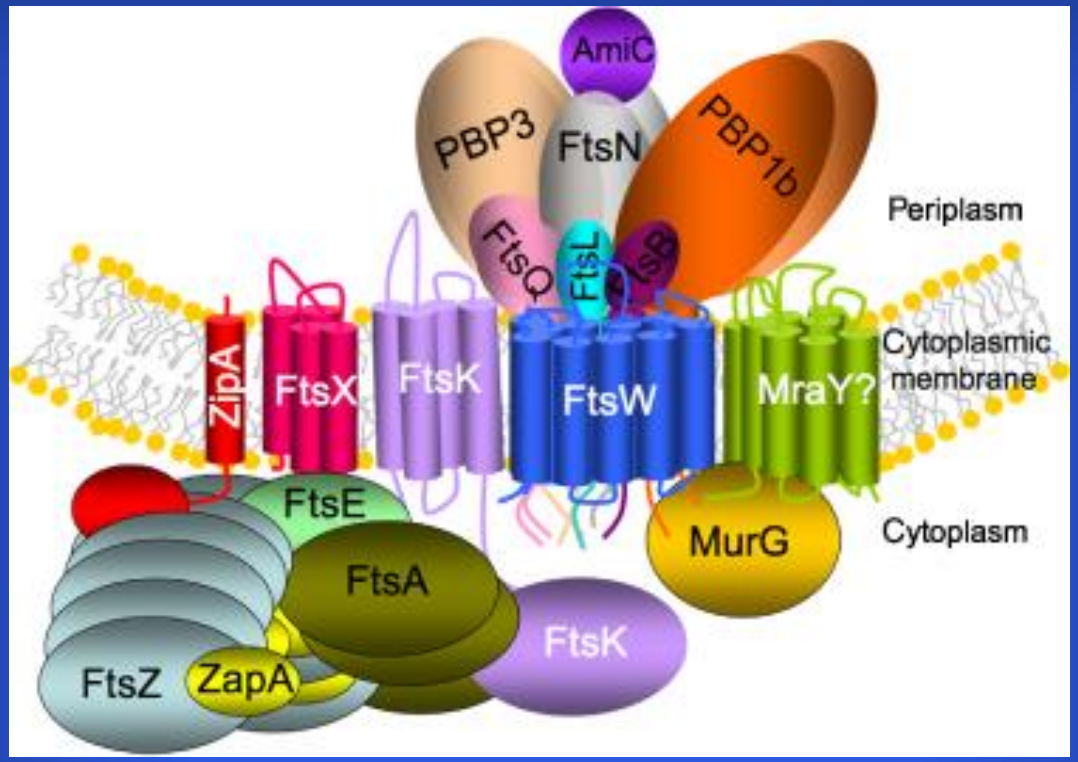
- La localizzazione delle proteine FtsZ nella parte centrale della cellula probabilmente è mediata da proteine denominate Min, in particolare il complesso MinCD, che impedisce la formazione dell'anello Z in zone diverse dall'equatore e MinE che è capace di interagire con i nucleoidi.

- Una volta avvenuto il restringimento, l'anello di proteine FtsZ comincia a depolimerizzarsi.

- Le FtsZ sono dotate di attività enzimatica: possono produrre energia, idrolizzando molecole di guanosina trifosfato (GTP), impiegata per la polimerizzazione e depolimerizzazione dell'anello.



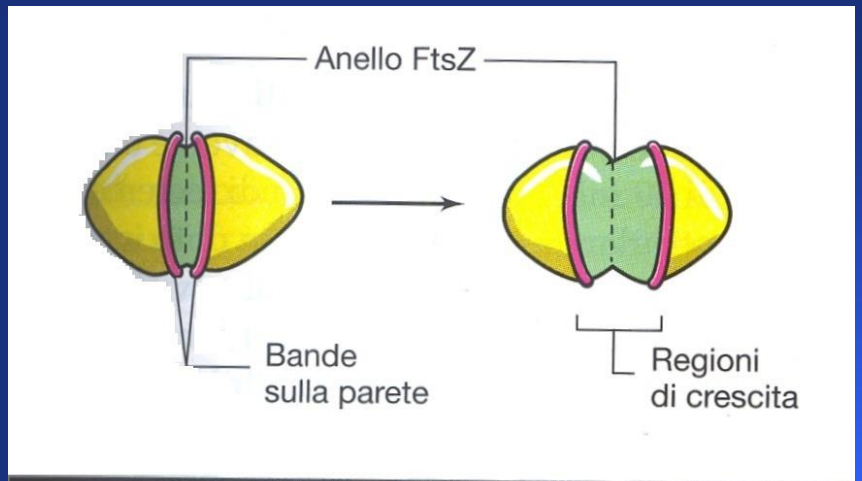
Il divisoma



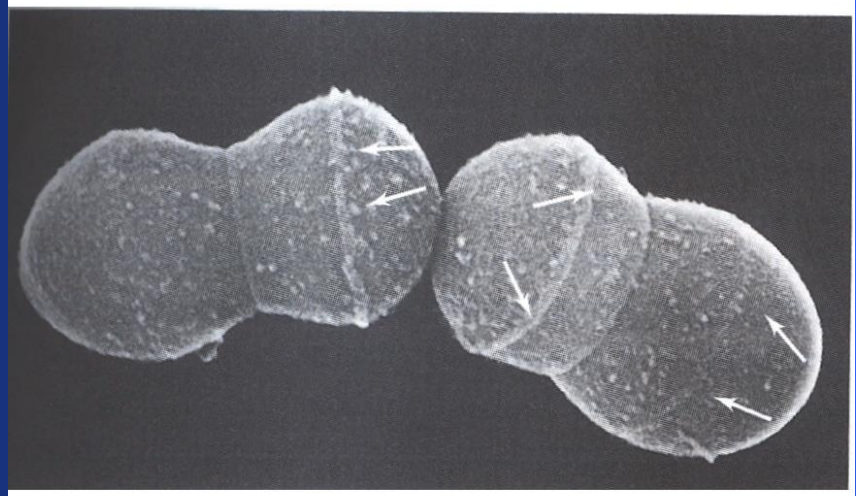
Rappresentazione schematica del divisoma: le proteine essenziali del macchinario della divisione cellulare batterica

Le varie proteine Fts, MurG, MraY , le PBP, le autolisine, ZipA..

FtsA e ZipA, insieme alle proteine Min , sono richieste per l'assemblaggio delle FtsZ alla membrana.



Regione di sintesi di nuova parete cellulare (verde)
L'anello FtsZ definisce il piano di divisione della cellula



Sulla superficie cellulare dei Gram-positivi la giunzione tra il peptidoglicano preesistente e quello di nuova sintesi forma un rilievo simile ad una cicatrice.

Micrografia a scansione elettronica di *Streptococcus hemolyticus* che mostra le giunzioni tra parete di nuova sintesi e parete preesistente

N.B. Nei batteri a bastoncino (E. coli) la sintesi di nuova parete avviene nella regione del setto ma anche in diversi siti di crescita distribuiti lungo la parete cilindrica del bastoncello.

Analisi della crescita batterica

CRESCITA MICROBICA: aumento del numero di cellule in una popolazione

- **velocità di crescita**: indica la variazione del numero di cellule o della massa cellulare per unità di tempo.

Analisi della crescita batterica

L'intervallo di tempo durante il quale da una singola cellula si formano due cellule figlie è definito

generazione

- Il **tempo di generazione** è dunque il tempo necessario ad una popolazione per duplicarsi e viene detto anche **tempo di duplicazione.**
- Molti batteri hanno tempi di generazione compresi tra una e tre ore; alcuni crescono rapidamente dividendosi in circa 10 minuti; mentre in altri può essere di alcuni giorni.
- Il tempo di generazione oltre a variare a seconda dello specifico microrganismo può essere influenzato dal terreno e dalle condizioni di crescita.

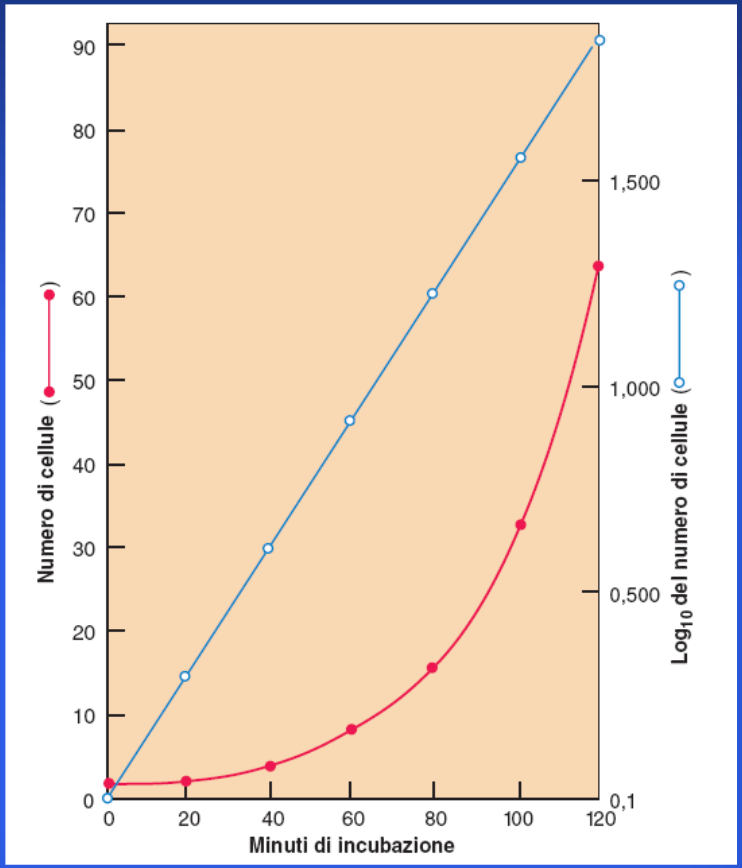


Grafico su scala aritmetica (scala delle ordinate a sinistra) e logaritmica (scala delle ordinate a destra) di una popolazione batterica che si duplica ogni 20 minuti.

Curva di crescita batterica in terreno liquido

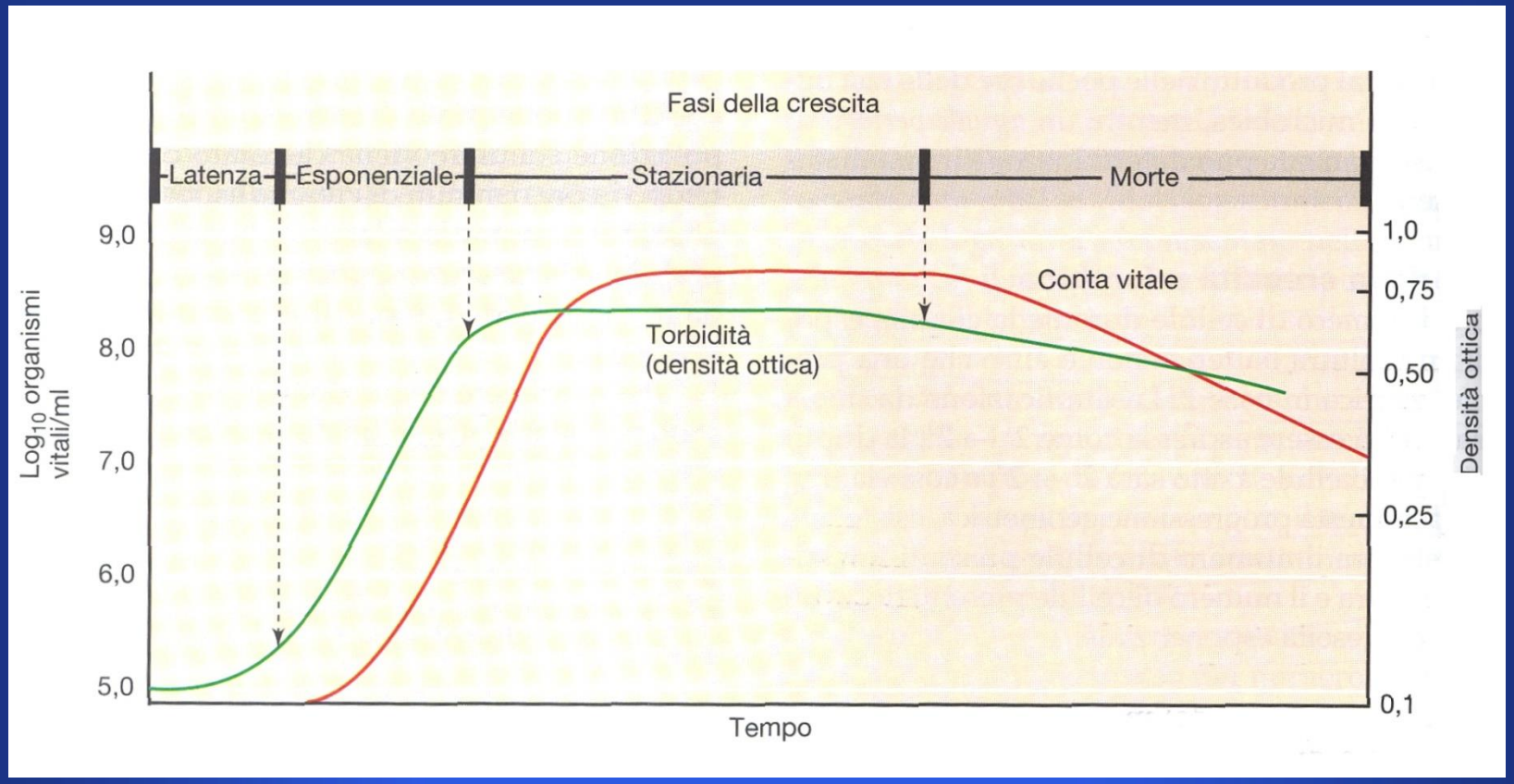


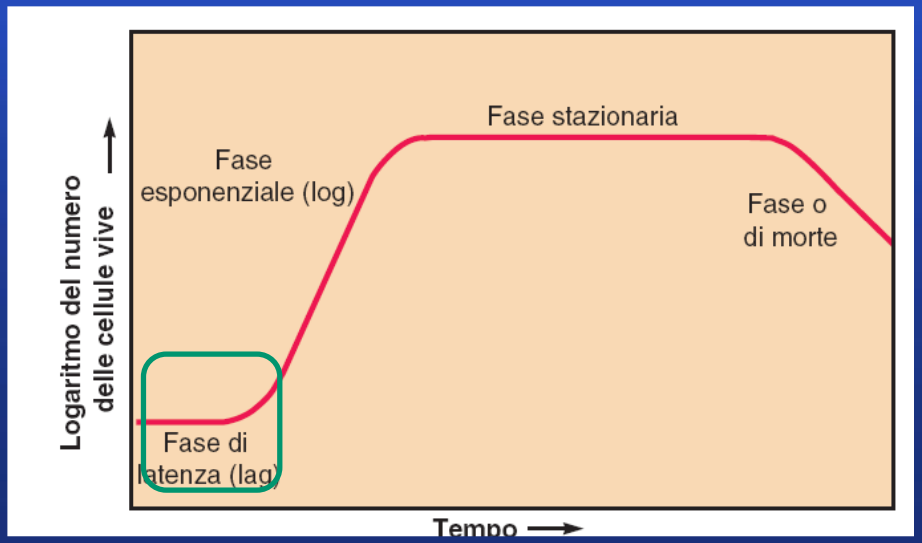
Grafico semilogaritmico: numero di cellule riportato come logaritmo; tempo riportato in scala aritmetica.

Una curva di crescita batterica completa, come quella ottenuta in un contenitore chiuso (coltura in sistema chiuso o in batch) può essere suddivisa in diverse fasi: fase di latenza (o fase "lag"), fase esponenziale, fase stazionaria e fase di morte.

.

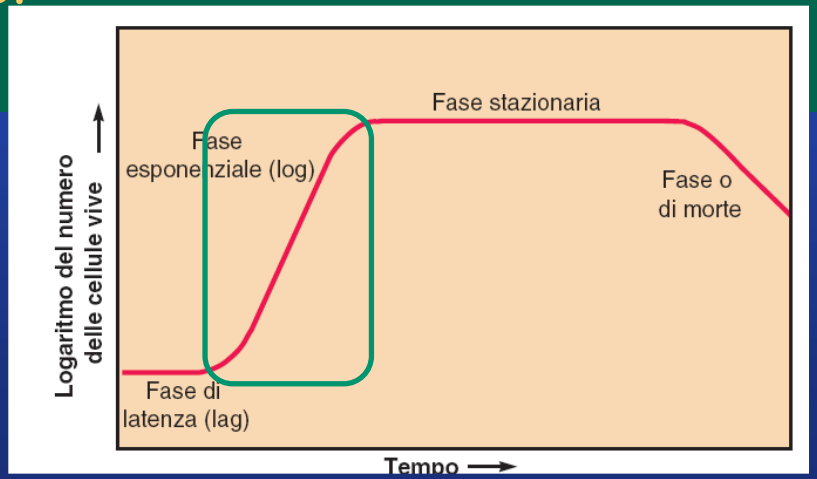
Le fasi della crescita microbica

- La crescita di una popolazione batterica inoculata in un terreno fresco di solito inizia dopo un periodo di tempo più o meno lungo definito fase di latenza.
- Le cellule provenienti da una coltura in fase stazionaria mancano di quantità ottimali di coenzimi e di altri costituenti essenziali per la crescita e necessitano pertanto di un certo periodo di tempo per sintetizzarli.



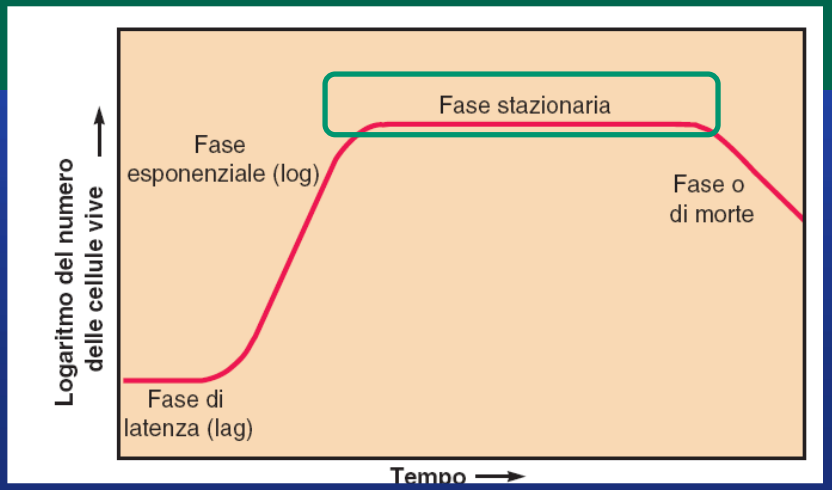
Le fasi della crescita microbica

- **La velocità di crescita esponenziale** è variabile ed influenzata sia da condizioni ambientali (temperatura, terreno, atmosfera) sia dalle caratteristiche genetiche del microrganismo.
- La crescita esponenziale di una coltura in batch non può continuare per un tempo indefinito, **è autolimitante** arrestandosi a **1-5x10^9 cellule/ml.**
- Generalmente, il termine di questa fase è determinato dall'esaurimento di nutrienti essenziali nel terreno oppure dall'accumulo di prodotti di rifiuto riversati nel terreno dal microrganismo stesso.



Le fasi della crescita microbica

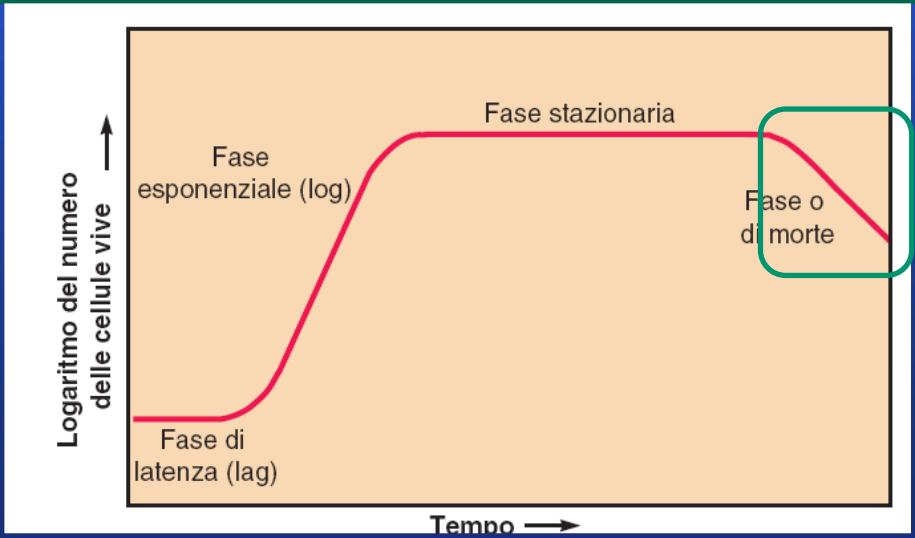
- In tal caso la popolazione cellulare entra nella fase stazionaria. Sebbene non vi sia crescita netta (numero delle cellule invariato), in questa fase molte funzioni cellulari, come il metabolismo energetico ed alcuni processi biosintetici, possono continuare.
- Alcuni batteri presentano in questa fase una crescita criptica, alcune cellule si dividono, mentre altre muoiono quindi il numero di cellule rimane costante.



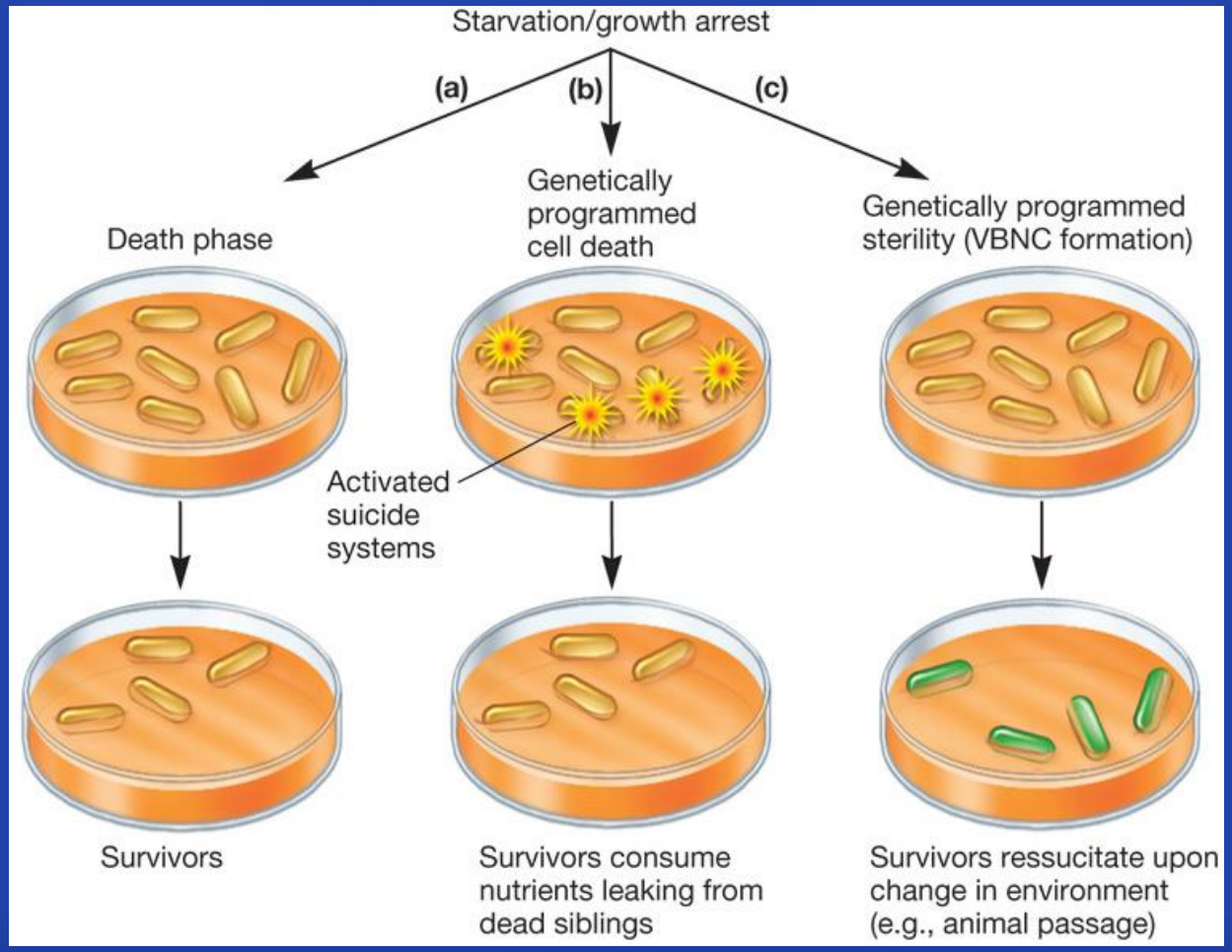
Le fasi della crescita microbica

- Se l'incubazione prosegue la coltura entra nella fase di morte in cui **la conta totale di cellule può rimanere costante mentre la conta vitale diminuisce lentamente.** Quando la morte è accompagnata da lisi cellulare, sia la torbidità che il numero totale di cellule diminuiscono.

- **VBNC** (Viable But Not Culturable): **batteri vitali ma non coltivabili**
- **Morte cellulare programmata** (commit suicide)



Le fasi della crescita microbica



Numero di generazioni e tempo di generazione

L'aumento del numero di cellule durante la crescita esponenziale di una coltura batterica non è altro che una progressione geometrica in base 2 ($2^0 \rightarrow 2^1$), per cui esiste una relazione diretta tra il numero di cellule presenti inizialmente in una coltura ed il numero presente dopo un certo periodo di crescita esponenziale:

$$N = N_0 2^n$$

N = numero finale di cellule

N_0 = numero iniziale di cellule

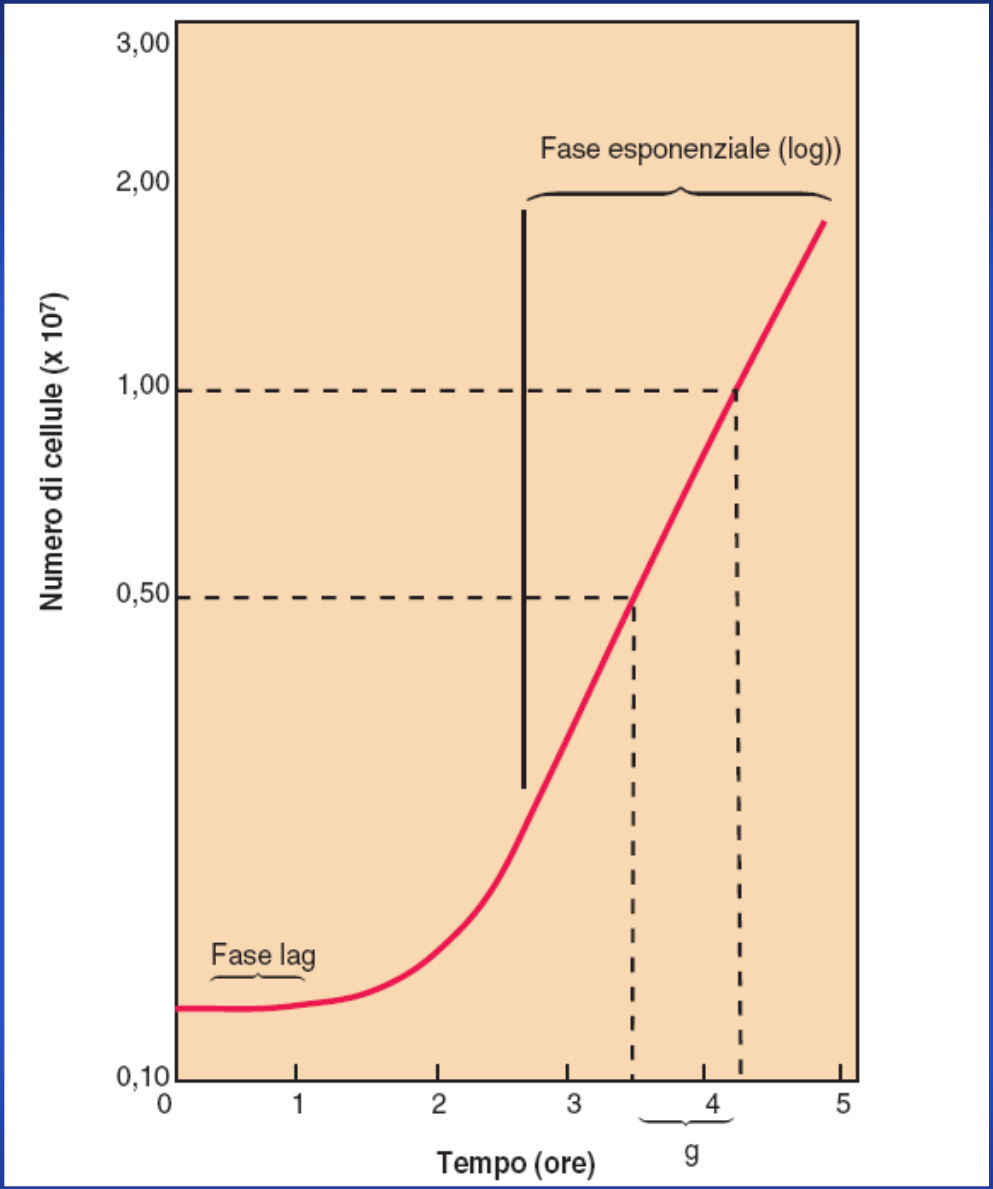
n = numero di generazioni avvenute nel periodo di crescita esponenziale

g = tempo di generazione

t = tempo in ore o minuti di crescita esponenziale

$$n = \log N - \log N_0 / \log 2 = 3{,}3 (\log N - \log N_0)$$

$$g = t/n$$



Il tempo di generazione (g) può essere determinato mediante grafico su carta semilogaritmica dei dati di crescita

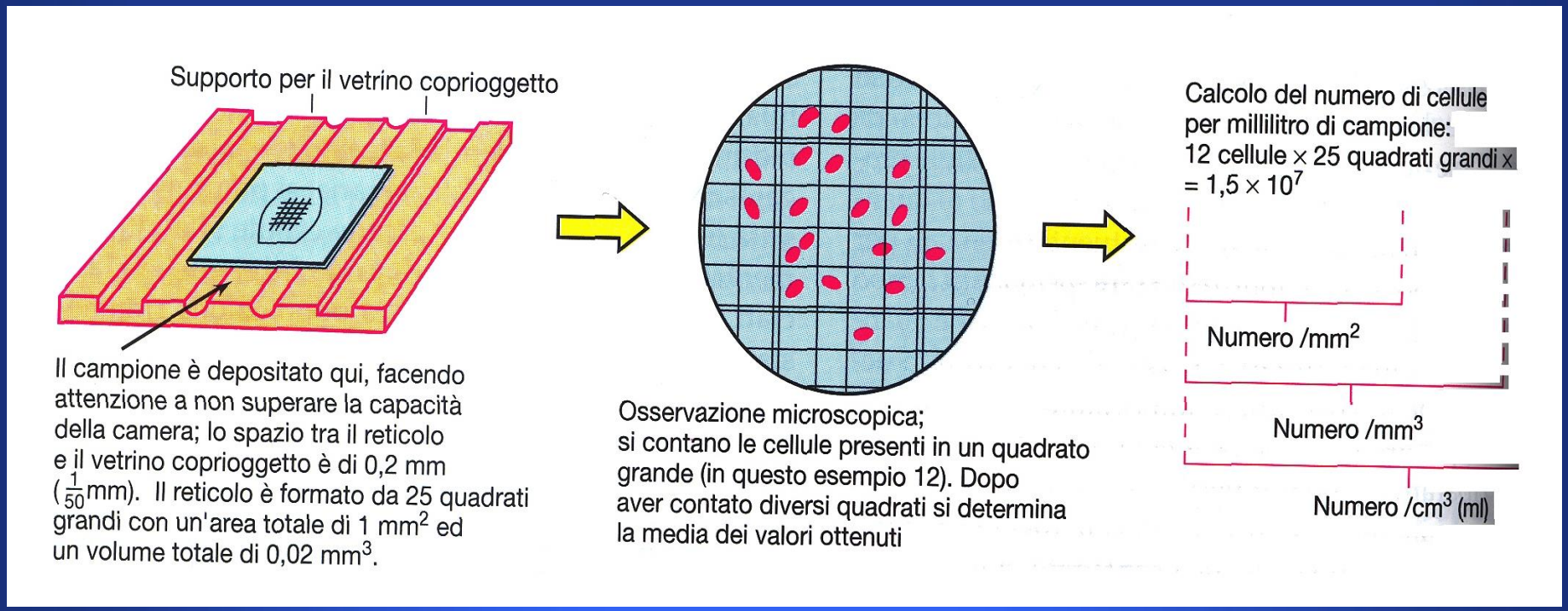
Tabella 5.2
Tempi di generazione di alcuni microrganismi

Microrganismo	Temperatura (°C)	Tempo di generazione (ore)
Batteri		
Beneckea natriegens	37	0,16
Escherichia coli	40	0,35
Bacillus subtilis	40	0,43
Staphylococcus aureus	37	0,47
Pseudomonas aeruginosa	37	0,58
Clostridium botulinum	37	0,58
Rhodospirillum rubrum	25	4,6–5,3
Anabaena cylindrica	25	10,6
Mycobacterium tuberculosis	37	≈12
Treponema pallidum	37	33
Alghe		
Scenedesmus quadricauda	25	5,9
Chlorella pyrenoidosa	25	7,75
Asterionella formosa	20	9,6
Euglena gracilis	25	10,9
Ceratium tripos	20	82,8
Protozoi		
Tetrahymena geleii	24	2,2–4,2
Leishmania donovani	26	10–12
Paramecium caudatum	26	10,4
Acanthamoeba castellanii	30	11–12
Giardia lamblia	37	18
Funghi		
Saccharomyces cerevisiae	30	2
Monilinia fructicola	25	30

Metodi di conteggio dei microrganismi

- Conta al microscopio con camera di Petroff-Hausser
- Metodi turbidimetrici (torbidità, assorbanza)
- Misura del peso secco
- Conteggio vitale in piastra (CFU)

Conta totale



La conta totale di una popolazione batterica può essere determinata mediante conta diretta al microscopio utilizzando campioni sospesi in liquido mediante l'impiego di speciali camere di conta (Petroff-Hausser), nelle quali il vetrino di superficie è inciso con un reticolo quadrettato. In pratica il numero di cellule presenti in ogni riquadro del reticolo è contato al microscopio; tale valore è poi convertito in numero di cellule per ml di sospensione moltiplicando per un fattore di conversione basato sul volume dalla camera.

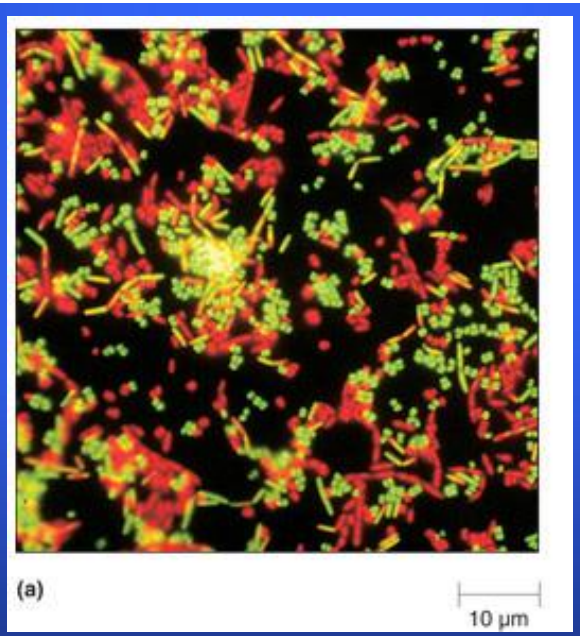
Conta totale

Questo metodo presenta numerosi limiti:

- non consente di distinguere tra cellule vive e morte;
- di individuare cellule di piccole dimensioni;
- fornisce stime imprecise soprattutto per sospensioni a bassa densità cellulare;
- necessità di utilizzare un microscopio a contrasto di fase se il campione non è colorato.

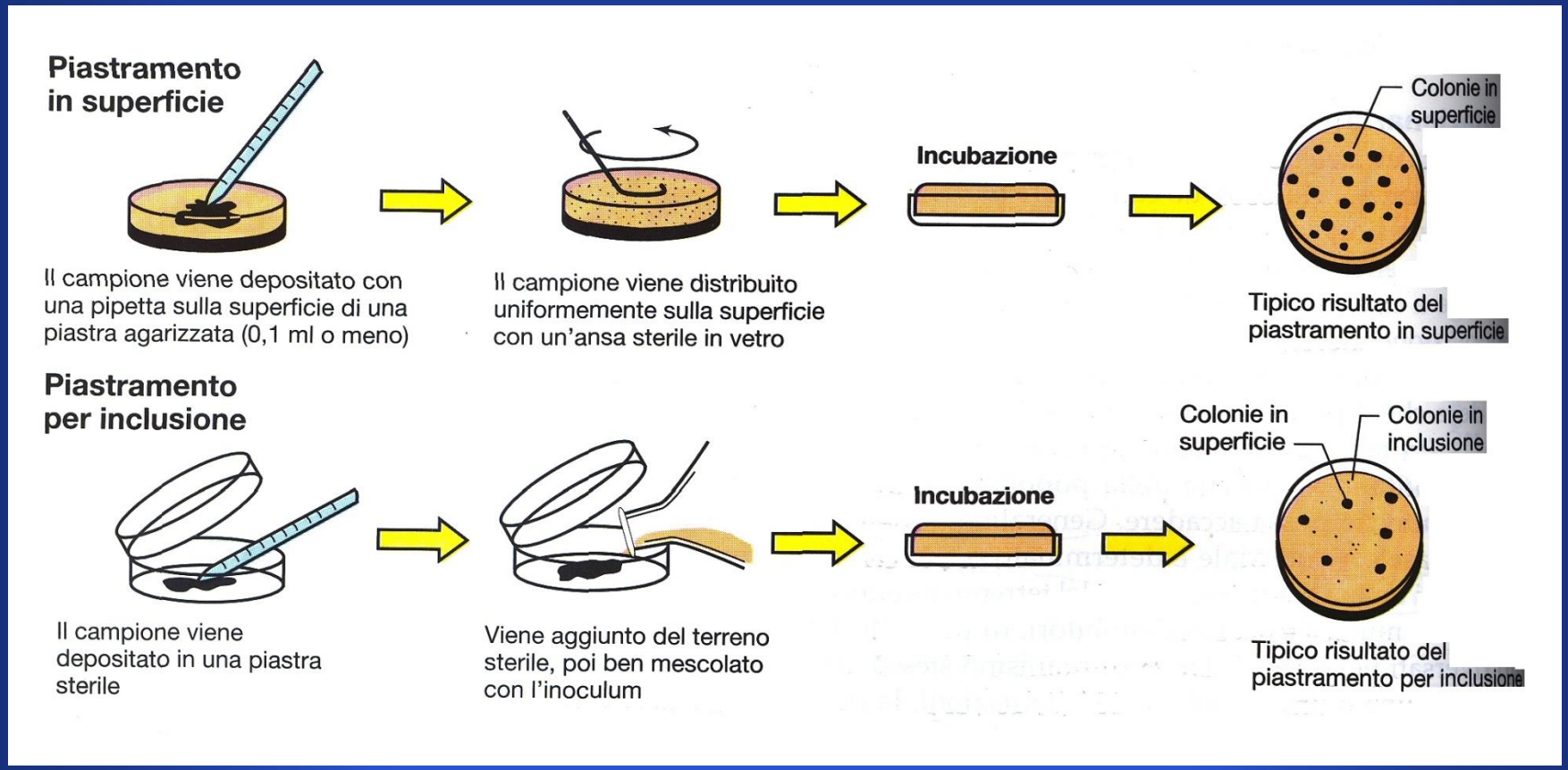
Conta diretta al microscopio ottico a fluorescenza

- espone il campione a luce UV, violetta o blu
- i campioni vengono generalmente colorati con fluorocromi
- mostra un'immagine brillante dell'oggetto derivata dalla luce fluorescente emessa dal campione
- Applicazioni in studi di microbiologia medica e di ecologia microbica



Coltura mista di *Macrococcus luteus* e *Bacillus cereus*.
I batteri vivi hanno una fluorescenza verde quelli morti una fluorescenza rossa

Conta vitale : metodo più sensibile



La **conta vitale** (conta in piastra o conta delle colonie) consiste invece nel determinare il numero di cellule di un campione in grado di formare colonie su terreno agarizzato.
Tale conta si può eseguire in due modi: attraverso piastramento di un volume noto di coltura sulla superficie di un terreno oppure mediante piastramento per inclusione mescolando un volume noto di coltura con terreno agarizzato fuso all'interno di una piastra di Petri sterile, assicurandosi che il microrganismo sopporti la temperatura di circa 45°C dell'agar fuso.

Conta vitale: diluizioni seriali

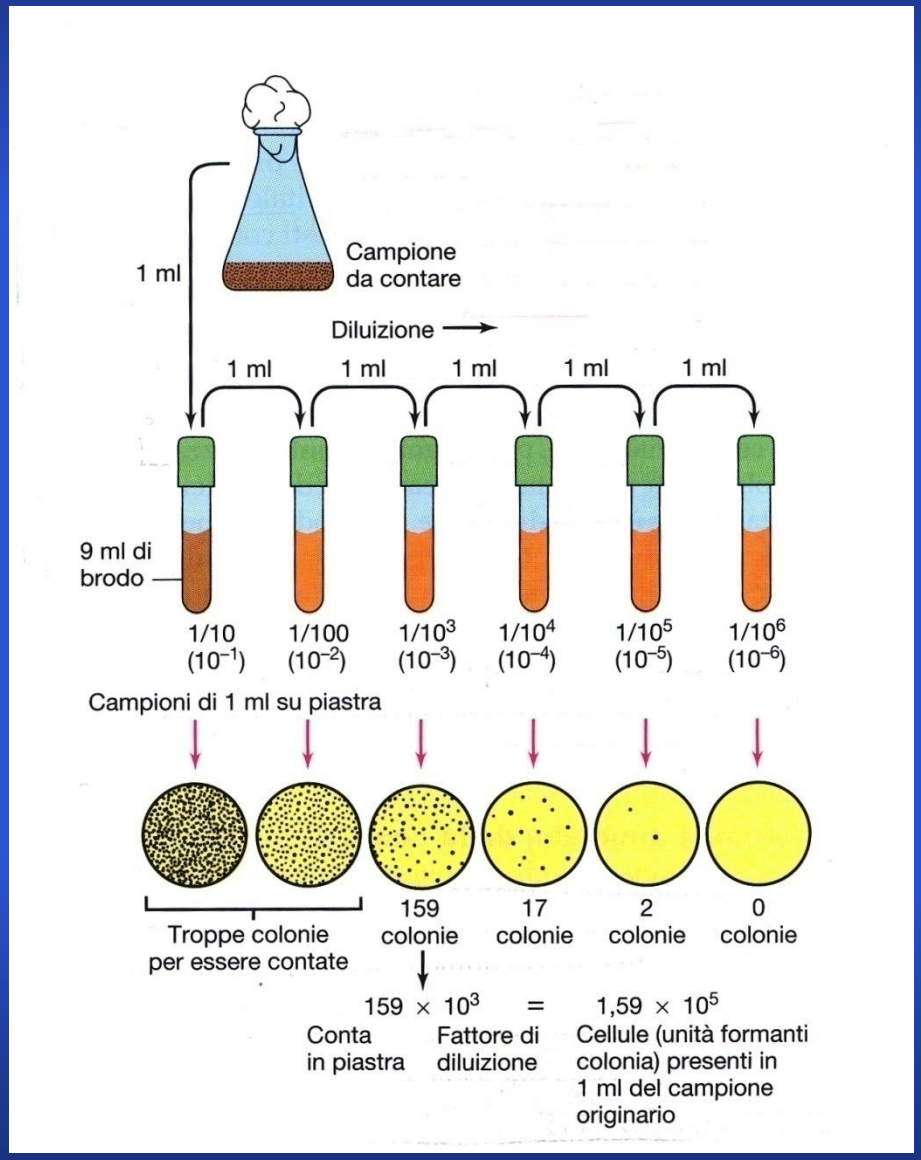
In entrambi i metodi è importante che il numero di colonie che si sviluppano sulla piastra non sia né troppo elevato in quanto l'affollamento determina fusione delle colonie con conteggio sottostimato, né troppo basso, diminuendo la significatività statistica del numero di cellule calcolate **(in genere un numero di colonie tra 30 e 300 è considerato statisticamente valido)**.

Per ottenere un numero di colonie appropriato, il campione viene di solito diluito mediante diluizioni seriali (in base 10) fino alla diluizione finale desiderata.

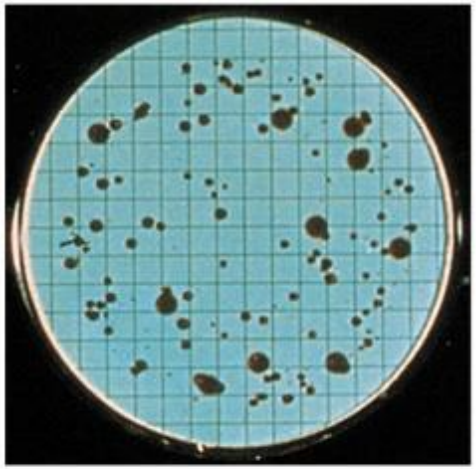
La conta vitale è influenzata oltre che dalle dimensioni dell'inoculo, dal terreno utilizzato, dalle condizioni e dal tempo d'incubazione.

N.B. Il risultato della conta vitale è spesso espresso come **numero di cfu (unità formanti colonia),** piuttosto che come numero di cellule vitali, in quanto una cfu può essere costituita da una o più cellule.

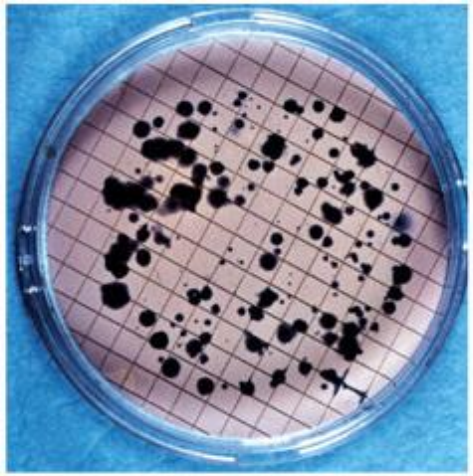
Diluizioni seriali e piastramento in superficie per conta vitale



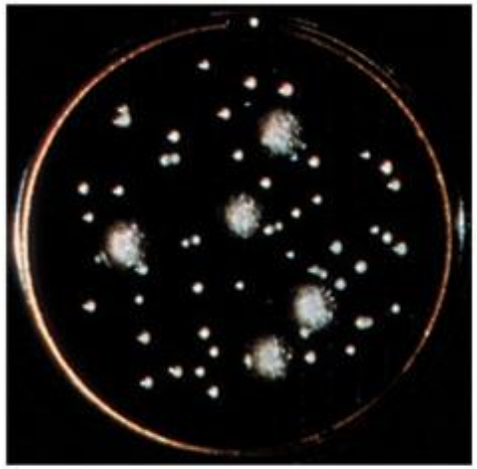
Conta vitale su membrane filtranti



(a)



(b)



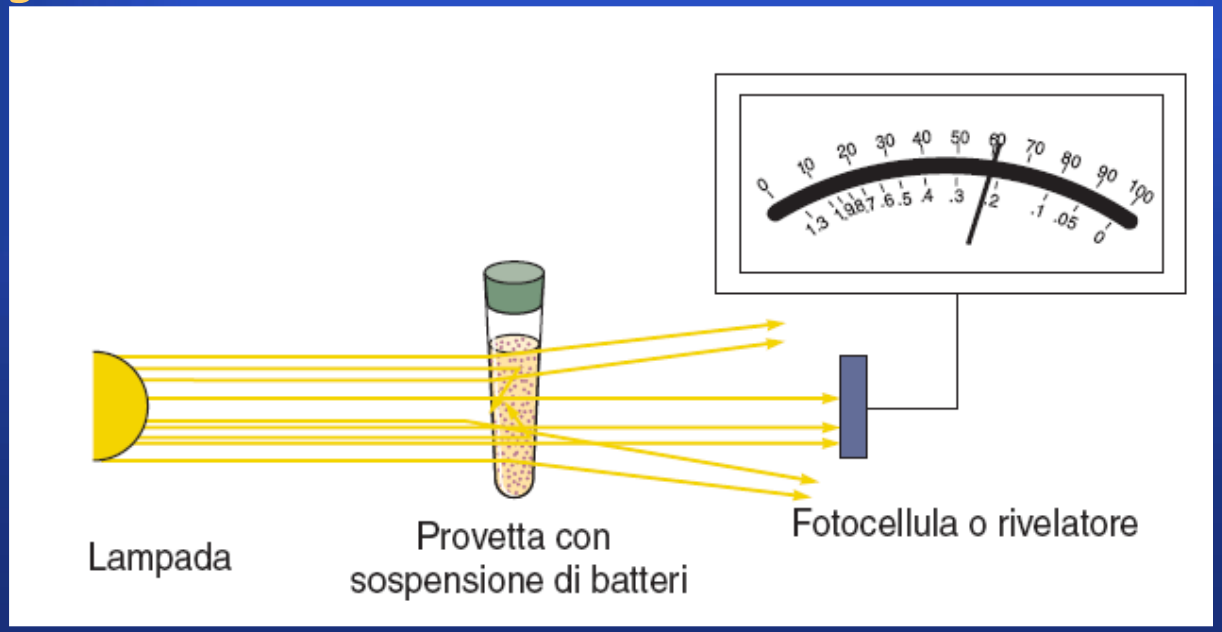
(c)

a: Courtesy of Nagle Company; b: © B. Otero/Visuals Unlimited; c: Courtesy of Nagle Company

Stima della massa cellulare batterica

- Un metodo semplice e molto utile per ottenere una stima relativa della massa cellulare consiste nell'effettuare misure della torbidità:
- più alto è il numero di cellule maggiore è la torbidità e la quantità di luce riflessa da parte della sospensione batterica.

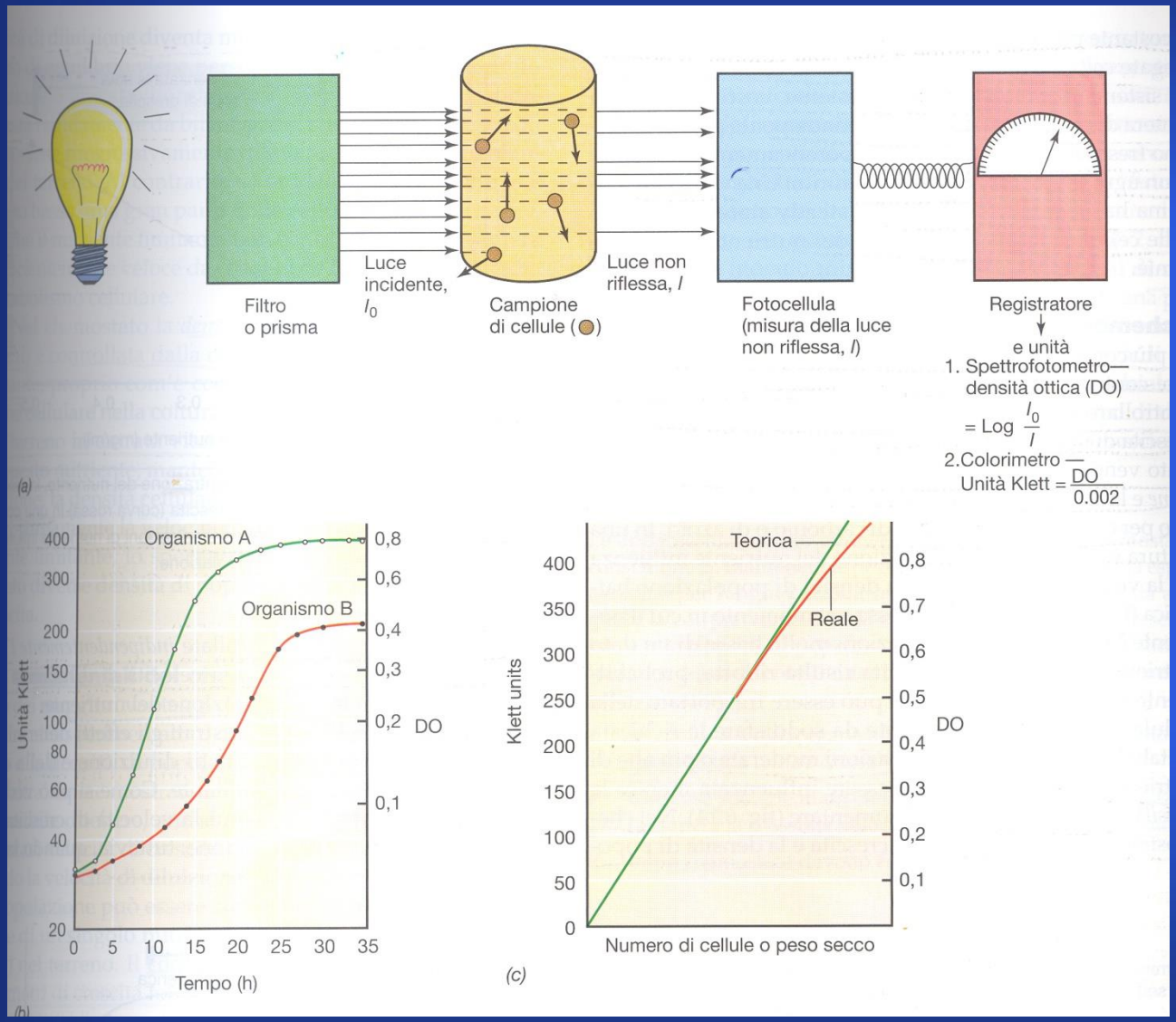
- Gli strumenti utilizzati per tale misura sono il colorimetro o lo spettrofotometro che fanno passare la luce attraverso una sospensione cellulare misurando la quantità di luce non riflessa che riemerge. (trasmittanza)



colorimetro e spettrofotometro

- Il colorimetro utilizza un semplice filtro per cui la luce incidente che attraversa il campione ha una lunghezza d'onda relativamente precisa.
- Lo spettrofotometro, utilizzando un prisma o un reticolo di diffrazione, genera una luce incidente in una banda di lunghezze d'onda molto precisa. Per determinare la torbidità batterica le lunghezze d'onda comunemente impiegate comprendono i 540 nm (verde), i 600 nm (arancione) e i 660 nm (rosso).
- Gli apparecchi che invece valutano la quantità di luce riflessa prendono il nome di nefelometri.
- Entro certi limiti, la misura della torbidità può essere ragionevolmente accurata, ha il vantaggio di essere rapida e facile da eseguire senza danneggiare il campione e quindi spesso impiegata per seguire la velocità di crescita delle colture microbiche.

Misure di torbidità della crescita microbica con spettrofotometro e colorimetro



La fotocellula misura la luce incidente non dispersa dalle cellule in sospensione e fornisce dati come densità ottiche (-log T) o unità colorimetriche

Relazione tra numero di cellule e dati di torbidità. Il rapporto 1:1 tra queste relazioni viene a mancare a condizioni di elevata torbidità

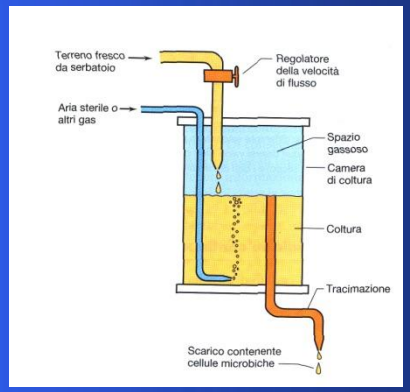
Tipiche curve di crescita di due microrganismi che crescono con differente velocità

Studio della crescita

Crescita di una popolazione batterica in coltura liquida:

- Coltura a termine o in “batch”
- Coltura in continuo o in chemostato

Coltura in continuo

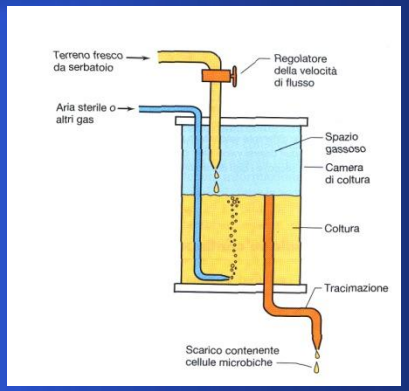


- Per lo studio di numerosi processi fisiologici e biochimici dei microrganismi molto utili sono le colture continue che permettono di prolungare la fase di crescita esponenziale (giorni, settimane).

- **Un sistema di coltura continua è un sistema di flusso a volume costante,**

costituito da una camera di crescita in cui viene continuamente aggiunto terreno fresco e da cui viene contemporaneamente allontanato un uguale volume di terreno esaurito.

chemostato



- Una volta che il sistema ha raggiunto l'equilibrio (steady state), il numero di cellule e la concentrazione di nutrienti rimane costante.
- Nella camera di crescita il controllo dell'ossigenazione, del pH e della temperatura è ottenuto con opportuni sistemi automatici.

L'apparecchio comunemente usato per le colture continue è **il chemostato**, che consente di controllare indipendentemente sia:

- la **densità di popolazione (numero di cellule/ml)**
- **che la velocità di crescita (variazione del n°di cellule nell'unità di tempo)**

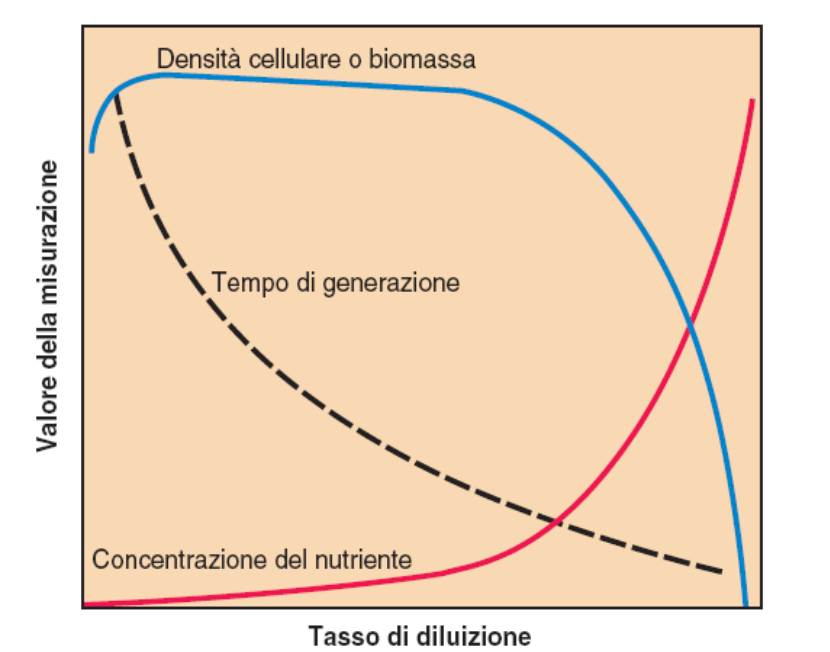
di una coltura.

chemostato

- La **densità di popolazione** è determinata dalla concentrazione del nutriente limitante,
- mentre **la velocità di crescita** è determinata dalla velocità di flusso o tasso di diluizione.

Se nel terreno in entrata viene aumentata la concentrazione del nutriente limitante, mantenendo costante la velocità di flusso, la densità cellulare aumenterà.

Con le colture continue variando opportunamente la velocità di diluizione e la concentrazione di nutriente limitante, si possono ottenere densità di popolazione a diverse velocità di crescita secondo le esigenze.

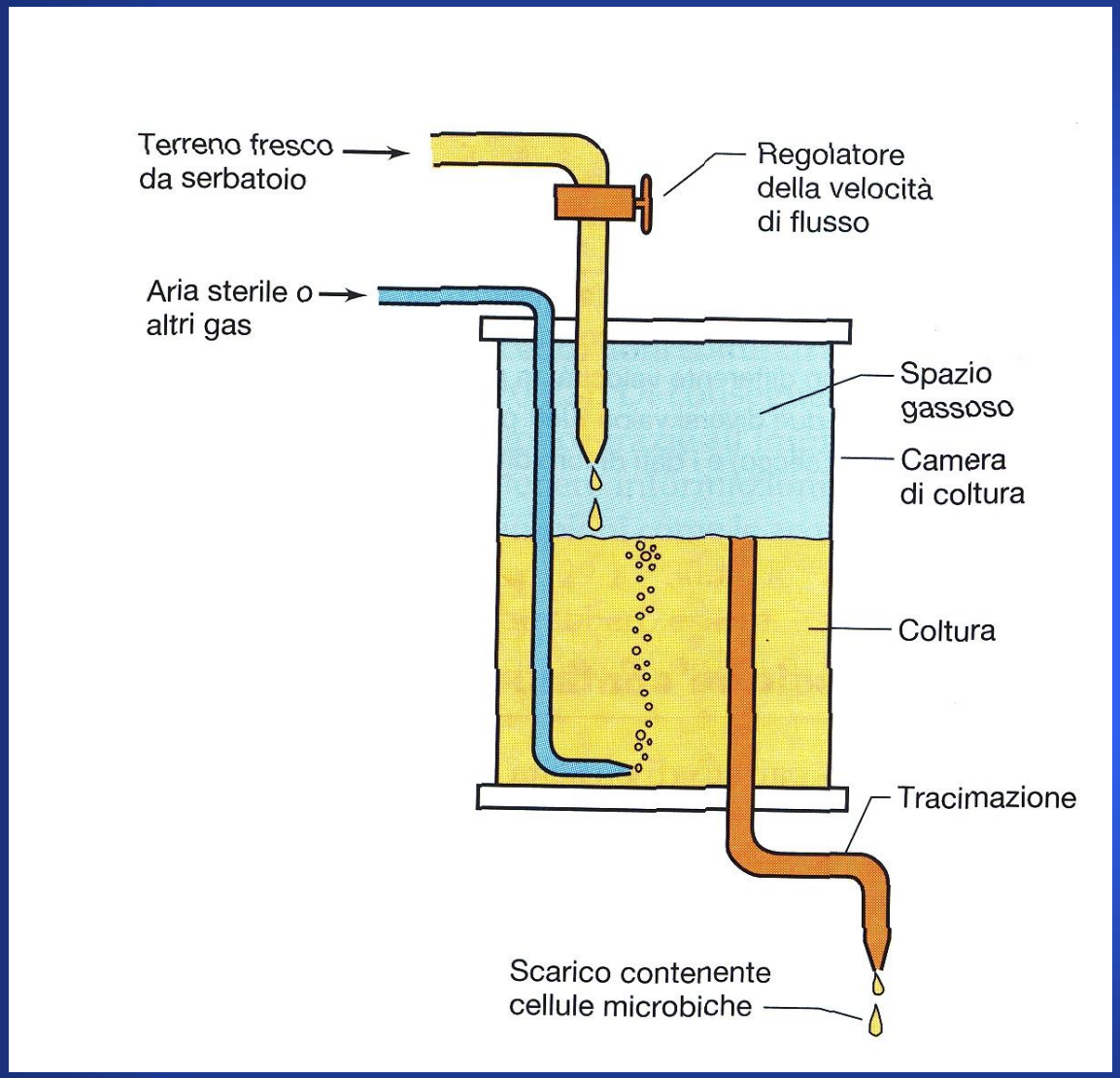


nota: la densità cellulare è mantenuta in un grande intervallo di tasso di diluizione ed il chemostato funziona al meglio ad un basso tasso di diluizione

chemostato

- Il chemostato è utilizzato in studi di ecologia microbica permettendo l'analisi di popolazioni batteriche miste e di indagare il fenomeno della competitività nei confronti del nutriente limitante.
- Con terreni di arricchimento permette inoltre di isolare batteri da un inoculo misto: recentemente è stato isolato un batterio con un tempo di duplicazione di 6 minuti, il più veloce conosciuto.

Chemostato

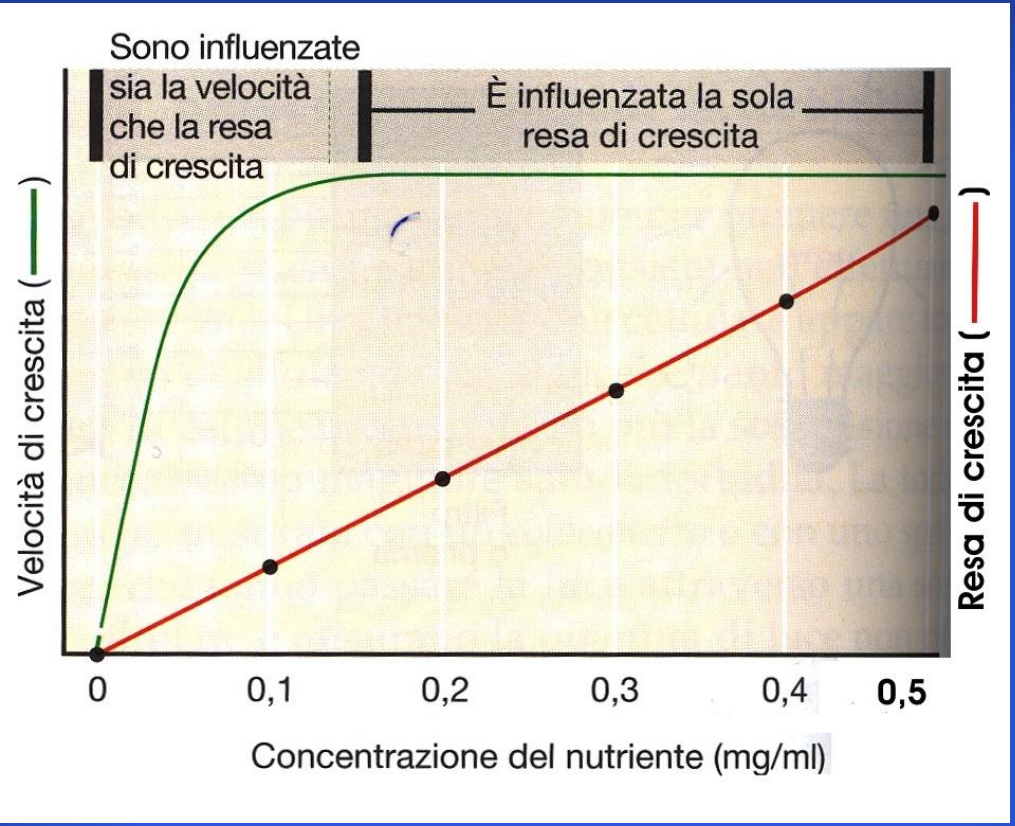


- La **resa (densità di popolazione)** può essere regolata variando la concentrazione del nutriente limitante, rappresentato da una fonte di carbonio o di azoto

- La **velocità di crescita** può essere regolata variando il flusso del terreno, ovvero la velocità di flusso

Schema di un chemostato per l'allestimento di colture continue : la coltura cresce in uno stato di equilibrio permanente

Coltura in batch



In una coltura in batch la concentrazione di nutriente invece influenza sia la densità di popolazione che la velocità di crescita.

I principali fattori che svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della crescita microbica sono:

- **temperatura**
- **pH**
- **disponibilità di acqua**
- **ossigeno**
- **pressione**

Tabella 5.3
Risposte microbiche ai fattori ambientali

Termine descrittivo	Definizione	Specie microbiche rappresentative
Soluti e attività dell'acqua		
Osmotolleranti	Capaci di crescere su ampi intervalli di valori di attività dell'acqua o di concentrazione osmotica	*Staphylococcus aureus, Saccharomyces rouxii*
Alofili	Per crescere necessitano di alti livelli di cloruro di sodio, in genere superiori a 0,2 M.	*Halobacterium, Dunaliella, Ectothiorhodospira*
pH		
Acidofili	Valore di pH ottimale per la crescita compreso tra 0 e 5,5.	*Sulfolobus, Picrophilus, Ferroplasma, Acontium, Cyanidium caldarium*
Neutrofili	Valore di pH ottimale per la crescita compreso tra 5,5 e 8,0.	*Escherichia, Euglena, Paramecium*
Alcalofili	Valore di pH ottimale per la crescita compreso tra 8,5 e 11,5	*Bacillus alcalophilus, Natronobacterium*
Temperatura		
Psicrofili	Crescono bene a 0 °C e la temperatura ottimale per la crescita è di 15 °C o inferiore.	*Bacillus psychrophilus, Chlamydomonas nivalis*
Psicrotrofi	Crescono a 0-7 °C e la temperatura ottimale per la crescita è compresa fra 20 e 30 °C, mentre il massimo è intorno a 35°C.	*Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens*
Mesofili	La temperatura ottimale per la crescita è di circa 20-45 °C.	*Escherichia coli, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis*
Termofili	Possono crescere a temperature di 55 °C o superiori; la temperatura ottimale è spesso compresa fra 55 e 65 °C	*Bacillus stearothermophilus, Thermus aquaticus, Cyanidium caldarium, Chaetomium thermophile*
Ipertermofili	La temperatura ottimale è compresa fra 80 e 113 °C circa	*Sulfolobus, Pyrococcus, Pyrodictium*
Concentrazione di ossigeno		
Aerobi obbligati	Crescita completamente dipendente dall'O_2 atmosferico	*Micrococcus luteus, Pseudomonas, Mycobacterium;* most algae, fungi, and protozoa
Anaerobi facoltativi	Non richiedono O_2 per crescere, ma in sua presenza crescono meglio.	*Escherichia, Enterococcus, Saccharomyces cerevisiae*
Anaerobi aerotolleranti	Crescono ugualmente bene in presenza o in assenza di O_2	*Streptococcus pyogenes*
Anaerobi obbligati	Non tollerano l'O_2 e muoiono se è presente	*Clostridium, Bacteroides, Methanobacterium, Trepomonas agilis*
Microaerofili	Per crescere necessitano di livelli di O_2 inferiori al 2-10% e sono danneggiati dall'O_2 atmosferico (20%)	*Campylobacter, Spirillum volutans, Treponema pallidum*
Pressione		
Barofili	Crescita più rapida a valori elevati di pressione idrostatica	*Photobacterium profundum, Shewanella benthica, Methanococcus jannaschii*

Temperature cardinali

Per ogni organismo è possibile definire:

- una temperatura minima, al di sotto della quale non si ha crescita;
- una temperatura ottimale, alla quale si ha la massima velocità delle reazioni metaboliche e di crescita;
- una temperatura massima, al di sopra della quale non si ha crescita.

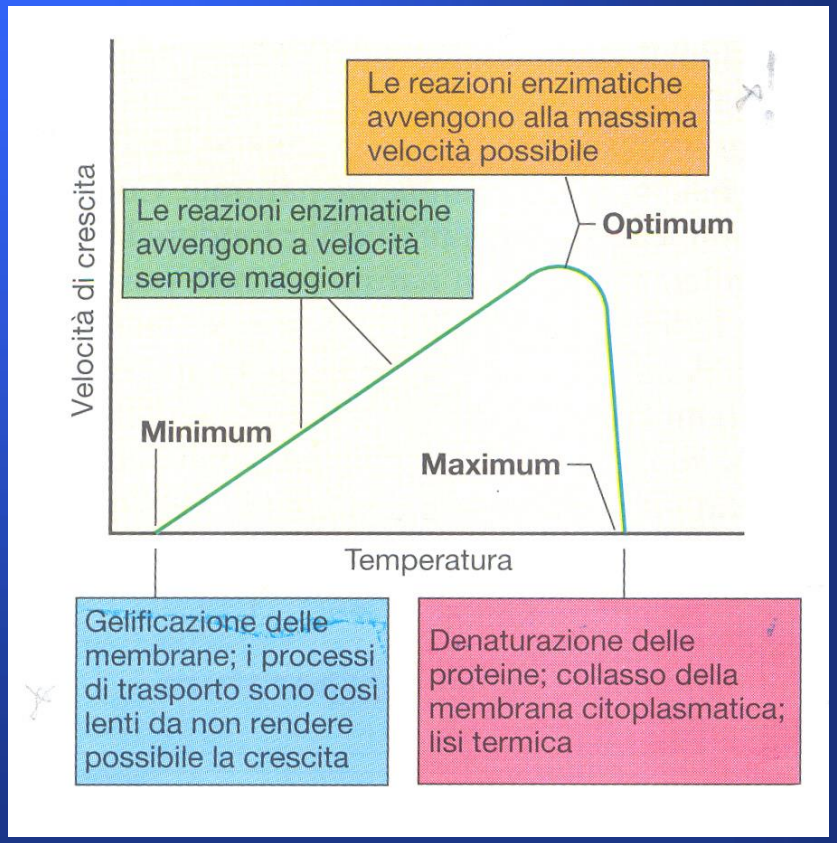
Temperature cardinali

Esiste dunque sia un intervallo di temperatura in cui le funzioni metaboliche e la crescita aumentano, sia un punto in cui iniziano reazioni di inattivazione con azzeramento delle funzioni cellulari.

La temperatura massima è determinata dalla denaturazione delle proteine aventi un ruolo fondamentale nell'economia cellulare con collasso della membrana citoplasmatica e lisi termica

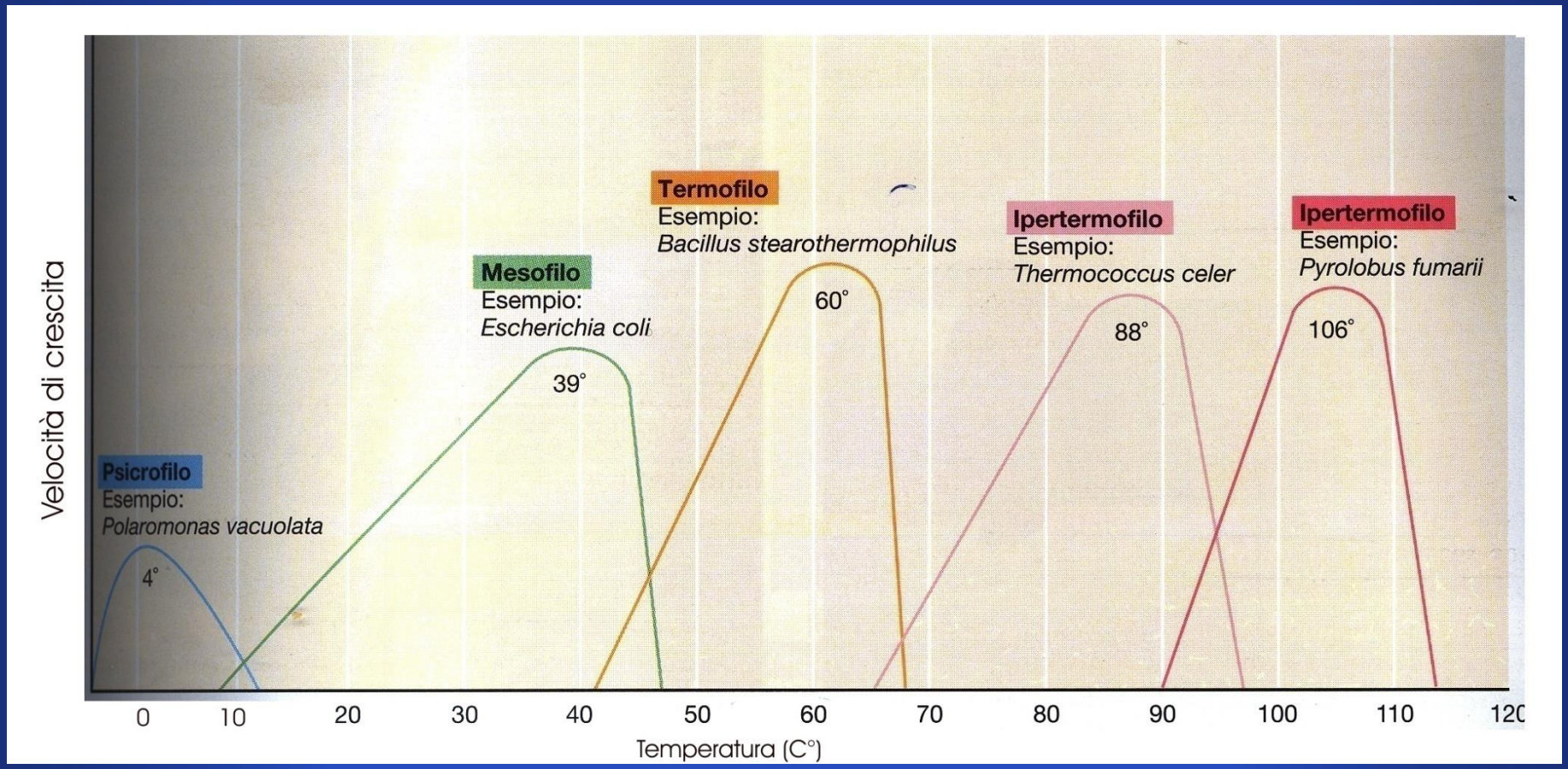
Il minimo di temperatura compatibile con la crescita è determinato probabilmente dal punto in cui la membrana per irrigidimento (gelificazione) non riesce più a svolgere le sue funzioni di trasporto di nutrienti e formazione di un gradiente protonico.

In un terreno complesso, la temperatura ottimale di E. coli è 39°C, la massima 48°C e la minima 8°C.



Effetto della temperatura sulla velocità di crescita e conseguenze a livello molecolare

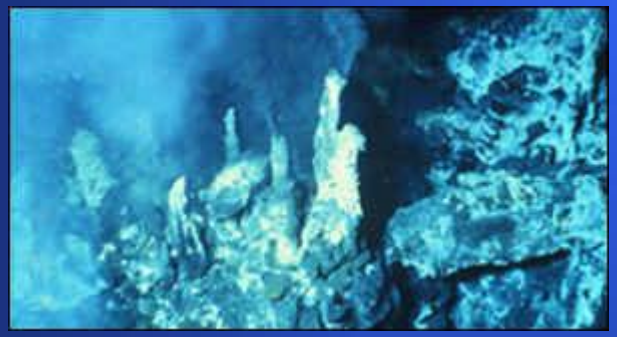
Relazione tra temperatura e velocità di crescita

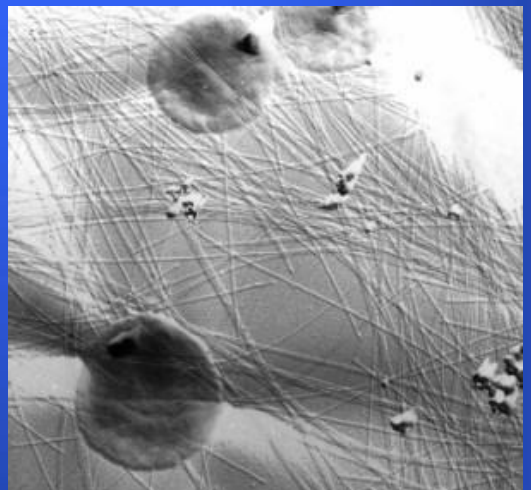


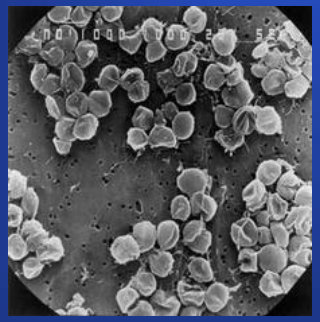
In funzione della temperatura ottimale i microrganismi possono essere suddivisi in 4 gruppi principali: psicrofili, con optimum a basse temperature; mesofili, con temperature ottimali di crescita medie; termofili, con temperature ottimali elevate; ipertermofili, con temperature ottimali estremamente elevate. Microrganismi evoluti per crescere in modo ottimale in habitat naturali con temperature estremamente calde o fredde sono definiti estremofili.

Ipertermofili

Pyrococcus abyssi e Pyrodictium occultum: Due specie ipertrmofile marine, ritrovate in punti particolarmente caldi del fondo oceanico







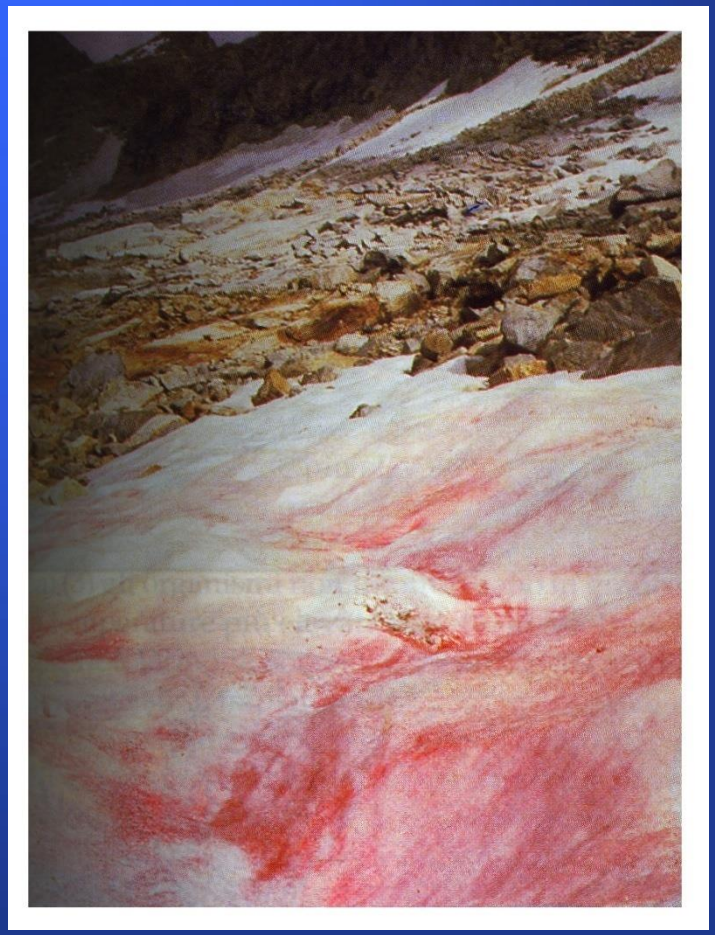
Pyrococcus abyssi

A hyperthermophilic bacterium with a metabolic optimum of 105 celsius, P. occultum is found living within submarine volcanic vents where it attaches itself to underlying rocks with a network of proteinaceous fibres.

It is lithoautotrophic, obtaining energy by oxidising hydrogen with sulphur, and gaining biomass by fixing carbon dioxide. Venus after the "Big Rain" would be paradise for such an organism.

Gli psicrofili

- Gli psicrofili hanno una temperatura ottimale di 5 °C (massima 20°C, minima 0°C) e vivono in ambienti freddi come le regioni polari.
- Maggiormente studiate sono le alghe psicrofile presenti sulla superficie di nevai e ghiacciai, ai quali impartiscono, per effetto della loro crescita, una caratteristica colorazione rossa o verde.
- La più comune alga della neve è *Chlamydomonas nivalis*, le cui spore dal colore rosso brillante sono responsabili della colorazione rossa delle superfici innevate.

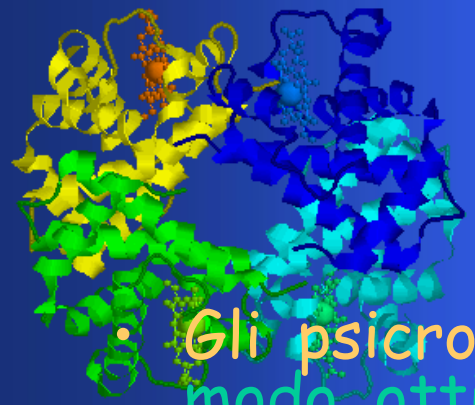


Nevaio della Sierra Nevada (California) con evidente colorazione rossa causata dalla presenza di alghe della neve *Chlamydomonas nivalis*

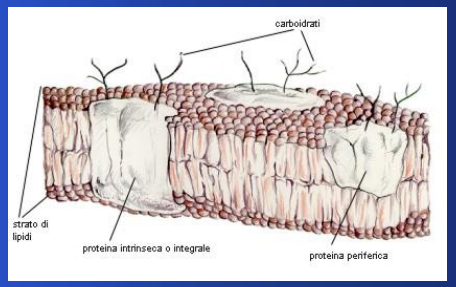
Gli organismi psicrotolleranti

- Gli organismi psicrotolleranti (batteri, alghe, funghi e protozoi) hanno un optimum di temperatura compreso tra 20 e 40°C ma sono capaci di crescere anche a 0°C.
- Ampiamente distribuiti in acqua e suolo di climi temperati, possono essere isolati anche da molti alimenti refrigerati a 4°C. (appartenenti a diversi ordini batterici)

- Nei climi temperati il periodico innalzamento delle temperature, durante il periodo estivo, costituisce una pressione selettiva in grado di favorire le specie psicrotolleranti rispetto alle psicrofile.

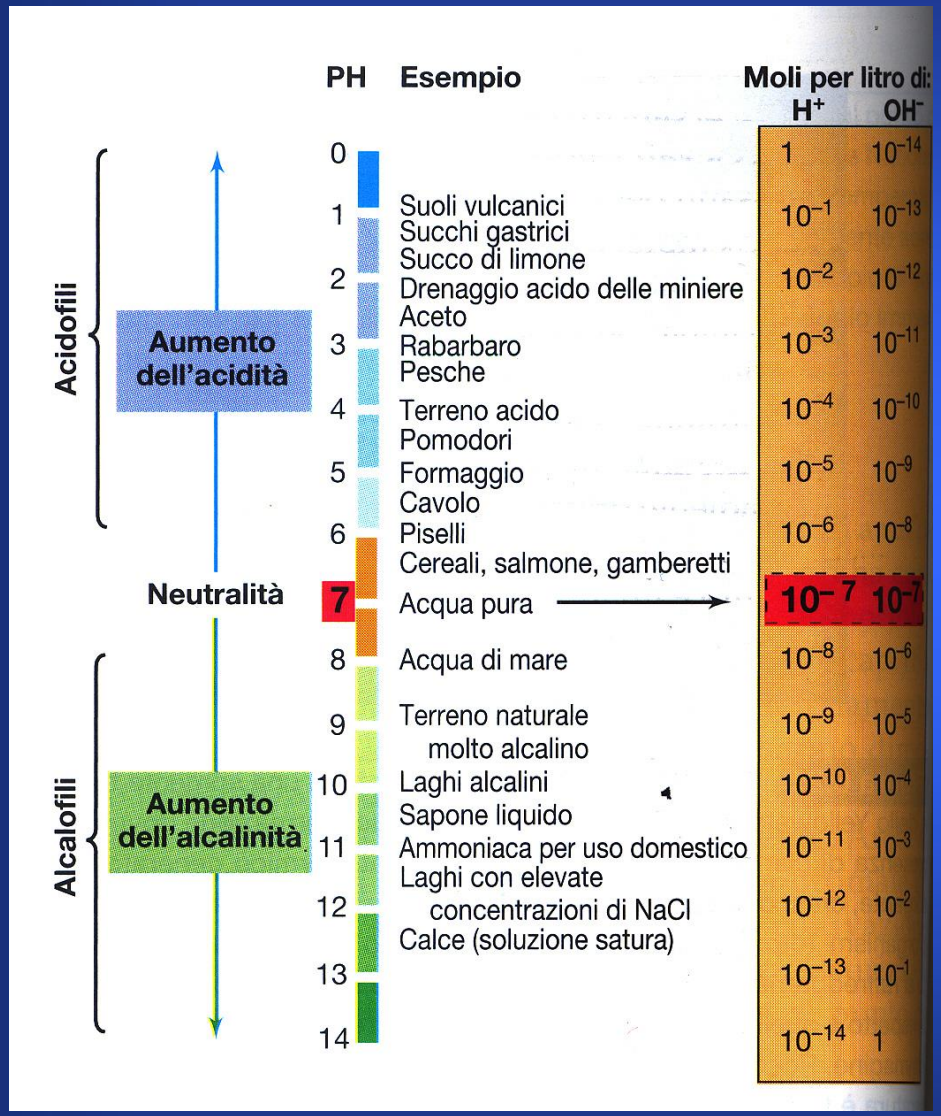


Gli psicrofili



- Gli psicrofili producono enzimi che funzionano in modo ottimale in ambiente freddo e che spesso vengono inattivati anche da temperature moderate.
- Questi enzimi hanno una **maggiore quantità di a-eliche** rispetto ai foglietti-b ed un **maggior contenuto di aminoacidi polari rispetto a quelli idrofobici,** caratteristiche che conferiscono una maggiore flessibilità alle proteine a basse temperature.
- La membrana citoplasmatica di questi microrganismi contiene una notevole quantità di acidi grassi insaturi (anche polinsaturi), responsabili del mantenimento della fluidità della membrana capace di realizzare un efficiente trasporto attivo anche a basse temperature.

Il pH e la crescita microbica



Ogni organismo cresce in un determinato intervallo di pH, all'interno del quale è possibile individuare un pH ottimale.

La maggior parte degli ambienti naturali ha valori di pH compresi tra 5 e 9 corrispondente al pH ottimale più comune tra i microrganismi.

Il pH ottimale di crescita rappresenta solo il pH dell'ambiente extracellulare; il pH intracellulare deve rimanere vicino alla neutralità in modo da impedire la distruzione delle macromolecole cellulari acido- o alcalino-labili.

Negli acidofili e basofili estremi il pH intracellulare può variare di qualche unità dalla neutralità

Scala del pH: sebbene alcuni microrganismi possano vivere a pH molto bassi o molto alti, il pH interno rimane vicino alla neutralità

Acidofili

- Microrganismi estremofili che crescono meglio a pH molto bassi sono detti **acidofili.**

- Alcuni batteri acidofili sono acidofili obbligati ovvero incapaci di crescere a pH neutro (Thiobacillus, Thermoplasma e Ferroplasma).

- Il componente cellulare che conferisce le caratteristiche di acidofilo obbligato è la membrana citoplasmatica, la cui stabilità è mantenuta da elevate concentrazioni di ioni idrogeno

Ferroplasma acidiphilum

Basofili

- Microrganismi estremofili con pH ottimale di crescita elevato, prossimo a 10, sono noti come **basofili (alcalofili estremi)** e molti appartengono al genere **Bacillus**.

I batteri alcalofili producono ciclodestrine, alcune specie producono proteine con attività antibatterica e antifungina.

- Alcuni basofili sono impiegati nelle industrie perché producono enzimi idrolitici, come proteasi e lipasi, che funzionano bene a pH alcalini e vengono impiegati come additivi nei detersivi.

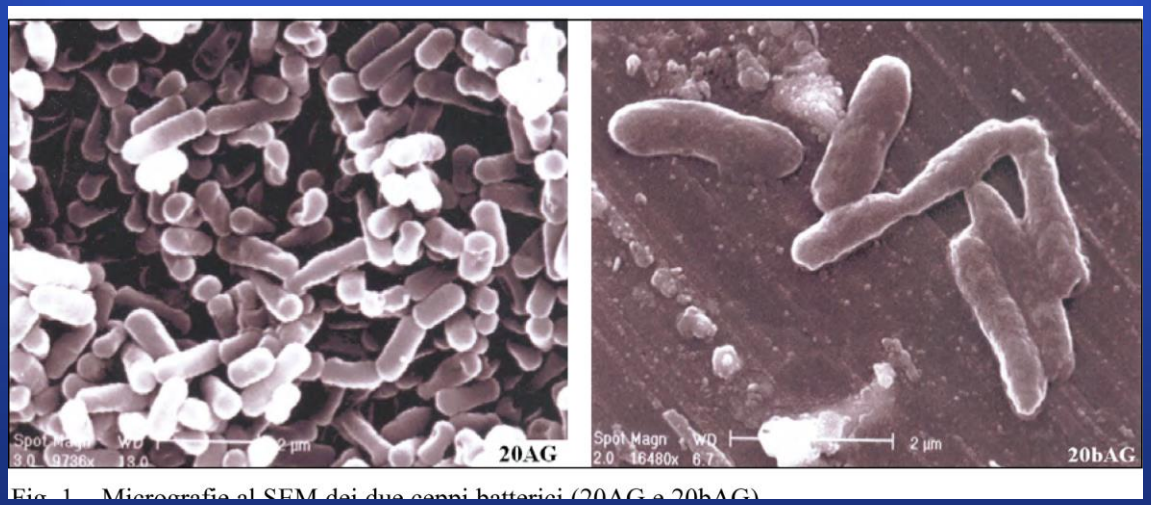
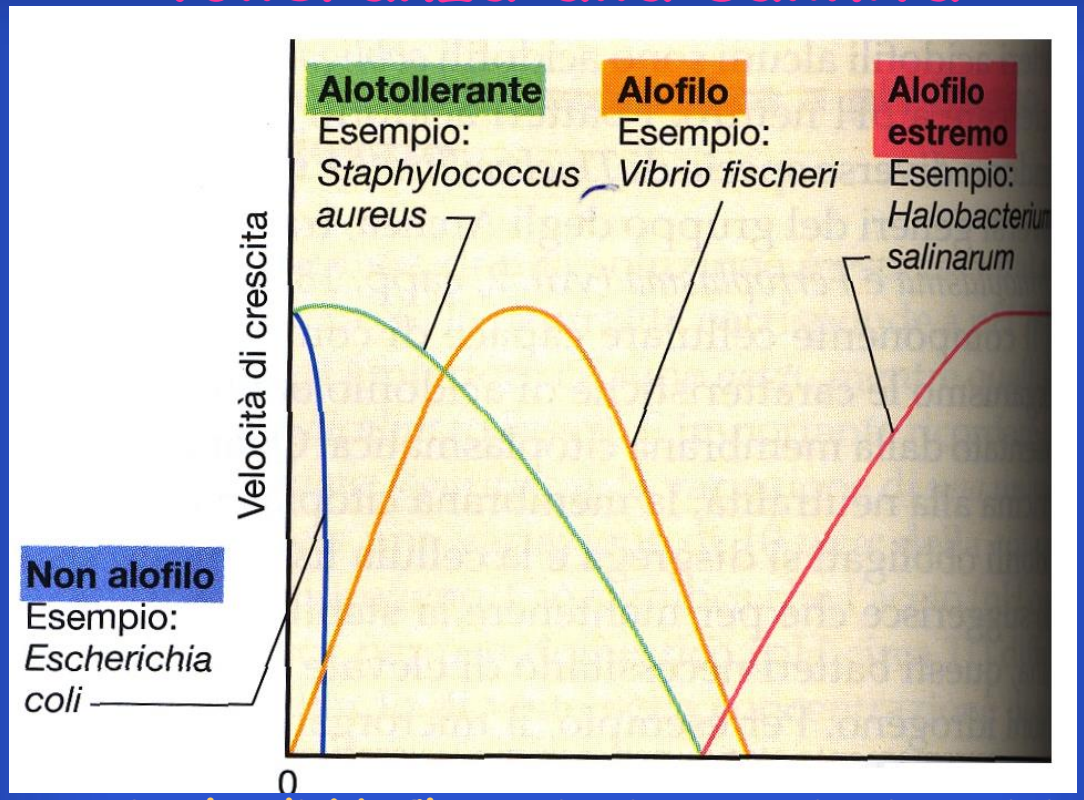


Fig. 1 – Micrografie al SEM dei due ceppi batterici (20AG e 20bAG)

Bacillus ed Halomonas

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



La concentrazione ottimale di NaCl per i microrganismi marini (alofili) è circa il 3%

Gli organismi alotolleranti resistono a lievi riduzioni dell'attività dell'acqua ma crescono meglio in assenza di soluti aggiunti.

Gli organismi capaci di vivere in condizioni di elevata salinità sono chiamati alofili estremi (15-30% di NaCl)

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

- La maggior parte dei microrganismi è incapace di crescere in ambienti in cui l'attività dell'acqua è molto bassa, dove in genere si disidratano e muoiono oppure rimangono dormienti. (plasmolisi)

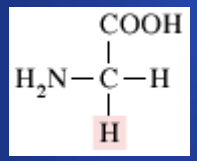
- I microrganismi marini hanno una specifica richiesta di ioni sodio e per poter svolgere in modo ottimale le loro attività fisiologiche l'attività dell'acqua deve essere simile a quella marina.

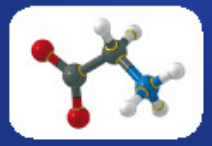
- Questi microrganismi sono definiti alofili (basso alofilo e moderato alofilo rispettivamente per bassa, 1-6%, o moderata, 6-15%, richiesta di NaCl).

Aw e soluti compatibili

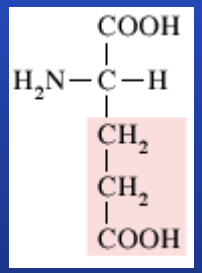
Quando un organismo cresce in un mezzo a bassa attività d'acqua, può ottenere l'acqua dall'ambiente circostante solo aumentando la concentrazione di soluti al suo interno.

I soluti utilizzati per regolare l'attività dell'acqua all'interno del citoplasma non devono inibire i processi biochimici della cellula stessa e vengono chiamati soluti compatibili (glicina, betaina,colina, prolina, glutammato, saccarosio, mannitolo).

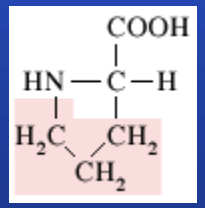




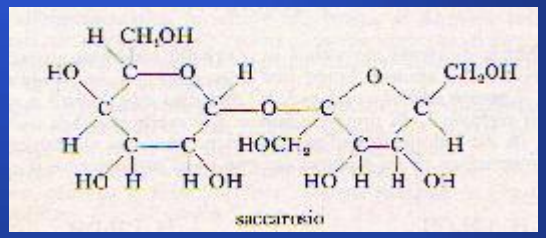
glicina

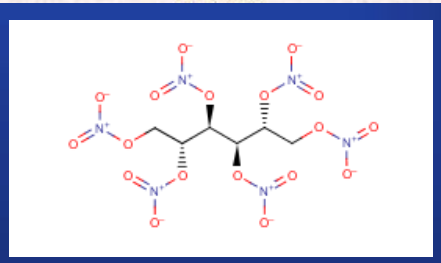


glutammato



prolina





mannitolo

Aw e soluti compatibili

Alofilo estremo che accumula enormi concentrazioni di K+ per mantenere l'equilibrio osmotico con l'ambiente circostante.
La membrana e la parete sono stabilizzate da elevate concentrazioni di ioni Na+

Halobacterium salinarum species NRC-1 growing around/on salt crystals on a dried-out plate

Altri effetti ambientali…

- osmofili e osmotolleranti: capaci di crescere su ampi intervalli di valori di Aw o di pressione osmotica; (*Staphylococcus, Saccharomyces*)

- Xerofili e xerotolleranti: quelli che vivono in ambienti molto secchi.

Contaminazione microbica degli alimenti
(batteri e funghi)

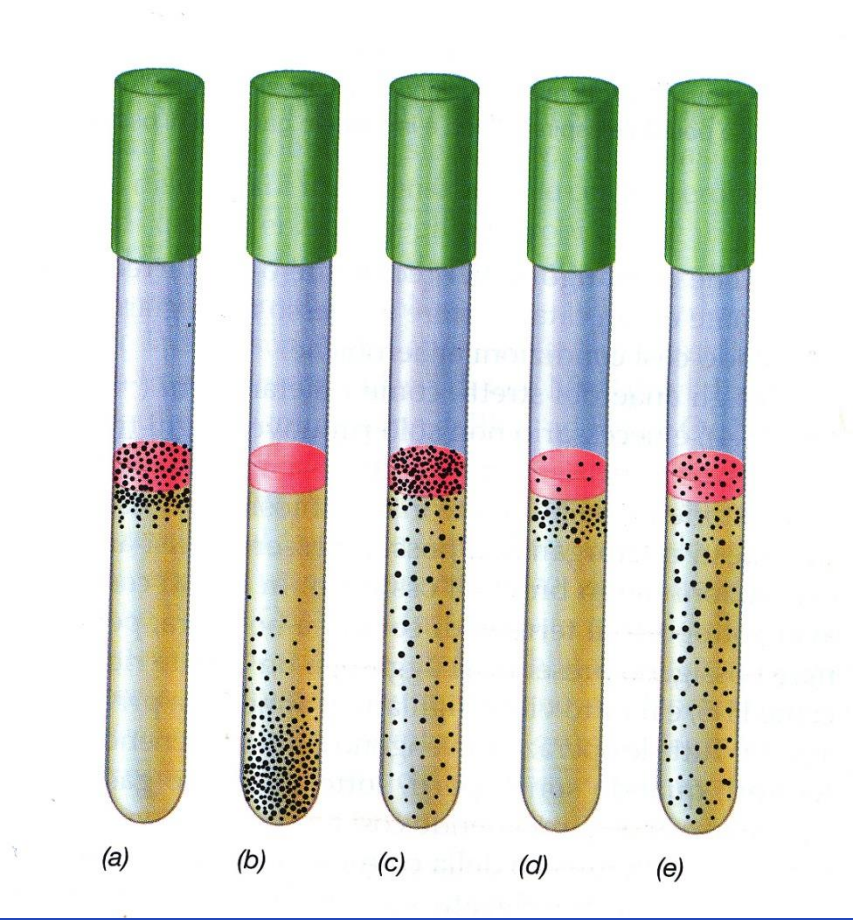
Effetti dell'ossigeno sui batteri

I microrganismi variano nella loro necessità e tolleranza all'ossigeno

- AEROBI OBBLIGATI: completamente dipendenti dall'ossigeno atmosferico
- ANAEROBI FACOLTATIVI: possono crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno; ma in sua presenza crescono meglio
- MICROAEROFILI: richiedono piccolissime quantità di ossigeno (2%), che ad elevate concentrazioni risulta tossico (20%: ossigeno atmosferico)
- ANAEROBI AEROTOLLERANTI: incapaci di usare l'ossigeno nel loro metabolismo; crescono sia in sua presenza che assenza
- ANAEROBI OBBLIGATI (stretti): danneggiati dall'ossigeno: muoiono se presente O2

Aerobi obbligati	Anaerobi facoltativi	Anaerobi aerotolleranti	Anaerobi stretti	Microaerofili
Contenuto enzimatico				
+ SOD + Catalasi	+ SOD + Catalasi	+ SOD – Catalasi	– SOD – Catalasi	+ SOD +/– Catalasi (bassi livelli)

Effetti dell'ossigeno sulle colture microbiche



Distribuzione di batteri a) aerobi, b) anaerobi obbligati, c) anaerobi facoltativi, d) microaerofili ed e) anaerobi aerotolleranti in provette contenenti brodo tioglicolato

Effetti della pressione sulle colture microbiche

Barofili e barotolleranti:
crescono più rapidamente in presenza di elevate pressioni idrostatiche (Photobacterium, Shewanella, Colwellia)
Alcuni archebatteri sono termobarofili (Pyrococcus, Methanocaldococcus)