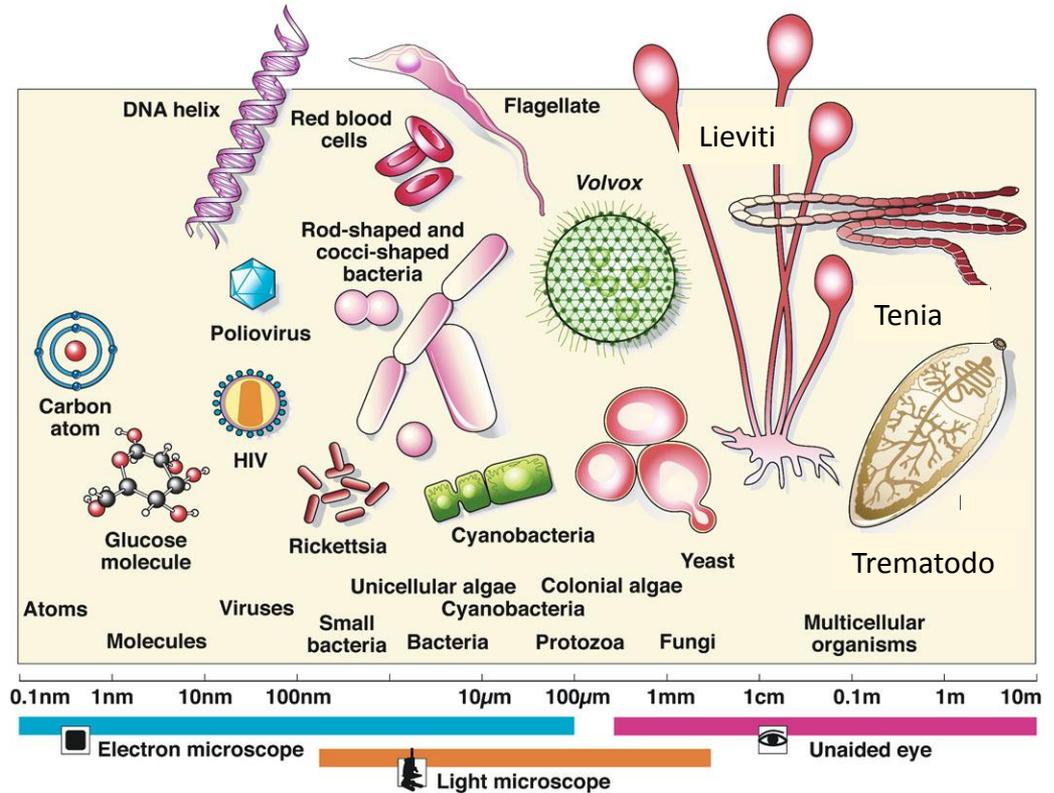


BATTERIOLOGIA DI BASE

MICROBIOLOGIA: studio della struttura e funzione dei microrganismi

MICRORGANISMI: organismi non visibili a occhio nudo (<0,1 mm)

Esempi di Dimensioni



Misure usate:

1 millimetro (mm)

$$0.001 \text{ m} = 10^{-3} \text{ m}$$

1 micrometro (μm)

$$0.000001 \text{ m} = 10^{-6} \text{ m}$$

1 nanometro (nm)

$$0.000000001 \text{ m} = 10^{-9} \text{ m}$$

AGENTI INFETTANTI

Eucarioti = con nucleo e membrana nucleare, architettura cellulare simile a quella degli organismi pluricellulari:

PROTOZOI (5-150 μm)

MICETI (funghi, 3-5 μm)

Procarioti = il materiale genetico non è racchiuso da membrana nucleare.

BATTERI = unicellulari, di varie forme (0,2-2 μm).

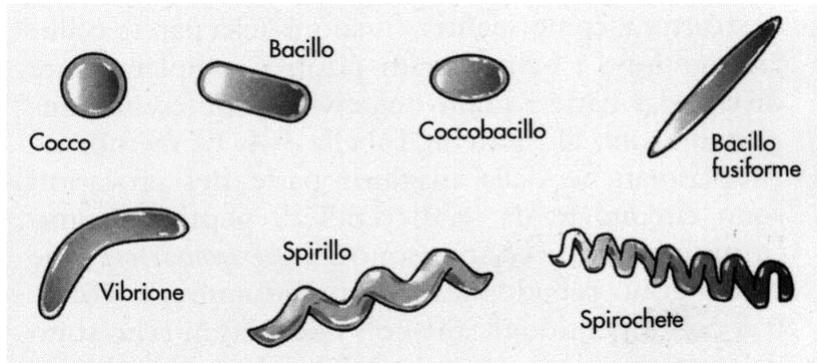
Virus = privi di qualsiasi struttura cellulare, “acellulari”, visibili solo al microscopio elettronico, struttura molto semplice, si possono riprodurre solo all’interno di una cellula. Formati solo da acido nucleico e proteine.

La cellula batterica

Dimensioni = ~ 0.2-2 μm di larghezza (mycoplasma)

~ 2 – 8 μm di lunghezza (spirochete)

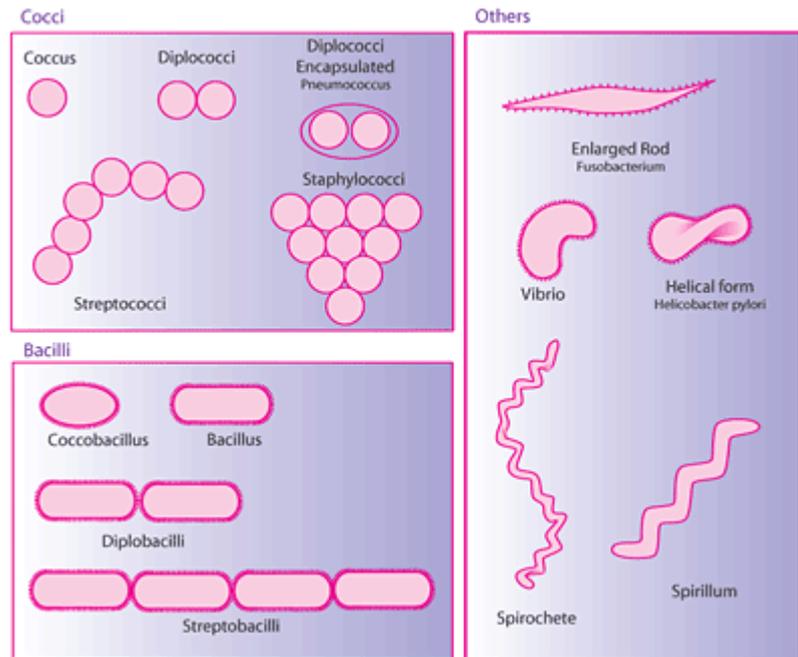
Forme = Cocco
Bacillo
Vibrione/Spirillo



Raggruppamento

Diplococchi,
Streptococchi,
Stafilococchi

Diplobacilli
Streptobacilli



Composizione chimica della CELLULA BATTERICA

80 % H_2O

Componenti inorganiche:

Na, K, Mg, Ca, Zn, Fe, P, S.

Componenti organiche:

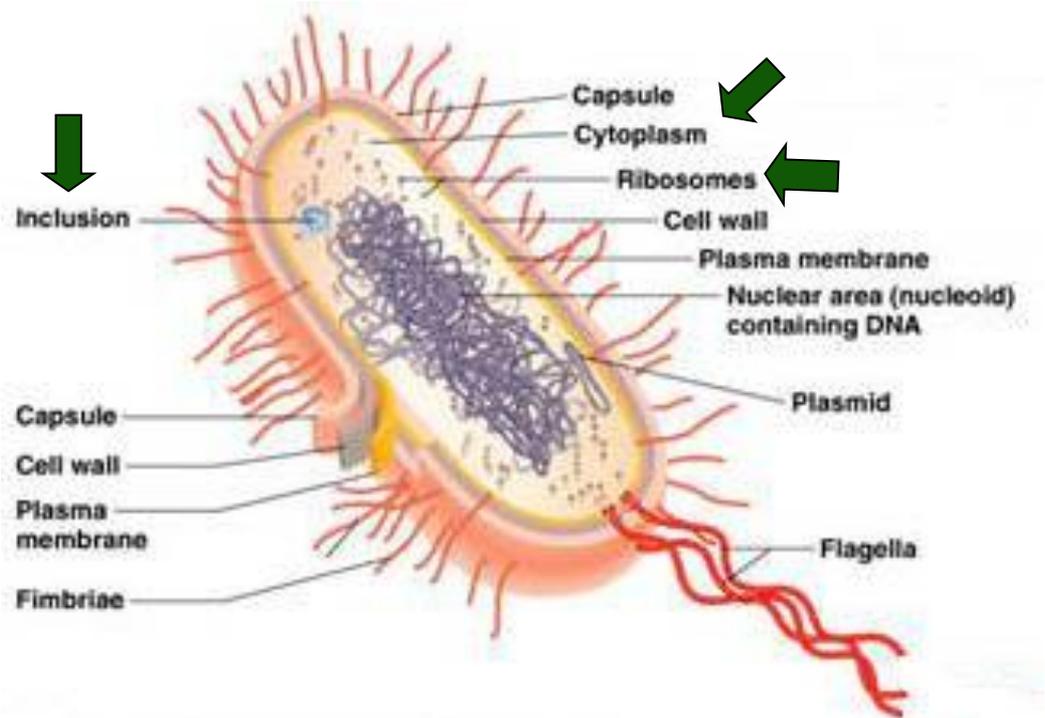
DNA, RNA, Proteine, Zuccheri, Lipidi

CITOPLASMA

Costituenti chimici = proteine, acidi nucleici, carboidrati, lipidi, ecc).

Non contiene organuli.

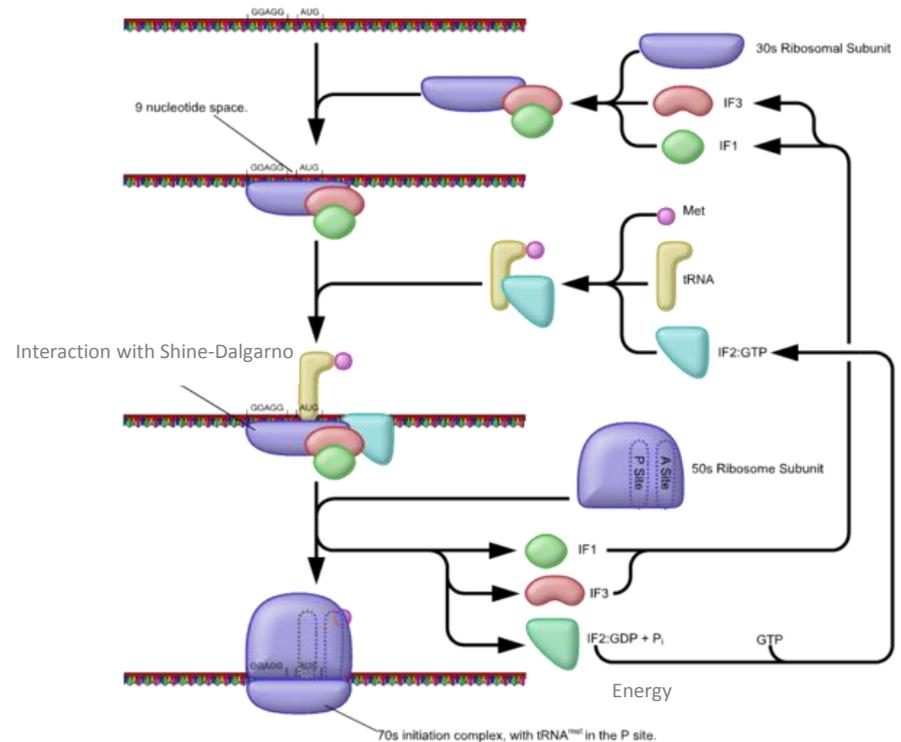
E' fortemente basofilo (più di quello delle cellule eucariotiche) in virtù dell'alto contenuto di RNA.



SINTESI PROTEICA

Trascrizione e traduzione accoppiate: mentre mRNA viene sintetizzato i ribosomi vi si possono legare per la sintesi proteica
Ribosomi 70S* (50S + 30S) (\neq ribosomi eucariotici: 40S + 60S)

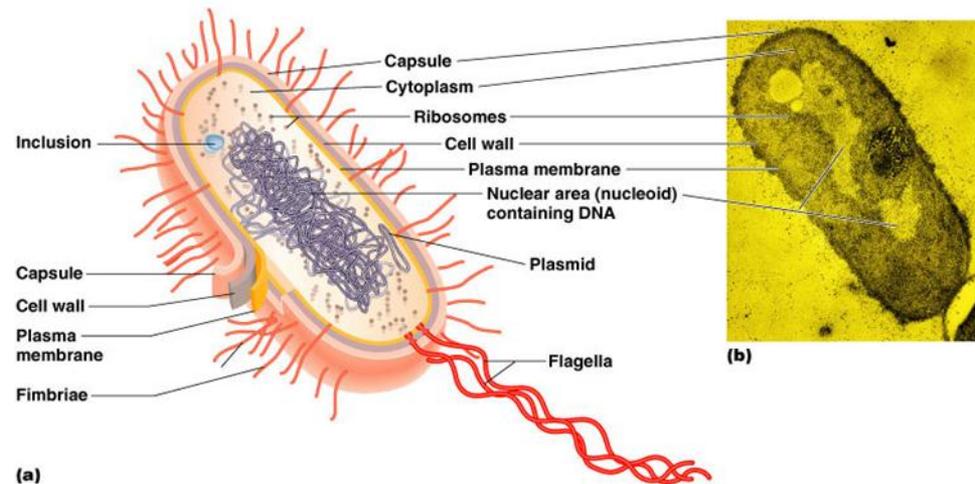
Legame initiation factors (IFs) all'Unità 30S e fMet-tRNA : si associano a mRNA
Per il reading frame, mRNA ha purine-rich - Shine-Dalgarno sequence (AGGAGG, sita fra i 3 e i 10 nucleotidi a monte del codone di inizio della traduzione), complementare a 30S.



*differenza importante per trattamento con antibiotici

INCLUSIONI

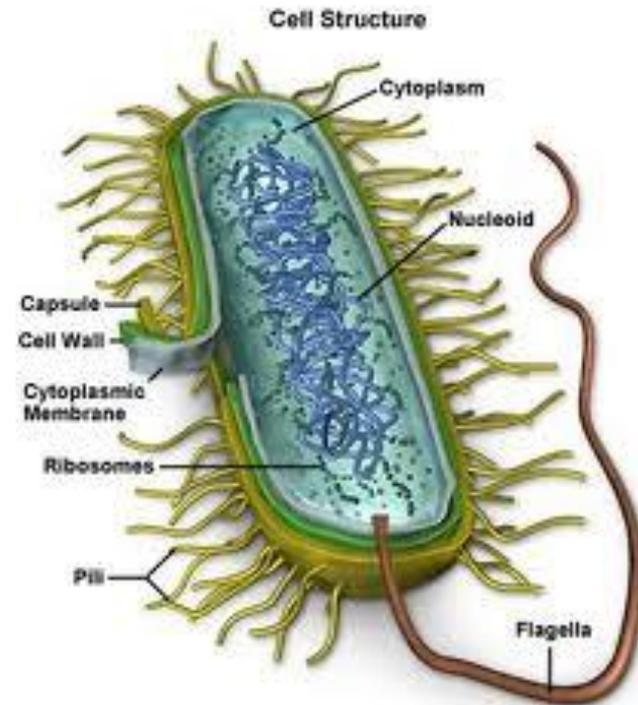
A volte presenti inclusioni citoplasmatiche di varia natura (per lo più materiale di riserva).



DNA CROMOSOMIALE

NUCLEOIDE = area separata della cellula dove si trova il DNA cromosomiale = una sola molecola di DNA, bicatenario, circolare (ad eccezione delle Borrelie e di altre Spirochete che hanno DNA lineare), strettamente raggomitolata e direttamente immersa nel citoplasma (lunga circa 1400 μm , 3×10^9 daltons in E. Coli).

Assenza di ISTONI



PLASMIDI

PLASMIDI = DNA EXTRACROMOSOMICO circolare, con replicazione autonoma rispetto al DNA genomico

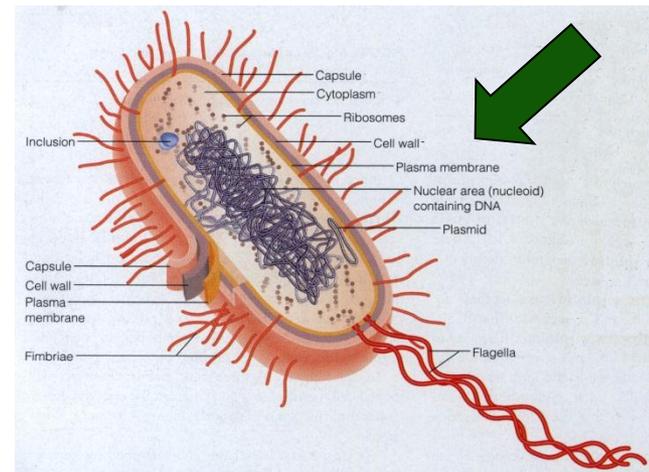
Codificano geni non essenziali ma offrono un vantaggio selettivo (es. resistenza a farmaci, coinvolti in meccanismi di scambio genetico, produzione di tossine, ecc).



MEMBRANA PLASMATICA

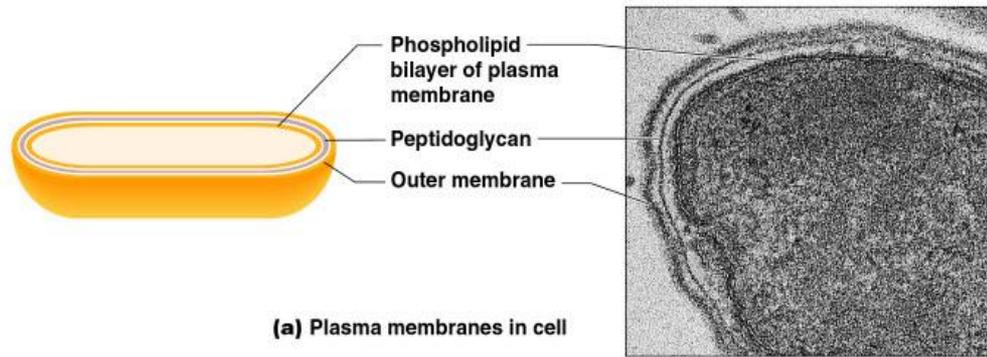
MEMBRANA PLASMATICA = doppio strato fosfolipidico, più flessibile della membrana eucariotica perché mancano gli steroli (COLESTEROLO)*.

**Contiene proteine per
trasporto di prodotti e nutrienti
pompe ioniche per potenziale membrana
enzimi per la respirazione
trasporto elettroni (energia)
filamenti proteici actino-simili (forma)**



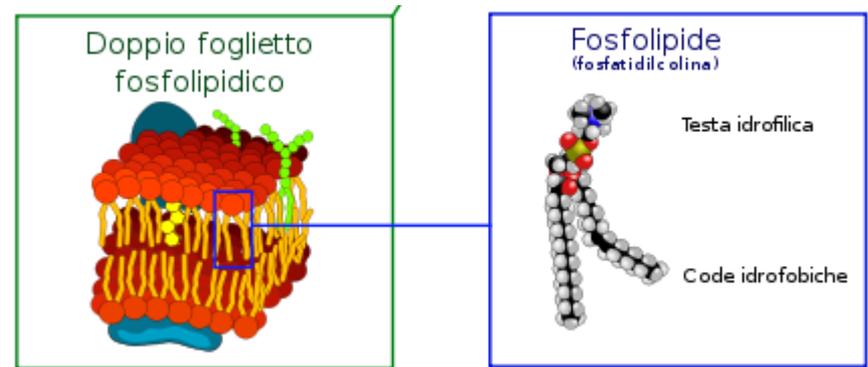
*eccezione micoplasmi

MEMBRANA PLASMATICA



Spessore 80Å
Steroli assenti

Proteine integrali e periferiche
Lipidi: doppio strato di fosfolipidi

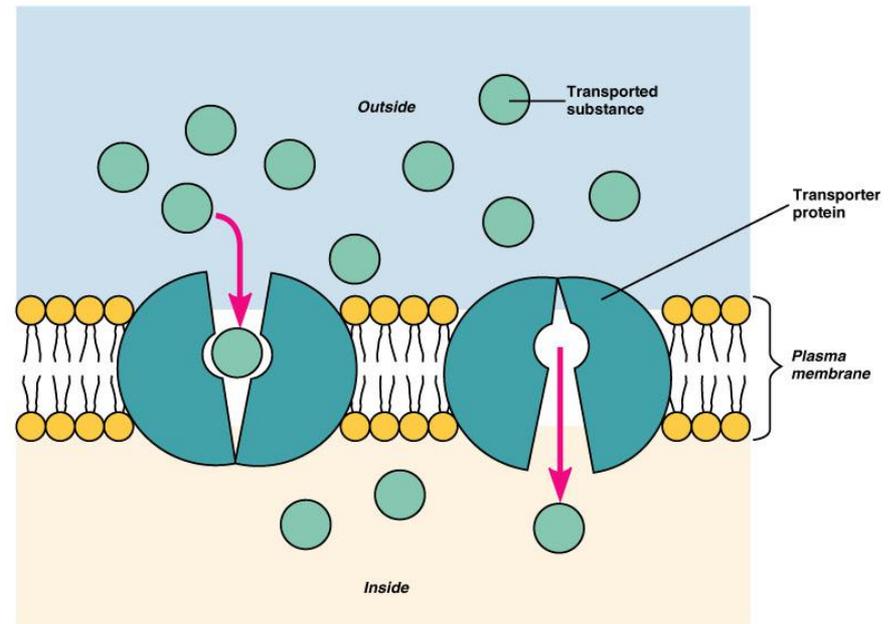


Fosfolipide : trigliceride con una testa polare idrosolubile a base di fosfato (ortofosfato PO_4^-) e una coda apolare non idrosolubile formata da catene alifatiche degli acidi grassi

FUNZIONI della membrana plasmatica:

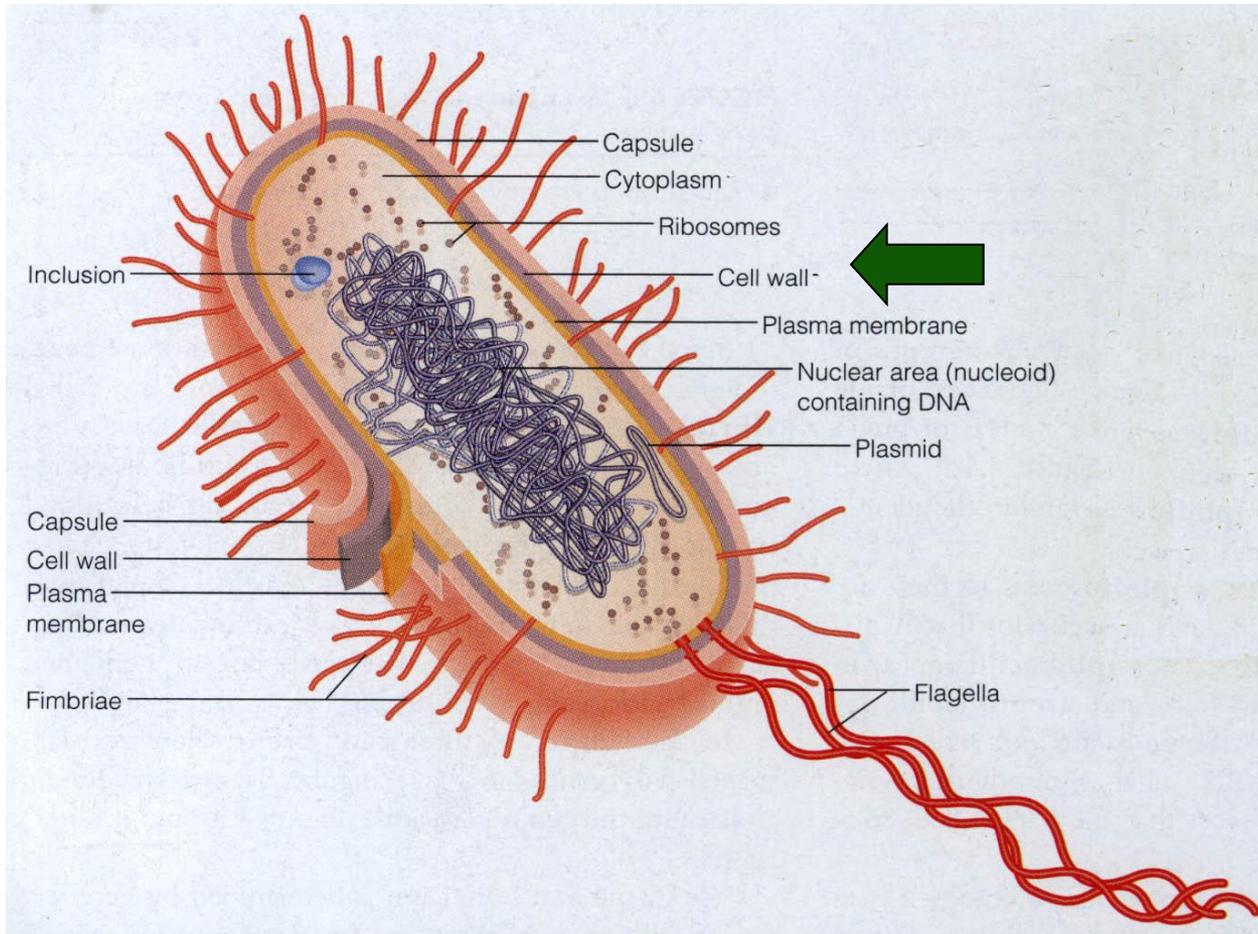
- ✓ **barriera selettiva: lascia passare per diffusione passiva (gradiente di concentrazione) solo piccole molecole: H_2O , O_2 , CO_2 , zuccheri semplici e alcune sostanze liposolubili.**
- ✓ **sistemi di trasporto attivo (pompe ioniche), necessitano energia sotto forma di ATP;**
- ✓ **produzione di energia (ATP) (trasportatori elettroni);**
- ✓ **processi biosintetici (es. sintesi di peptidoglicano).**

Trasporto ad opera di proteine



LA PARETE BATTERICA

E' un "contenitore" rigido che racchiude la cellula e ne condiziona la forma.



**Componente fondamentale =
Peptidoglicano, composto da 2 carboidrati
azotati:**

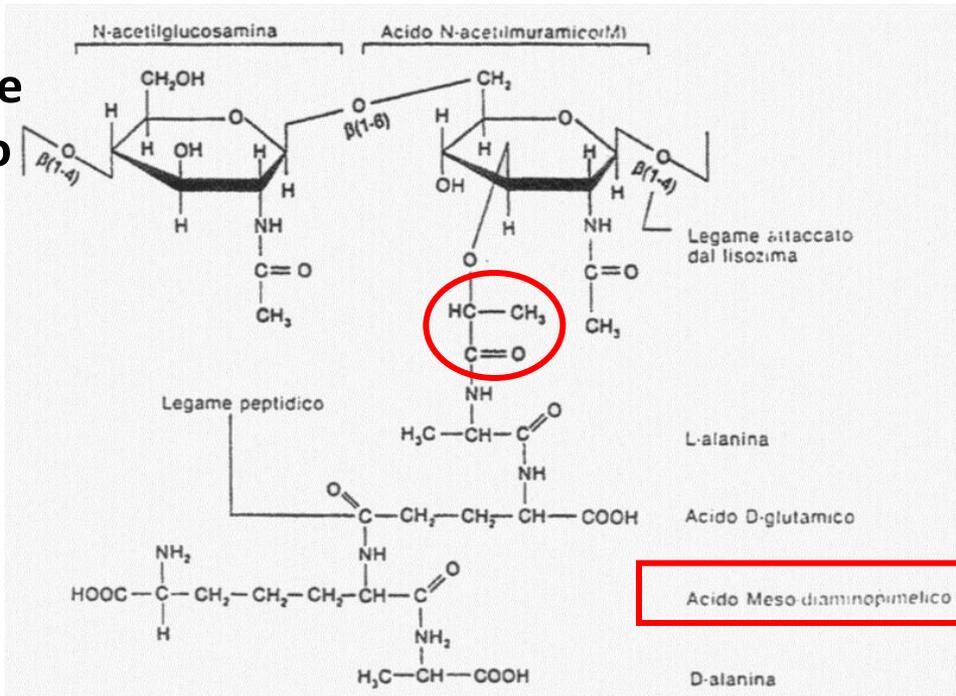
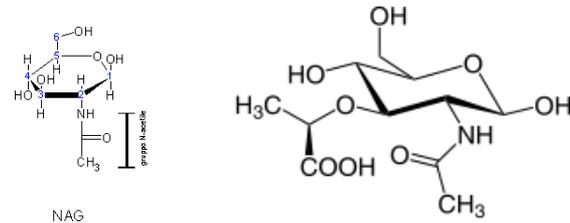
**N-acetilglucosamina (NAGA)
Acido N-acetilmuramico (NAMA)**

} **legati da legame $\beta(1-6)$**

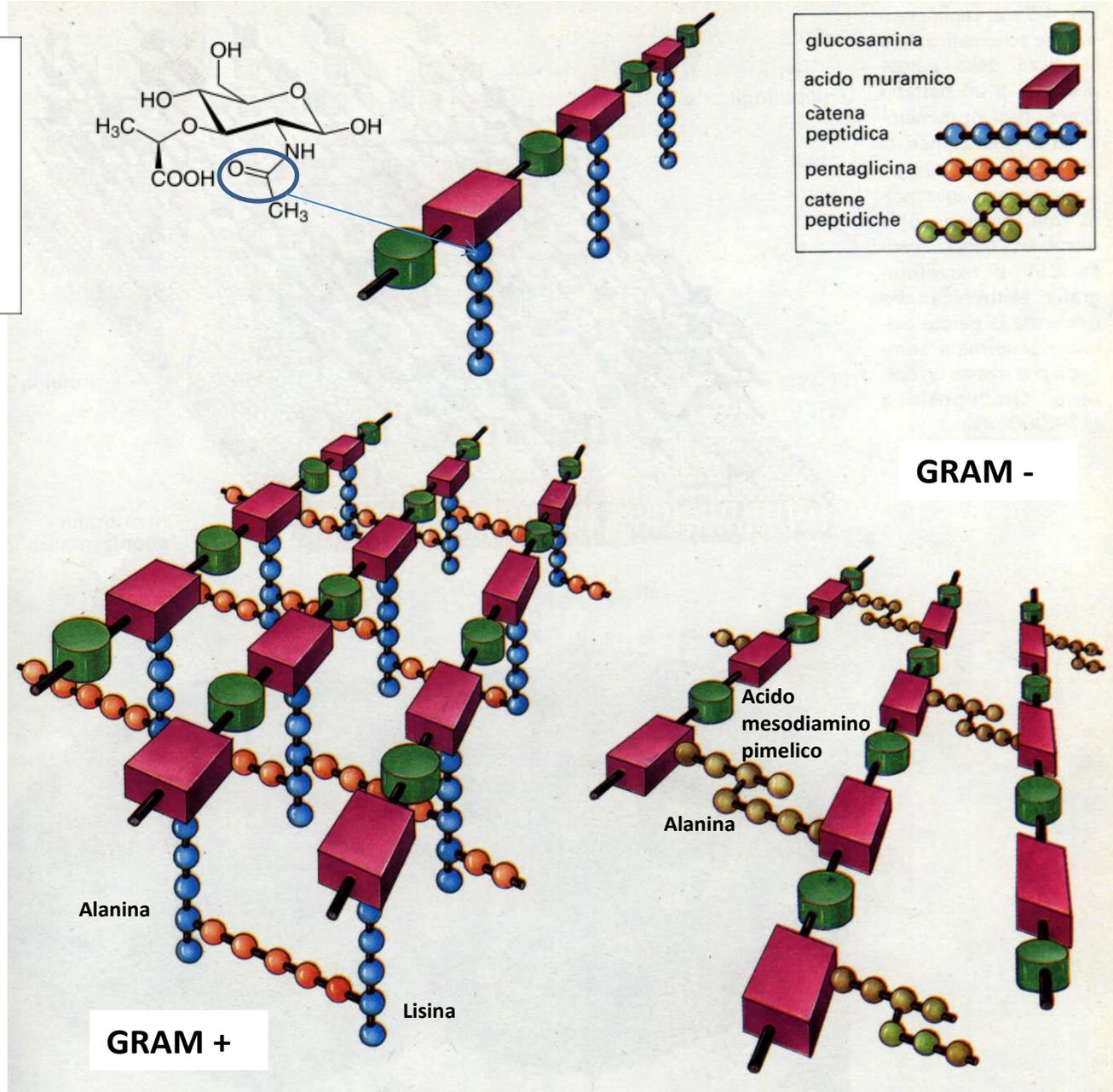
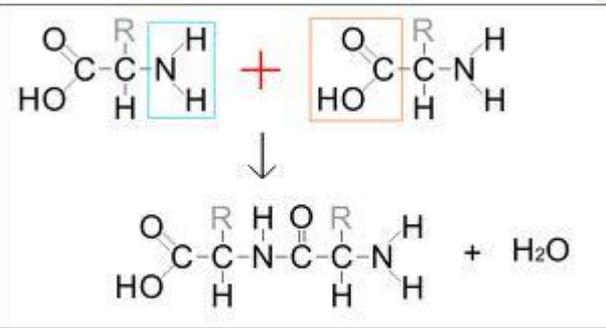
Unità legate con legame $\beta(1-4)$

Al NAMA è attaccato un tetrapeptide

**NAGA + NAMA sono l'unità fondamentale
del peptidoglicano; diverse unità si legano
in successione con legame $\beta(1-4)$.**



Struttura base della catena di peptidoglicano



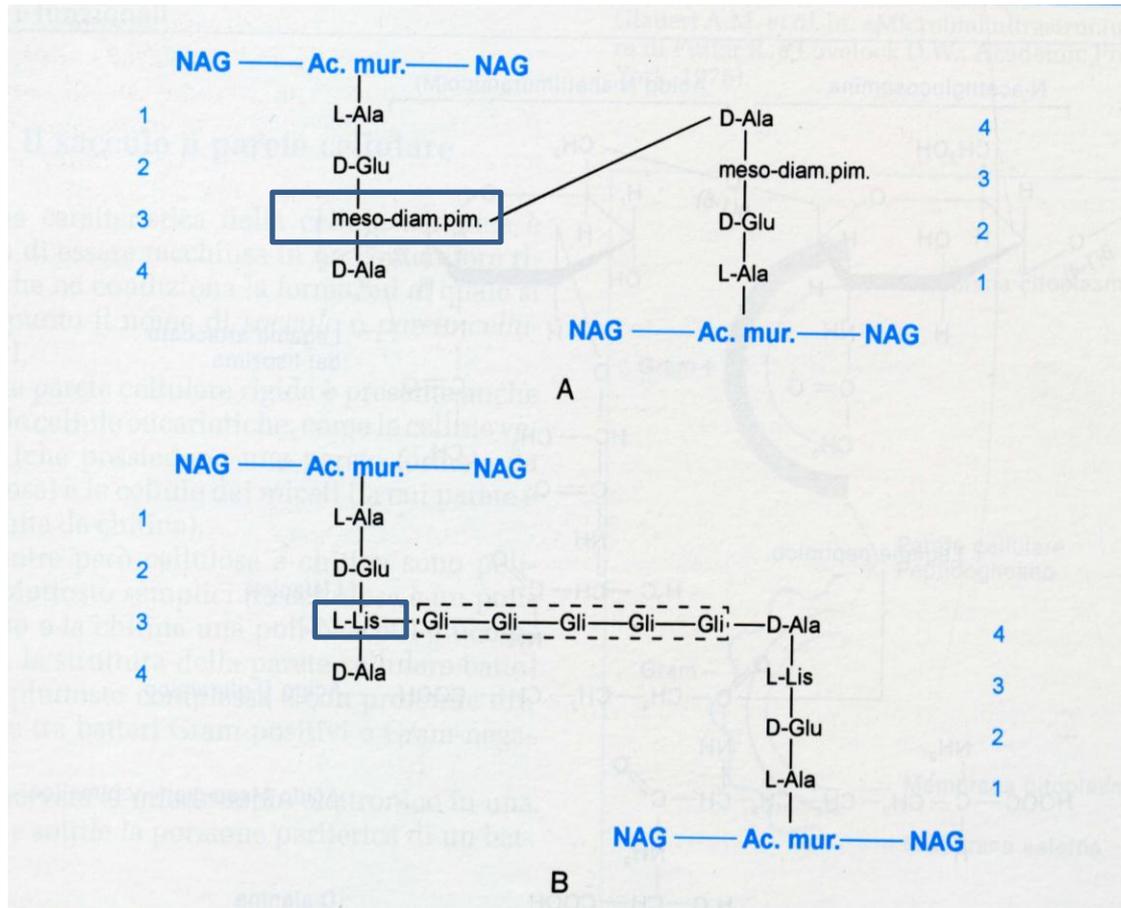
Catene di peptidoglicano unite mediante corte catene peptidiche:

Gram -: tetrapeptidi

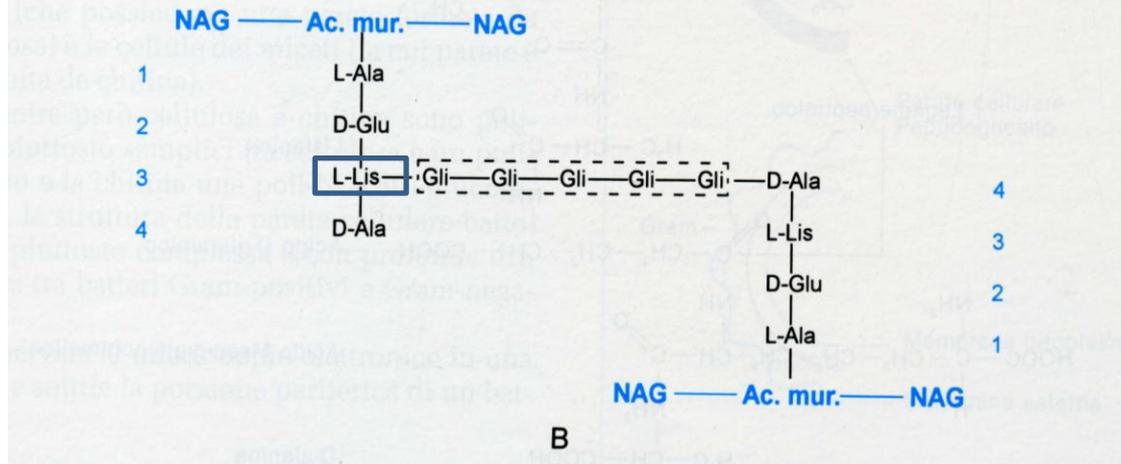
Gram +: ponte di 5 glicine

Formazione legame peptidico

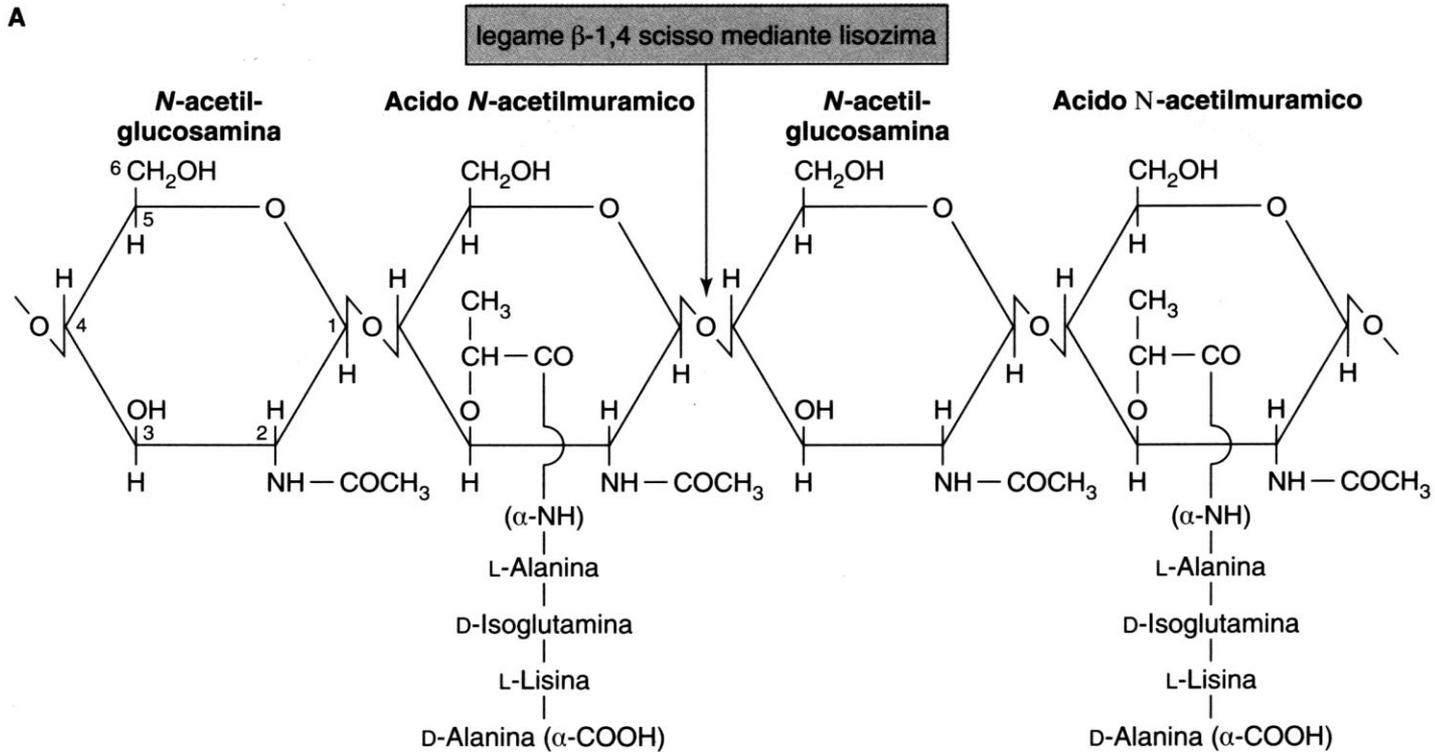
GRAM -



GRAM +



DISTRUZIONE DELLA PARETE



Il **lisozima** (enzima molto diffuso nei fluidi biologici come saliva, muco, lacrime, bianco d'uovo, ecc.) rompe il legame β 1-4 fra le due unità, causando **la formazione di un protoplasto** (= cellula batterica priva di parete, con la sola membrana cellulare).

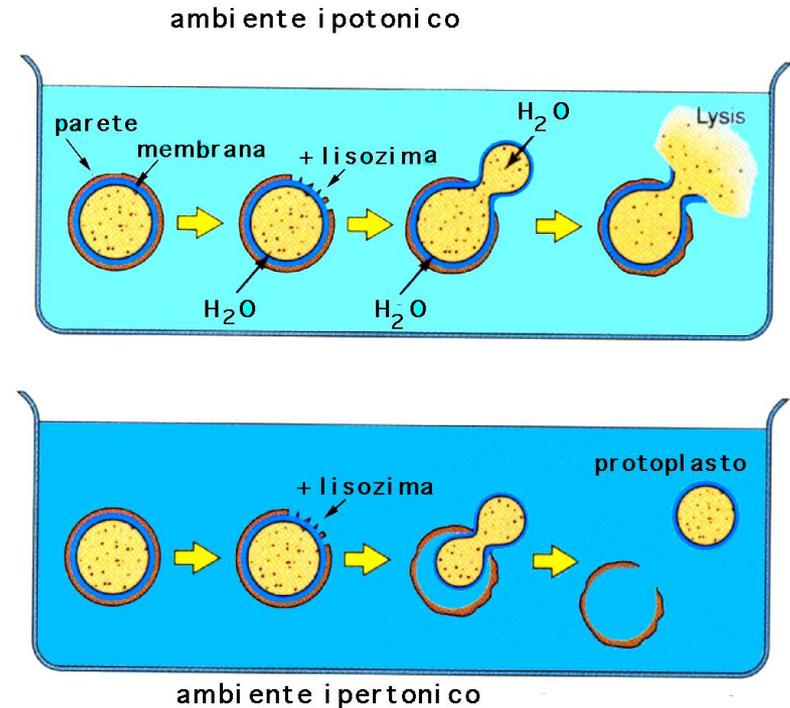
LA PARETE BATTERICA

FUNZIONI PIU' IMPORTANTI:

1) Impedire che le cellule batteriche si rompano per effetto della pressione osmotica (maggiore dentro alla cellula che all'esterno).

La maggior parte dei batteri vive in mezzi ipotonici (= la concentrazione dell'acqua è maggiore all'esterno che all'interno della cellula). L'acqua entrerebbe fino ad uguagliare le concentrazioni interna ed esterna → la cellula si rigonfierebbe e scoppierebbe ("lisi osmotica"). La parete resiste alla pressione dell'acqua ed impedisce il rigonfiamento.

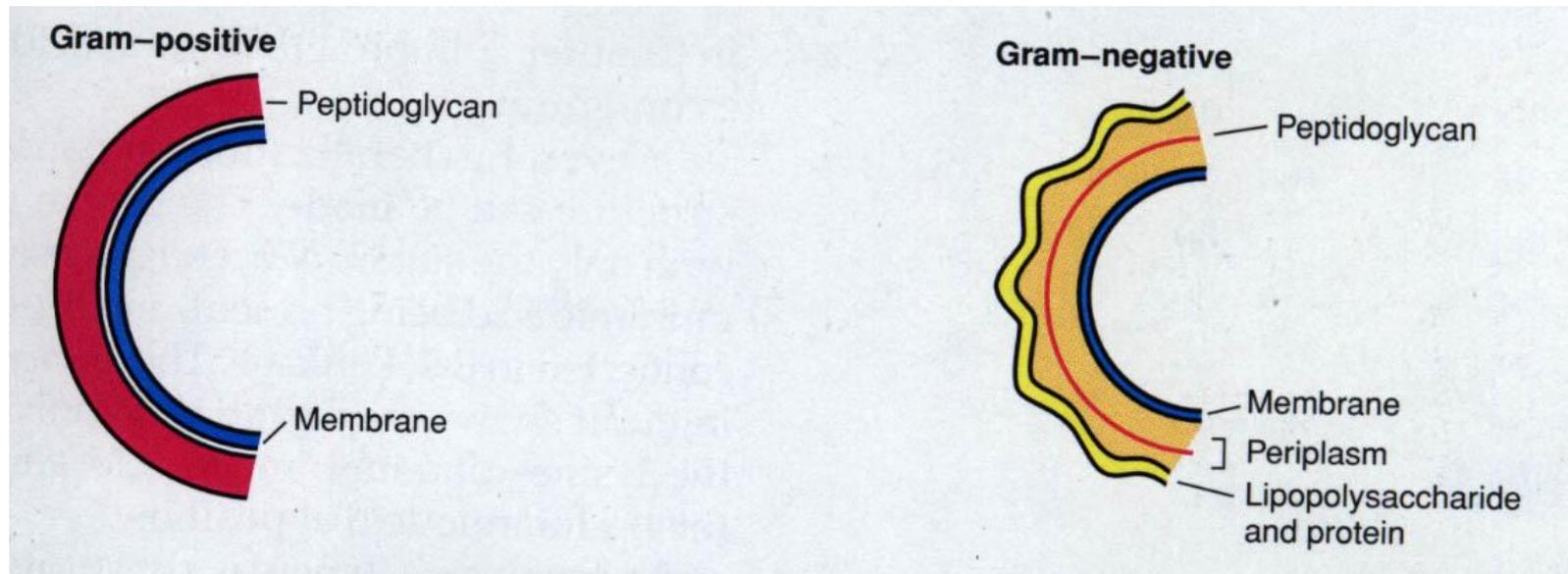
2) Protezione della membrana plasmatica e dell'ambiente cellulare da sostanze dannose (es. tossine, DNAsi, Proteasi, Lipasi, ecc.), e l'ingresso di nutrienti.



LA PARETE BATTERICA

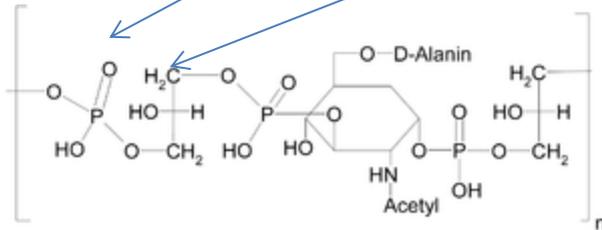
Gram+: uniforme, spessa 20-80 nm

Gram-: più sottile (10nm) con una membrana esterna

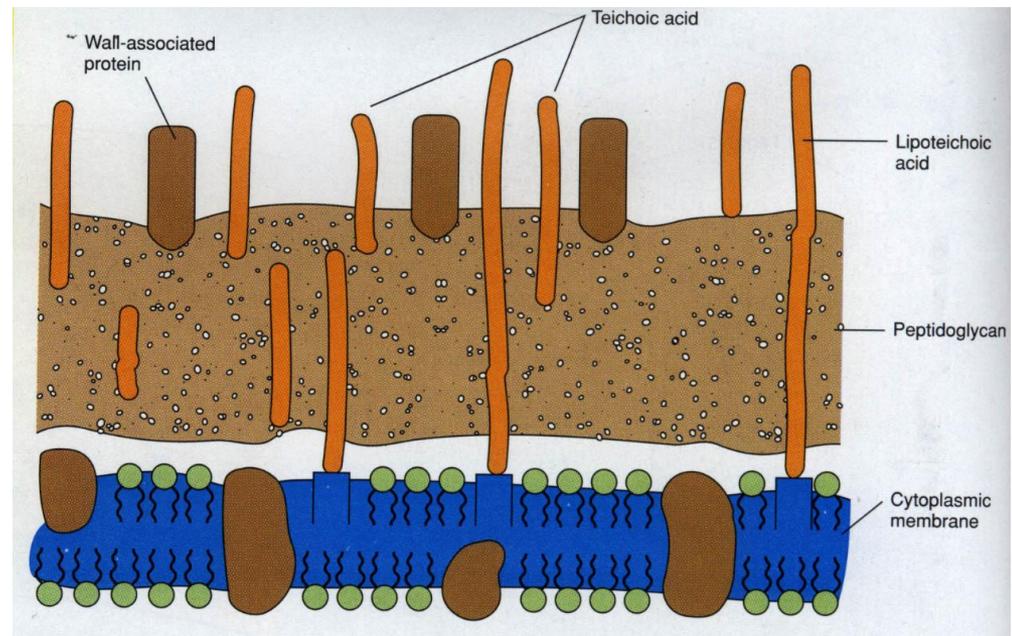


Parete dei Gram +

La parete è formata da molti strati di peptidoglicano, intersecato da **acidi teicoici** (polimeri di alcoli ($C_nH_{(2n+2)}O$) esterificati con acido fosforico), spesso associati a aminoacidi (D-alanina) e porzione lipidica (**acidi lipoteicoici**)



Si proiettano all'esterno formando strutture filiformi (**fibrille**): adesione a superficie mucose



Parete dei batteri Gram+

Acidi teicoici: - altamente antigenici

- carica negativa (polarità)

- essenziali per legare alla superficie cellulare ioni (es. Mg^{2+}) necessari al funzionamento degli enzimi di membrana

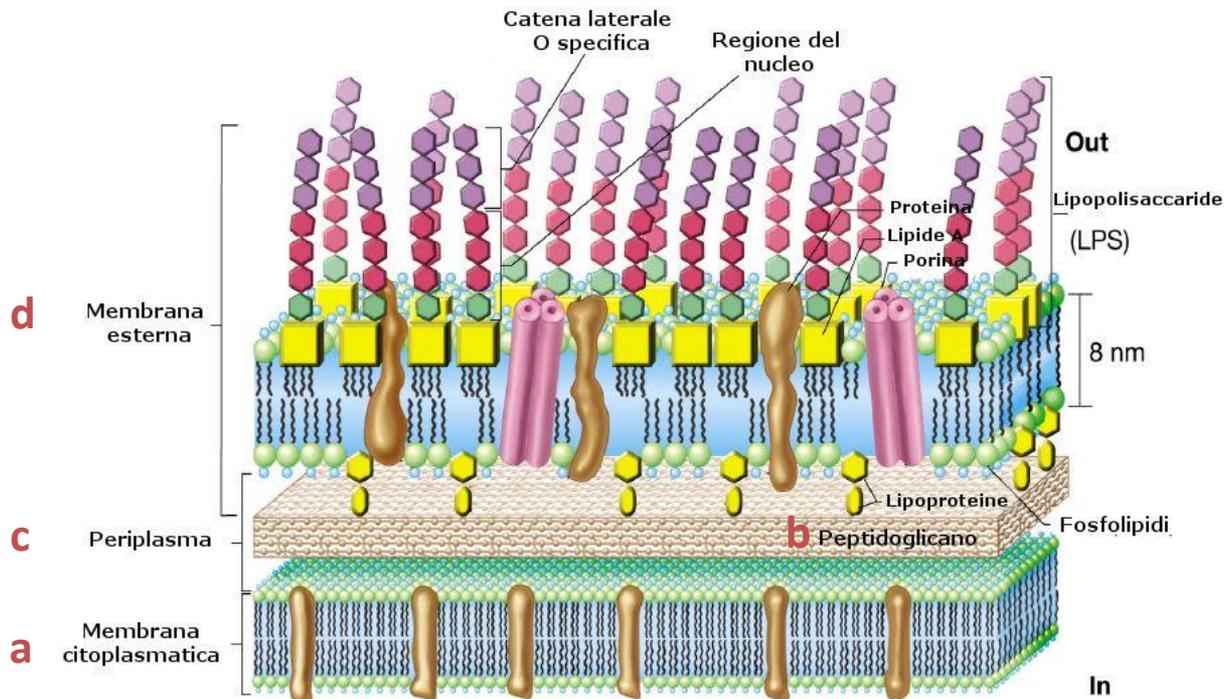
- consentono ai Gram+ di tollerare concentrazioni saline più elevate dei Gram- (→ terreni selettivi) (polarità)

- polare (cariche degli Aa e del fosfato) e quindi

- permeabile a molecole idrofile (es. zuccheri, Aa) ma impermeabile alle molecole idrofobiche (sali)

Parete dei GRAM-

- a) **Membrana Cellulare:** trilaminare
- b) **Strato di peptidoglicano** senza acidi teicoici, ma associato a lipoproteine ponte
- c) **Spazio periplasmico/periplasma**, che contiene gel proteico: i) favorire la diffusione passiva attraverso la membrana citoplasmatica di molecole a basso peso molecolare alterandone la concentrazione; ii) degradare le grosse molecole favorendone il passaggio attraverso la membrana citoplasmatica; iii) inattivare alcuni farmaci antibatterici
- d) **Membrana esterna:** bilaminare ma selettivamente permeabile per la presenza di **PORINE** (pori di diffusione passiva piccole molecole idrofile 900-1000D) e di **PROTEINE CARRIERS**



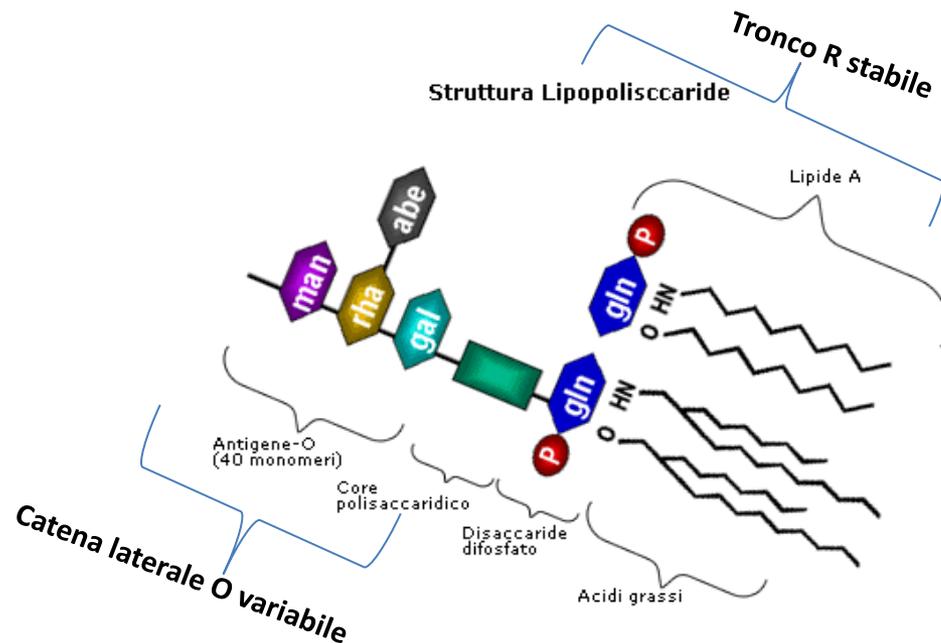
MEMBRANA ESTERNA dei GRAM-

MEMBRANA ESTERNA:

Struttura bilaminare asimmetrica.

Fosfolipidi all'interno, molecole complesse (LPS = lipopolisaccaride batterico) all'esterno.

- LPS =
- parte lipidica (**lipide A**, scheletro disaccaridico di glucosamina fosforilata associata ad acidi grassi): **attività endotossica**
 - porzione polisaccaridica interna (**core**, 9-12 zuccheri)
 - lunga catena polisaccaridica (**Antigene O**, 50-100 unità da 4-7 zuccheri) - funzione antigenica specie-specifica



LPS

Endotossina

Effetto tossico a causa del lipide A (solo quando viene rilasciato a seguito di lisi cellulare)
Causare i sintomi che caratterizzano le infezioni da Gram- (*Salmonella*, *Shigella* ed *Escherichia*)

Funzione principale: fornire una "resistenza" alle interazioni di tipo idrofobico, come quelle che si stabiliscono con i detergenti, che danneggerebbero la membrana stessa (questo grazie alla sua natura altamente idrofilica)

- **PORINE**
- **Le porine sono aggregate tre a tre e formano dei canali attraverso la membrana che permettono il passaggio per diffusione di alcune piccole molecole (600-700 Da).**
- **La sintesi delle porine è strettamente regolata**

Tabella 6.2. **Proteine dei canali della membrana esterna di *E. coli* e *S. typhimurium***

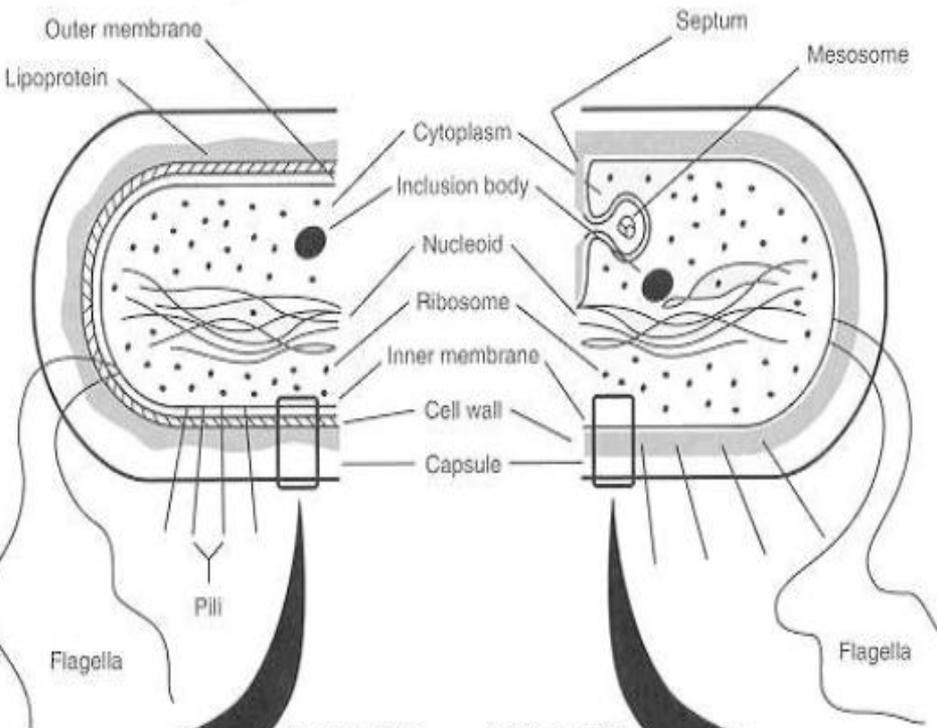
<i>Proteine</i>	<i>Ruolo fisiologico</i>
PORINE	
OmpC	Forma piccoli pori (1,1 nm)
OmpD	Presente solo in <i>S. typhimurium</i>
OmpF	Forma pori più larghi (1,2 nm) di OmpC; viene repressa da alte temperature e da pressione osmotica più elevata
PhoE	Viene formata in carenza di fosfato
PROTEINE DI CANALE SPECIFICHE	
LamB	Specifica per la diffusione del maltosio e delle maltodestrine; è indotta da maltosio; sito di adsorbimento del fago lambda
Tsx	Specifica per l'entrata per diffusione dei nucleosidi; sito di adsorbimento del fago T6
TonA	Specifica per l'entrata per diffusione del ferricromo; sito di adsorbimento dei fagi T1 e T6

MEMBRANA ESTERNA dei GRAM-

I batteri Gram- sono insensibili ad alcuni antibiotici che impediscono la sintesi del peptidoglicano (tipo penicillina), in quanto il farmaco non riesce ad attraversare la membrana esterna

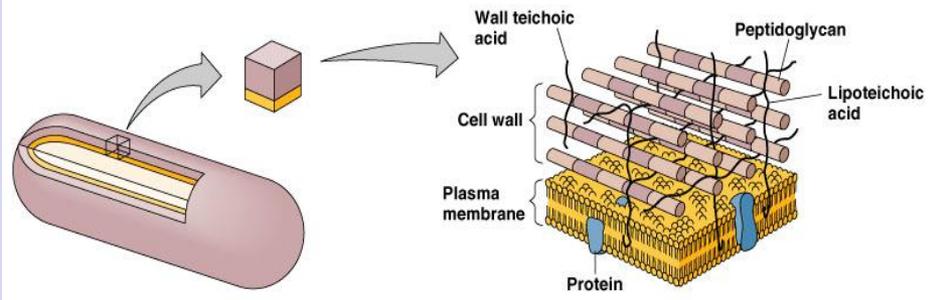
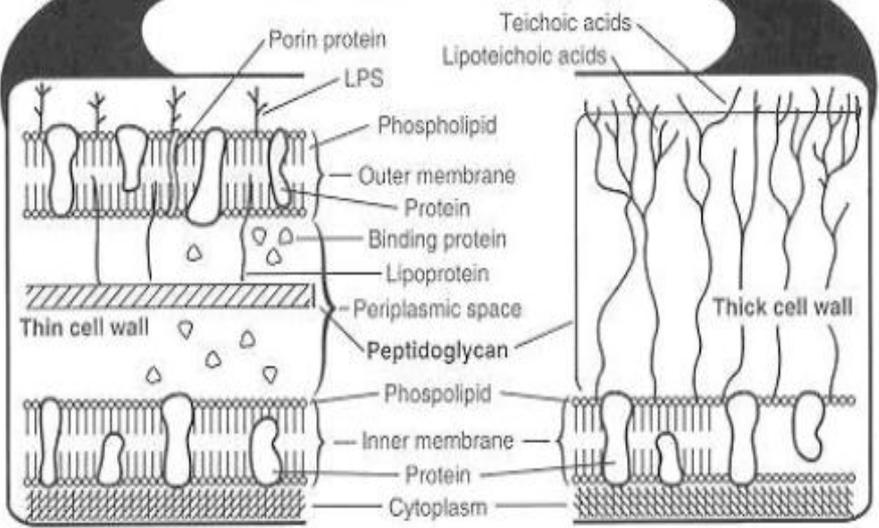
Gram Negative

Gram Positive

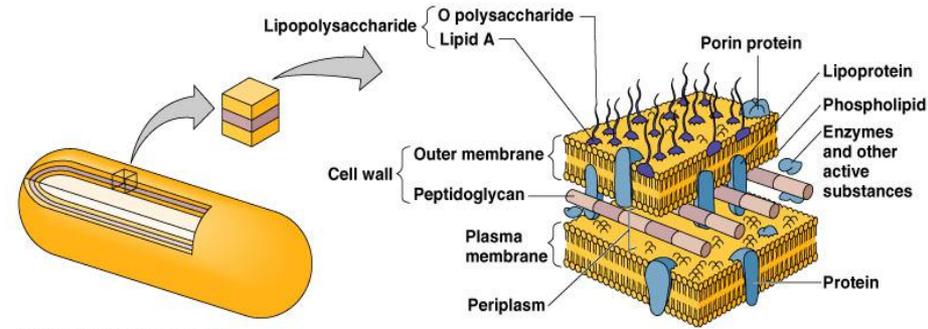


Gram negative cell envelope

Gram positive cell envelope



(b) Gram-positive cell wall



(c) Gram-negative cell wall

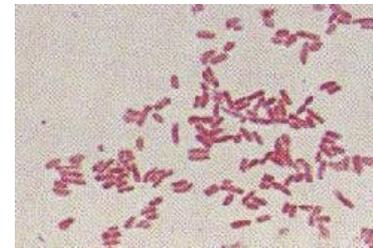
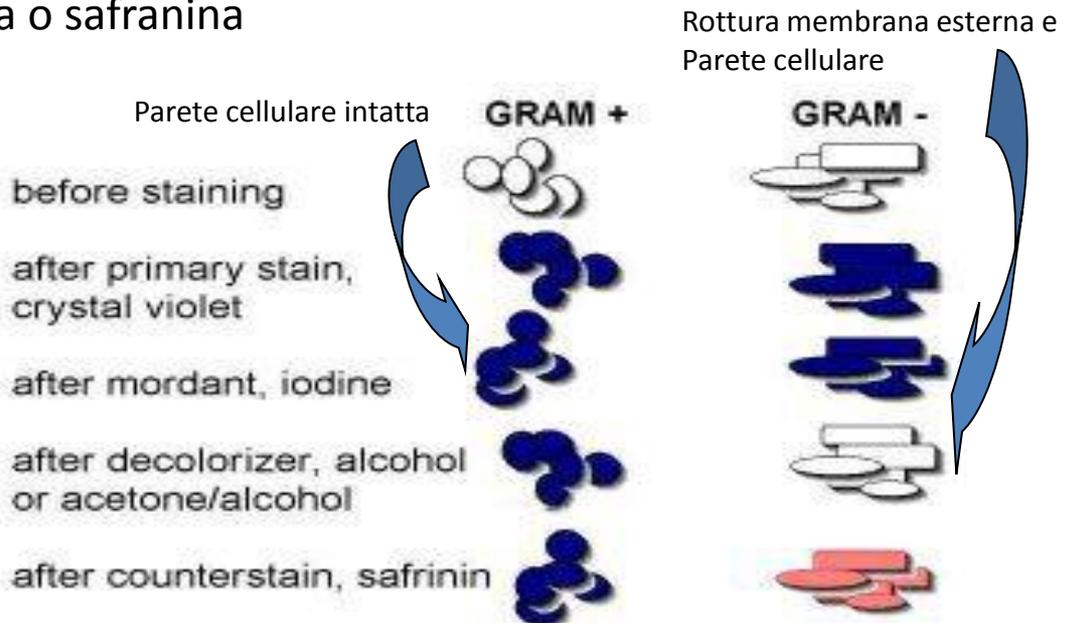
Colorazione di Gram

- 1) Fissatura con calore
- 2) Colorante: cristalvioletto (basico)
- 3) Mordenzatura (precipita colorante): iodo-ioduro potassico (liquido di Lugol)
- 4) Decolorazione con alcool o acetone
- 5) Colorazione di contrasto: fucsina o safranina

Batteri Gram +: trattengono il colorante basico (viola), poiché l'alcool non ha danneggiato a sufficienza la spessa parete cellulare (idrofila) che non permette al colorante di passare.

Batteri Gram -: sono privi di colorazione, questo perché l'alcool ha sciolto i lipidi della membrana esterna e danneggiando la sottile parete cellulare che non è più in grado di trattenere il complesso cristal violetto - ioduro (liposolubile).

Colorante di contrasto: *penetra solo in cellule decolorate poiché, anche se solo modestamente idrofile, sono in grado di passare la parete cellulare grazie alle loro ridotte dimensioni.*

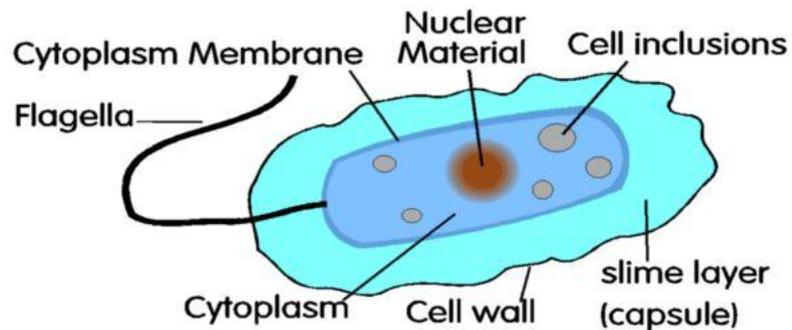
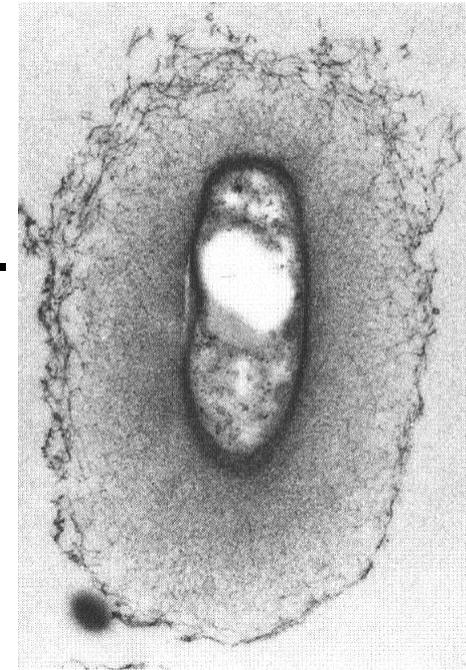


LA CAPSULA

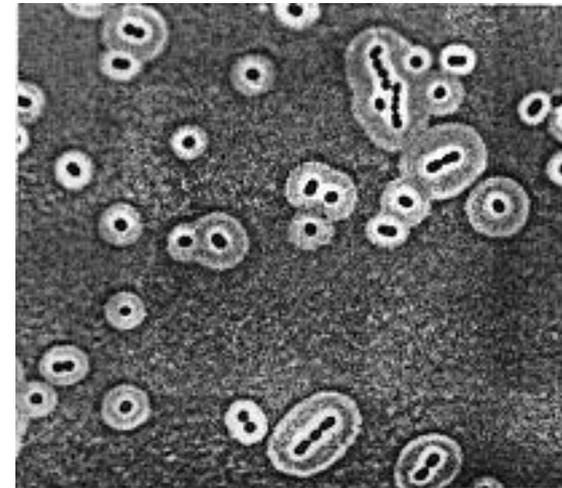
La capsula non è una struttura essenziale e la sua presenza dipende dal mezzo in cui i batteri crescono.

Di solito i batteri patogeni sono capsulati in vivo, ma non in vitro.

La presenza della capsula si evidenzia mediante colorazione negativa con inchiostro di china



Cell structure



LA CAPSULA

Involucro mucoso formato da glicoproteina (strato S) + matrice fibrosa esterna (capsula)

Riveste numerosi batteri, sia Gram+ che Gram-.

Importante per:

- Fare aderire i batteri al substrato (es. Streptococcus mutans, agente della carie dentale, può aderire ai denti grazie alla capsula).**
- Attività antifagocitaria**
- Impedire l'azione di antibiotici (assorbe il farmaco impedendogli di raggiungere a concentrazioni ottimali le molecole bersaglio).**
- Aiuta alcuni batteri a “travestirsi” (mimetismo antigenico) (es. Streptococco Pyogenes ha la capsula con acido ialuronico, uguale a quello del connettivo).**

BIOFILM

Insieme di complesse strutture formate da una estesa matrice di materiale capsulare contenente numerosi batteri.

Possono invadere fasce connettivali intermuscolari (es. fascite necrotizzante da alcuni tipi di *Streptococco Pyogenes*), le cardiache (es. infezioni da *Streptococchi Viridanti*), materiali inerti (fili di sutura, cateteri, protesi vascolari, lenti a contatto).

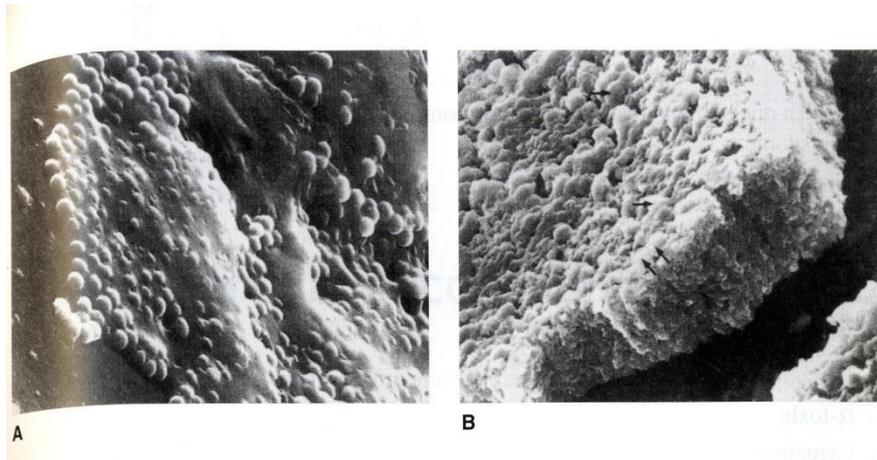


FIGURE 24-9. Coagulase negative staphylococcal slime. A.

S. epidermidis cocci are shown attached to the surface of a plastic catheter and are starting to produce extracellular polysaccharide slime. **B.** After 48 hours, the bacteria are fully embedded in the slime glycoalyx. (Reproduced with permission from Connor DH, Chandler FW, Schwartz DQA, Manz HJ, Lack EE (eds). *Pathology of Infectious Diseases*, vol. 1. Stamford, CT:Appleton & Lange; 1997.)

All'interno del biofilm, i batteri sono relativamente resistenti all'azione delle difese antimicrobiche dell'ospite (fagociti e anticorpi) e degli antibiotici, che non riescono a diffondere attraverso la spessa matrice di materiale capsulare che ingloba i batteri (facilità all'instaurarsi di infezioni persistenti).

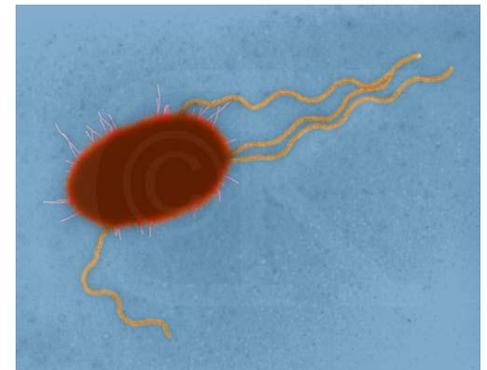
FLAGELLI

Alcuni batteri possono avere 1 o più flagelli. Originano dalla membrana plasmatica e si estendono 5-10 μm dalla superficie. Responsabili di:

- ❖ **MOTILITA'** = organi di propulsione, ruotano velocemente (come un'elica) da 10 a 100 giri/sec, in senso orario o antiorario.
- ❖ **CHEMIOTASSI** = movimento stimolato dalla presenza di sostanze; i batteri si raggruppano nella zona che presenta condizioni ottimali per il loro metabolismo.

C. positiva = “richiamo” esercitato da zuccheri, aminoacidi, ecc.

C. negativa = “fuga” da sostanze dannose, es. acidi, alcoli.



Fonte di energia = non ATP, ma gradiente elettrochimico di protoni.

STRUTTURA FLAGELLI

Unico filamento sprovvisto di membrana

Filamento: fibre da 3 a 6 formate da flagellina disposta con simmetria elicoidale con vuoto centrale

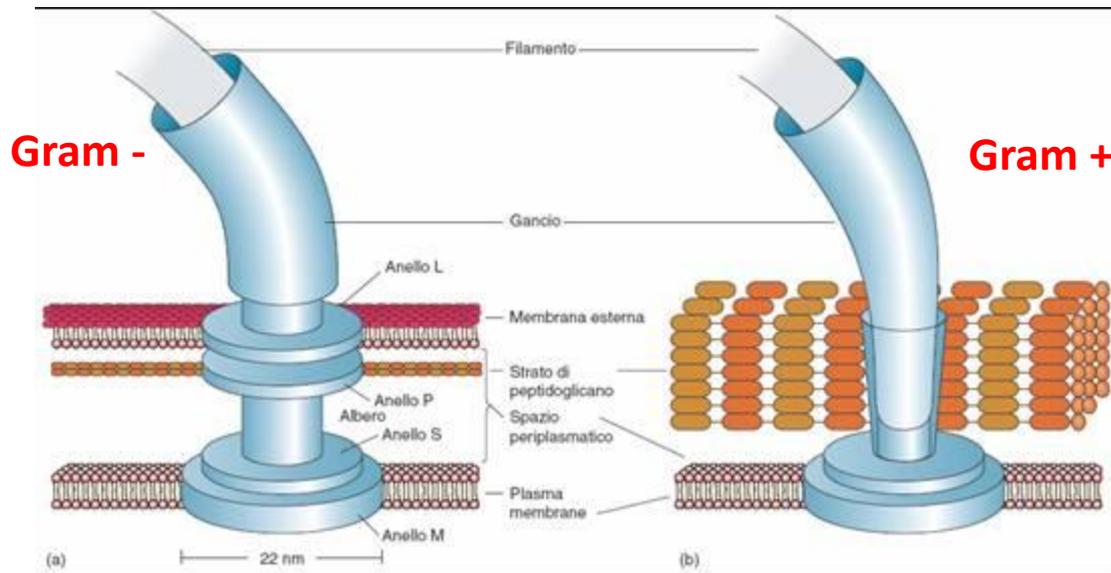
Gancio: struttura vuota che penetra nella parete cellulare

Corpuscolo basale:

Gram+: Anello S associato alla faccia interna del peptidoglicano

Anello M nella membrana plasmatica

Gram-: Anelli P e L per attraversare involucri esterni



FLAGELLI

Caratteristica batteri cilindrici (bacilli vibrioni spirilli)

Posizionati su un lato: polari (mono/lofo-trichi)

Attorno alla cellula: peritrichi

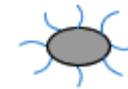


MONOTRICHI



LOFOTRICHI

PERITRICHI



ANFITRICHI



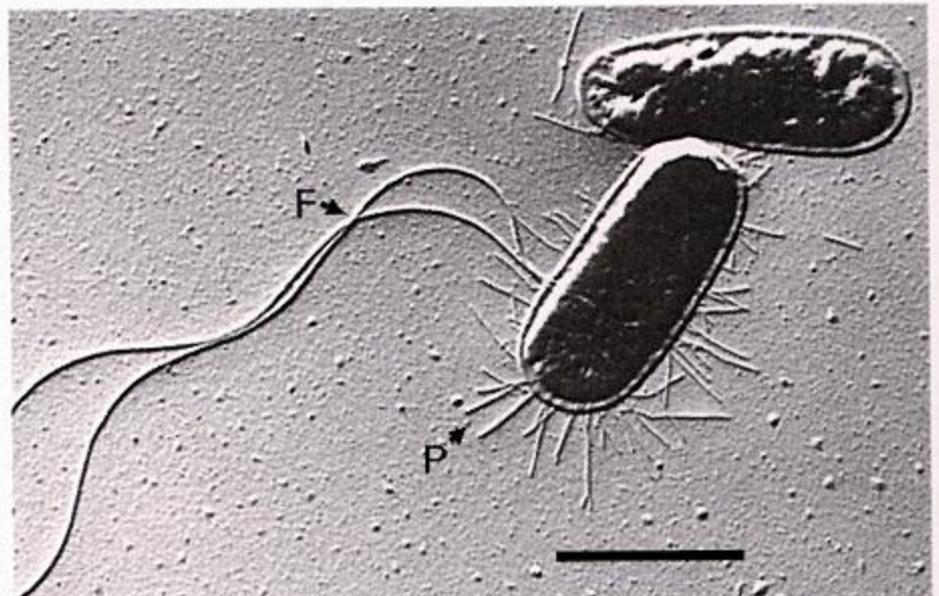
PILI (o Fimbrie)

Appendici filamentose più corte e sottili dei flagelli. Presenti soprattutto nei **Gram-**, 100-300 in numero, lunghi 0.2-2 μm .

PILI COMUNI = numerosi e piccoli, sono organi di ancoraggio (adesine).

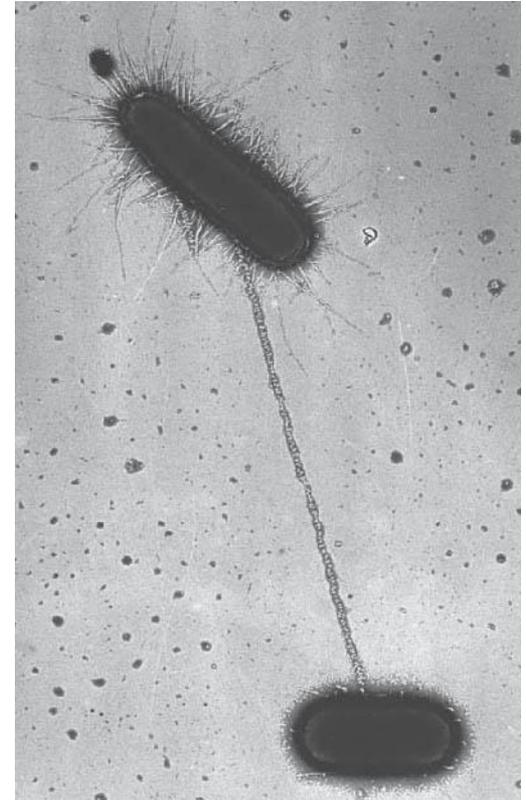
❖ **Aderiscono ai tessuti e condizionano la patogenicità (es. *Neisseria gonorrhoeae* si fissa alla mucosa del tratto urinario con i pili, senza pili non è patogena). Sono molto specifici nell'adesione perché interagiscono solo con alcuni zuccheri specifici.**

Incrementano la superficie cellulare attiva, potenziando attività di membrana (es respirazione, utilizzo di nutrienti, ecc).



PILI (o Fimbrie)

PILI SESSUALI = sono meno numerosi, più lunghi e più larghi degli altri pili. Codificati da fattori extracromosomici (= plasmidi) intervengono nei processi di scambio genetico (coniugazione) fra batteri.



ANTIGENI BATTERICI

Gram+: acido teicoico

Gram-: lipopolisaccaridi, porine

Batteri flagellati in coltura formano pellicole (Hauch): antigene H del flagello

Batteri non flagellati in coltura non formano pellicole: antigene O del soma

Struttura tipica di una cellula batterica

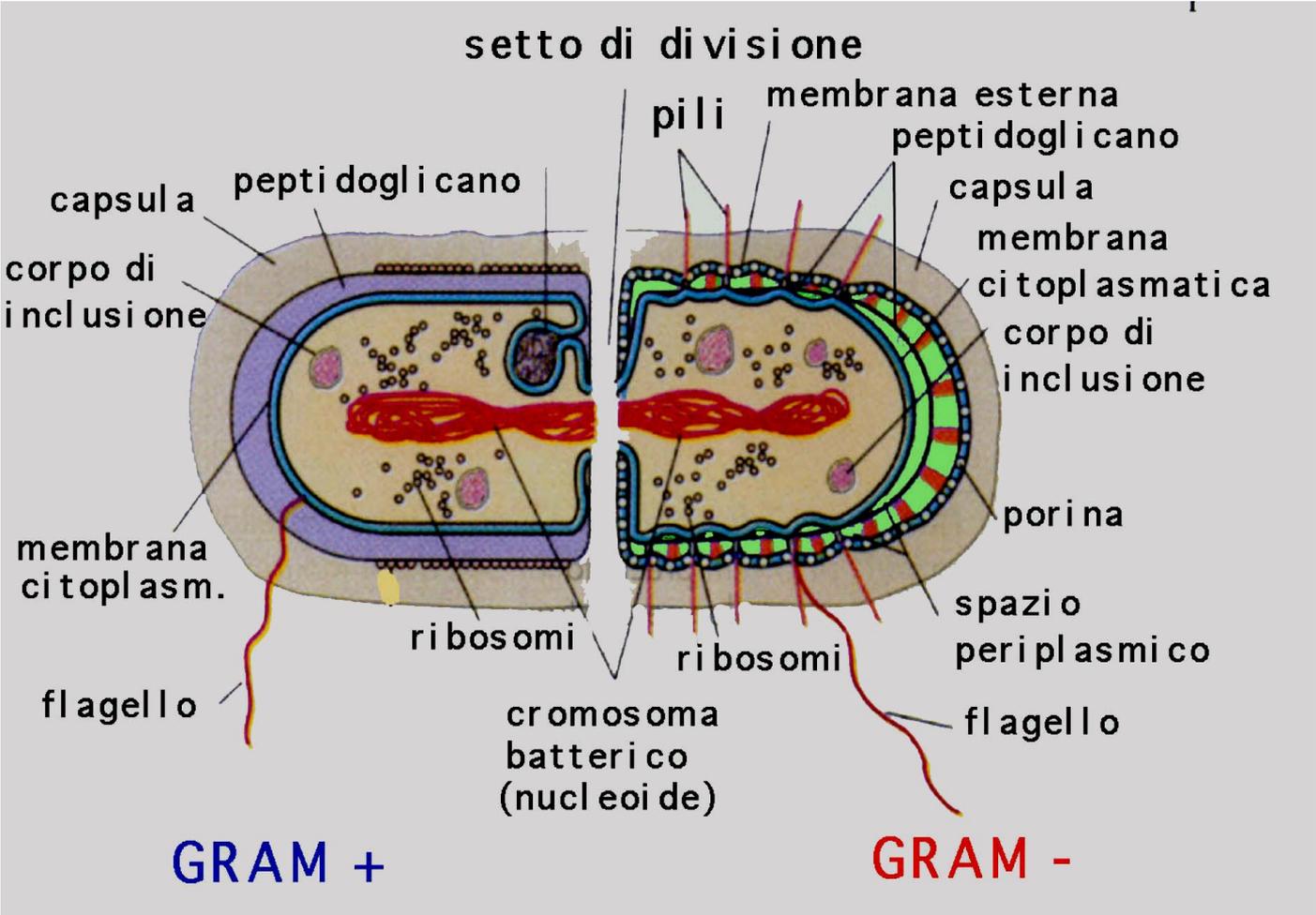
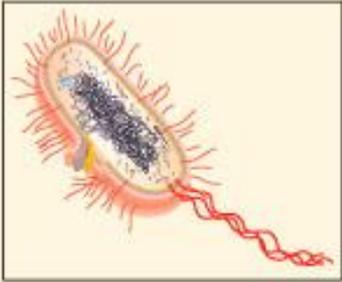


TABLE 4.2

Principal Differences Between Prokaryotic and Eukaryotic Cells

Characteristic	Prokaryotic	Eukaryotic
		
Size of cell	Typically 0.2–2.0 μm in diameter	Typically 10–100 μm in diameter
Nucleus	No nuclear membrane or nucleoli	True nucleus, consisting of nuclear membrane and nucleoli
Membrane-enclosed organelles	Absent	Present; examples include lysosomes, Golgi complex, endoplasmic reticulum, mitochondria, and chloroplasts
Flagella	Consist of two protein building blocks	Complex; consist of multiple microtubules
Glycocalyx	Present as a capsule or slime layer	Present in some cells that lack a cell wall
Cell wall	Usually present; chemically complex (typical bacterial cell wall includes peptidoglycan)	When present, chemically simple
Plasma membrane	No carbohydrates and generally lacks sterols	Sterols and carbohydrates that serve as receptors present
Cytoplasm	No cytoskeleton or cytoplasmic streaming	Cytoskeleton; cytoplasmic streaming
Ribosomes	Smaller size (70S)	Larger size (80S); smaller size (70S) in organelles
Chromosome (DNA)	Single circular chromosome; lacks histones	Multiple linear chromosomes with histones arrangement
Cell division	Binary fission	Mitosis
Sexual reproduction	No meiosis; transfer of DNA fragments only	Involves meiosis



Bronchi

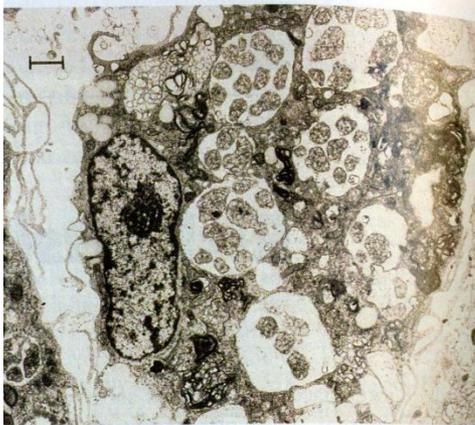


Organo Corti orecchio

BATTERI ATIPICI

Micoplasmi

- non hanno peptidoglicani e parete
- colesterolo nella membrana cellulare
- forma tonda o filamentosa
- 0.1-0.3 μm di diametro
- divisione per scissione binaria
- colorazione di Gram: rosso
- crescono in terreni acellulari
- parassiti extracellulari



Parassiti endocellulari obbligati (terreni cellulari)

Clamidio:

- cocco Gram negativo privo di peptidoglicano

Rickettsie:

- bacillo Gram negativo
- le specie patogene sono conservate in serbatoi animali ed in artropodi, e trasmessi casualmete all'uomo tramite artropodi vettori

NUTRIZIONE

Tutti gli organismi per vivere hanno bisogno di:

ENERGIA: luce, sostanze inorganiche (zolfo, carbonio, ammoniaca, ecc:) o sostanze organiche già formate (zuccheri, proteine, grassi, ecc.)

AZOTO allo stato gassoso, o ammoniaca, o nitrati/nitriti, o composti organici (proteine, aminoacidi)

CARBONIO: anidride carbonica, metano, composti organici, ecc.

OSSIGENO: tutte le cellule usano ossigeno in forma legata. Molti richiedono ossigeno gassoso, che però è letale per molti microbi.

ACQUA

Inoltre hanno bisogno, in piccole quantità, di fosforo, zolfo, magnesio, potassio, sodio, ecc.

ORGANISMI AUTOTROFI = svolgono in modo autonomo i processi di sintesi a partire da materiale inorganico (es.: piante). Per sintetizzare tutti i componenti cellulari hanno bisogno solo di luce, acqua, carbonio e azoto.

ORGANISMI ETEROTROFI = dipendono dalle attività biosintetiche di altri organismi per quelle sostanze organiche che non riescono a sintetizzare.

I BATTERI POSSONO ESSERE AUTOTROFI (FOTOSINTETICI) O ETEROTROFI.

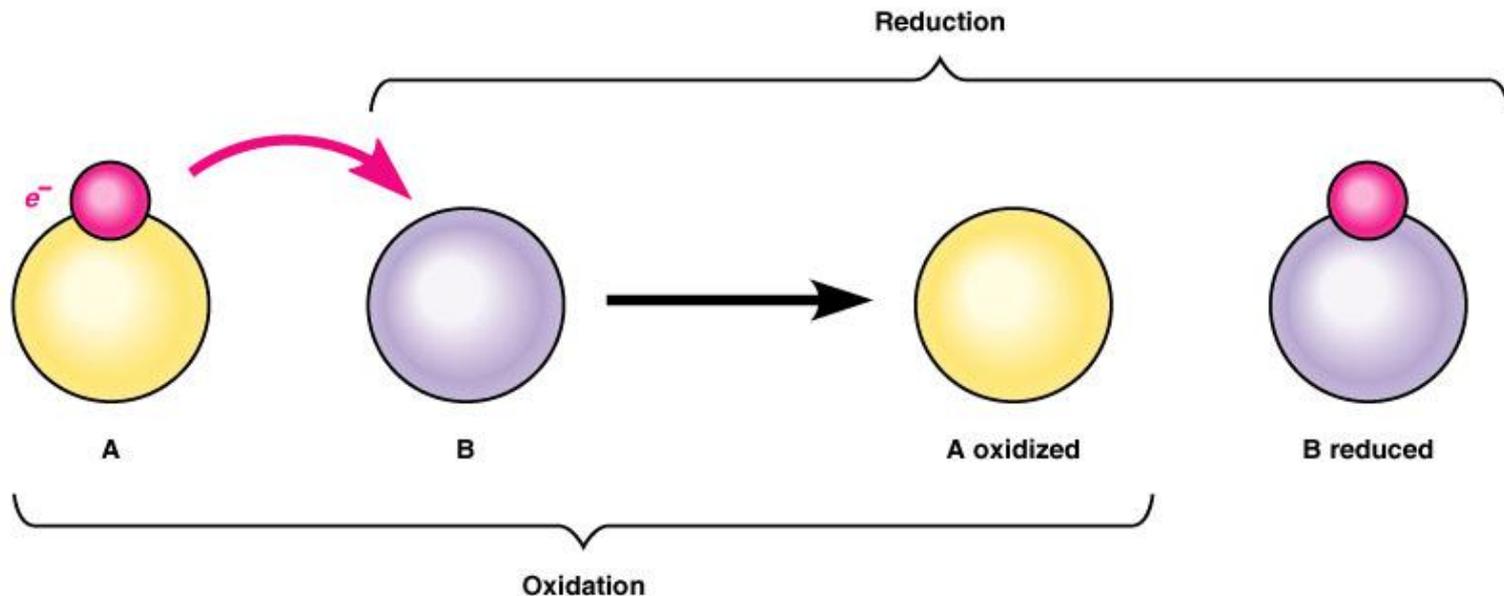
I batteri patogeni per l'uomo sono **eterotrofi**

I batteri hanno a disposizione essenzialmente due fonti di energia:

E. luminosa (→ Batteri FOTOSINTETICI)

E. da reazioni chimiche (→ Batteri CHEMIOSINTETICI)

I batteri chemiosintetici producono energia attraverso ossidazione di composti (perdita di elettroni).



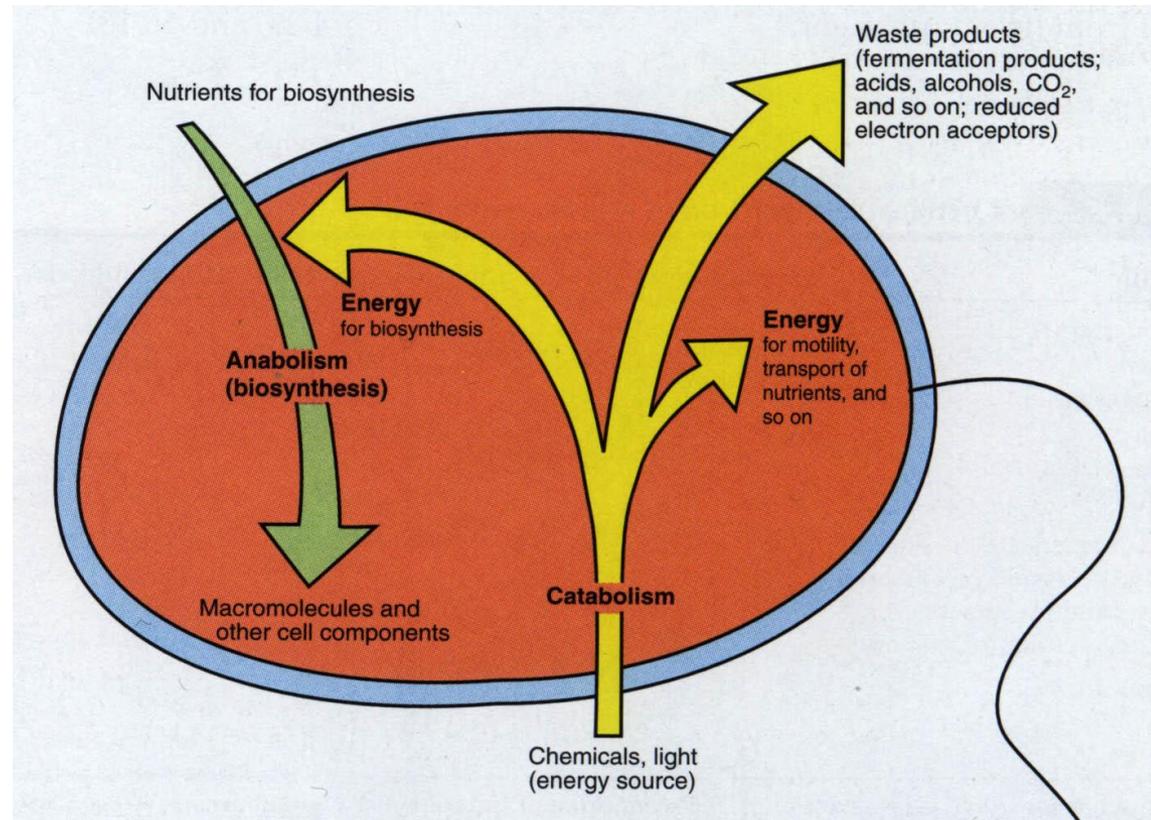
METABOLISMO BATTERICO

METABOLISMO (= trasformazione) → somma di tutte le reazioni chimiche che avvengono nell'organismo o nella cellula.

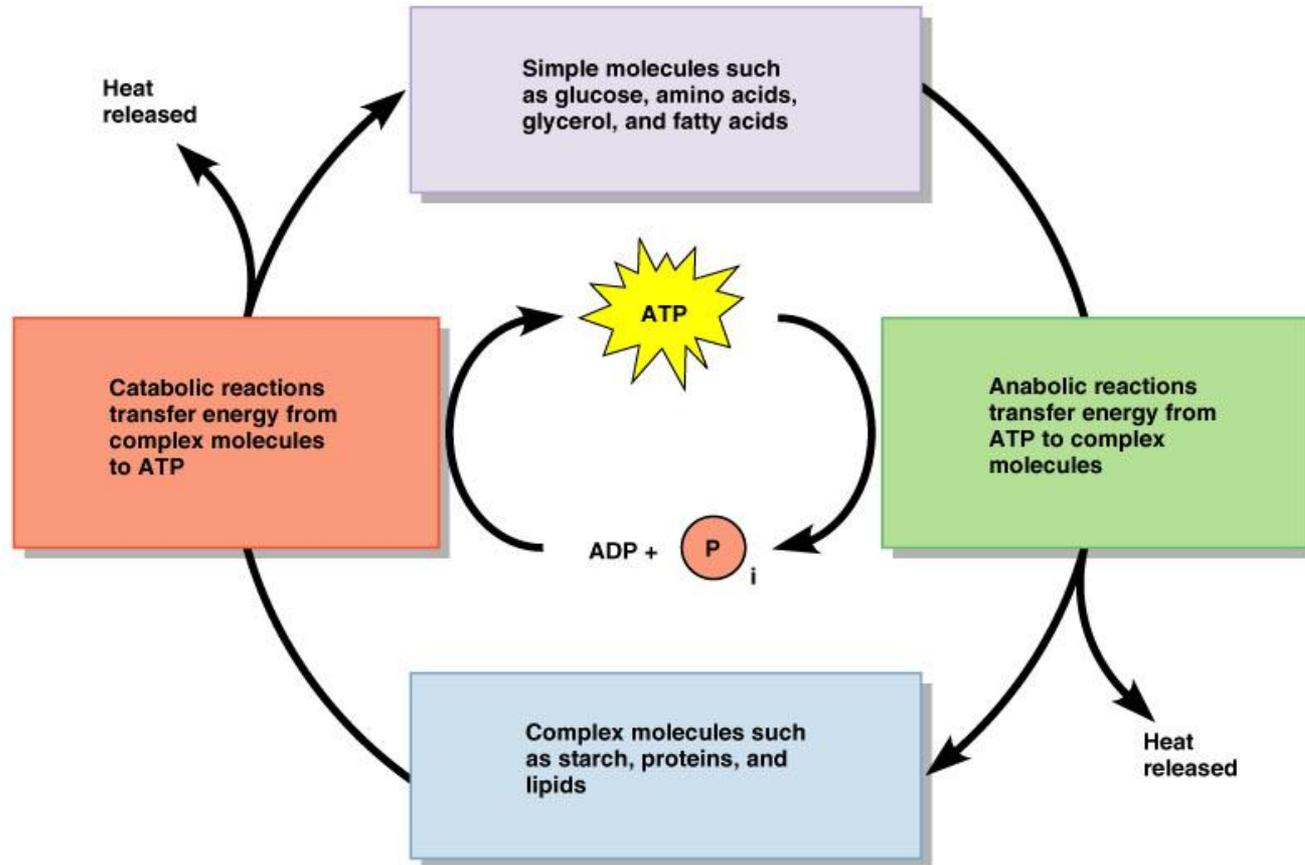
CATABOLISMO (= distruzione) = degradazione da composti complessi a semplici; rilascio di energia.

ANABOLISMO (=salita) = biosintesi di molecole complesse da sostanze semplici; richiede energia.

Le reazioni cataboliche forniscono l'energia necessaria alle reazioni anaboliche.



Ruolo dell'ATP



Quando le molecole complesse sono degradate (catabolismo), parte dell'energia viene trasferita ed immagazzinata in ATP, ed il resto viene dispersa sotto forma di calore. Quando molecole semplici vengono combinate fra loro per formare molecole complesse (anabolismo), l'ATP fornisce l'energia necessaria per la sintesi, rilasciando ulteriore calore.

I batteri chemiosintetici producono energia mediante **RESPIRAZIONE o FERMENTAZIONE**

FERMENTAZIONE = reazioni di ossidoriduzione a basso rendimento energetico, che avvengono in assenza di ossigeno libero (anaerobiosi). Sia il donatore che l'accettore di e^- sono composti organici. Enzimi degradano zuccheri o aminoacidi, con liberazione di elettroni. Si ha una catena di trasferimento di H^+ , fino ad un accettore finale che lo inattiva formando un composto stabile organico (alcol, acido).

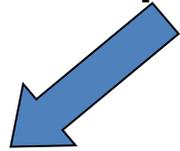
Fermentazione lattica:



RESPIRAZIONE = L'accettore finale di e^- è una sostanza inorganica. Composti organici (zuccheri, proteine, lipidi) vengono ossidati a CO_2 e H_2O (R. aerobia) o a sali, acidi, metano (R. anaerobia). Nella R. aerobia l'accettore finale di protoni è l'ossigeno, in quella anaerobia sono composti inorganici ossigenati:



GLICOLISI → il glucosio viene degradato ad acido piruvico



ANAEROBIOSI

Degradazione a cataboliti organici: etanolo, ac. lattico, ecc. (fermentazione)

Bilancio energetico:

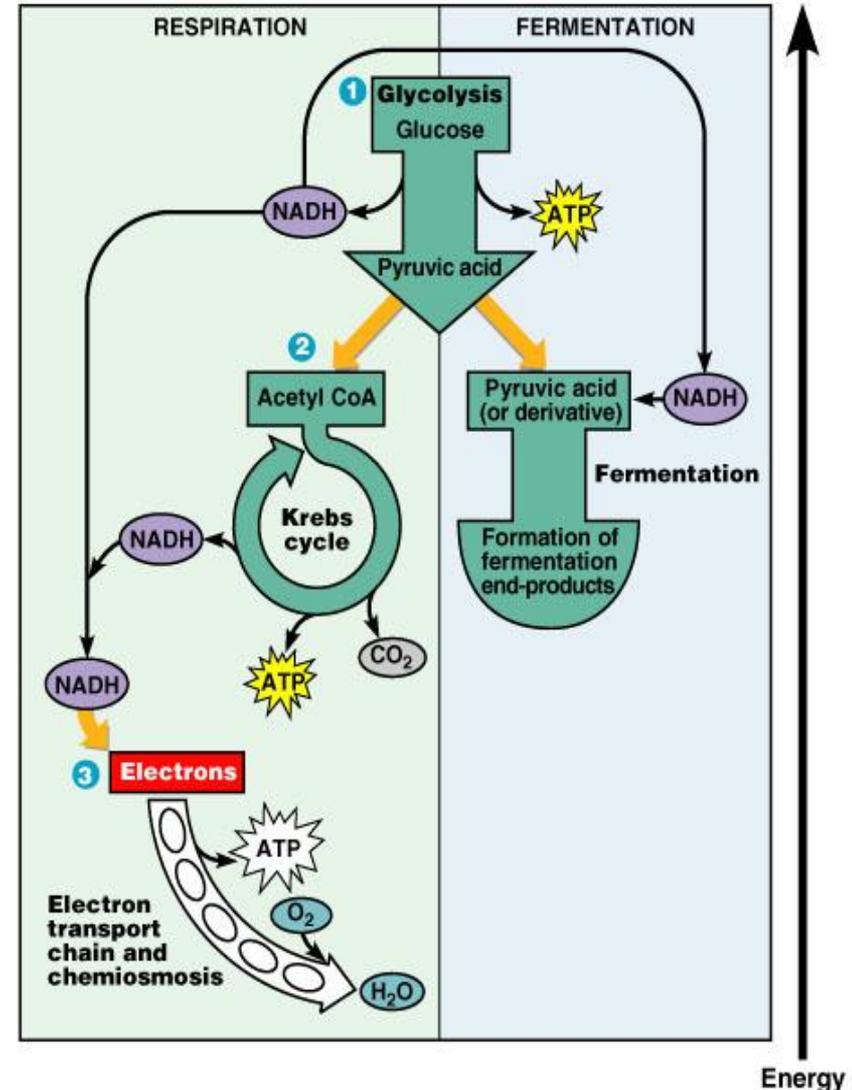
Fermentazione lattica:
glucosio → 2 ac. lattico + 2 ATP

Fermentazione alcolica:
glucosio → 2 etanolo + 2CO₂ + 2 ATP

Respirazione aerobica:
glucosio + 6O₂ → 6CO₂ + 6H₂O + 38 ATP

AEROBIOSI

completamente catabolizzato: CO₂, H₂O (respirazione aerobia, ciclo di Krebs), membrana citopl.



REQUISITI DI CRESCITA DEI BATTERI

Sono variabili da specie a specie

Acqua = sempre necessario un certo grado di umidità

Temperatura = Mesofili (crescono a 30-35° C)



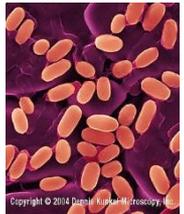
Flavobacterium meningosepticum

Psicrofili (basse temp., anche sotto 0°C)

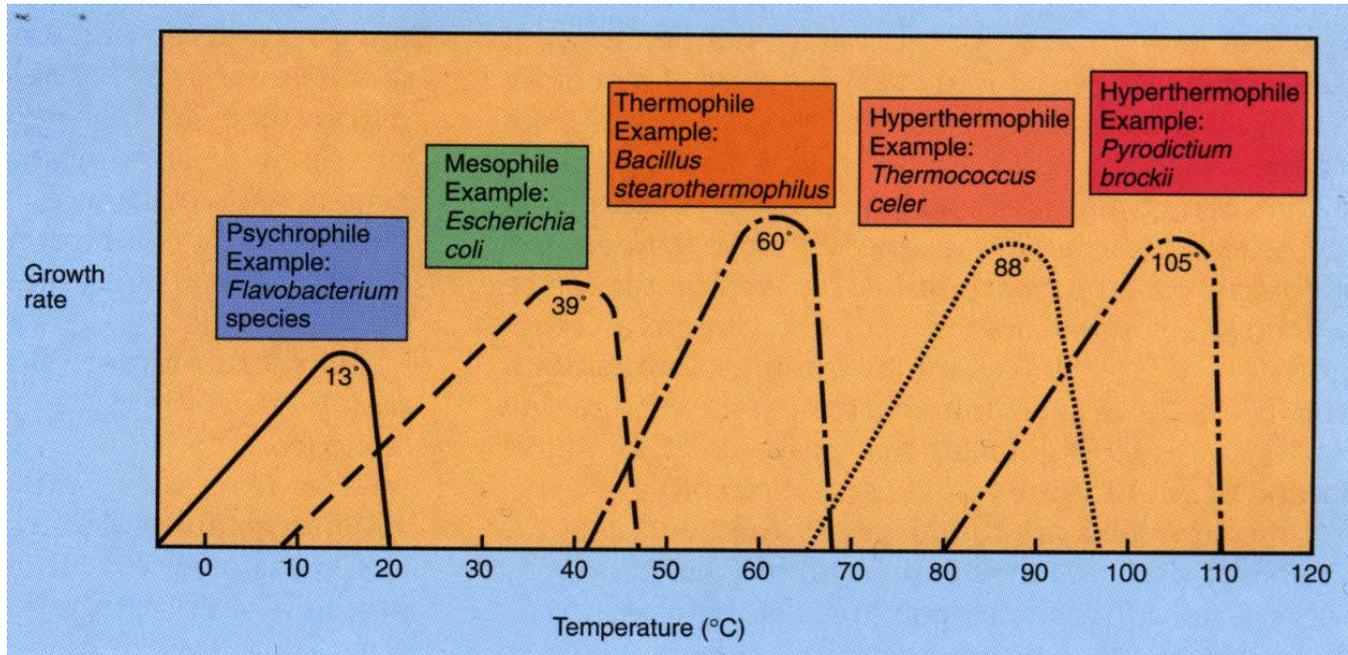
Termofili (50-60°C, alcuni anche a 100°C)

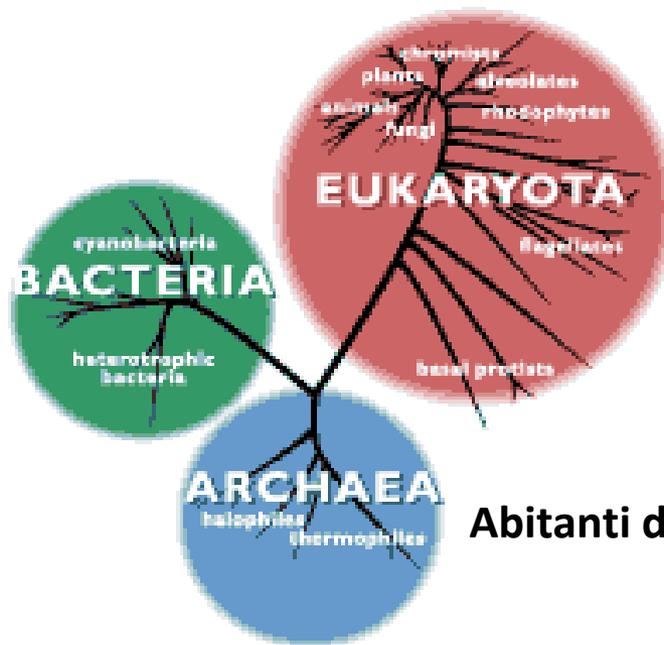


Salmonella

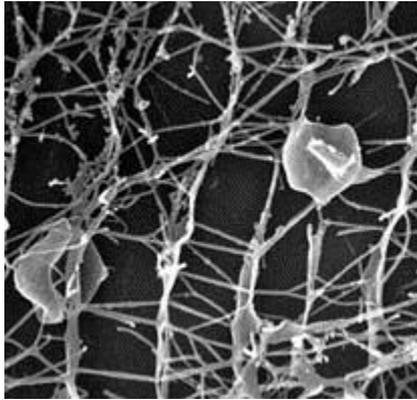


Bacillus stearothermophilus

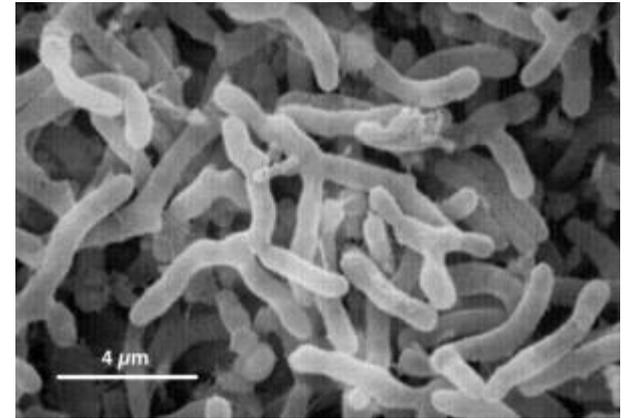




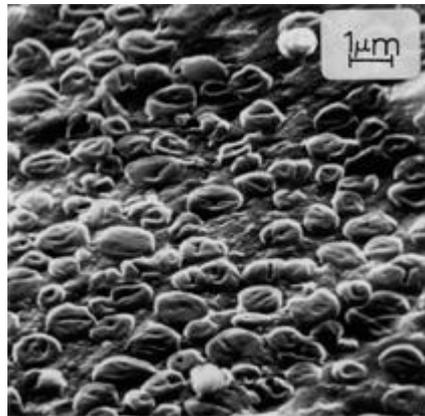
Abitanti degli ambienti estremi del pianeta



Pyrodictium, **termofilo**, vive ad alte temperature (80-150°C) nei pori idrotermici marini.



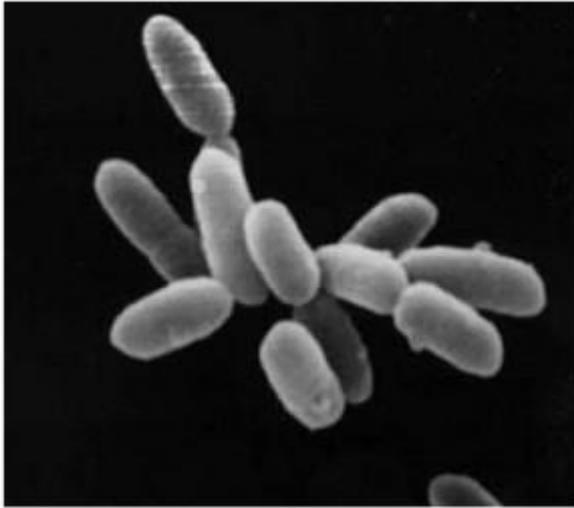
Rhodococcus sp., vive in ambienti freddi a temperature < 15 C°.



Sulfolobus acidocaldarius, **termofilo**, vive in ambienti vulcanici con temperature di 112°C.



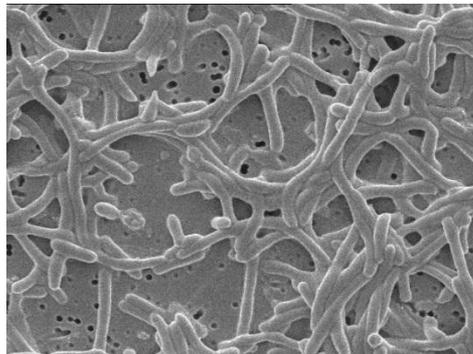
Chlamydomonas Nivalis è **psicrofilo** (basse temperatura).



Halobacterium salinarum è un batterio **alofilo**, che vive in ambienti ad alta concentrazione salina (8-30%) come laghi salati o stagni.



Deinococcus Radiodurans, resiste alle radiazioni grazie ad un eccellente sistema di correzione del DNA

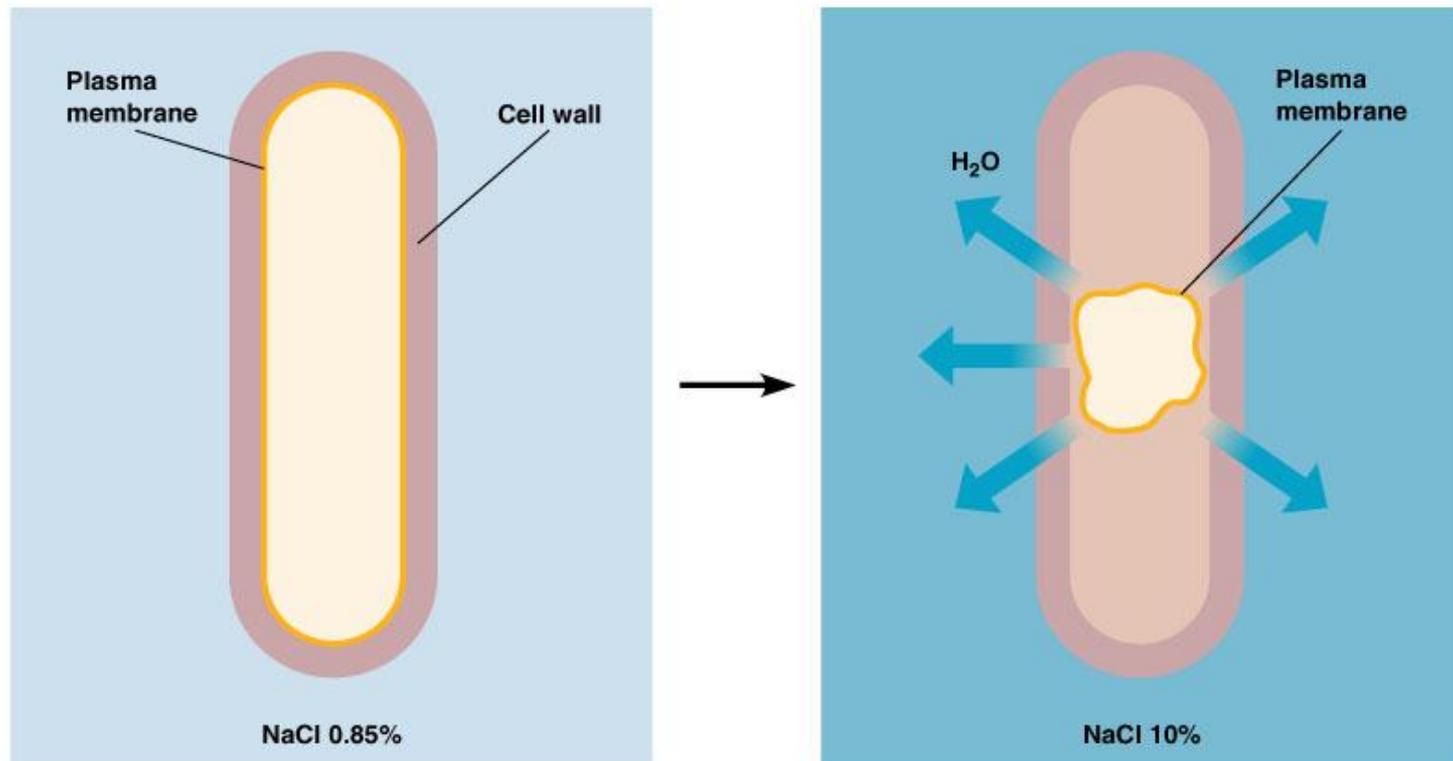


Thiobacillus ferrooxidans, **acidofilo**, ossidare solfuri ad acido solforico; attualmente il 10% della produzione mondiale di rame.

pH ottimale di crescita = in genere fra 6 e 8, ma alcuni crescono anche a **pH < 1** ed altri **> 9**

Pressione osmotica = Se la pressione osmotica è troppo elevata, i batteri muoiono. Ma ci sono batteri **osmofili** che possono crescere anche in soluzioni molto concentrate (es. 20% saccarosio)

Concentrazione salina fisiologica = 0.85%, ma i batteri **alofili** possono crescere in presenza del 15-25% di sale



SPORA

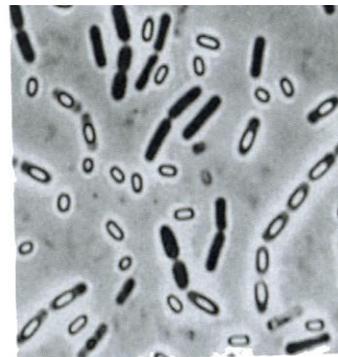
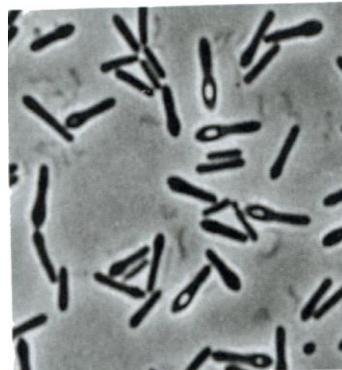
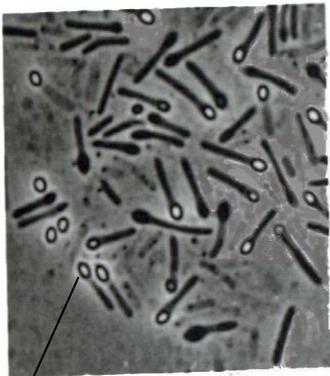
Alcuni bacilli **Gram+** (**Bacillus**, **Clostridium**) quando sono in condizioni sfavorevoli per la loro sopravvivenza possono formare **SPORE**.

La **SPORA** è una forma di resistenza che consente al batterio di sopravvivere in stato di inattività per tempi molto lunghi (anni, secoli - es. spore germinate da mummie egizie).

Resistente a essiccamento, calore, disinfettanti chimici e fisici.

La spora è metabolicamente inerte e contiene molta meno acqua del batterio nella forma vegetativa.

Causa notevoli problemi, es. nella conservazione di prodotti alimentari, nella sterilizzazione di materiale chirurgico.



La spora si forma all'interno del batterio e si libera dopo la distruzione del batterio.

Nei bacilli il diametro della spora non supera quello del batterio, nei clostridi invece è maggiore.

SPORA



Nella seconda metà del 1800
Ferdinand Julius Cohn (botanico
Polacco)
dimostrò come l'acqua bollente
uccideva le cellule vegetative del
Bacillus subtilis, ma non le
endospore mettendo così
definitivamente a tacere la vecchia
dottrina della "generazione
spontanea".

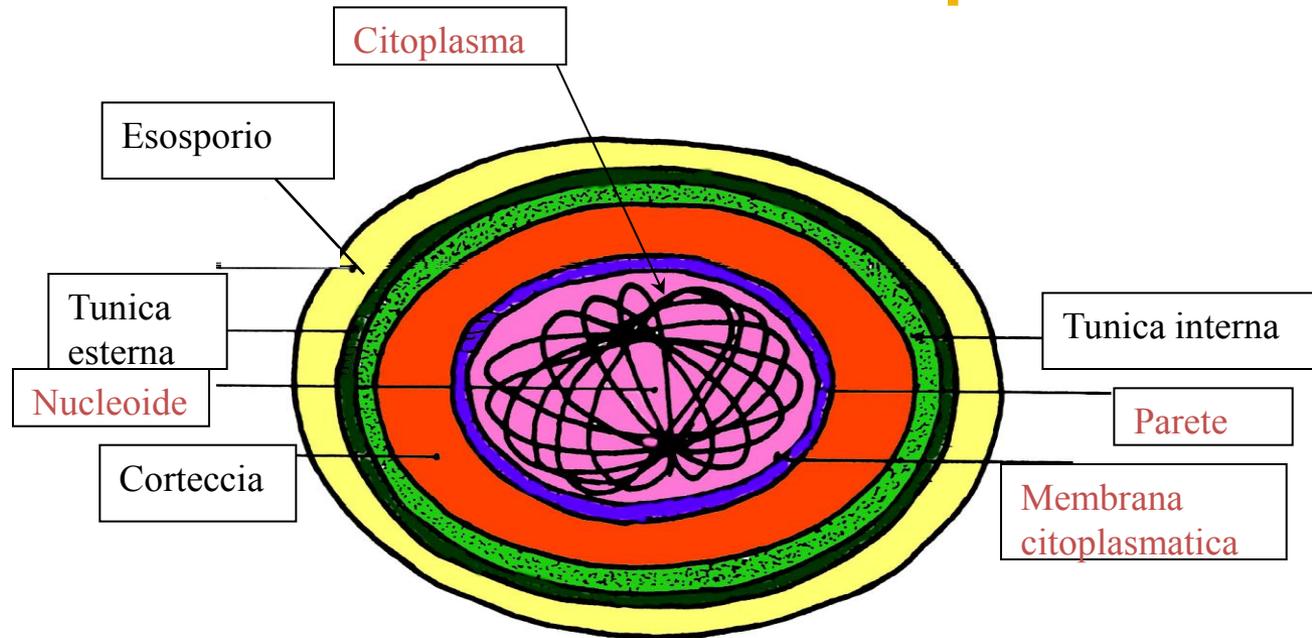
Descritte da un gruppo di
ricercatori in colture di
batteri del suolo presi da
un recipiente sigillato per
300 anni



Descritte in mummie
egiziane di 4000 anni fa



Ultrastruttura della Spora



- Nucleo centrale o protoplasto: DNA, RNA (rRNA e tRNA, ma non mRNA) e proteine (ribosomiali ed enzimi) immersi in quello che resta del citoplasma.
- Membrane cellulare
- Parete cellulare (peptidoglicani).
- Corteccia: peptidoglicano modificato+ **acido dipicolinico**, che ingloba residui citoplasmatici
- Tuniche: proteine solforate molto stabili, ricche di legami crociati; responsabili resistenza spora ad agenti chimici tossici.
- Membrana esterna complessa (esosporio), con peptidoglicani e **acido teicoico**.

Struttura

Struttura

vegetativa Gram +

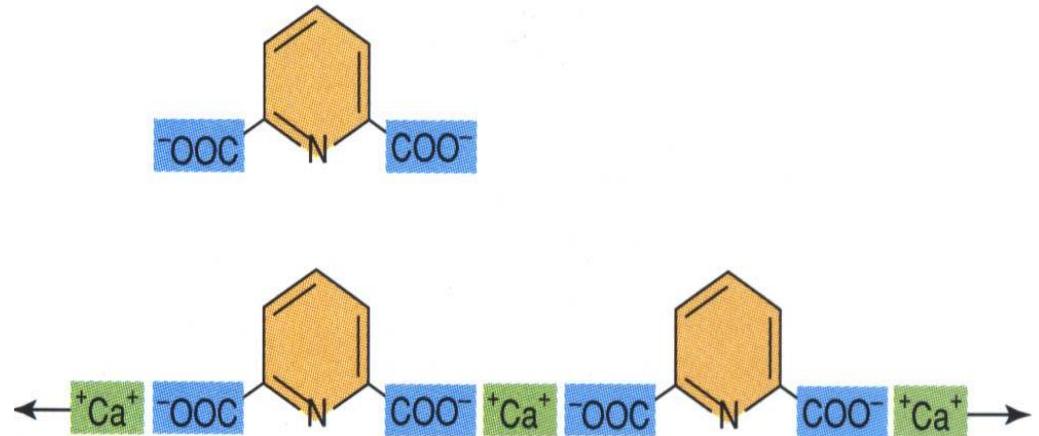
spora

Caratteristiche chimiche e molecolari

Le caratteristiche chimiche più appariscenti della spora sono:

- 1) disidratazione;
- 2) accumulo di Ca^{2+} e **acido dipicolinico** (può costituire più del 10% della spora). Il Ca^{2+} è legato dall'ac. dipicolinico a formare il dipicolinato di calcio;
- 3) Nel citoplasma sono presenti proteine a basso peso molecolare (**SASP**: small acid soluble proteins) con funzione di protezione e di riserva

Un costituente della spora, assente nel batterio allo stato vegetativo, è l'acido dipicolinico, formato da un precursore del peptidoglicano.



RESISTENZA DELLA SPORA

Al calore:

- Estrema disidratazione del protoplasto
- Integritá rivestimenti: tuniche, corteccia
- Mineralizzazione del protoplasto (accumulo di ioni Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+})
- Mantenimento struttura delle macromolecole: dipicolinato di Ca, che si sostituisce all'acqua libera

All'ambiente:

- Barriera all'ingresso di sostanze e agenti chimici: tuniche e corteccia
- Protezione da danni causati dalle radiazioni ultraviolette: DNA batterico rivestito da proteine (SASP)

Resistenza della Spora al calore

Tabella 8.1 Alcuni tempi di uccisione di spore batteriche mediante calore

ORGANISMO	TEMPO DI DISTRUZIONE in minuti						
	120°C	130°C	140°C	150°C	160°C	170°C	180°C
<i>Bacillus anthracis</i>			fino a 180	60 ÷ 120	9 ÷ 90		3
<i>Clostridium botulinum</i>	120	60	15 ÷ 60	25	20 ÷ 25	10 ÷ 15	5 ÷ 10
<i>Clostridium welchii</i>	50	15 ÷ 35	5				
<i>Clostridium tetani</i>		20 ÷ 40	5 ÷ 15	30	12	5	1
Spore del suolo				180	30 ÷ 90	15 ÷ 60	15

Calore secco

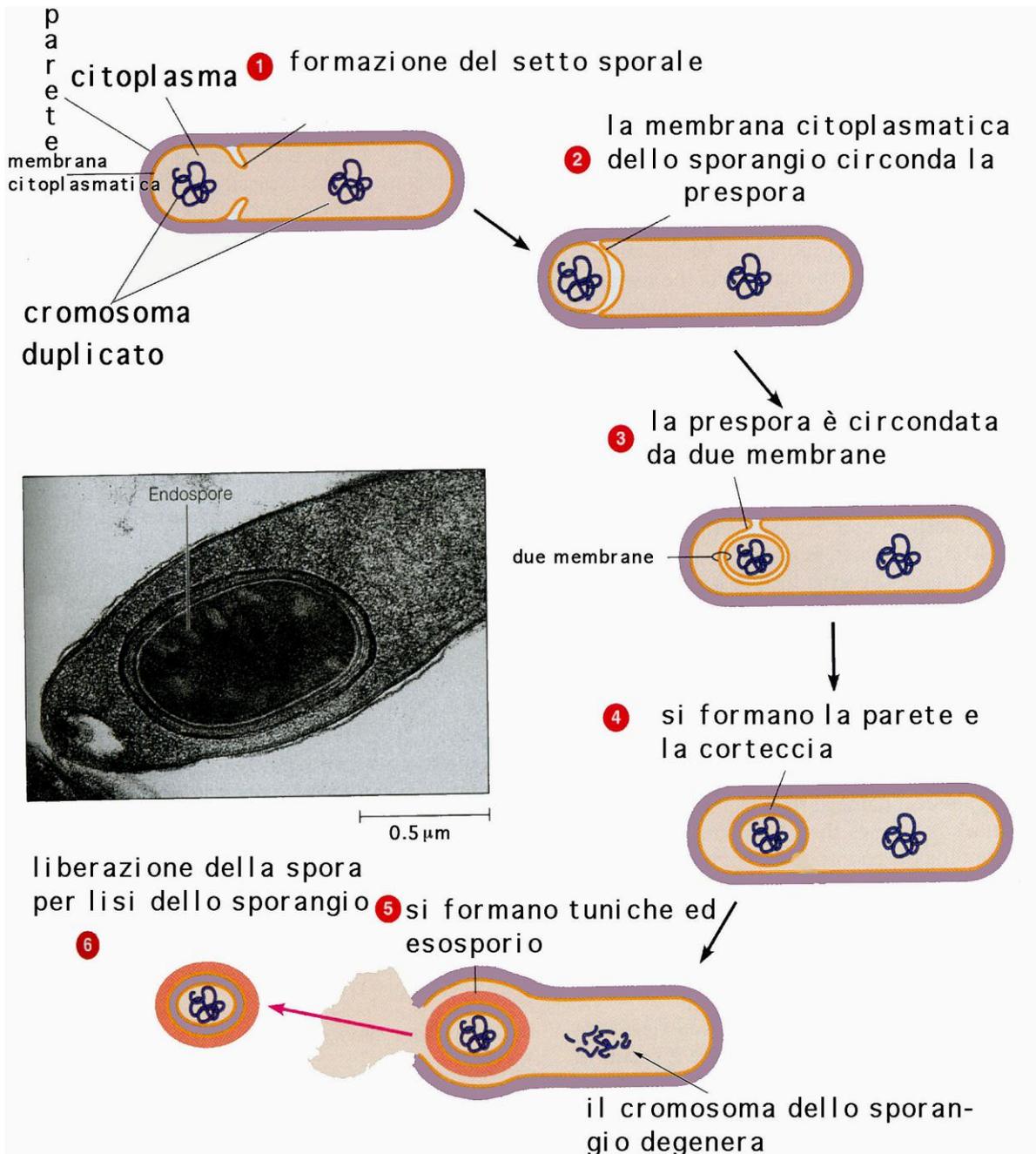
Tabella 8.2. Alcuni tempi di distruzione di spore batteriche mediante calore umido

ORGANISMO	TEMPO DI DISTRUZIONE in minuti							
	100°C	105°C	110°C	115°C	120°C	125°C	130°C	134°C
<i>Bacillus anthracis</i>	2 ÷ 15	5 ÷ 10						
<i>Bacillus subtilis</i>	molte ore							
Un batterio anaerobio putrefattivo	780	170	41	15	5,6			
<i>Clostridium tetani</i>	5 ÷ 90	5 ÷ 25						
<i>Clostridium welchii</i>	5 ÷ 45	5 ÷ 27	10 ÷ 15	4	1			
<i>Clostridium botulinum</i>	300 ÷ 530	40 ÷ 120	32 ÷ 90	10 ÷ 40	4 ÷ 20			
Batteri del suolo	molte ore	420	120	15	6 ÷ 30	4		1,5 ÷ 10
Batteri termofili		400	100 ÷ 300	40 ÷ 110	11 ÷ 35	3,9 ÷ 8,0	3,5	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	150	45	12					

Calore umido

Formazione della spora

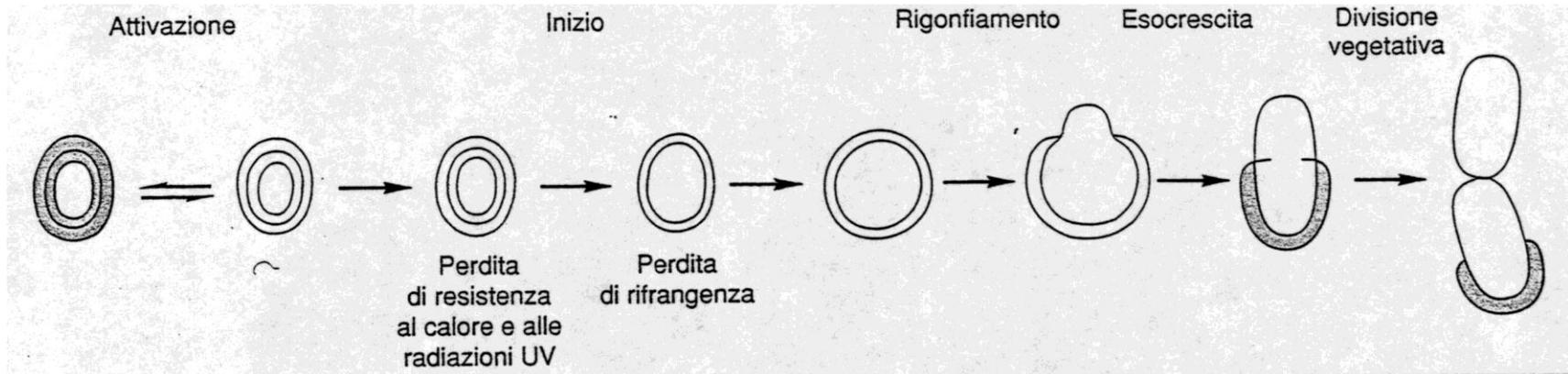
La sporulazione è un processo complesso; si verifica di solito quando mancano le sostanze nutritive (es. alla fine della fase esponenziale di crescita). Inizia con la duplicazione del cromosoma batterico e la formazione di un setto asimmetrico ad un polo della cellula che divide le due molecole di DNA.



La durata del processo di sporulazione è di circa 6-10 ore.

GERMINAZIONE

Si verifica naturalmente quando le condizioni ambientali ritornano favorevoli (umidità e nutrienti).



ATTIVAZIONE = si ha sperimentalmente mediante esposizione al calore ($60^{\circ} - 80^{\circ} \text{C}$ per qualche minuto), corrisponde all'invecchiamento naturale della spora → danneggiamento e permeabilizzazione degli involucri esterni → scambi metabolici con l'ambiente.

GERMINAZIONE = reazioni degradative, idrolisi della corteccia, eliminazione dell'ac. Dipicolinico e del Ca^{2+} , inizio dell'idratazione, ricomparsa della termosensibilità.

ESOCRESCITA = fuoriuscita cellula vegetativa, inizia il metabolismo respiratorio e l'attività biosintetica. mRNA → proteine → DNA. Le proteine che proteggono il DNA costituiscono la riserva di aminoacidi ed energia utilizzata durante la germinazione.

Durata della germinazione 1-2 ore

ALCUNI BACILLI GRAM POSITIVI SPORIGENI

Bacillus

B. anthracis

CARBONCHIO

B. cereus

TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

B. subtilis

INFEZIONI RESPIRATORIE

B. clausii

PROBIOTICO

Clostridium

C. botulinum

BOTULISMO

C. difficile

COLITE PSEUDOMEMBRANOSA

C. perfringens

GANGRENA GASSOSA

C. tetani

TETANO

COCCHI

Sporasarcina

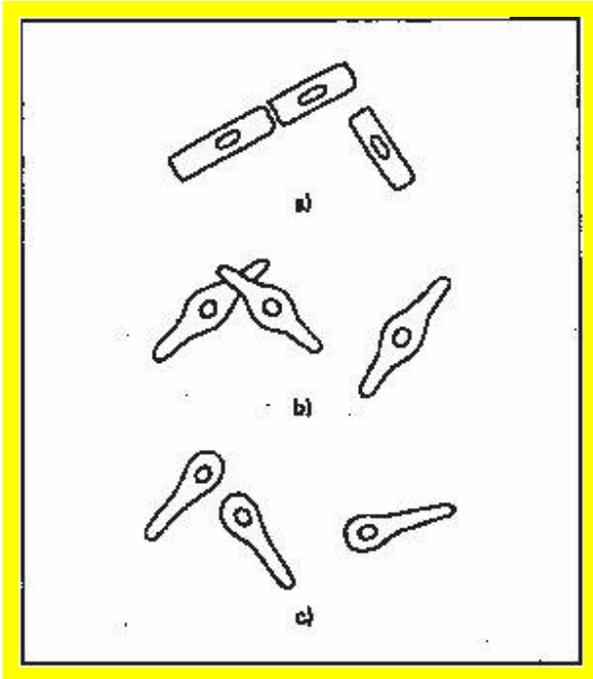
PATOGENI OPPORTUNISTI

RICKETTSIE

Coxiella burneti

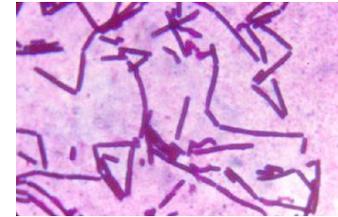
FEBBRE Q

MORFOLOGIA



BATTRIDIO

Spora centrale che non deforma la cellula madre



Clostridium perfringens

CLOSTRIDIO

Spora centrale con diametro maggiore che deforma la cellula madre



Bacillus anthracis

PLETTRIDIO

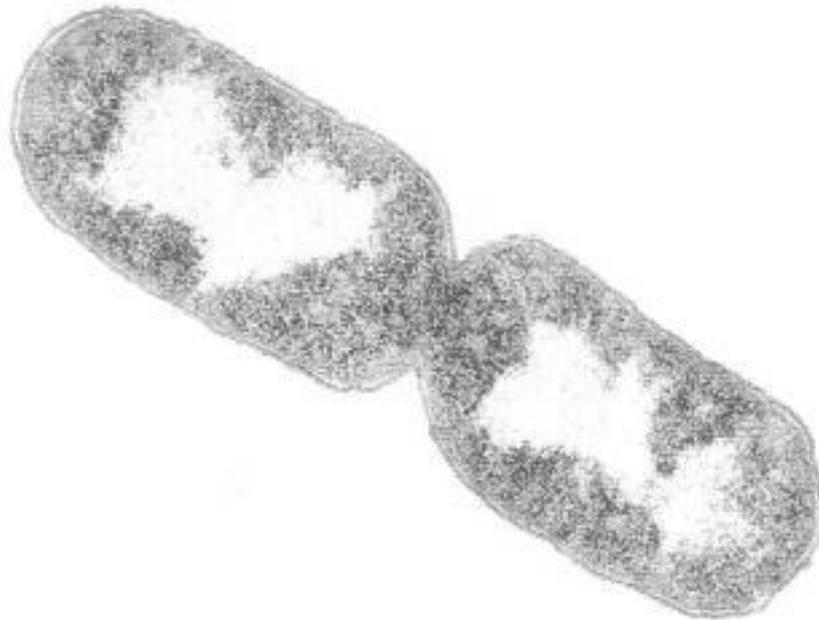
Spora terminale che deforma la cellula madre



Clostridium tetano

RIPRODUZIONE BATTERICA

I batteri hanno solo 1 molecola di DNA cromosomico → non è necessaria la mitosi per dividere i prodotti di replicazione fra le cellule figlie, ma avviene per **SCISSIONE SEMPLICE BINARIA**



DIVISIONE PER SCISSIONE SEMPLICE BINARIA

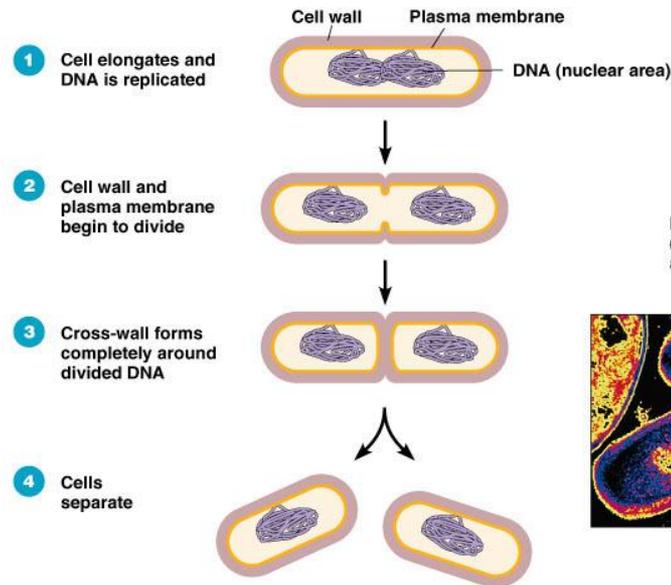
Il cromosoma è ancorato alla membrana plasmatica

1) Duplicazione del cromosoma e duplicazione del punto di attacco sulla membrana.

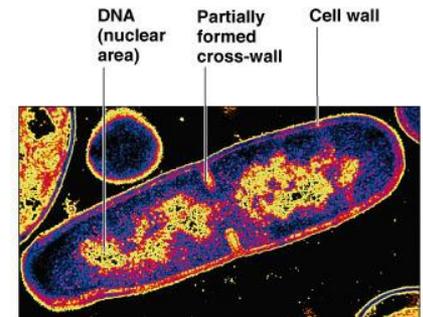
2) Accrescimento della membrana → allungamento della cellula partendo dalla zona fra le 2 molecole di DNA.

3) Formazione di un setto dalla membrana plasmatica in direzione centripeta

4) Sintesi della parete sul setto



(a) A diagram of the sequence of cell division.



(b) A thin section of a cell of *Bacillus licheniformis* starting to divide.

Replicazione del DNA batterico

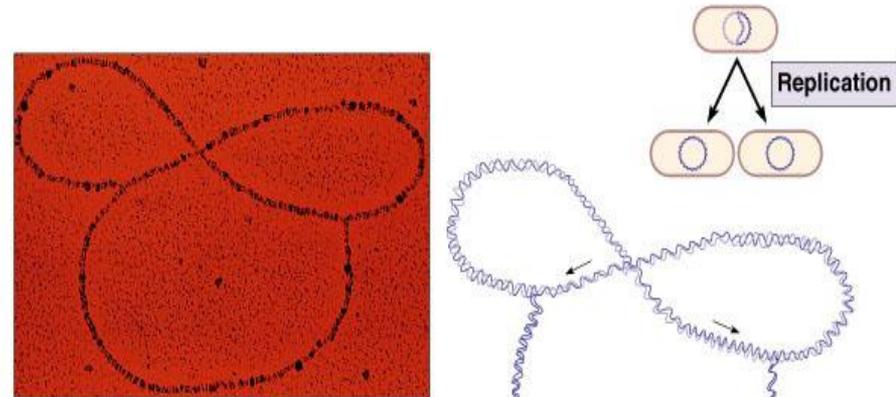
OriC: origine di replicazione

Girasi-Elicasi: svolge il DNA

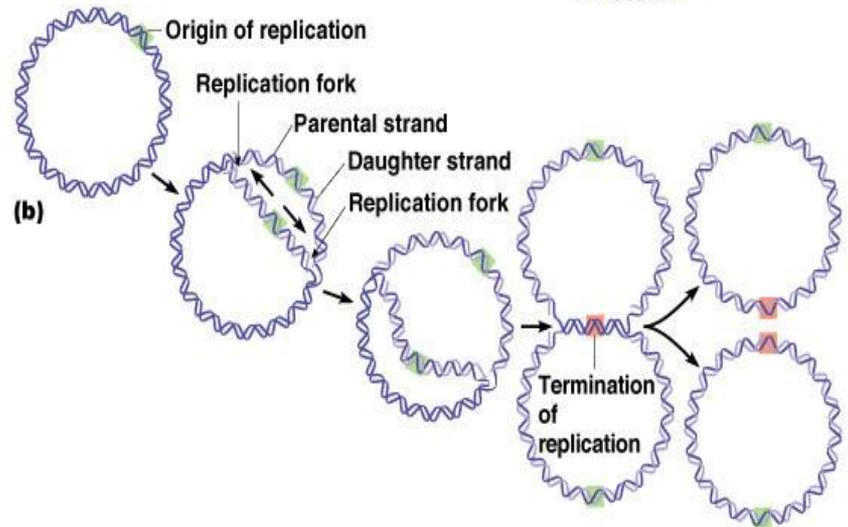
Primasi: sintesi iniziatori

DNA-pol-DNA dipendente: sintesi copia

Topoisomerasi: controlla superavvolgimenti DNA circolare



(a)



(b)

Principali enzimi coinvolti nella replicazione del DNA nei Batteri

Enzima	Geni codificanti	Funzione
DNA polimerasi III	<i>polC; dnaE, Q, N, X; holA-E; mutD</i>	Principale enzima polimerizzante
DNA polimerasi I	<i>polA</i>	Elimina l'innesco di RNA e polimerizza i nucleotidi mancanti
Elicasi	<i>dnaB</i>	Svolge l'elica a livello della forca di replicazione
Primasi	<i>dnaG</i>	Inizia la sintesi di nuove eliche di DNA
Proteina di legame all'origine della replicazione	<i>dnaA</i>	Si lega all'origine di replicazione; facilita la denaturazione del DNA e l'apertura del complesso
Proteina di legame al DNA a singola elica	<i>ssb</i>	Evita che le eliche denaturate si riappaino
DNA ligasi	<i>ligA, ligB</i>	Salda le interruzioni nel DNA

Replicazione del DNA batterico

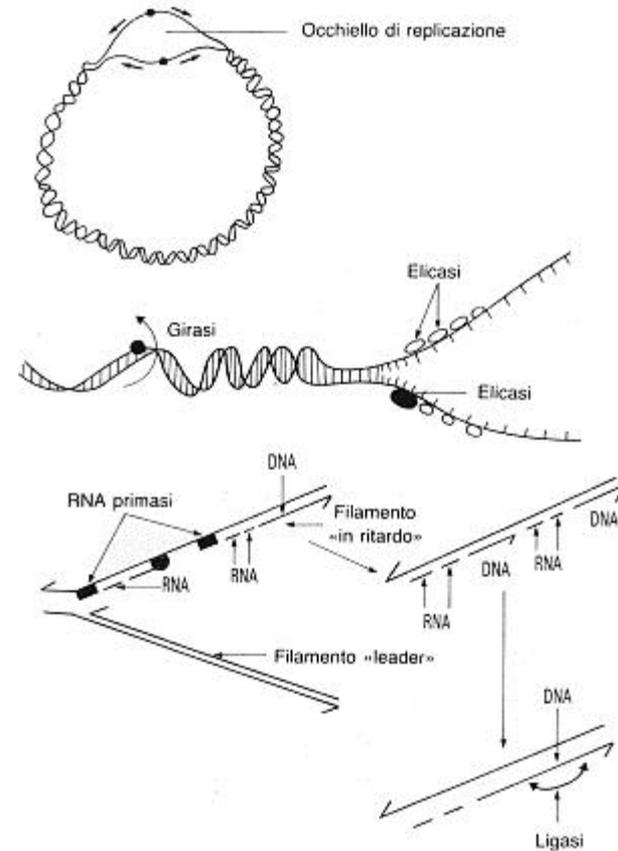
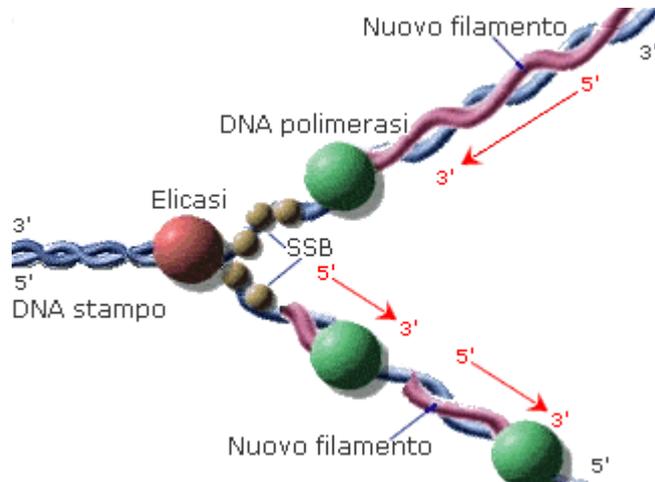
Sintesi semiconservativa

Entrambi i filamenti come stampi

Forcelle di crescita bidirezionale

Filamento leading: 5'-3'

Filamento lagging: Frammenti di okazaki



MODIFICAZIONI GENICHE NEI BATTERI

Determinate da 2 meccanismi:

MUTAZIONI

**Mutazione =
evento casuale,
improvviso e raro. Il
batterio mutato
acquisisce
caratteristiche genetiche
diverse trasmissibili ai
discendenti.**

RICOMBINAZIONE

**Ricombinazione =
quando 2 regioni di
DNA si appaiono in
corrispondenza di
zone omologhe e si
scambiano alcune
sequenze.**

MUTAZIONE

M. spontanea = frequenza 10^{-6} – 10^{-9} .

Avviene nelle normali condizioni di crescita dei batteri ed è dovuta soprattutto ad errori di appaiamento delle basi durante la replicazione del DNA.

M. indotta = mezzi fisici o chimici possono aumentare la frequenza di mutazione di 100-1000 volte.

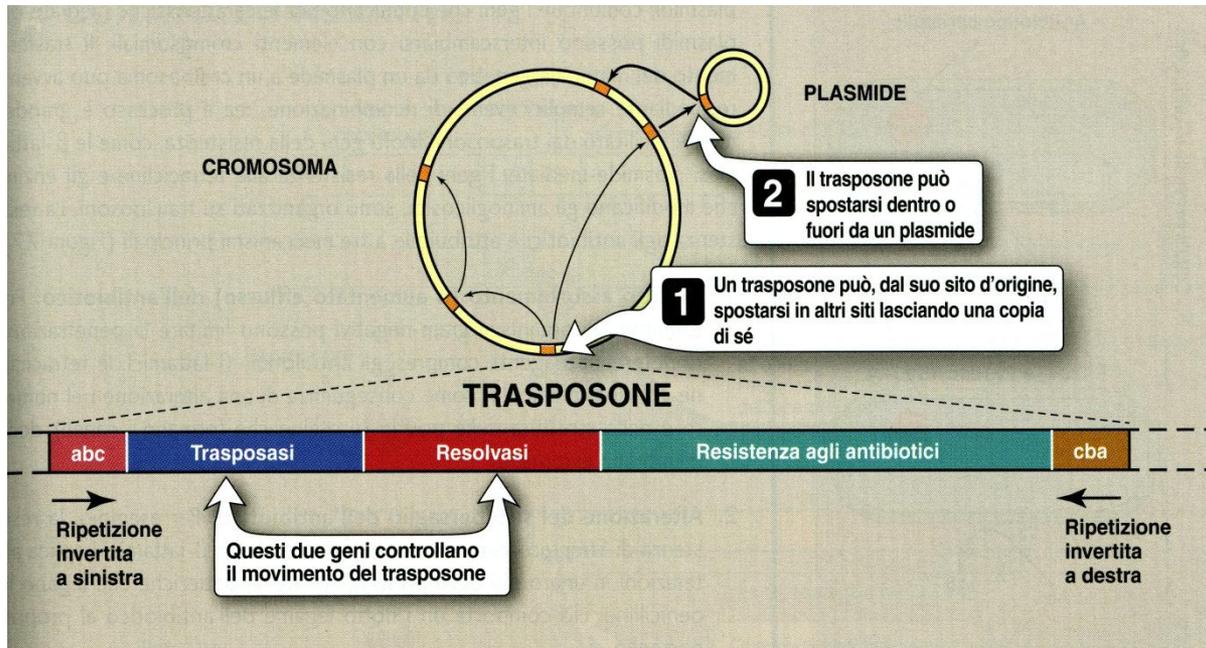
M. puntiforme = coinvolge una sola base nucleotidica. Molte m. puntiformi sono silenti = nessun cambio nell'attività del prodotto genico.

Mutazioni più consistenti possono verificarsi mediante inversione, traslocazione o delezione di più basi.

Esistono diversi tipi di mutanti: resistenti agli antibiotici, nutrizionali (auxotrofi = perdita di capacità di sintesi di metaboliti), morfologici, letali condizionati (incapaci di crescere in certe condizioni ambientali, es. mutanti termosensibili), di virulenza (perdita di tossine, capsula, ecc.).

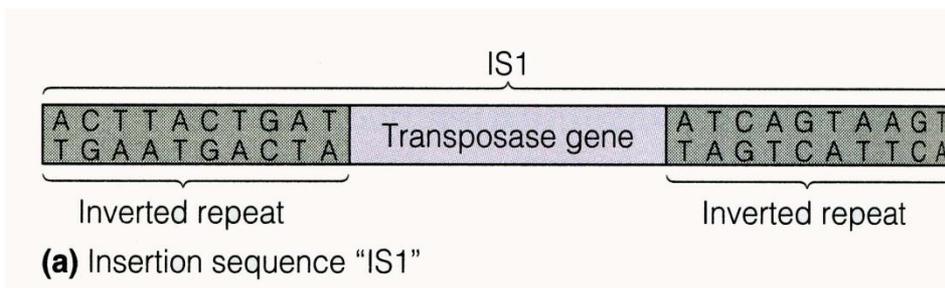
MUTAZIONE (2)

Mutazioni consistenti possono verificarsi mediante TRASPOSIZIONE.



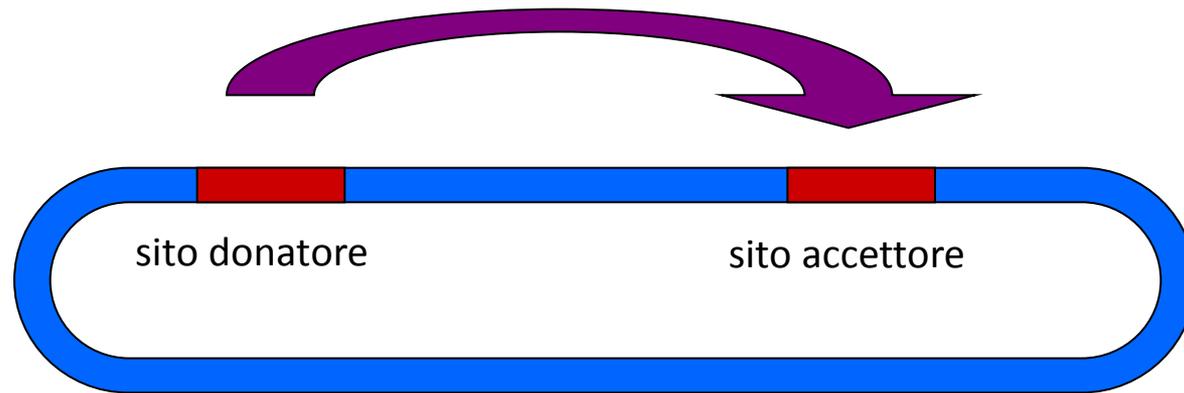
I **trasposoni** sono segmenti di DNA che possiedono la capacità di spostarsi da un sito all'altro sul cromosoma e anche dentro o fuori dei plasmidi. Quando un trasposone si inserisce in un gene spesso la funzione del gene viene distrutta, quindi

i trasposoni sono agenti mutageni interni.



Elementi trasponibili

Sequenze che hanno la capacità di muoversi da un sito all'altro del cromosoma

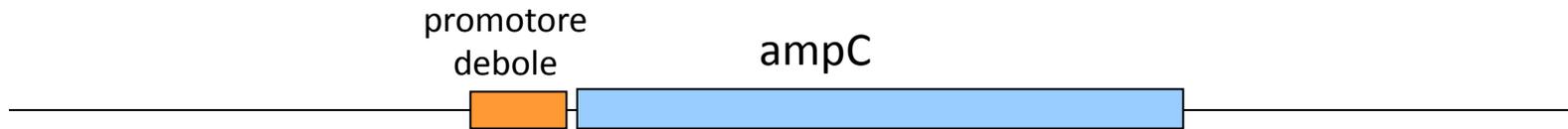


Diversamente dagli altri processi coinvolti nella ristrutturazione genomica, per la trasposizione non c'è nessuna omologia tra le sequenze del sito donatore e accettore

Gene *ampC* di *Klebsiella*

I trasposoni svolgono un ruolo importante nel movimento dei geni per la resistenza agli antibiotici e altri geni da un genoma a un plasmide e viceversa

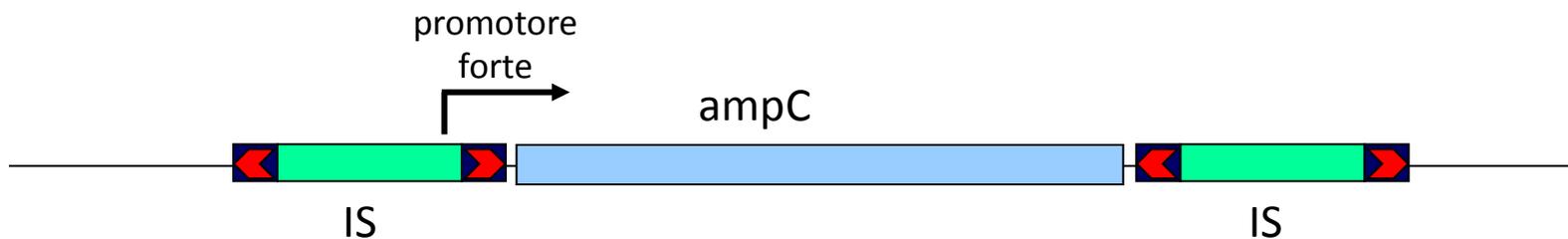
Il gene *ampC* di *K. pneumoniae* codifica per una β -lattamasi



Il ceppo iniziale di *Klebsiella* era poco resistente ai beta-lattamici (impediscono la sintesi della parete cellulare dei batteri, inibendo la transpeptidasi, che catalizza la formazione dei legami peptidici del peptidoglicano) poichè il gene *ampC* era scarsamente trascritto

Gene *ampC* di *Klebsiella*

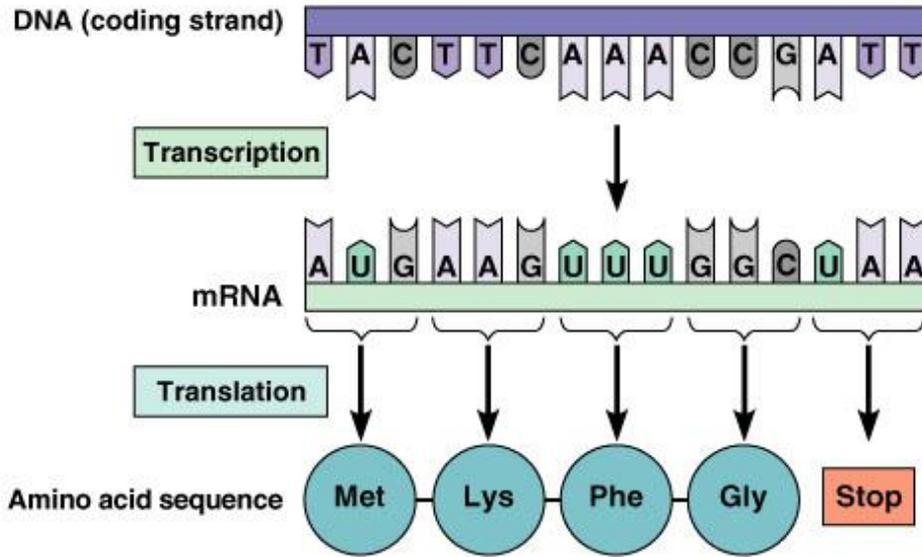
Sotto la selezione degli antibiotici il gene *ampC* ha acquisito due sequenze IS con il risultato di essere maggiormente trascritto conferendo un livello di resistenza clinicamente significativo



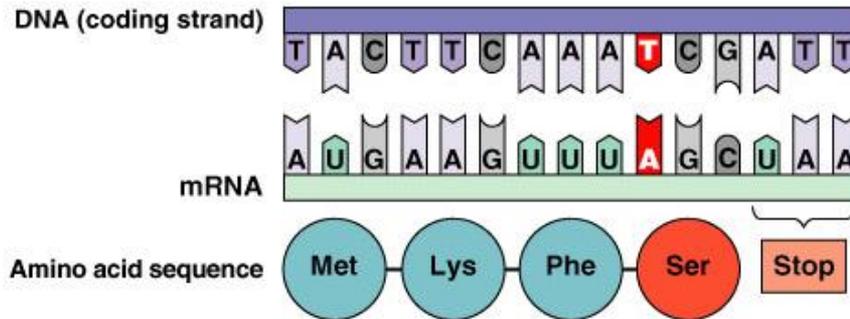
Il risultante trasposone è stato capace di muovere *ampC* in un plasmide coniugativo, oggi diffuso a molti ceppi di *Klebsiella*

Quello che un tempo era un gene di resistenza clinicamente irrilevante è diventato il terrore degli ospedali – tutto grazie alle IS

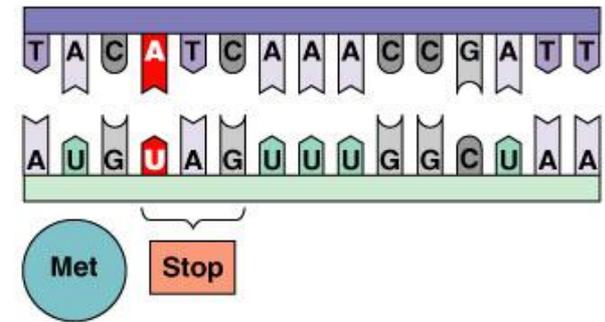
Esempi di mutazione



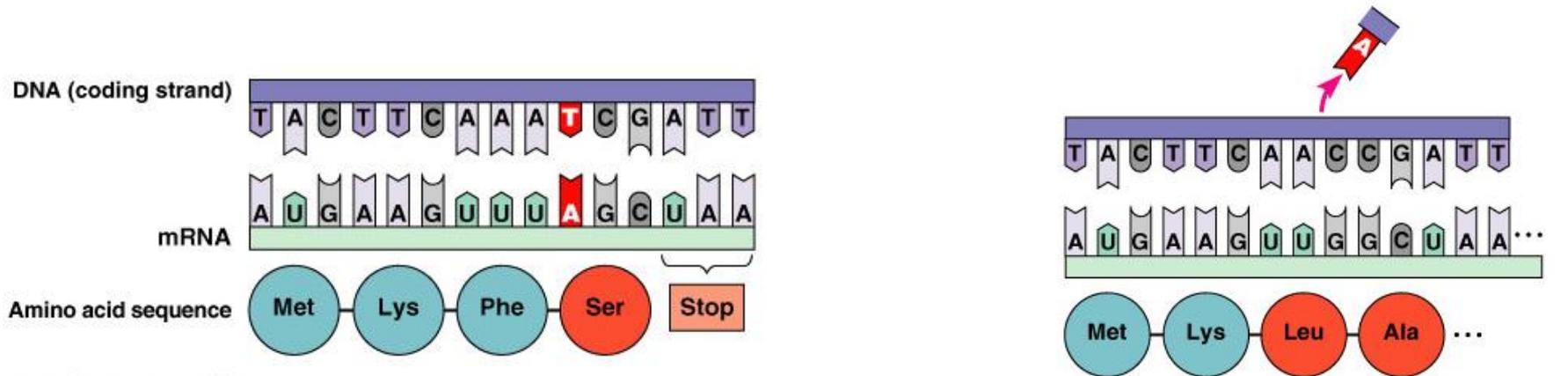
(a) Normal DNA molecule



(b) Missense mutation



(c) Nonsense mutation

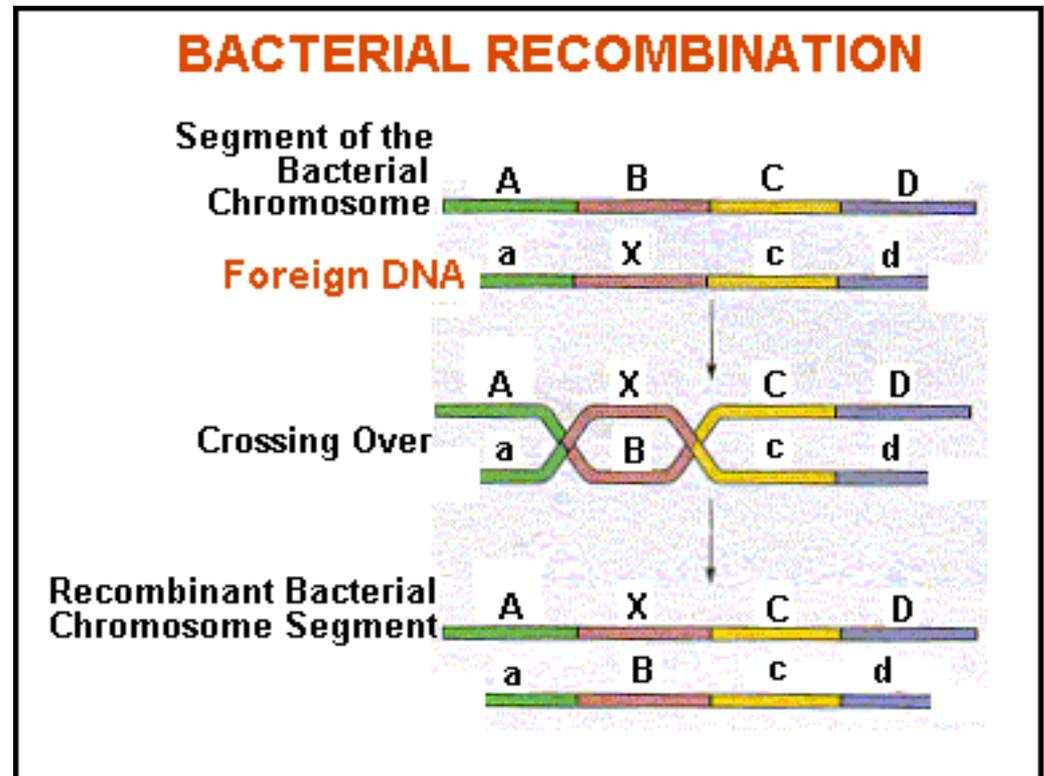


(d) Frameshift mutation

Ricombinazione

Nella cellula eucariotica (diploide) lo scambio genetico avviene nella stessa cellula durante la meiosi in occasione dell'appaiamento dei cromosomi, tramite crossing over.

Nella cellula batterica (aploide) ci deve essere **trasferimento di materiale genetico** da una cellula (donatrice) ad un'altra (ricevente) e, in caso di sequenze omologhe, ricombinazione attraverso crossing over.



Il trasferimento di materiale genetico da un batterio all'altro può avvenire mediante 3 meccanismi:

TRASFORMAZIONE

TRASDUZIONE

CONIUGAZIONE

Attenzione: il fatto che ci sia trasferimento di materiale genetico NON VUOL DIRE che c'è anche ricombinazione o modificazione nel batterio ricevente

Destino del DNA nella cellula ricevente:

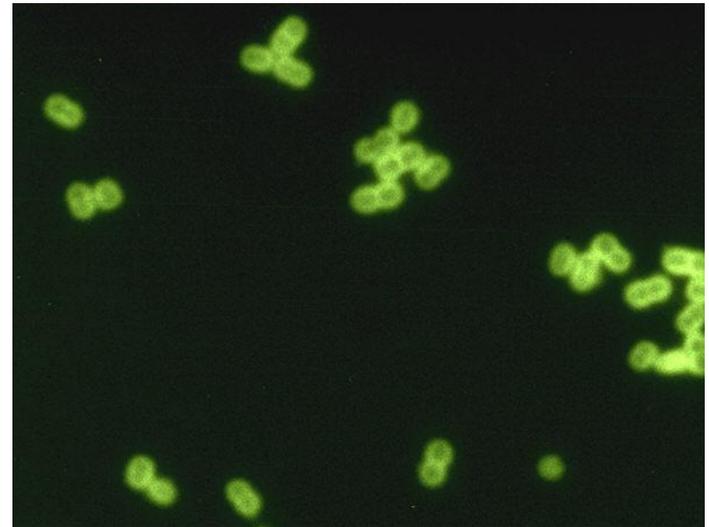
- può essere digerito
- può ricombinarsi
- può rimanere libero nel citoplasma senza replicarsi (trasmesso ad una sola cellula figlia)
- può rimanere plasmidico

Trasformazione:

- Esperimento di Griffith : 1928
- Streptococcus pneumoniae
- Patogenicità legata alla capsula polisaccaridica .
- Colonie lisce presenza di capsula S.
- Colonie rugose assenza di capsula R.

Lo *Streptococcus pneumoniae*, è un batterio Gram+, il principale responsabile della polmonite negli adulti. All'esame microscopico si presenta costituito da due cocci che si uniscono ad un'estremità.

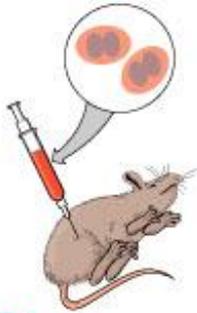
Le specie virulente sono dotate di capsula gelatinosa polisaccaridica.



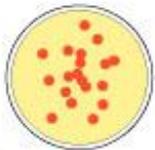
Esperimento di Griffith (1928)

TRASFORMAZIONE

- 1** Living encapsulated bacteria injected into mouse



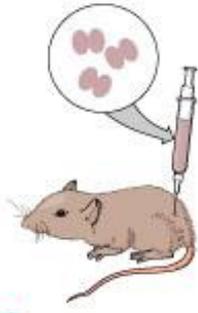
- 2** Mouse died



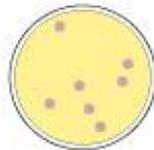
- 3** Colonies of encapsulated bacteria were isolated from dead mouse

(a)

- 1** Living nonencapsulated bacteria injected into mouse



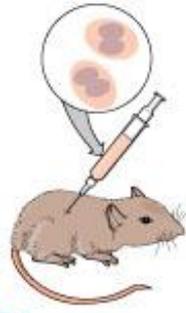
- 2** Mouse remained healthy



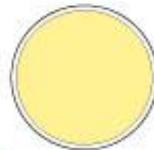
- 3** A few colonies of nonencapsulated bacteria were isolated from mouse; phagocytes destroyed nonencapsulated bacteria

(b)

- 1** Heat-killed encapsulated bacteria injected into mouse



- 2** Mouse remained healthy



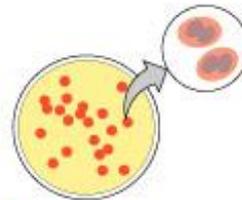
- 3** No colonies were isolated from mouse

(c)

- 1** Living nonencapsulated and heat-killed encapsulated bacteria injected into mouse



- 2** Mouse died

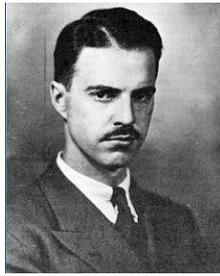


- 3** Colonies of encapsulated bacteria were isolated from dead mouse

(d)

**Quando lo *Streptococcus pneumoniae* ha la capsula
resiste alla fagocitosi dei macrofagi → polmonite.**

I batteri non capsulati sono stati **trasformati →
hanno acquisito un nuovo carattere ereditario
incorporando DNA (geni) dei batteri uccisi**



Avery, MacLeod, McCarty, c. 1944

STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE
INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES
INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION
ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III

BY OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MACLEOD, M.D., AND
MACLYN McCARTY,* M.D.

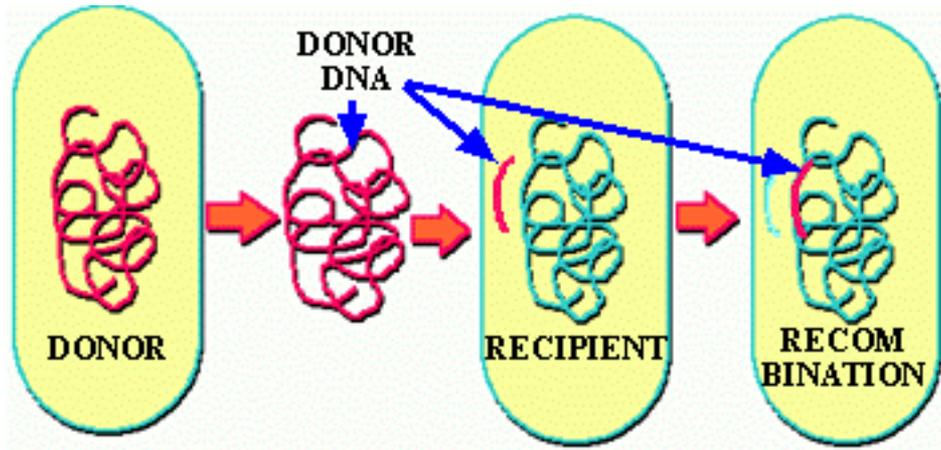
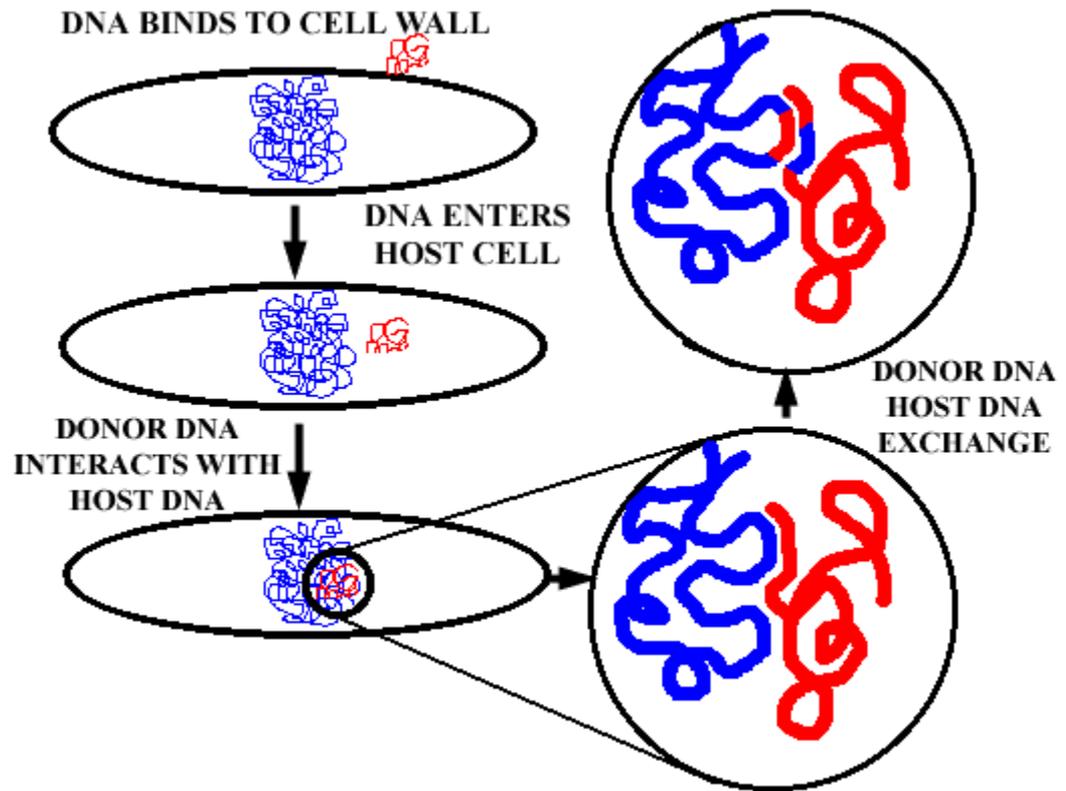
(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)

Nel 1944 “il principio trasformante” di Griffith venne identificato con il DNA batterico

Enzima	Substrato	Effetto sull'attività trasformante
Chimotripsina	Proteine	Nessuno
Tripsina	Proteine	Nessuno
Ribonucleasi	RNA	Nessuno
Deossiribonucleasi	DNA	Distrutta

Trasformazione: due condizioni perche' avvenga:

1. Il DNA trasformante deve essere a doppia elica con peso molecolare superiore a 10^6 daltons ed avere un'elevata omologia con il DNA della cellula ricevente



2. La cellula ricevente deve trovarsi in un particolare stato fisiologico definito "**competenza**". Il > numero di cellule competenti si ha alla fine della fase di crescita esponenziale.

1) Sviluppo dello stato di competenza:

La cellula libera nell'ambiente la proteina detta “**fattore di competenza**”.

a) **Interazione** con appositi **recettori di superficie** della cellula che produce il fattore.

b) Sintesi di un **autolisina** che digerisce parte della parete cellulare esponendo la membrana in cui si espongono alcune **proteine come:**

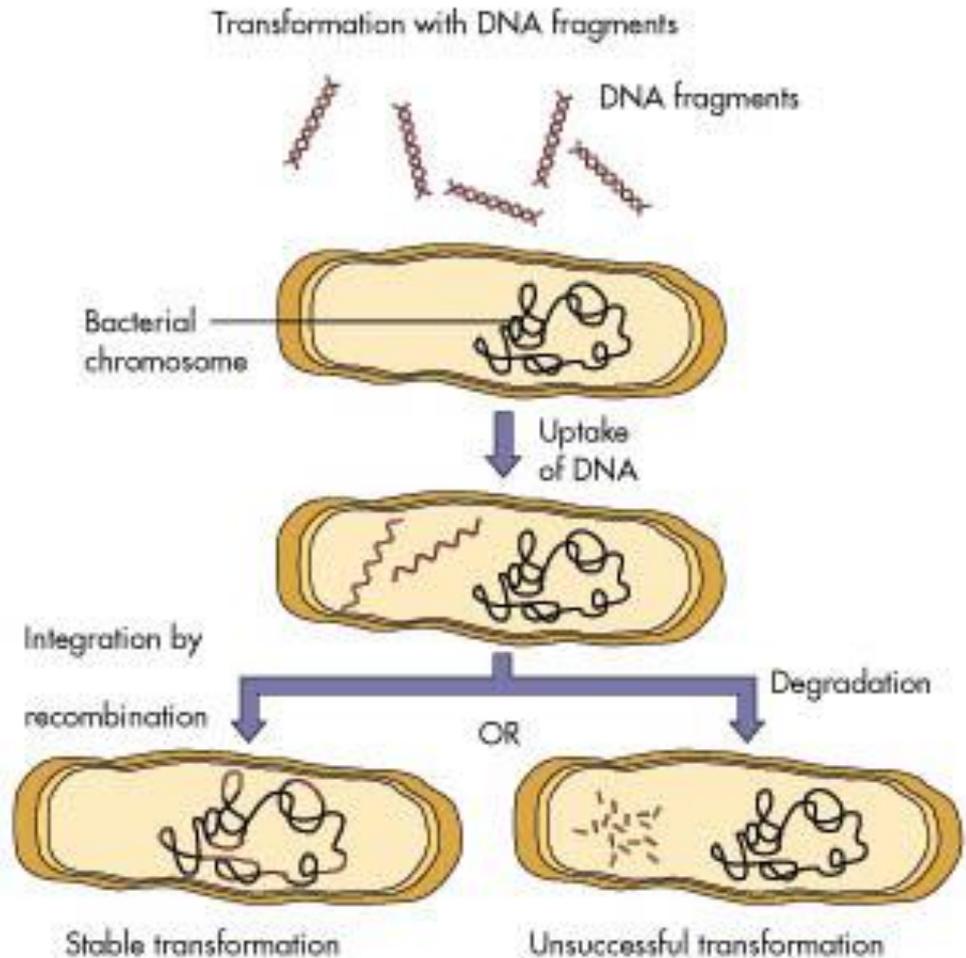
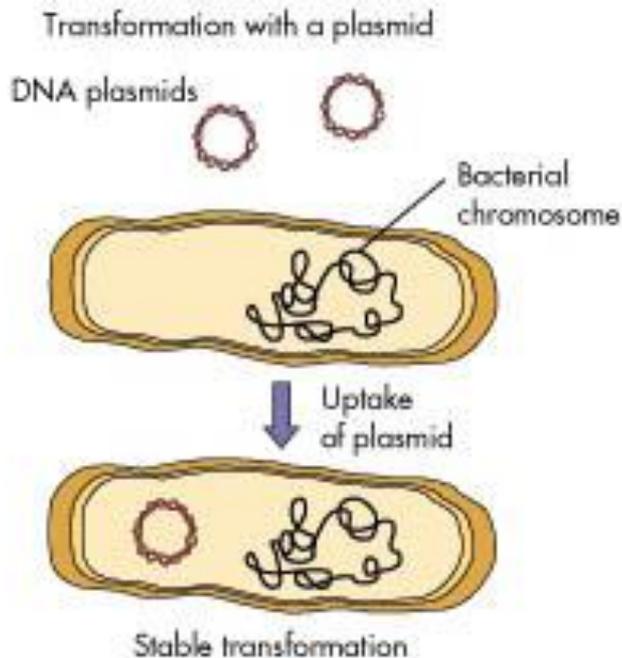
la proteina DNA-binding ed una **nucleasi specifica**.

- a) Frammenti di DNA bicatenario presenti nell'ambiente si legano alle **proteine DNA-binding**.
- b) Un filamento viene digerito dalla **nucleasi specifica**.
- c) Il filamento residuo, complessato ad alcune proteine specifiche ed introdotto nella cellula dove per analogia di basi si **integra nel genoma batterico**, spiazzando un parte dei due filamenti della molecola originaria.

Per la trasformazione è necessario che:

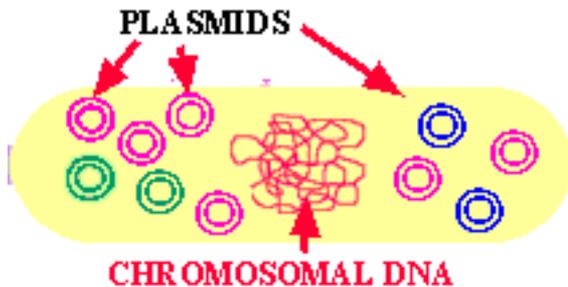
1- Il DNA donatore entri nel batterio ricevente

2 - Ci sia ricombinazione o il DNA donatore sia un plasmide in grado di replicarsi autonomamente



PLASMIDI

Elemento genetico extracromosomiale formato da DNA bicitenario circolare, con dimensioni variabili (1000 – 200.000 paia di basi) [il cromosoma batterico è $1 - 5 \times 10^6$ pb]. Replicazione autonoma.



Un batterio può non avere plasmidi, averne uno solo, o averne tanti

Codificano funzioni non necessarie per la sopravvivenza in ambienti ottimali, come: tossine, pili ed adesine, enzimi che danno resistenza ai farmaci antibatterici (fattore R), batteriocine (peptidi che inibiscono o uccidono altre specie batteriche), ecc.

EPISOMA = plasmide che può integrarsi nel genoma batterico.

Importanza dei Plasmidi

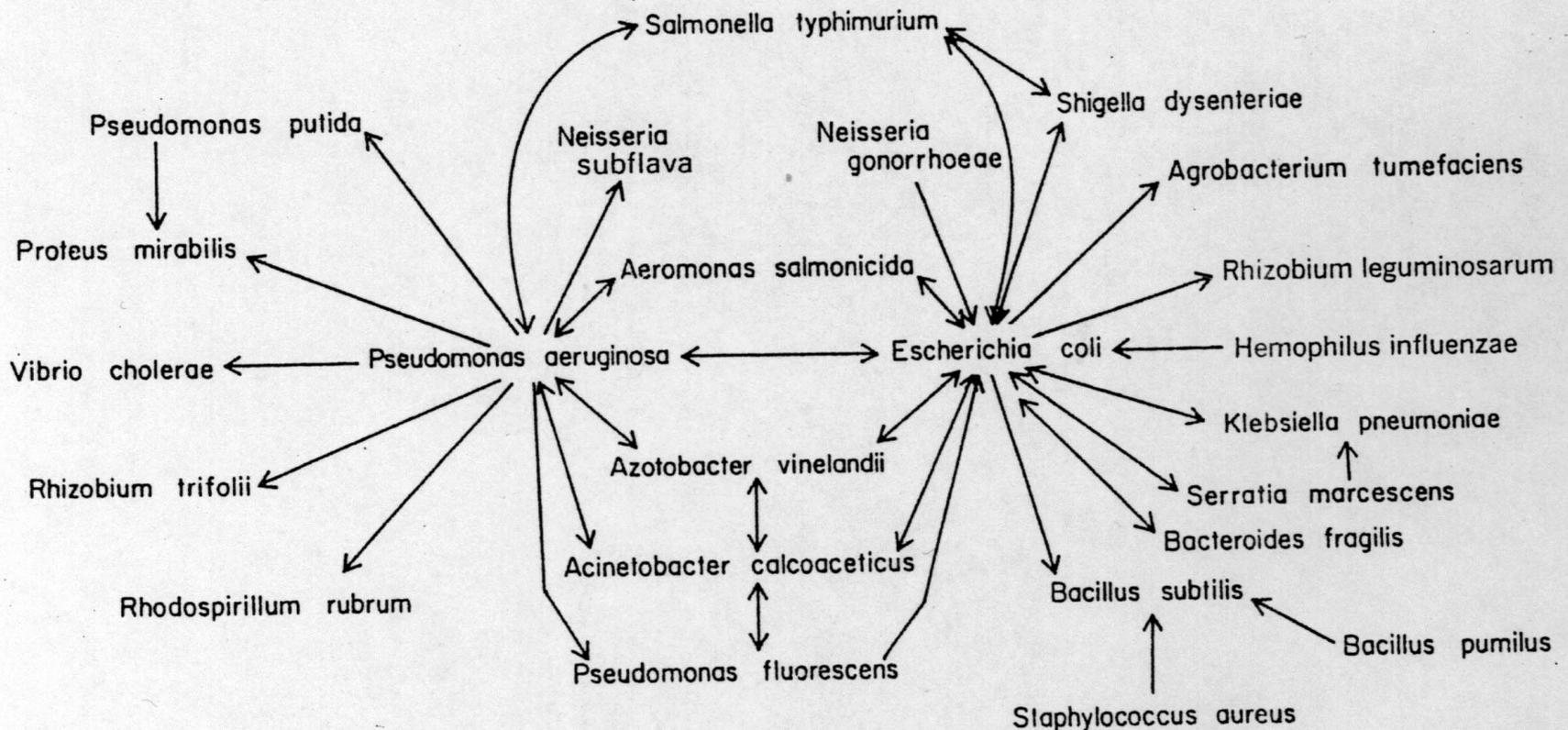
Alcune specie di *Pseudomonas* possono metabolizzare sostanze tossiche (toluene, idrocarburi del petrolio) e utilizzarle come fonte di carbonio, perché hanno plasmidi che codificano particolari enzimi catabolizzanti - **BIOREMEDIATION**



I ceppi di *Escherichia coli* che causano diarrea contengono plasmidi che codificano tossine e fattori di adesione alla parete intestinale. Senza questi plasmidi *E. coli* è un residente innocuo dell'intestino, con i plasmidi è patogeno.

PLASMIDI

Alcuni plasmidi hanno un ampio spettro d'ospite e possono essere trasferiti (mediante i meccanismi di scambio genetico) anche a batteri molto differenti:



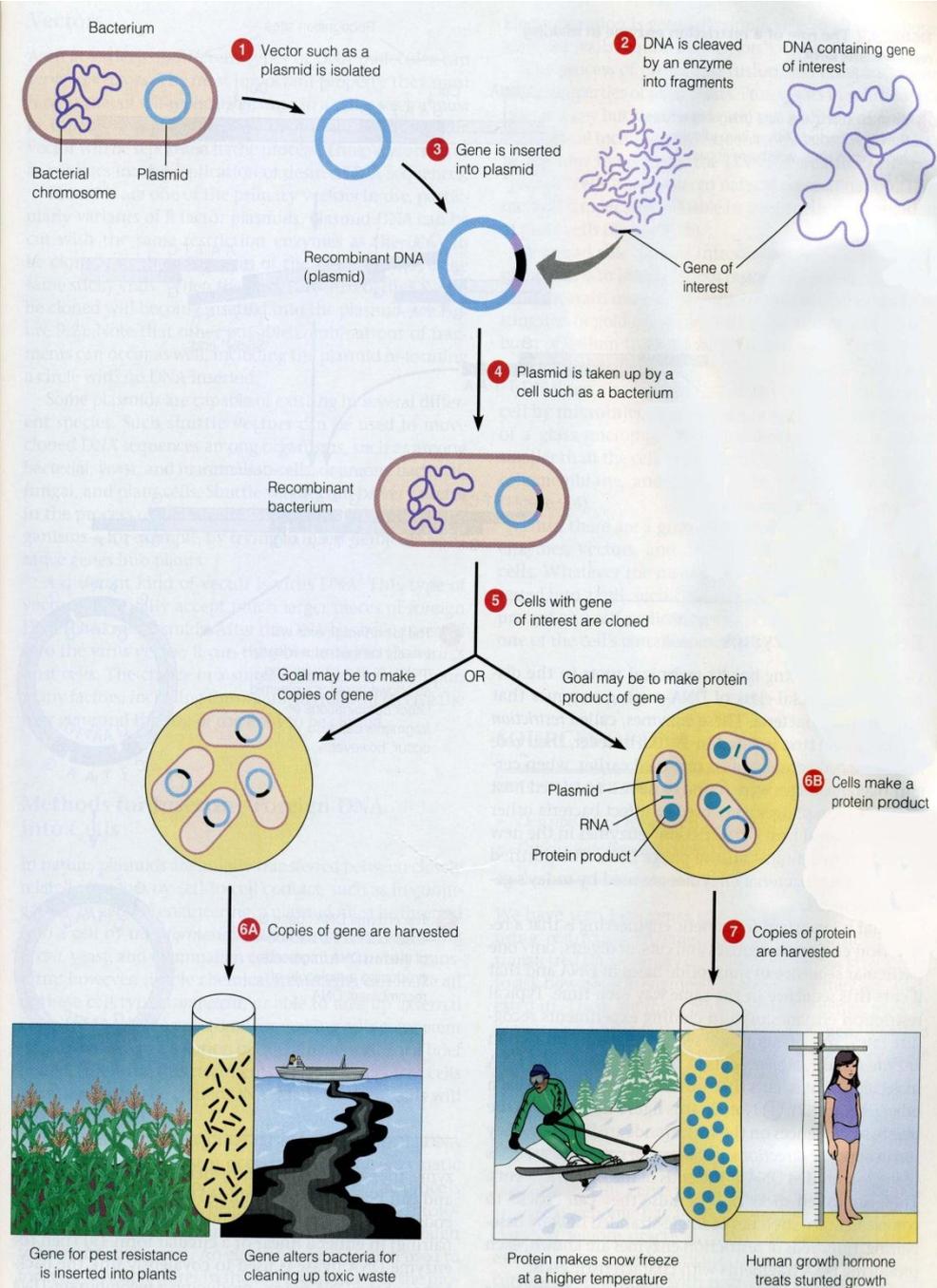


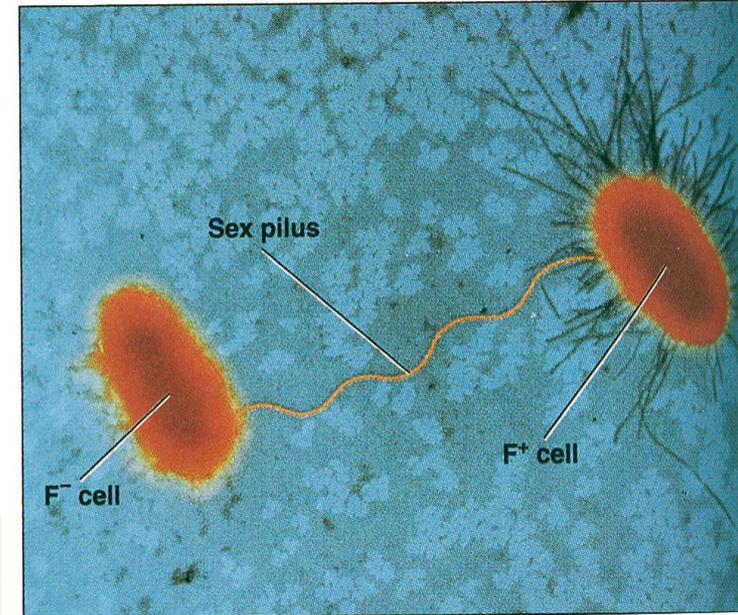
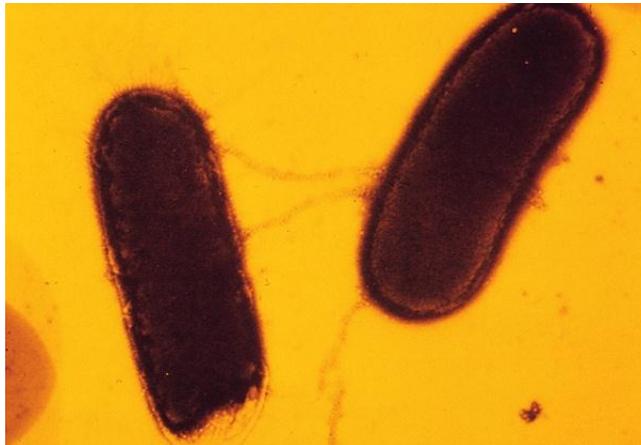
FIGURE 9.1 Typical genetic engineering procedures with examples of applications.

CONIUGAZIONE BATTERICA

Trasferimento diretto di materiale genetico da un batterio all'altro, attraverso un contatto fisico fra due cellule. La coniugazione è mediata da un plasmide particolare, il **PLASMIDE F** (Fertilità) ($50 \times 10^6 D$).

GRAM-

Il **PLASMIDE F** contiene diversi geni: alcuni codificano la produzione di un **pilo "F"** e dei prodotti necessari per la replicazione del DNA plasmidico. Se batteri con il plasmide F (**F+**) vengono mescolati a batteri senza il plasmide F (**F-**) **F+** produce il pilo di coniugazione e si unisce alla cellula **F-**, formando un ponte citoplasmatico.



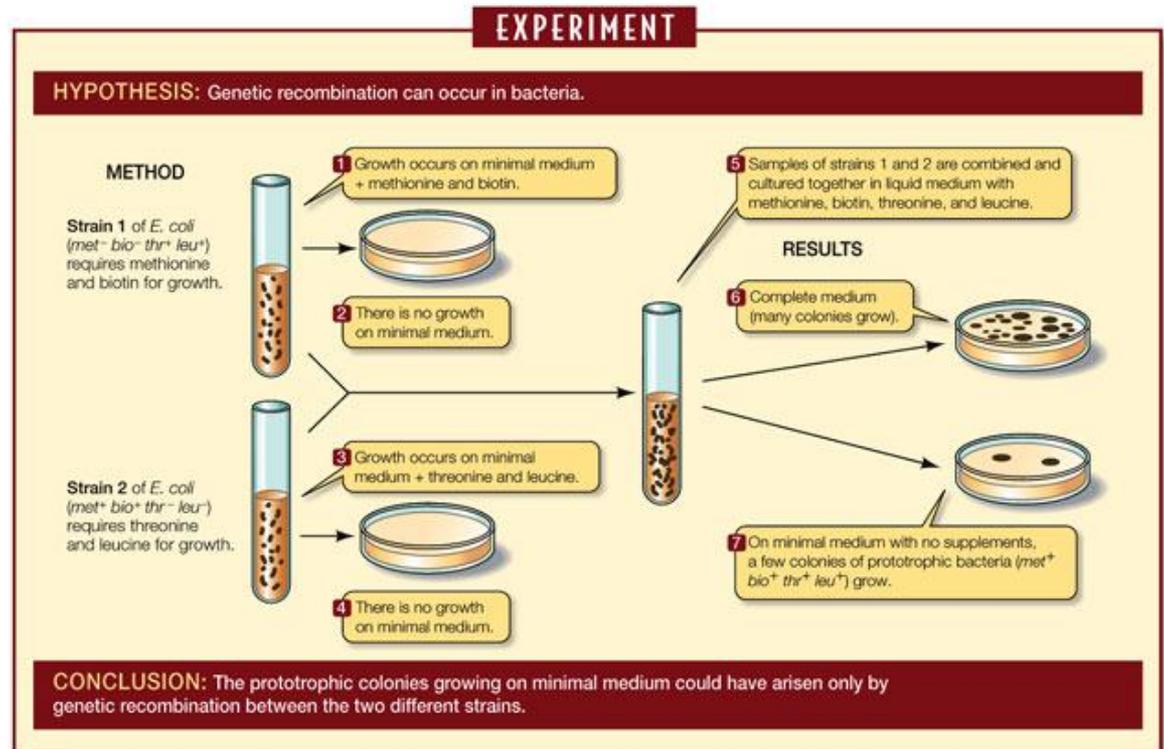


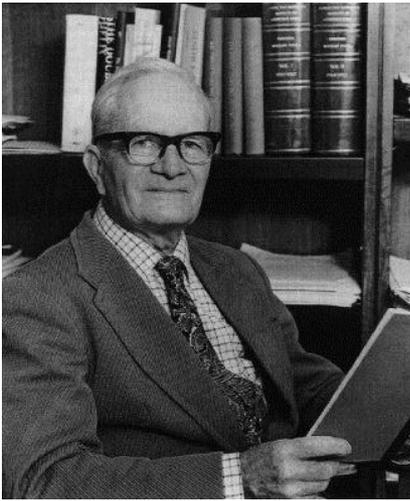
Courtesy of Dr. Joshua Lederberg and the National Library of Medicine. Noncommercial, educational use only.

1958 Nobel Prize winners: (L-R) George Beadle, Edward Tatum (Physiology or Medicine), I. Tamm (Physics), F. Sanger (Chemistry), P. Cherenkov (Physics), I. Frank (Physics), Joshua Lederberg (Physiology or Medicine).

Esperimento di Lederberg e Tatum (1946)

Non ipotizzabile mutazione





Esperimento di Hayes (1946)

Bill Hayes scoprì il fattore di fertilità
nei batteri donatori

E. Coli k12

Streptomicina resistente
Streptomicina sensibile

Colture in terreno + str

1str res x 2 str sens = progenie ricombinante 2 str res

1 str sens x 2 str res = non progenie (muore il ceppo donatore)

1 è il ceppo donatore

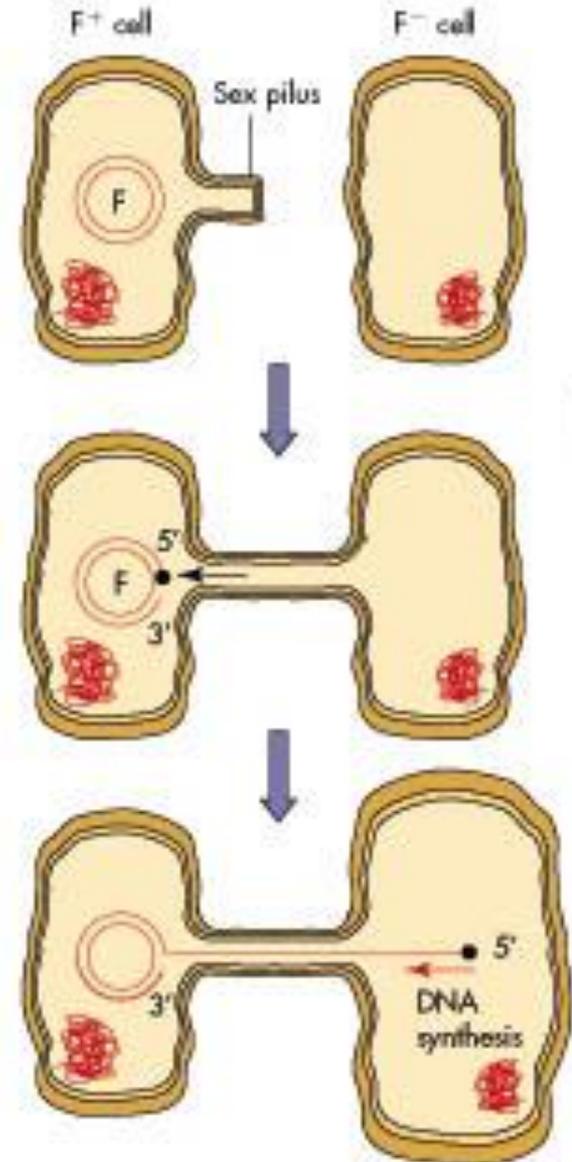
Coniugazione - 1

1) L'attacco del pilo F ad un batterio F- determina l'avvio della replicazione del plasmide (meccanismo a **rolling circle** 5' → 3').

Replicazione e trasferimento del plasmide F avvengono simultaneamente.

2) Mentre la replicazione sta procedendo, l'estremo 5' entra nel batterio F-.

3) Nella cellula ricevente viene iniziata la sintesi del filamento complementare.



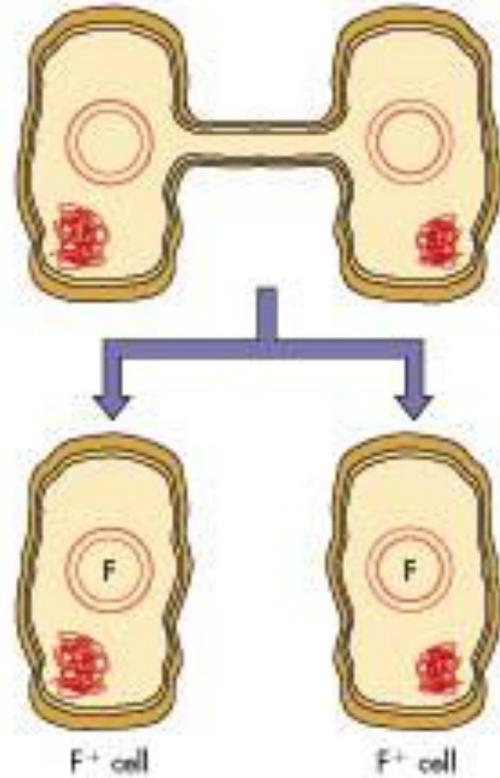
Coniugazione - 2

Il plasmide si ricircularizza.

La cellula ricevente ora possiede un plasmide F completo, diventando F+.

Si rompe il pilo e le due cellule si separano

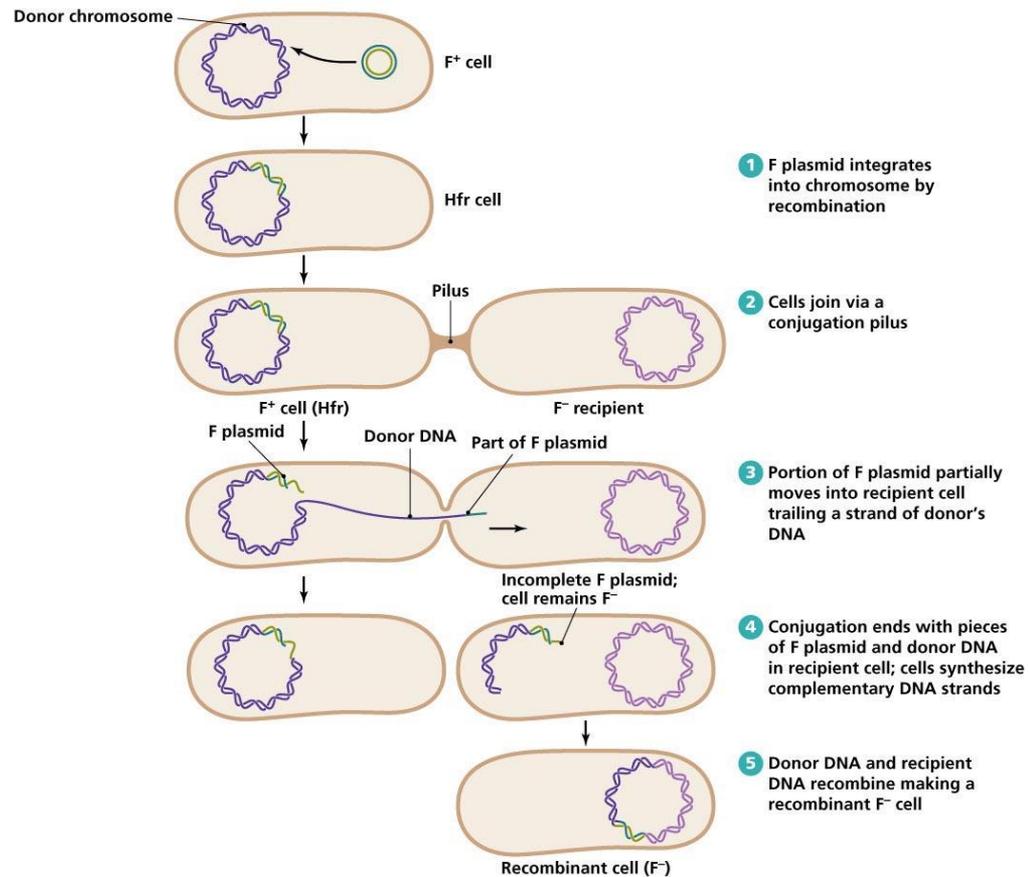
F+ x F- = 2 cellule F+





Luca Cavalli-Sforza

Ceppi di *E. coli* che trasferiscono porzioni di cromosoma: **HIGH FREQUENCY of RECOMBINATION (ceppi Hfr)**

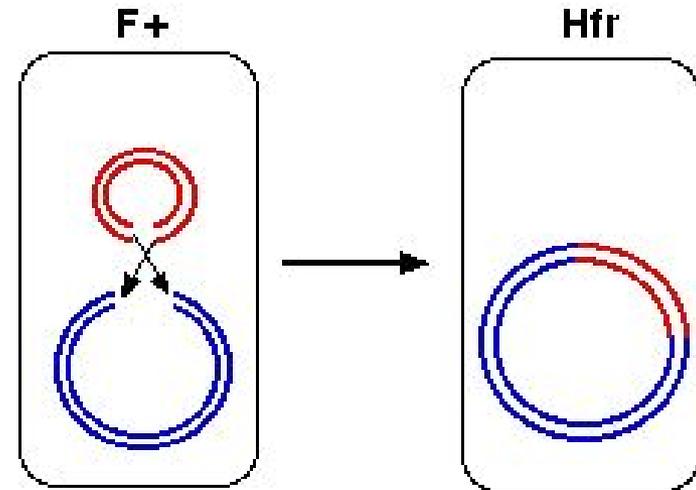


Coniugazione - 3

A volte il fattore F può integrarsi nel cromosoma batterico, convertendo la cellula F+ in Hfr (High frequency of recombination).

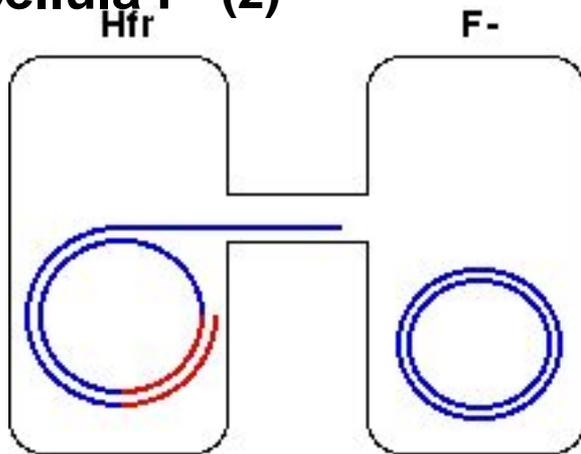
L'integrazione avviene in corrispondenza di particolari sequenze di inserzione (IS).

Le cellule Hfr mantengono la capacità di formare pili di coniugazione e possono trasferire porzioni del loro genoma ad altre cellule batteriche F-.



Coniugazione - 4

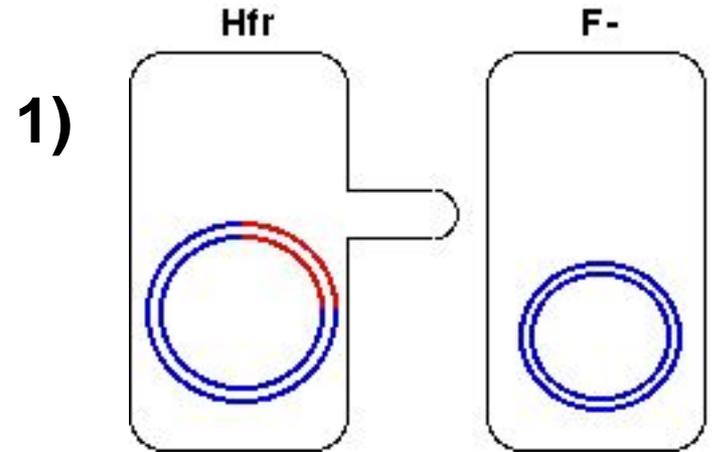
Quando una cellula Hfr stabilisce un contatto con F- (1), il cromosoma batterico (con il fattore F) si replica e attraverso il pilo comincia a migrare nella cellula F- (2)



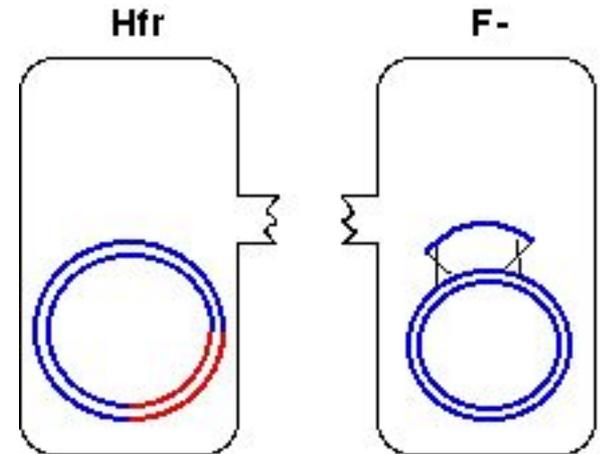
2)

Quasi sempre, il pilo (estremamente fragile) si rompe prima di avere trasferito tutto il cromosoma. Quindi il fattore F, che viene trasferito solo alla fine, non riesce a migrare nella cellula F-.(3)

[Il trasferimento di tutto il cromosoma batterico richiederebbe 100 min.]



1)



3)

Coniugazione - 5

Il frammento di DNA donatore così trasferito può:

- essere **DEGRADATO** da nucleasi
- **circolarizzare** e formare un plasmide
- **ricombinarsi ed INTEGRARSI** conferendo nuovi caratteri genetici cromosomici alla cellula ricevente.

**LA CELLULA RICEVENTE PERÒ RIMANE F-,
PERCHÉ NON HA RICEVUTO L'INTERO
FATTORE F.**

HFR x F- = HFR e F- (ricombinante)

Altri fattori extracromosomiali

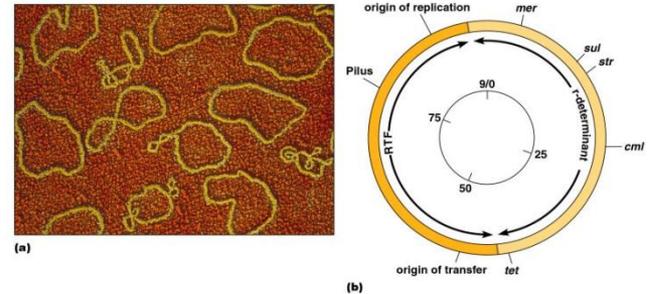
- Plasmide Fattore "R", che conferisce la resistenza ai farmaci antibatterici

Nel fattore R ci sono:

- geni che controllano la replicazione
- geni che controllano la formazione del pilo
- geni che controllano il trasferimento del DNA
- geni che controllano la resistenza ai farmaci
(generalmente producendo enzimi in grado di inattivare il farmaco)

RTF
resistance transfer factor

Anche il fattore R (come il fattore F) si può integrare nel cromosoma batterico.



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

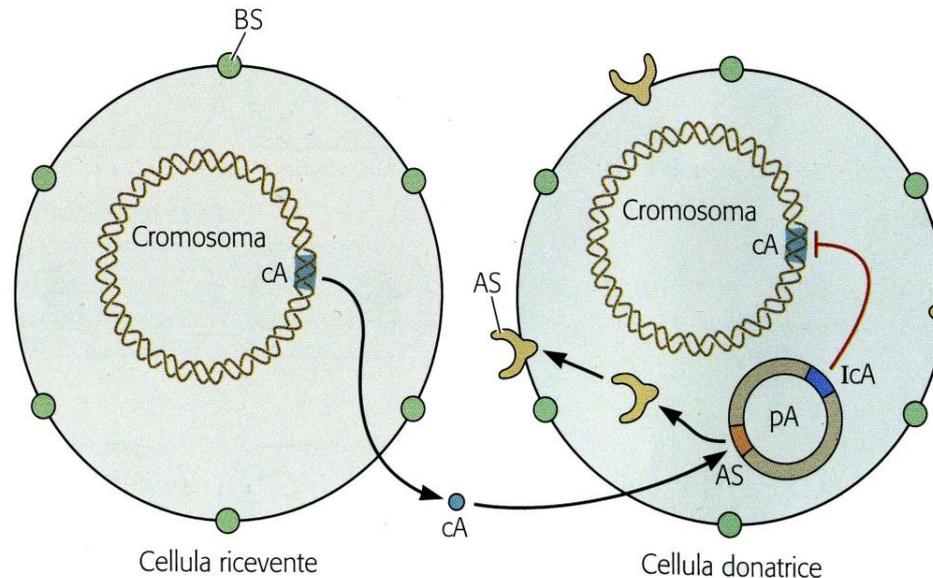
- il fattore **col** che codifica per proteine dette colicine, che hanno azione battericida/antibiotici di origine batterica; Enterobacteriaceae)
- il fattore **ent** che si trova in alcuni stipiti di E.Coli enteritogeni, produttori di un'enterotossina attiva sulla mucosa dell'intestino tenue. Codifica anche la sintesi di adesine.

Coniugazione GRAM+ in assenza di pili

Le cellule F+ non formano pili sessuali, ma producono alla loro superficie una particolare sostanza che provoca l'aggregazione con i batteri F-. I plasmidi di coniugazione tramite questo aggregato batterico si trasferiscono dalle cellule F+ alle F-.

Figura 10.7

Coniugazione di *Enterococcus faecalis*. La cellula ricevente produce un ferormone (cA), codificato dal cromosoma, che interagisce con un plasmide (pA) nella cellula donatrice, inducendo quest'ultima a produrre una sostanza aggregante (AS) che migra verso la superficie cellulare. Sulla superficie, AS si lega ad una sostanza di legame (BS) sulla superficie di altre cellule, formando un'aggregazione di cellule dentro cui avvengono gli scambi genetici. Sebbene anche la cellula donatrice porti un gene codificante cA, la sua espressione è repressa da IcaA, codificato da pA. Così l'aggregazione avviene solo tra gruppi di cellule donatrici e riceventi.



TRASDUZIONE

I batteri possono essere infettati da virus specifici, i Batteriofagi o Fagi.

Il capsid media la penetrazione dell'acido nucleico nel batterio.

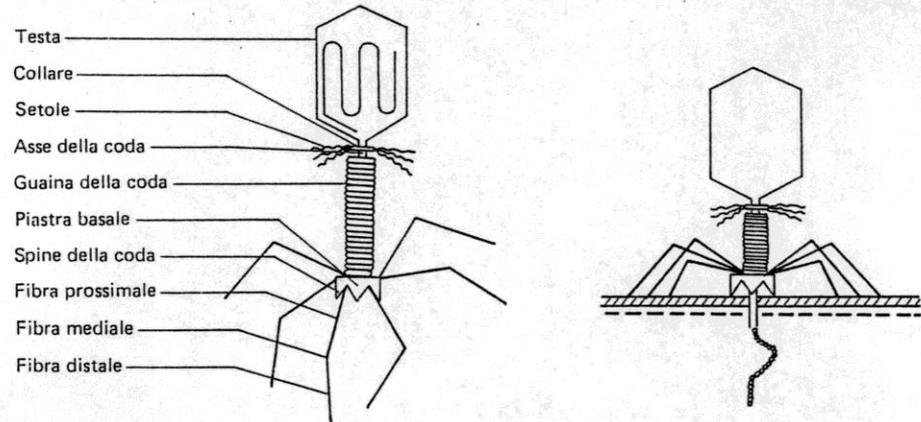
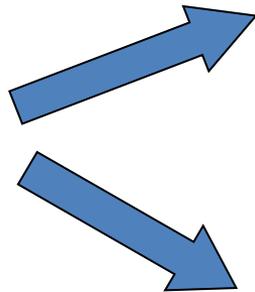


Figura 46.19.

Diagramma schematico di una particella batteriofagica di tipo A. A destra schema della penetrazione del genoma fagico nella cellula batterica infettata.

2 possibilità



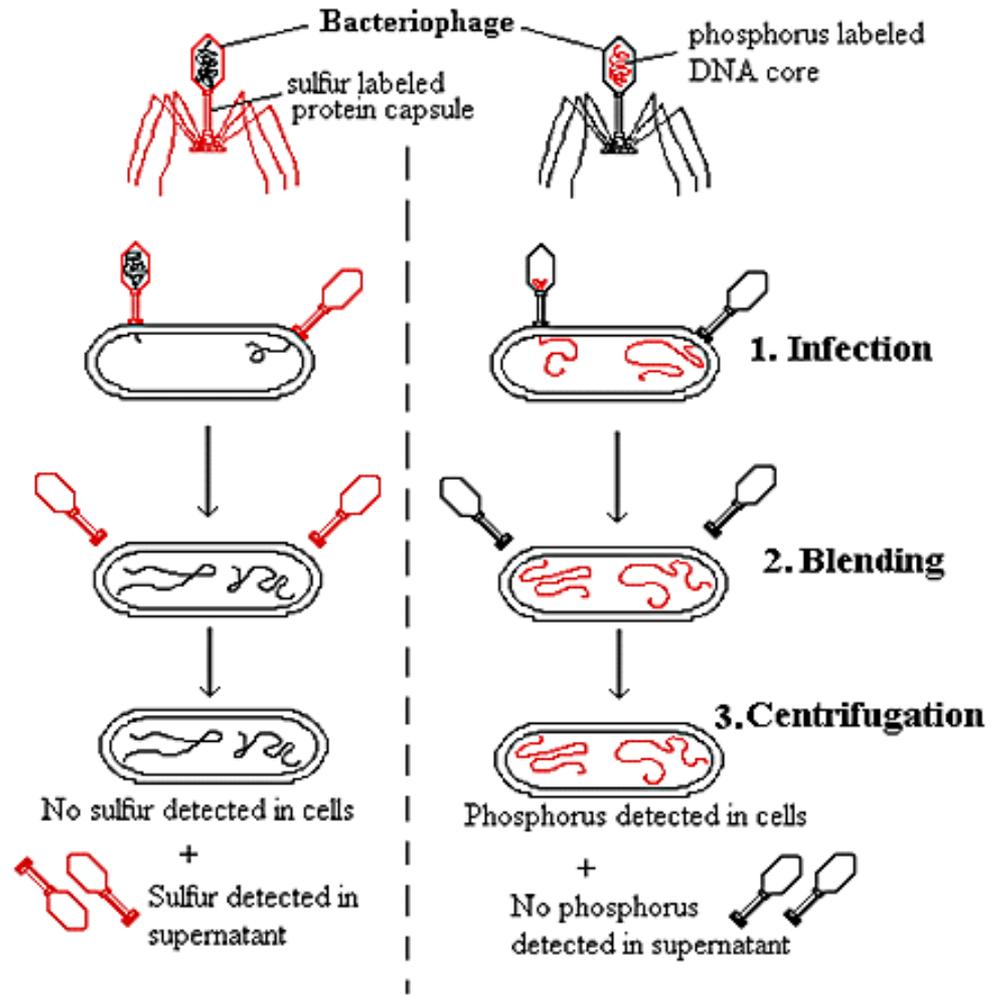
Ciclo litico Fagi Virulenti

Ciclo lisogeno Fagi Temperati



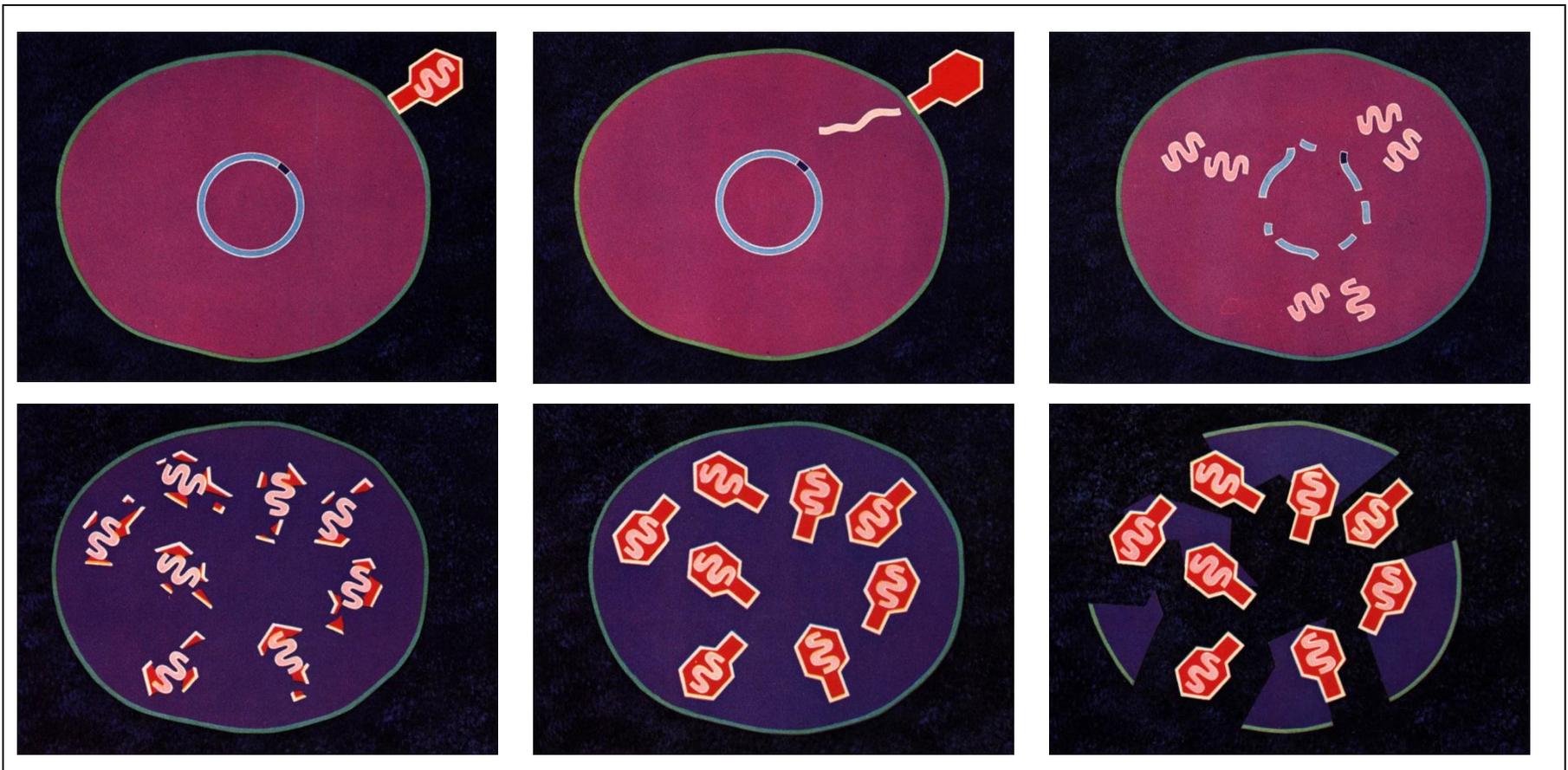
Alfred Harshey e Martha Chase (1952)

BACTERIOFAGI

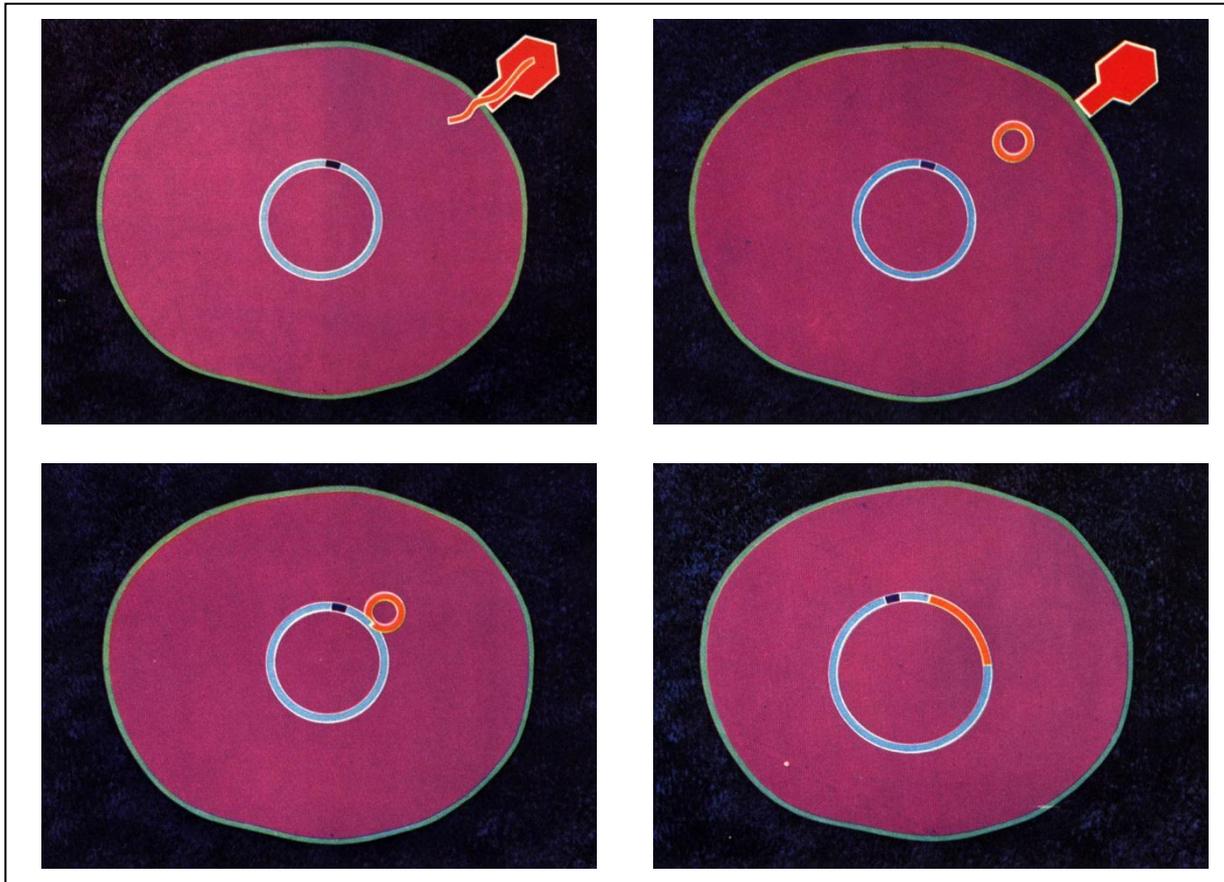


The Hershey-Chase Experiment

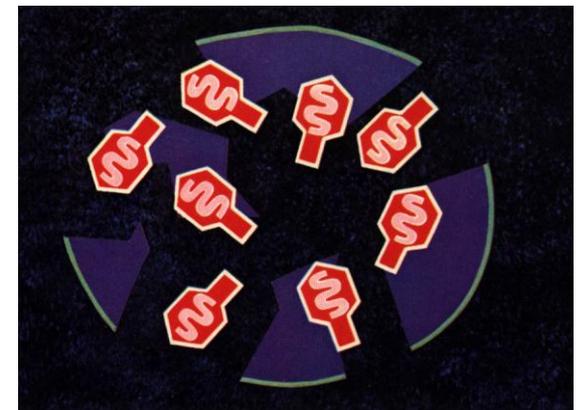
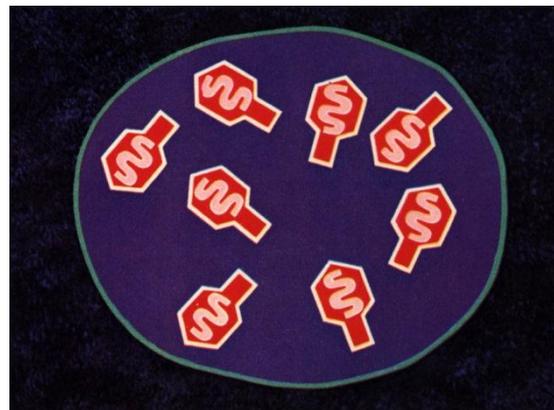
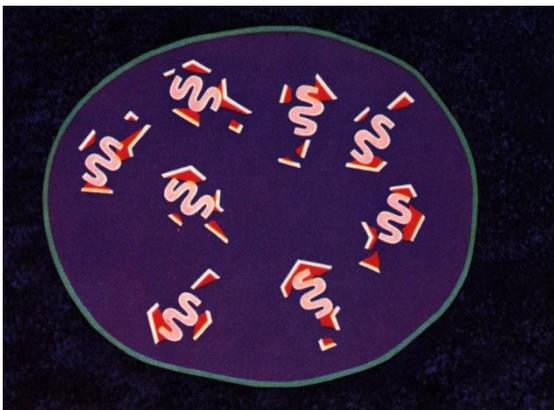
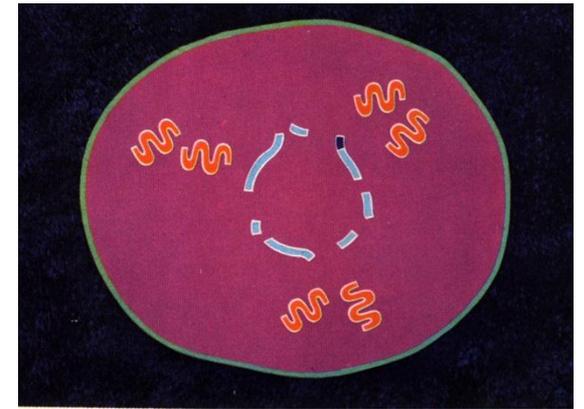
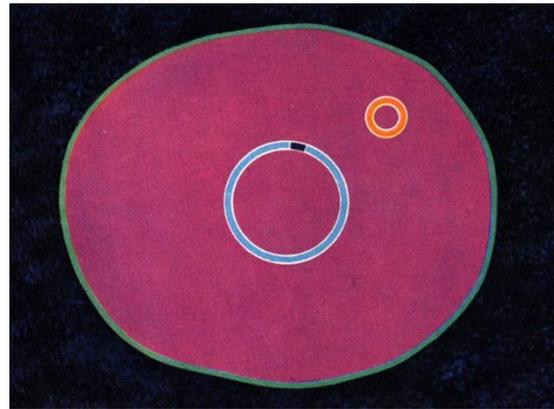
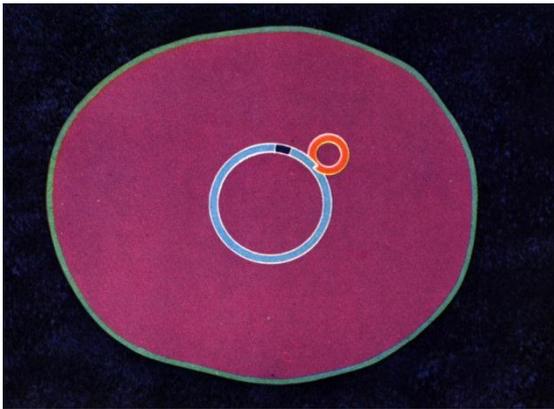
CICLO LITICO: Il genoma fagico replica utilizzando i sistemi cellulari, il metabolismo batterico viene alterato significativamente, il DNA batterico si frammenta, vengono prodotte le proteine fagiche, c'è assemblaggio di nuove particelle → lisi del batterio.

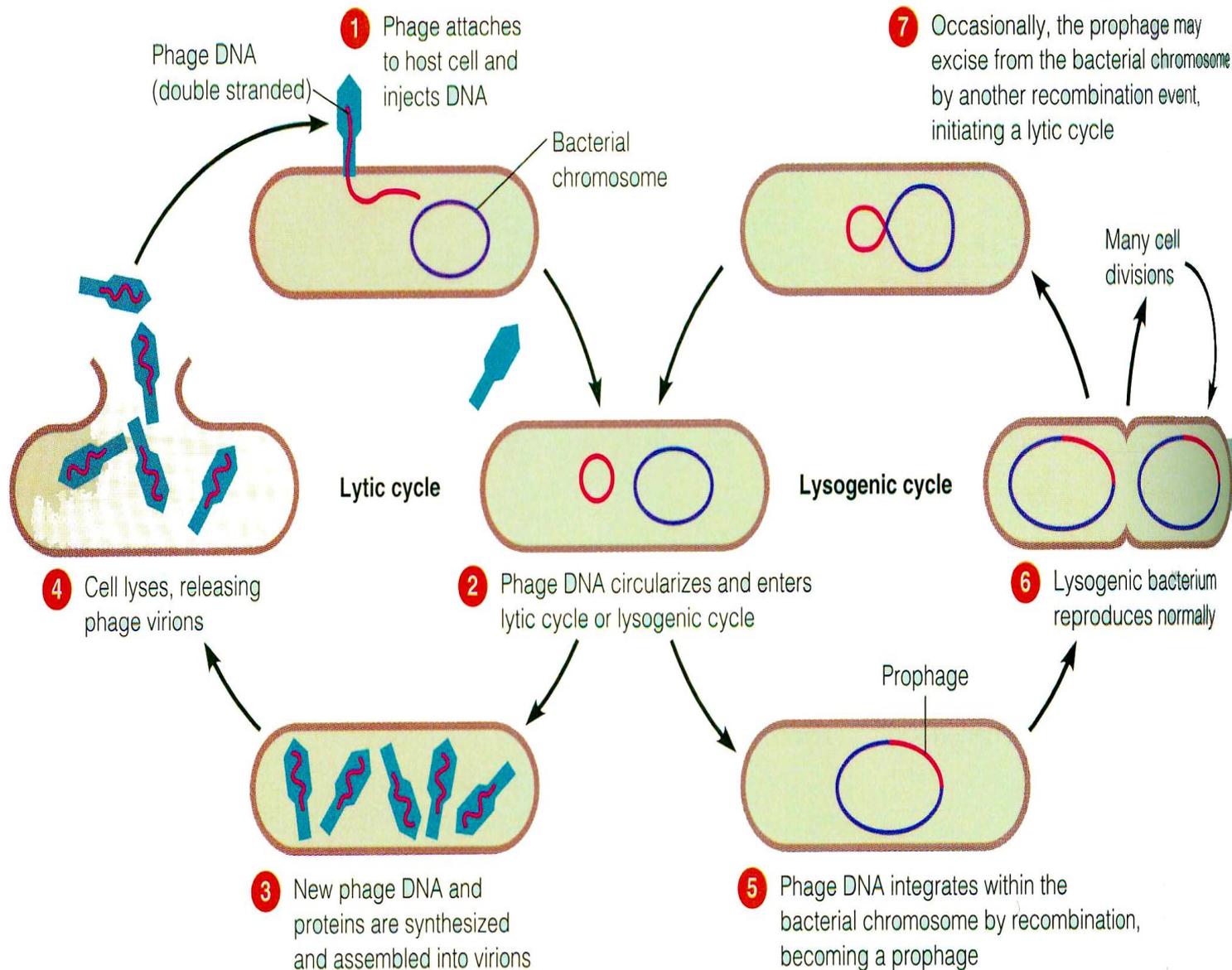


CICLO LISOGENO: Il DNA si integra nel genoma batterico (PROFAGO), in corrispondenza di zone di omologia → rimane silente e si replica assieme al genoma batterico.



In particolari condizioni il profago può essere indotto ad “excidersi” ed originare un ciclo litico.

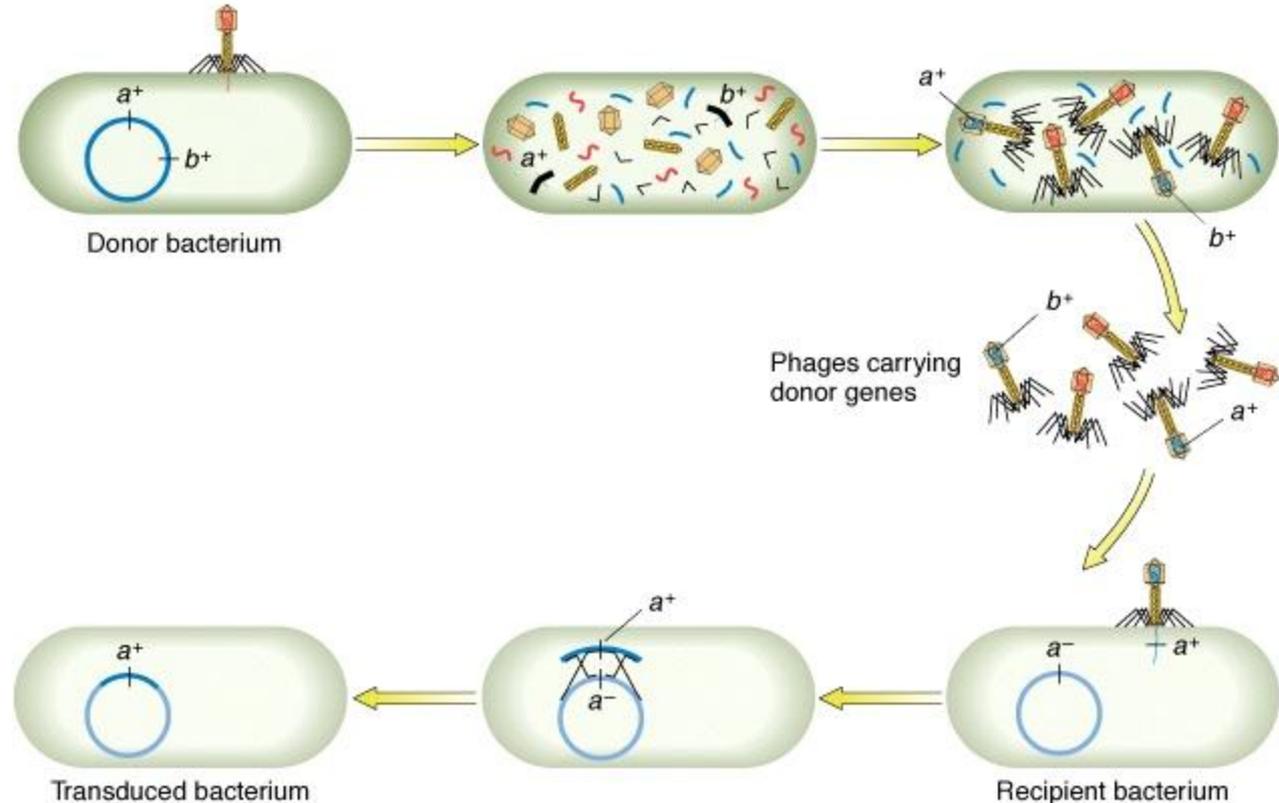




Due tipi di trasduzione: **GENERALIZZATA** e **SPECIALIZZATA**

T. GENERALIZZATA (litico) = trasferimento casuale di un qualsiasi gene batterico. Frammenti di DNA batterico possono essere impaccati per sbaglio dentro i fagi neofornati. Questi fagi non replicano, ma possono infettare altri batteri, iniettando il DNA → se c'è ricombinazione il batterio ricevente assume stabilmente nuovi caratteri genici.

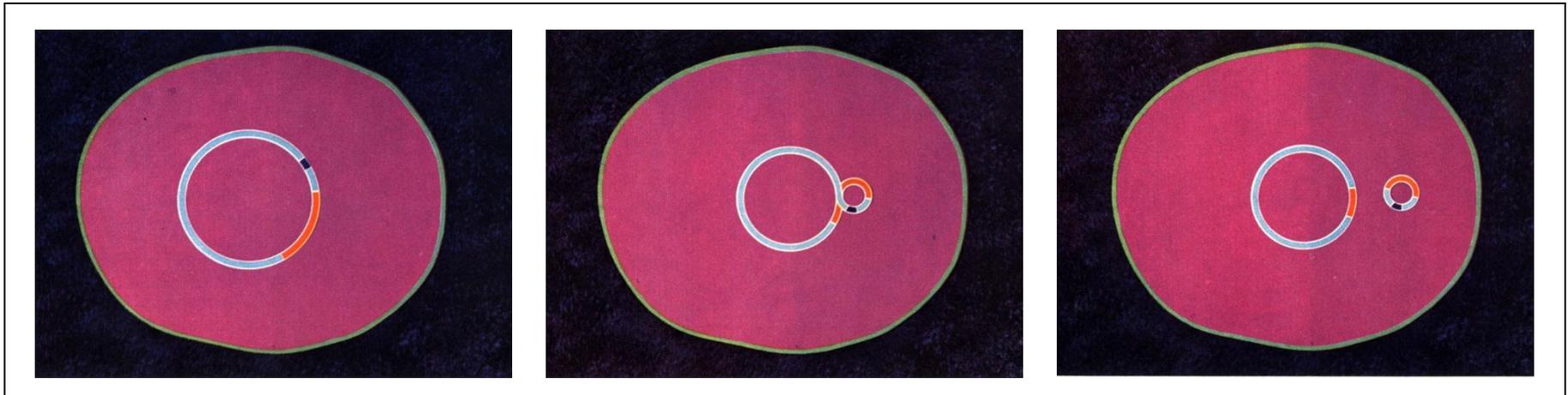
In certi casi fino all'1% dei batteri infettati danno fagi trasducenti. Si può avere trasduzione anche di interi plasmidi.



Video

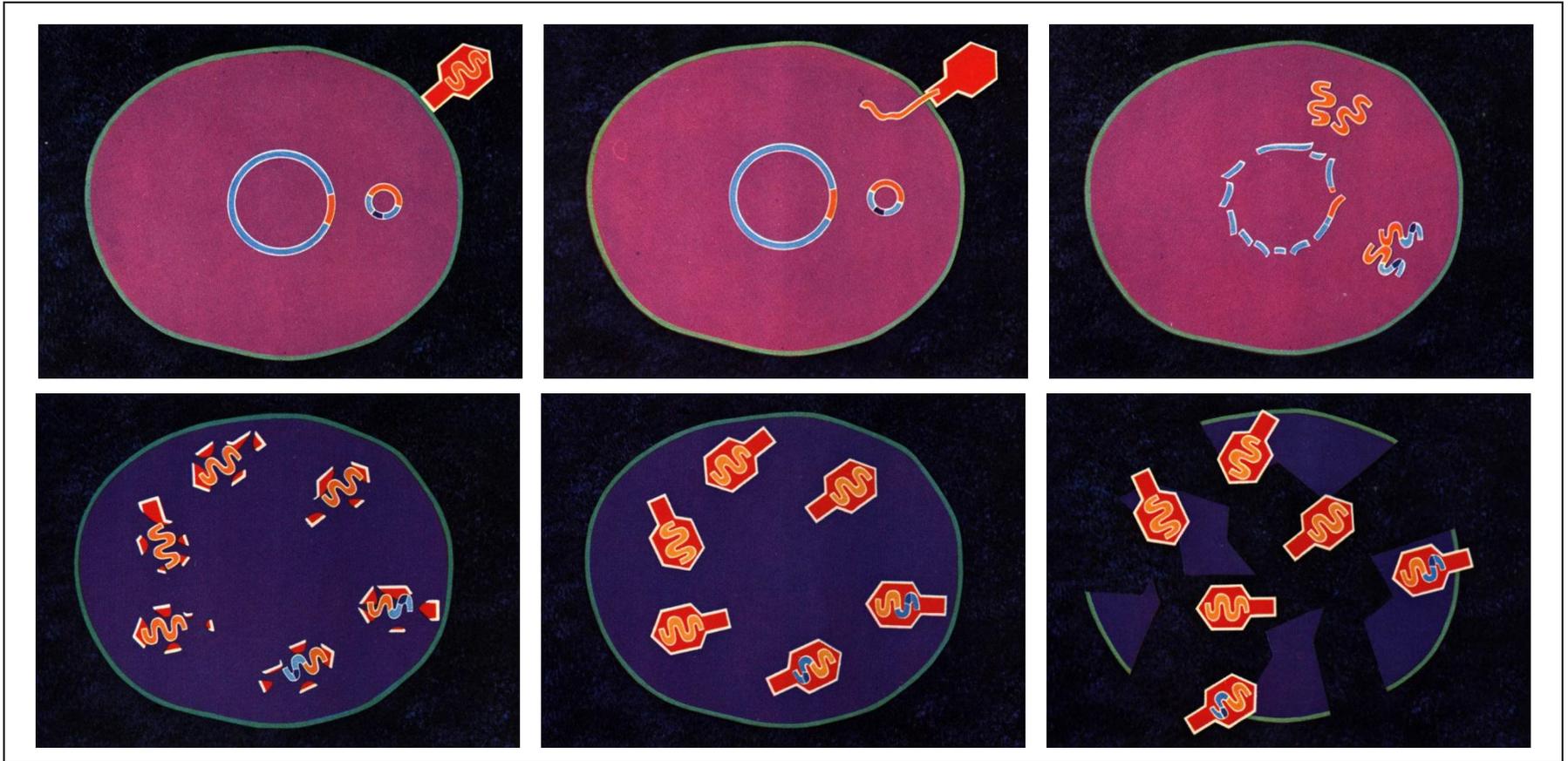
Generalised transduction_3

TRASDUZIONE SPECIALIZZATA (lisogeno) = trasferimento esclusivo di uno specifico gene batterico. Durante l'excisione del profago possono verificarsi degli errori → il genoma fagico si excide insieme ad un tratto del DNA batterico adiacente.



Se non si sono perse informazioni fagiche necessarie, il DNA fagico può replicarsi ed originare una progenie composta da particelle fagiche difettive (in cui parte del genoma fagico è stato sostituito dal DNA batterico).

Spesso la particella fagica defettiva non può replicarsi, e quindi ha bisogno della presenza di un fago normale che supplisce alle funzioni mancanti.



I fagi defettivi possono infettare altri batteri e spesso si integrano, ma a causa della perdita di funzioni non possono innescare un nuovo ciclo litico. Quindi si può trasferire solo un frammento cromosomico contiguo al sito di integrazione. Fenomeno raro: $\sim 1 \times 10^6 - 10^7$ cellule.

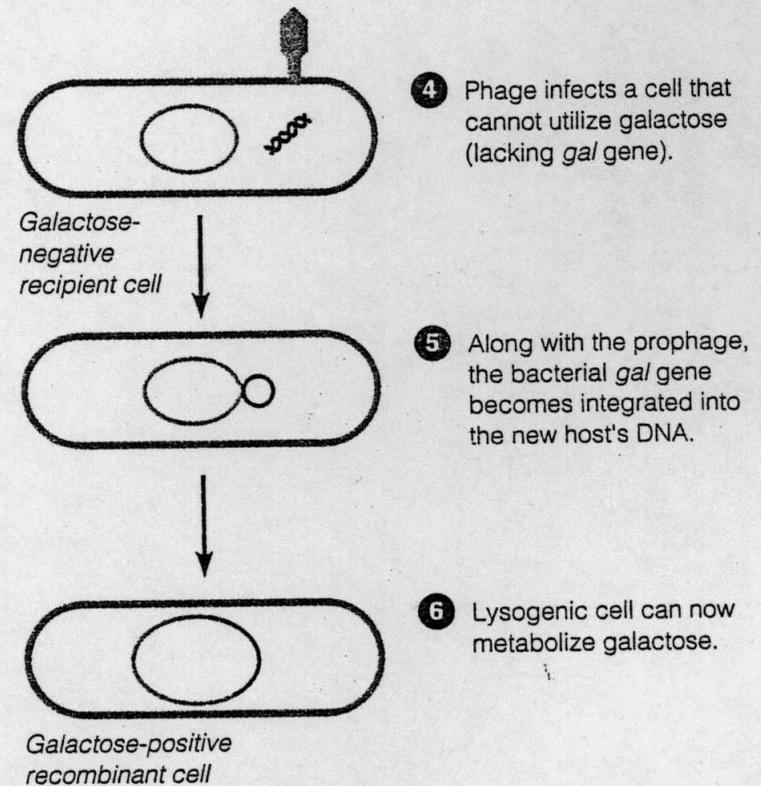
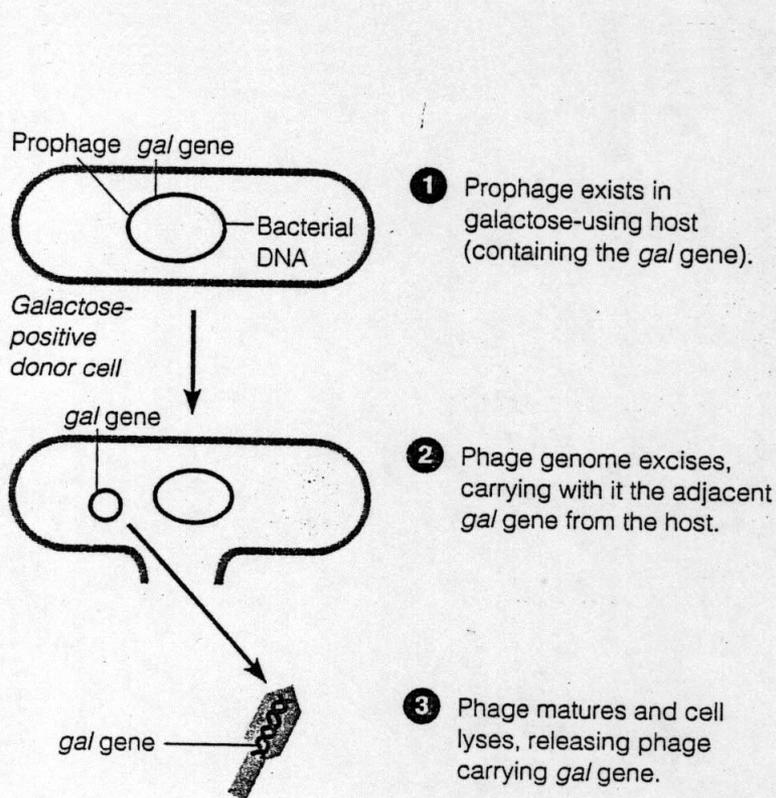


FIGURE 13.17 Specialized transduction. When a prophage is excised from its host chromosome, it can take with it a bit of the adjacent DNA from the bacterial chromosome.

CONVERSIONE LISOGENICA

Nei batteri lisogeni il DNA del profago rimane silente perché la sua espressione viene inibita da “repressori” della replicazione codificati dal genoma fagico*. In qualche caso una parte del genoma profagico non viene repressa → sintesi di prodotti virali che possono influenzare il fenotipo cellulare (produzione di tossine, espressione di nuovi antigeni, adesine, ecc).

- Es. Difterite = solo il *Corynebacterium diphtheriae* che ospita un fago temperato (sintetizza la tossina difterica) dà la malattia.
Scarlattina = solo gli streptococchi che portano il fago temperato producono la tossina.
Botulismo = solo il *Clostridium botulinum* che contiene un determinato profago produce la tossina responsabile dell'intossicazione alimentare.

*Immunità fagica = i batteri che contengono fagi lisogeni non permettono la replicazione di fagi dello stesso tipo, per la presenza del repressore.