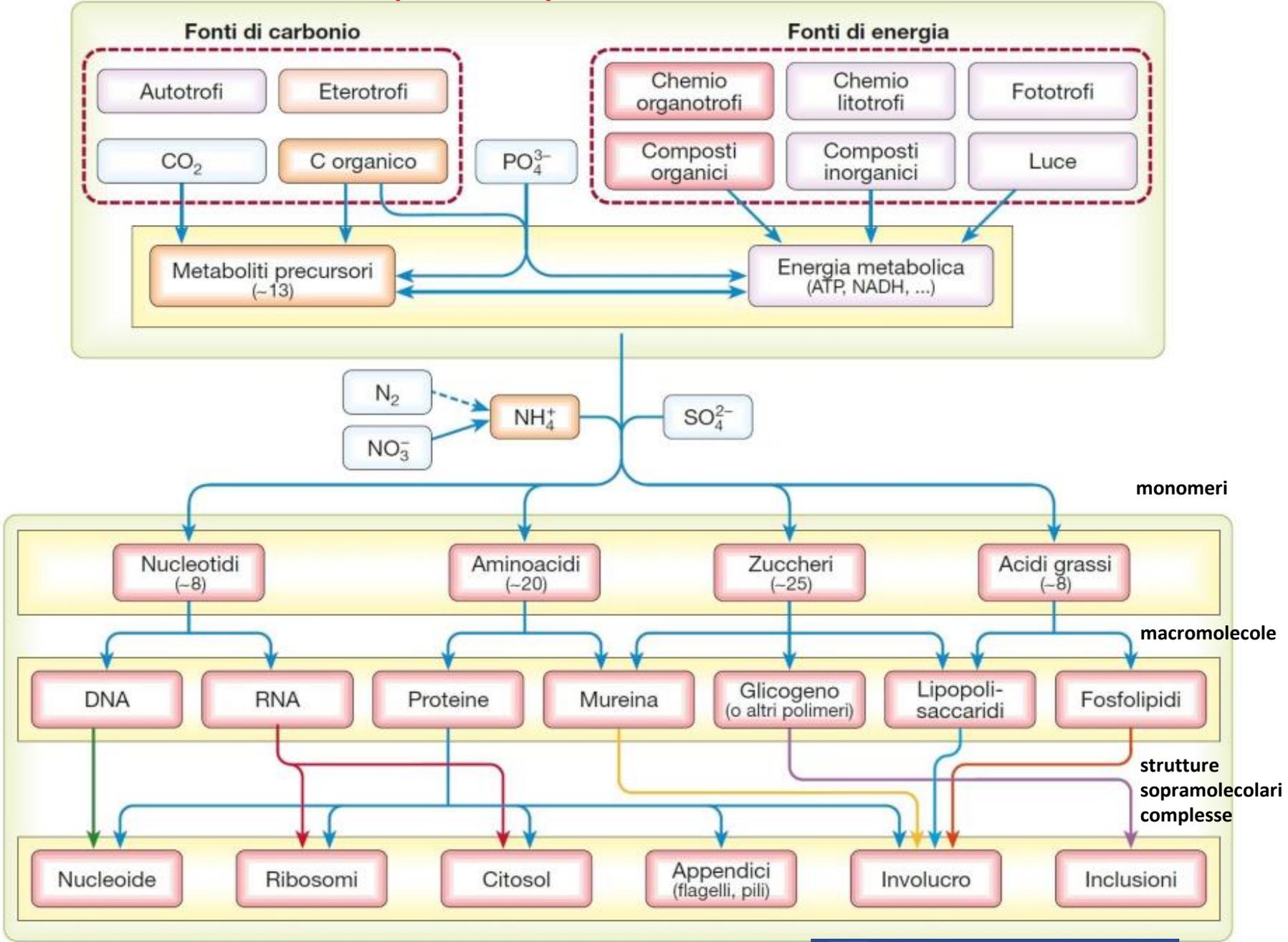


# Costruzione della cellula (batterica)



La nutrizione microbica, nell'ambito della fisiologia dei microrganismi, si occupa del rifornimento di monomeri, o precursori di monomeri, necessari alla cellula.

nutrienti

Tab. 5.1 Macronutrienti in natura e nei terreni di coltura

Elemento	Forma usuale dell'elemento presente in natura	Forma chimica addizionata nel terreno di coltura
Carbonio (C)	CO <sub>2</sub> , composti organici	Glucosio, malato, acetato, piruvato, aminoacidi, centinaia di altri composti o miscele complesse (estratto di lievito, peptone ecc.)
Idrogeno (H)	H <sub>2</sub> O, composti organici	H <sub>2</sub> O, composti organici
Ossigeno (O)	H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> , composti organici	H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> , composti organici
Azoto (N)	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> , composti organici azotati	→ Inorganici: NH <sub>4</sub> Cl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KNO <sub>3</sub> , N <sub>2</sub> → Organici: aminoacidi, basi nucleotidiche azotate, altri composti contenenti azoto
Fosforo (P)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Zolfo (S)	H <sub>2</sub> S, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , composti organici solforati, metalli solfati, (FeS, CuS, ZnS, NiS ecc.)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> S, cisteina o altri composti organici solforati
Potassio (K)	K <sup>+</sup> in soluzione o come sali di K	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Magnesio (Mg)	Mg <sup>2+</sup> in soluzione o come sali di Mg	MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>
Sodio (Na)	Na <sup>+</sup> in soluzione o come NaCl o altri sali di Na	NaCl
Calcio (Ca)	Ca <sup>2+</sup> in soluzione o come CaSO <sub>4</sub> o altri sali di Ca	CaCl <sub>2</sub>
Ferro (Fe)	Fe <sup>2+</sup> o Fe <sup>3+</sup> in soluzione o come FeS, Fe (OH) <sub>3</sub> o molti altri sali di Fe	FeCl <sub>3</sub> , FeSO <sub>4</sub> , varie soluzioni di ferro chelato (Fe <sup>3+</sup> EDTA, Fe <sup>3+</sup> citrato ecc.)

**C** → ~50% peso secco cellula

Fonte → aa, acidi grassi, acidi organici, zuccheri, basi azotate, composti aromatici, etc.

Autotrofi?

**N** → ~12% peso secco cellula

Fonte → ammoniaca, nitrato, N<sub>2</sub>.

azotofissatori

**P** → acidi nucleici, fosfolipidi

Fonte → fosfati

**S** → aa, vitamine, coenzima A

Fonte → solfati ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), solfuri ( $\text{HS}^-$ )

**K** → richiesto nell'attività di alcuni enzimi

**Mg** → stabilizzazione dei ribosomi, membrane cellulari, acidi nucleici – richiesto nell'attività di molti enzimi

**Tab. 5.1** Macronutrienti in natura e nei terreni di coltura

Elemento	Forma usuale dell'elemento presente in natura	Forma chimica addizionata nel terreno di coltura
Carbonio (C)	$\text{CO}_2$ , composti organici	Glucosio, malato, acetato, piruvato, aminoacidi, centinaia di altri composti o miscele complesse (estratto di lievito, peptone ecc.)
Idrogeno (H)	$\text{H}_2\text{O}$ , composti organici	$\text{H}_2\text{O}$ , composti organici
Ossigeno (O)	$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{O}_2$ , composti organici	$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{O}_2$ , composti organici
Azoto (N)	$\text{NH}_3$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{N}_2$ , composti organici azotati	<i>Inorganici:</i> $\text{NH}_4\text{Cl}$ , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{KNO}_3$ , $\text{N}_2$ <i>Organici:</i> aminoacidi, basi nucleotidiche azotate, altri composti contenenti azoto
Fosforo (P)	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Zolfo (S)	$\text{H}_2\text{S}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , composti organici solforati, metalli solfati, ( $\text{FeS}$ , $\text{CuS}$ , $\text{ZnS}$ , $\text{NiS}$ ecc.)	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , $\text{Na}_2\text{S}$ , cisteina o altri composti organici solforati
Potassio (K)	$\text{K}^+$ in soluzione o come sali di K	$\text{KCl}$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Magnesio (Mg)	$\text{Mg}^{2+}$ in soluzione o come sali di Mg	$\text{MgCl}_2$ , $\text{MgSO}_4$
Sodio (Na)	$\text{Na}^+$ in soluzione o come $\text{NaCl}$ o altri sali di Na	$\text{NaCl}$
Calcio (Ca)	$\text{Ca}^{2+}$ in soluzione o come $\text{CaSO}_4$ o altri sali di Ca	$\text{CaCl}_2$
Ferro (Fe)	$\text{Fe}^{2+}$ o $\text{Fe}^{3+}$ in soluzione o come $\text{FeS}$ , $\text{Fe}(\text{OH})_3$ o molti altri sali di Fe	$\text{FeCl}_3$ , $\text{FeSO}_4$ , varie soluzioni di ferro chelato ( $\text{Fe}^{3+}$ EDTA, $\text{Fe}^{3+}$ citrato ecc.)

**Ca** → contribuisce alla stabilizzazione della parete cellulare e nella formazione delle endospore

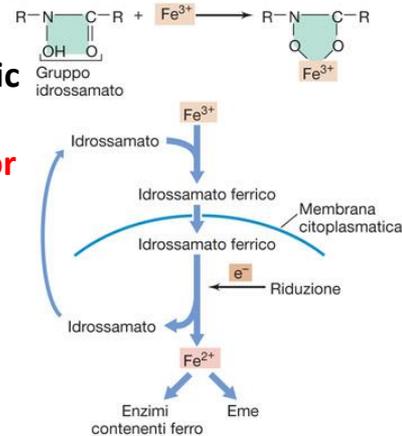
**Na** → necessario per il metabolismo di alcuni microrganismi (alofili)

Saha et al., 2012 Microbial siderophores: a mini review. J. Bas. Microb. 52:1–15.

Need for iron - **Iron is one of the most important macronutrient** required for microbial growth in diverse environments. In microorganisms it acts as a **global regulator** for many cellular, metabolic and biosynthetic processes including: i) **DNA synthesis** ii) **electron transport system** iii) **formation of heme** iv) **cofactor for enzymes** v) **oxygen transport** vi) **synthesis of ATP** and vii) **nitrite reduction** in nitrogen cycle.

Overall iron is required for the optimum growth and maintenance of cellular activities of microorganisms.

## Ferro

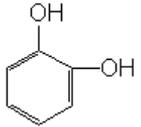


(a)

In generale, i batteri producono agenti chelanti il ferro (**siderofori**) che legano il ferro ( $Fe^{3+}$ ) e lo trasportano all'interno delle cellule.

I siderofori sono composti ad **altissima affinità per il ferro**

- **Idrossamati**
- **Catecoli**

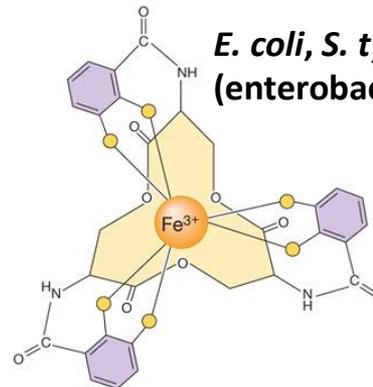


In ambienti non ossigenati

- $Fe^{2+}$  (stato ossidazione +2)
- Forma solubile

In ambienti ossigenati

- $Fe^{3+}$  (stato ossidazione +3)
- Forma minerali insolubili



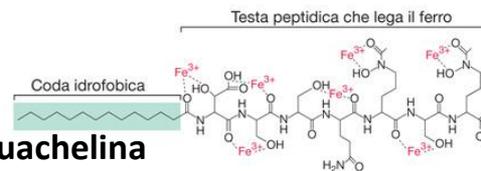
*E. coli*, *S. typhimurium* → siderofori fenolici (enterobactine) derivanti dal catecolo

*E. coli* → enterobactina

Nelle acque marine il ferro si trova in concentrazioni molto basse (picogrammi →  $10^{-12}$  g). Molti batteri marini sintetizzano **siderofori** (acquachelina) in grado di complessare il ferro.

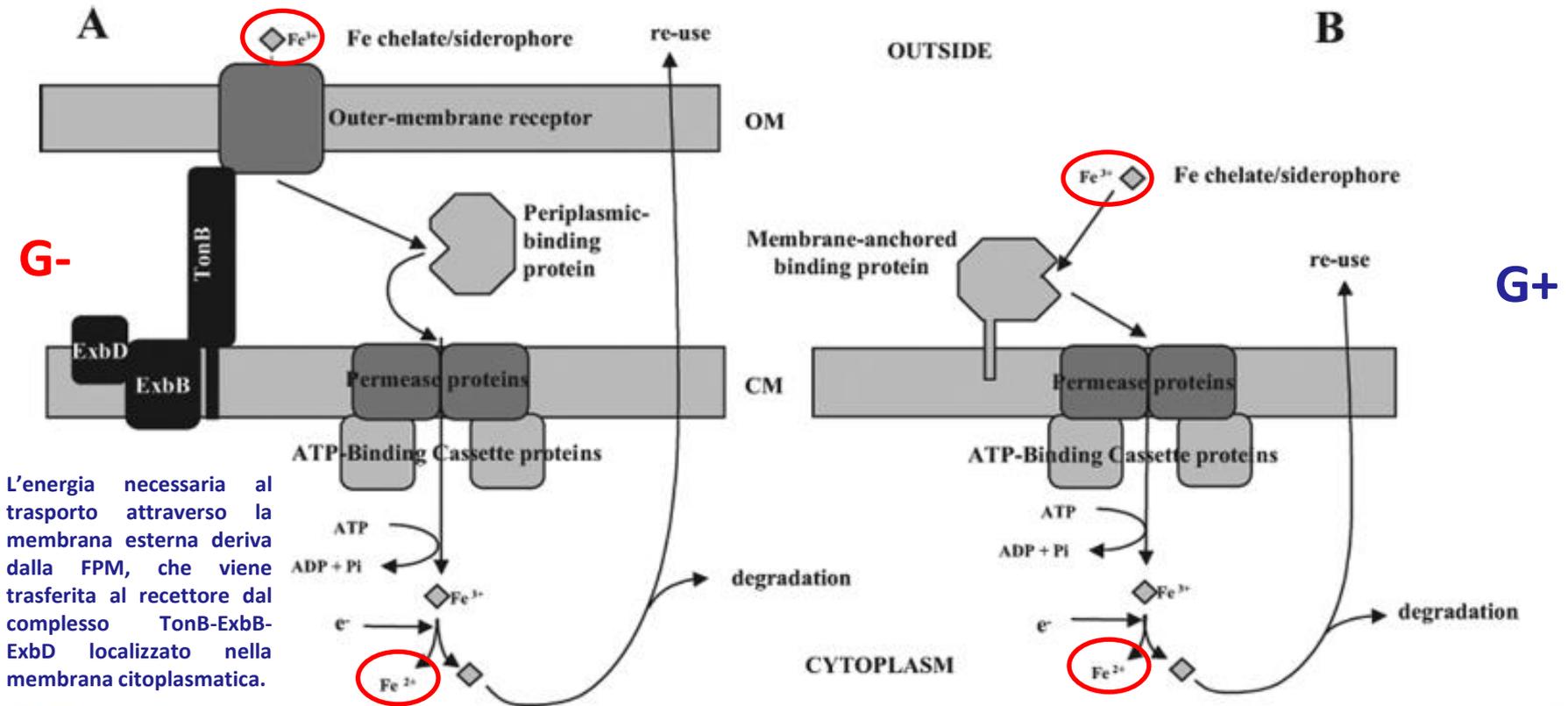


acquachelina



(c)

Alcuni batteri (*Lactobacillus plantarum* e *Borrelia burgdorferii*, ...) possono utilizzare  $Mn^{2+}$  in sostituzione del ferro.



**Figure 2.** Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake in gram-negative (A) and gram-positive (B) bacteria [39]. (Reprinted from FEMS Microbiology Reviews, 27/3, Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis, 215–237, Copyright (2003), with permission from Elsevier.)

## Micronutrienti

Alcuni metalli sono necessari in bassissime concentrazioni per il metabolismo cellulare.

Hanno soprattutto funzioni strutturali in alcuni enzimi (cofattori di enzimi).

Durante la preparazione dei terreni di coltura, se non si utilizzano reagenti o acqua con elevato grado di purezza, non è necessario l'aggiunta di micronutrienti.

Tab. 5.2

### Micronutrienti (elementi in tracce) necessari agli organismi viventi<sup>a</sup>

Elemento	Funzione cellulare
Boro (B)	Presente in un autoinduttore del "quorum sensing" nei batteri; riscontrato anche in alcuni antibiotici polichetidi
Cobalto (Co)	Vitamina B <sub>12</sub> ; transcarbossilasi (acido propionico dei batteri)
Cromo (Cr)	Necessario nei mammiferi per il metabolismo del glucosio; nessuna richiesta microbica conosciuta
Ferro (Fe) <sup>b</sup>	Citocromi; catalasi; perossidasi; proteine ferro-zolfo; ossigenasi; tutte le nitrogenasi
Manganese (Mn)	Attivatore di molti enzimi, presente in alcune superossido dismutasi e nell'enzima di scissione dell'acqua dei fototrofi ossigenici (fotosistema II)
Molibdeno (Mo)	Alcuni enzimi contenenti flavina; nitrogenasi; nitrato riduttasi, solfito ossidasi, DMSO-TMAO riduttasi, alcune formiato deidrogenasi
Nichel (Ni)	La maggior parte delle idrogenasi; coenzima F <sub>430</sub> dei metanogeni; deidrogenasi del monossido di carbonio; ureasi
Rame (Cu)	Respirazione, ossidasi del citocromo <i>c</i> ; fotosintesi, plastocianina, alcune superossido dismutasi
Selenio (Se)	Formato deidrogenasi; alcune idrogenasi; l'aminoacido selenocisteina
Tungsteno (W)	Alcune formato deidrogenasi; ossitransferasi degli ipertermofili
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasi; bromoperossidasi
Zinco (Zn)	Anidrase carbonica; alcol deidrogenasi; RNA e DNA polimerasi; molte proteine che legano il DNA

<sup>a</sup> Non tutti i micronutrienti elencati sono necessari alle cellule; alcuni metalli si trovano in enzimi presenti solamente in microrganismi specifici.

<sup>b</sup> Necessario in quantità maggiore rispetto ad altri metalli in tracce.

## Fattori di crescita

- **Composti organici necessari in basse concentrazioni**

vitamine,

aa,

basi azotate,

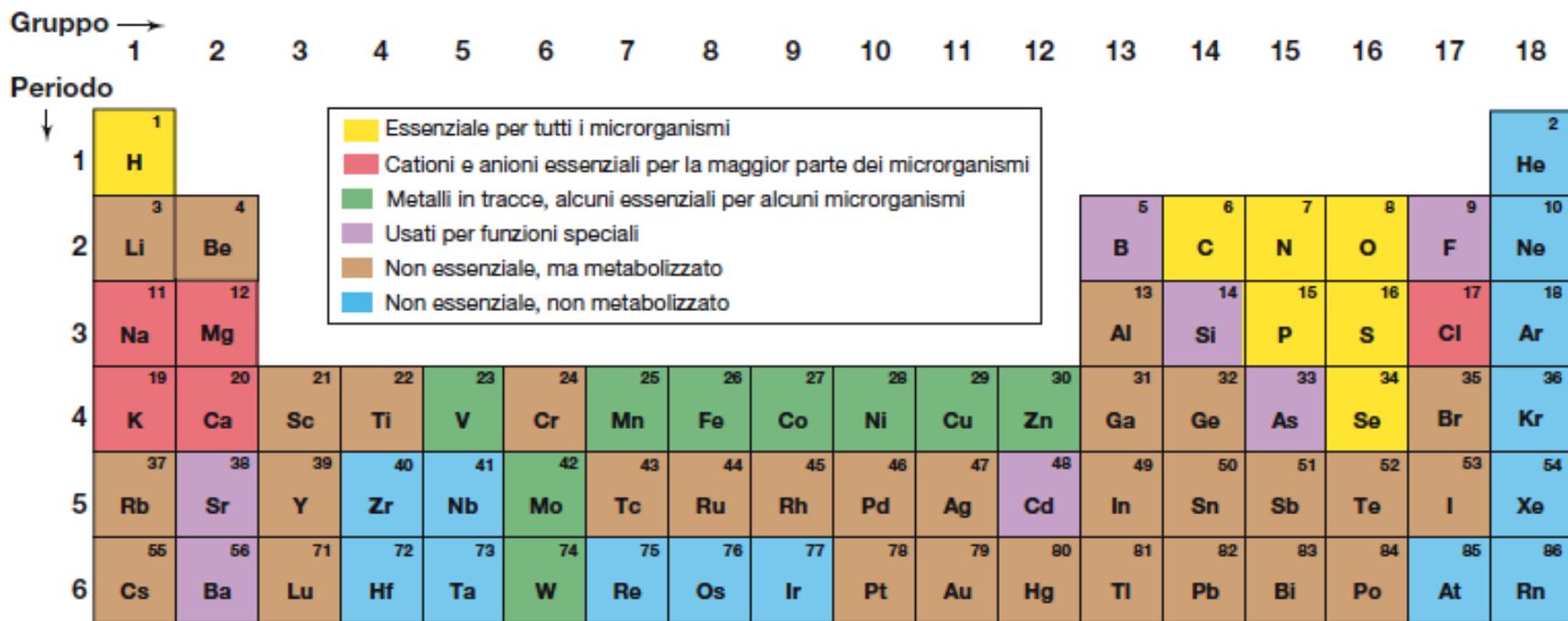
...

Quando si coltivano batteri incapaci di sintetizzare queste molecole è necessario prevederne l'**aggiunta nel terreno di coltura**.

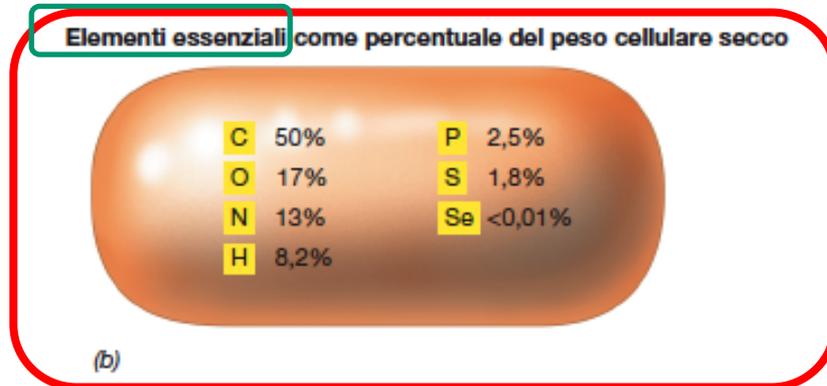
La maggior parte di queste molecole, soprattutto vitamine, funzionano come **componenti di coenzimi** (componenti non proteiche degli enzimi).

**Tab. 5.3** Fattori di crescita: vitamine e loro funzioni

Vitamine	Funzioni
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	Precursore dell'acido folico
Acido folico	Metabolismo del carbonio; trasferisce il gruppo metile
→ Biotina	Biosintesi degli acidi grassi; $\beta$ -decarbossilazione; alcune reazioni di fissazione di CO <sub>2</sub>
→ Cobalamina (B <sub>12</sub> )	Riduzione e trasferimento di singoli frammenti di carbonio; sintesi del deossiribosio
Acido lipoico	Trasferimento di gruppi acilici nella decarbossilazione del piruvato e $\alpha$ -chetoglutarato
Acido nicotinico (niacina)	Precursore del NAD <sup>+</sup> (vedi fig. 5.10); trasferimento di elettroni nelle reazioni di ossido-riduzione
Acido pantotenico	Precursore del coenzima A; attivazione dei derivati acetilici e acilici
Riboflavina	Precursore del FMN (vedi fig. 5.15), FAD nelle flavoproteine coinvolte nel trasporto di elettroni
→ Tiamina (B <sub>1</sub> )	$\alpha$ -decarbossilazione; transchetolasi
→ Vitamina B <sub>6</sub> (gruppo piridossal-piridossamina)	Trasformazioni degli aminoacidi e chetoacidi
Gruppo vitamina K; chinoni	Trasporto di elettroni; sintesi di sfingolipidi
Idrossamati	Composti che legano il ferro; solubilizzazione del ferro e trasporto nella cellula

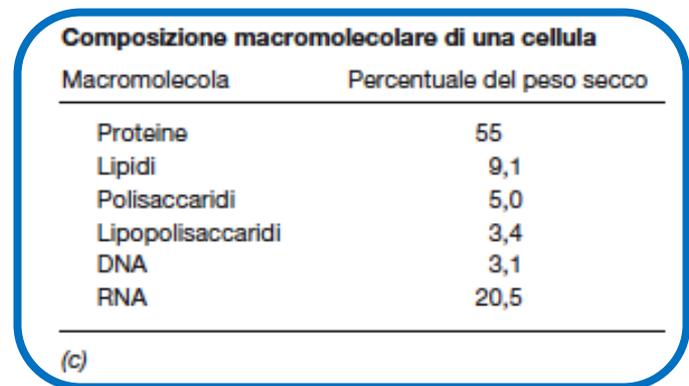


(a)



**Figura 4.1** Composizione elementare e macromolecolare di una cellula batterica. (a) La tavola periodica degli elementi rivista in funzione delle necessità microbiche. Con l'eccezione dell'uranio, che può essere metabolizzato

da alcuni procarioti, non è noto che siano metabolizzati gli elementi del periodo 7 e oltre nella tavola periodica completa degli elementi. (b) Contributo relativo degli elementi essenziali al peso cellulare secco. (c) Abbondanza relativa delle



macromolecole in una cellula batterica. Dati in (b) da *Aquat. Microb. Ecol.* 10: 15-27 (1996) e in (c) da *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. ASM, Washington, DC (1996).

## Terreni di coltura

Miscele di nutrienti che consentono la crescita dei microrganismi in laboratorio.

**La maggior parte dei microrganismi non è stata ancora coltivata!**

### Terreni chimicamente definiti

E' nota l'esatta composizione chimica

### Terreni chimicamente indefiniti (complessi)

La composizione chimica del medium non è esattamente nota

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g  
(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 1 g  
MgSO<sub>4</sub> 0,1 g  
CaCl<sub>2</sub> 0,02 g  
Glucosio 4-10 g  
Elementi in tracce (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2-10 µg di ognuno  
1000 ml di acqua distillata  
pH 7



(a)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g  
NH<sub>4</sub>Cl 3 g  
MgSO<sub>4</sub> 0,1 g  
Glucosio 25 g  
Acetato di sodio 20 g  
Aminoacidi (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteina, glutamato, glutamina, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) 100-200 µg di ognuno  
Purine e pirimidine (adenina, guanina, uracile, xantina) 10 mg di ognuna  
Vitamine (biotina, acido folico, acido nicotinico, piridossale, piridossamina, piridossina, riboflavina, tiamina, acido pantotenico, acido *p*-aminobenzoico) 0,01-1 mg di ognuno  
Elementi in tracce (*vedi* la prima colonna) 2-10 µg di ognuno  
1000 ml di acqua distillata  
pH 7

Glucosio 15 g  
Estratto di lievito 5 g  
Peptone 5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g  
1000 ml di acqua distillata  
pH 7



(b)

<sup>a</sup> Le foto sono provette del terreno definito (a) e del terreno complesso (b) qui descritti. Il terreno complesso è colorato dai vari estratti organici che contiene. Le foto sono di Cheryl L. Broadie e John Vercillo, Southern Illinois University di Carbondale.

La **fonte di carbonio** è essenziale per la crescita microbica.

In un **terreno semplice** è presente una sola fonte di carbonio.

Il **terreno complesso** contiene derivati di prodotti microbici, animali o vegetali (caseina, estratto di carne, estratto di lievito, etc.).

## TERRENI DI COLTURA NON SELETTIVI

- Terreni di coltura di uso generale che consentono la crescita della maggior parte dei microrganismi.

## TERRENI DI COLTURA SELETTIVI

Terreni a cui vengono aggiunte sostanze che

- favoriscono la moltiplicazione dei microrganismi ricercati.
- inibiscono selettivamente o ritardano la crescita di tutti gli altri microrganismi.

### Acqua peptonata alcalina

Peptone 10 g/L

NaCl 1

pH 8,6

Dehydrated Ox Bile 5.0

Bromocresol Purple 0.01



### MacConkey broth

Peptone 20.0 g/L

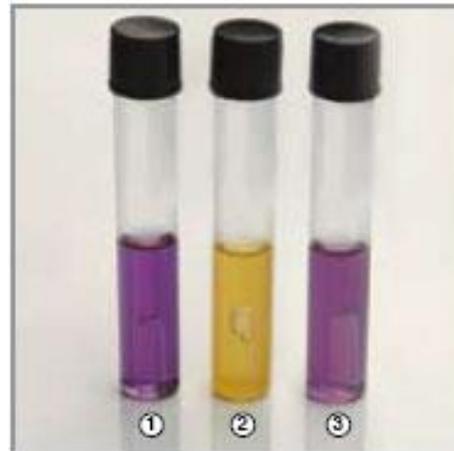
Lactose 10.0

**Bile salts** 5.0

Sodium chloride 5.0

**Bromocresol purple** (o **neutral red**) 0.01

pH 7.3 ±0.2



## TERRENI DI COLTURA DIFFERENZIALI

Terreno di coltura a cui viene aggiunto un indicatore che permette di distinguere batteri con attività metaboliche diverse.

### MacConkey agar n. 3

Peptone 20.0 g/L

Lactose 10.0

**Bile salts No. 3** 1.5

Sodium chloride 5.0

**Neutral red** 0.03

Crystal violet 0.001

**Agar** 15.0

pH 7.1 ±0.2



## Microrganismi diversi possono avere esigenze nutrizionali diverse

Considerando *E. coli* e *L. mesenteroides*, quale di questi batteri ha maggiori capacità biosintetiche?

**Tab. 5.4 Esempi di terreni di coltura per microrganismi con richieste nutritive semplici e complesse<sup>a</sup>**

Terreni di coltura definiti per <i>Escherichia coli</i>	Terreni di coltura definiti per <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Terreni di coltura complessi sia per <i>E. coli</i> che per <i>L. mesenteroides</i>
<p>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g                      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g                      (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g                      MgSO<sub>4</sub> 0,1 g                      CaCl<sub>2</sub> 0,02 g                      Glucosio 4-10 g                      Elementi in tracce (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2-10 µg di ognuno                      1000 ml di acqua distillata                      pH 7</p> 	<p>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g                      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g                      NH<sub>4</sub>Cl 3 g                      MgSO<sub>4</sub> 0,1 g                      Glucosio 25 g                      Acetato di sodio 20 g                      Aminoacidi (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteina, glutamato, glutamina, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) 100-200 µg di ognuno                      Purine e pirimidine (adenina, guanina, uracile, xantina) 10 mg di ognuna                      Vitamine (biotina, acido folico, acido nicotinico, piridossale, piridossamina, piridossina, riboflavina, tiamina, acido pantotenico, acido <i>p</i>-aminobenzoico) 0,01-1 mg di ognuno                      Elementi in tracce (<i>vedi</i> la prima colonna) 2-10 µg di ognuno                      1000 ml di acqua distillata                      pH 7</p> 	<p>Glucosio 15 g                      Estratto di lievito 5 g                      Peptone 5 g                      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g                      1000 ml di acqua distillata                      pH 7</p> 
<b><i>E. coli</i> + <i>L. mesenteroides</i> -</b>	<b><i>E. coli</i> + <i>L. mesenteroides</i> +</b>	<b><i>E. coli</i> + <i>L. mesenteroides</i> +</b>

<sup>a</sup> Le foto sono provette del terreno definito (a) e del terreno complesso (b) qui descritti. Il terreno complesso è colorato dai vari estratti organici che contiene. Le foto sono di Cheryl L. Broadie e John Vercillo, Southern Illinois University di Carbondale.

Alcuni microrganismi molto esigenti (*fastidious*) necessitano di terreni di coltura complessi con aggiunta di nutrienti (**terreni arricchiti**): **sangue**, **siero**, **emina** (fattore X), **NAD** (fattore V), etc.

## TRYPTONE SOYA BROTH

**A highly nutritious general purpose medium for the growth of bacteria and fungi.**

Formula g/litre

Pancreatic digest of casein	17.0
Papaic digest of soybean meal	3.0
Sodium chloride	5.0
Dibasic potassium phosphate	2.5
Glucose	2.5
pH 7.3 ±0.2	

### Directions

Add 30 g to 1 litre of distilled water, mix well and distribute into final containers. **Sterilise** by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

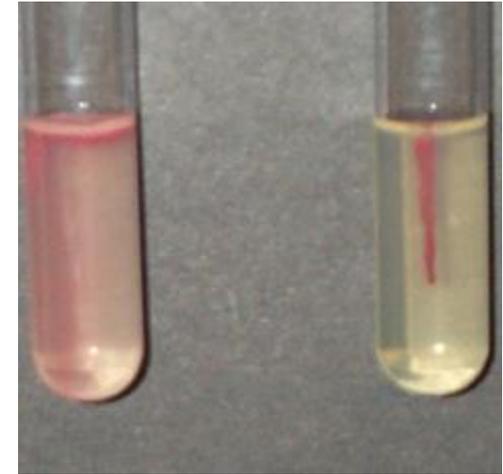
### Description

A highly nutritious versatile medium which is recommended for general laboratory use. Due to the inclusion of both Tryptone and Soya Peptone, the medium will support a luxuriant growth of many fastidious organisms without the addition of serum, etc.

informazioni fornite dal produttore

## TERRENI DI COLTURA

- liquidi
- solidi
- semisolidi



Test motilità in terreno semisolido  
(basse concentrazioni di agar ~0,4%)

**Agar** is a complex mixture of polysaccharides extracted from species of the red algae known as agarophytes (*Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Acanthopeltis* and *Ahnfeltia* species).

It is a sulphuric acid ester of a linear galactan, **soluble in hot water but insoluble in cold water**.  
A 1.5% w/v aqueous solution should set at 32±39°C and **not melt below 85°C**.

La solidificazione dei terreni di coltura può essere ottenuta anche mediante l'impiego di altri agenti solidificanti: gel di silice, gelrite, ...

### **STANDARD PLATE COUNT AGAR**

A standard medium corresponding to the APHA formulation for milk, water, food and dairy products.

Yeast extract	2.5 g/L
Pancreatic digest of casein	5.0
Glucose	1.0
Agar	15.0

pH 7.0 ±0.2

#### **Directions**

Suspend 23.5g in 1 litre of distilled water. Bring to the boil to dissolve completely. Dispense into bottles and sterilise by autoclaving at 121°C for 15'.

### **TRYPTONE SOYA AGAR**

A general purpose medium for the growth of a wide variety of organisms.

Tryptone	15.0 g/L
Soya peptone	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

pH 7.3 ±0.2

#### **Directions**

Add 40g to 1 litre of distilled water. Bring to the boil to dissolve completely. Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

#### **Description**

A general purpose agar medium, containing two peptones, which will support the growth of a wide variety of organisms. The medium may also be used as a blood agar base.

## **Esempi di terreni di coltura (liquidi o solidi?)**

### **R2A AGAR**

A medium for the bacterial examination of drinking water.

#### **Formula g/L**

Yeast extract	0.5
Tryptone	0.25
Peptone	0.75
Dextrose	0.5
Starch	0.5
Di-potassium phosphate	0.3
Magnesium sulphate	0.024
Sodium pyruvate	0.3
Agar	15.0

pH 7.2 ±0.2

#### **Directions**

Suspend 18.1 grams in 1 litre of distilled water. Bring to the boil to dissolve completely. Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

The combination of pancreatin and papain enzyme systems ensures that these bacteriological peptones contain a wide spectrum of polypeptides.

## Altri esempi di terreni di coltura

### MacCONKEY AGAR

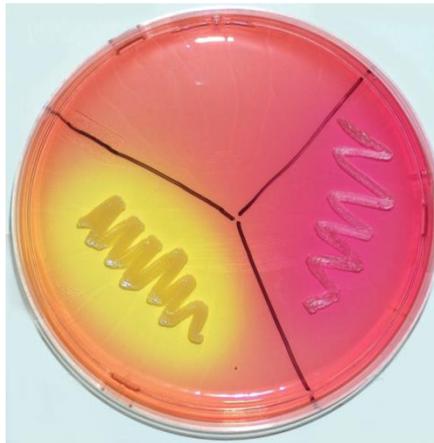
Peptone	20.0 g/L
Lactose	10.0
<b>Bile salts No.3</b>	<b>1.5</b>
Sodium chloride	5.0
Neutral red	0.03
<b>Crystal violet</b>	<b>0.001</b>
Agar	15.0
<b>pH 7.1 ±0.2</b>	

#### Directions

Suspend 51.5 g in 1 litre of distilled water. Bring to the boil to dissolve completely. Sterilise by **autoclaving at 121 °C for 15 minutes.**



Due to the inclusion of a specially prepared fraction of **bile salts** in addition to **crystal violet**, the medium gives improved differentiation between coliforms and non-lactose fermenting organisms, whilst Gram positive cocci are completely inhibited.



autoclave

Piastre Petri



### MANNITOL SALT AGAR

estratto di carne

'Lab-Lemco' powder	1.0 g/L
Peptone	10.0
<b>Mannitol</b>	<b>10.0</b>
Sodium chloride	75.0
Phenol red	0.025
Agar	15.0
<b>pH 7.5 ±0.2</b>	

#### Directions

Suspend 111 g in 1 litre of distilled water and bring to the boil to dissolve completely. Sterilise by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

A selective medium prepared for the isolation of presumptive pathogenic staphylococci. Most other bacteria are inhibited by the **high salt concentration**. Presumptive coagulase-positive staphylococci produce colonies surrounded by bright yellow zones whilst non-pathogenic staphylococci produce colonies with reddish purple zones.

## COLTURE BATTERICHE

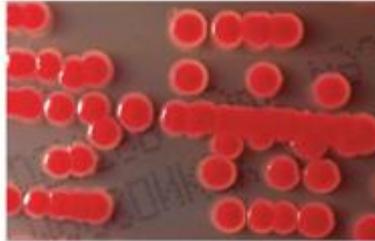
Colonie batteriche

Le caratteristiche morfologiche delle colonie variano a seconda della specie batterica e del terreno di coltura utilizzato.

Grandezza,  
Forma,  
Consistenza,  
Colore,  
Odore,  
...

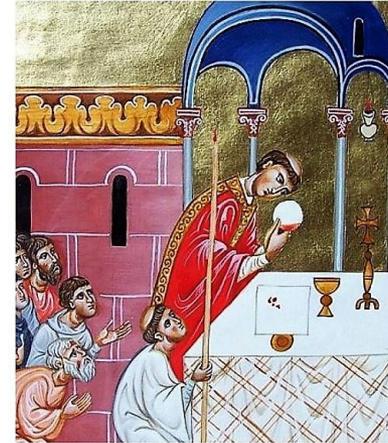


(a) MacConkey agar



(b)

*Serratia marcescens* (Gram -)



Colture pure?

*Pseudomonas aeruginosa*  
(Trypticase soy agar)



(c)

*Shigella flexneri*  
(MacConkey agar)



(d)



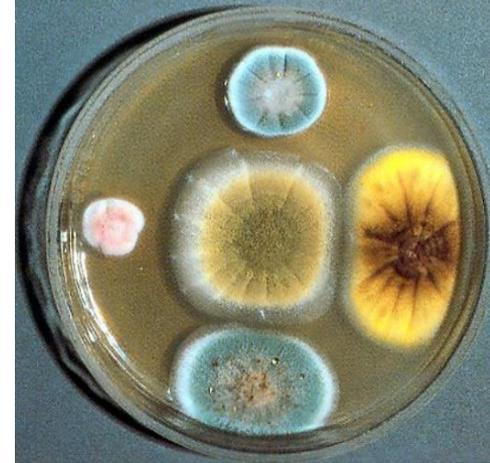


## colonie batteriche

Sono visibili ad occhio nudo.

Ogni colonia, cresciuta sulla superficie del terreno di coltura solido, è costituita da milioni di cellule.

Si assume che ogni colonia pura e ben isolata deriva dalla moltiplicazione di una singola cellula.



# Descrizione morfologia colonie

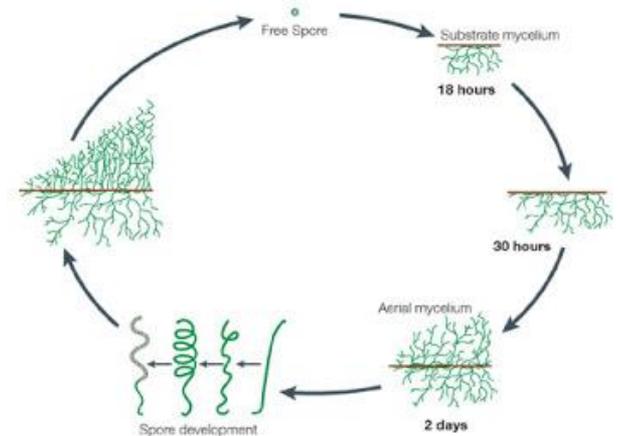
Forma,  
Grandezza,  
Colore,

...



<i>Forma della colonia</i>	<i>Margine</i>	<i>Profilo</i>	<i>Superficie</i>
Puntiforme	Intero	Piatto	Liscia, lucida
Rotonda	Ondulato	Elevato	Ruvida
Rizoide	Lobato	Convesso	Rugosa
Irregolare		Pulvinato	Secca, polverosa
Filamentosa	Filamentoso (come la colonia)	Umbonata	
	Eroso		

Alcuni batteri (**attinomiceti**) crescono sotto forma di corti filamenti (**ife**); la rete tridimensionale formata dalle ife costituisce il **micelio**, che può essere **aereo** o **vegetativo**.



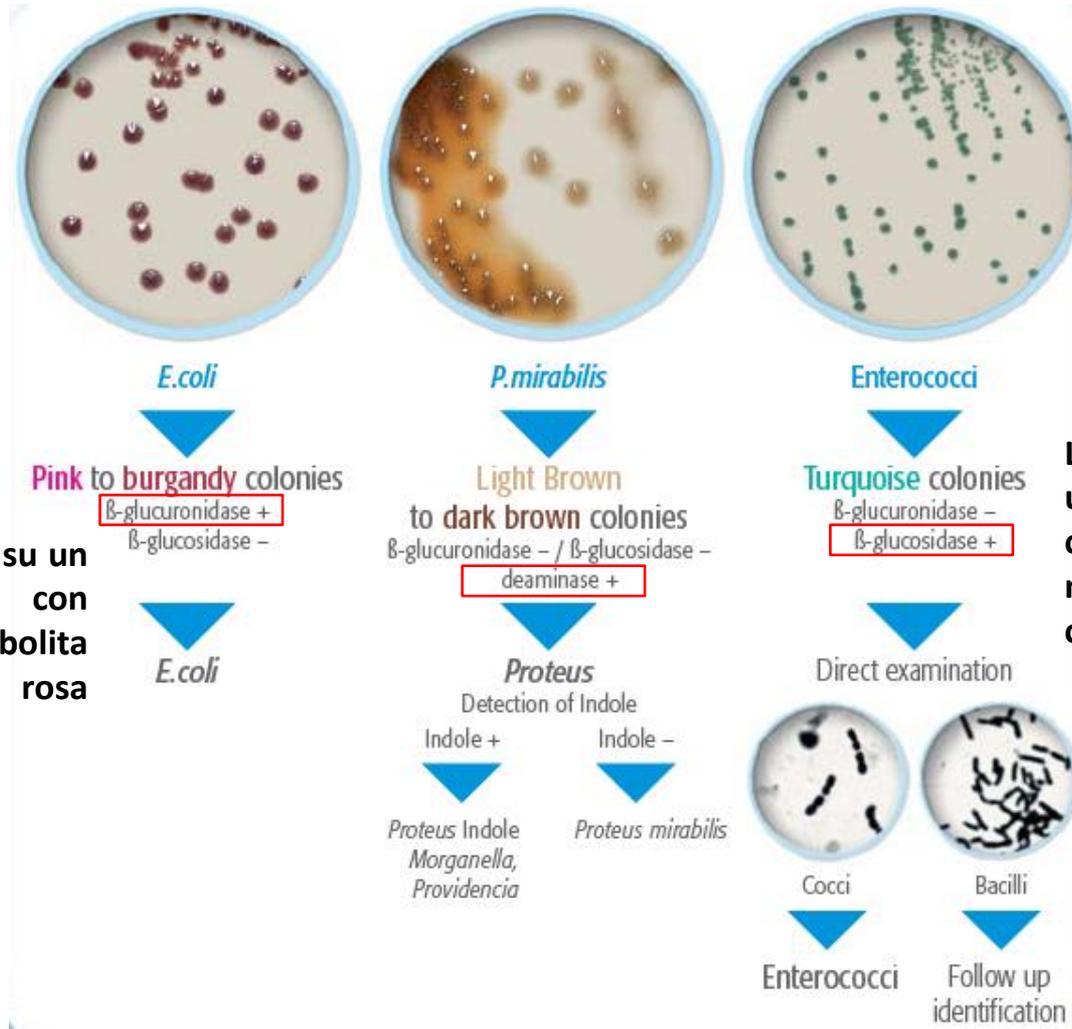
# Esistono centinaia di terreni di coltura

Scelta in funzione del tipo di analisi da effettuare

Terreno di coltura usato nella diagnostica clinica contenente **sostanze cromogene** in grado di evidenziare specifiche attività enzimatiche di alcune specie batteriche comunemente responsabili di infezioni urinarie.

La maggior parte delle **infezioni urinarie** sono dovute ad

- *E. coli*
- Enterococchi
- *Proteus mirabilis*



La  $\beta$ -glucuronidasi agisce su un substrato cromogeno con produzione di un metabolita insolubile di colore rosa salmone.

La  $\beta$ -glucosidasi agisce su un substrato cromogeno che produce un metabolita insolubile di colore blu.

## Esempi di tecniche microbiologiche

Un **terreno di coltura** sterile (al momento dell'impiego), deve essere inoculato in **condizioni asettiche** ed incubato in condizioni tali da permettere la crescita del microrganismo ricercato.

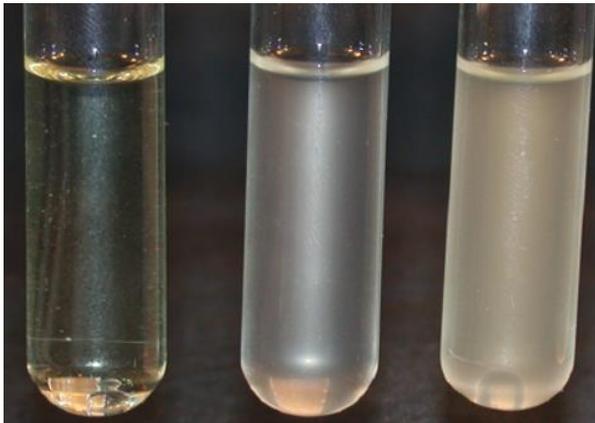
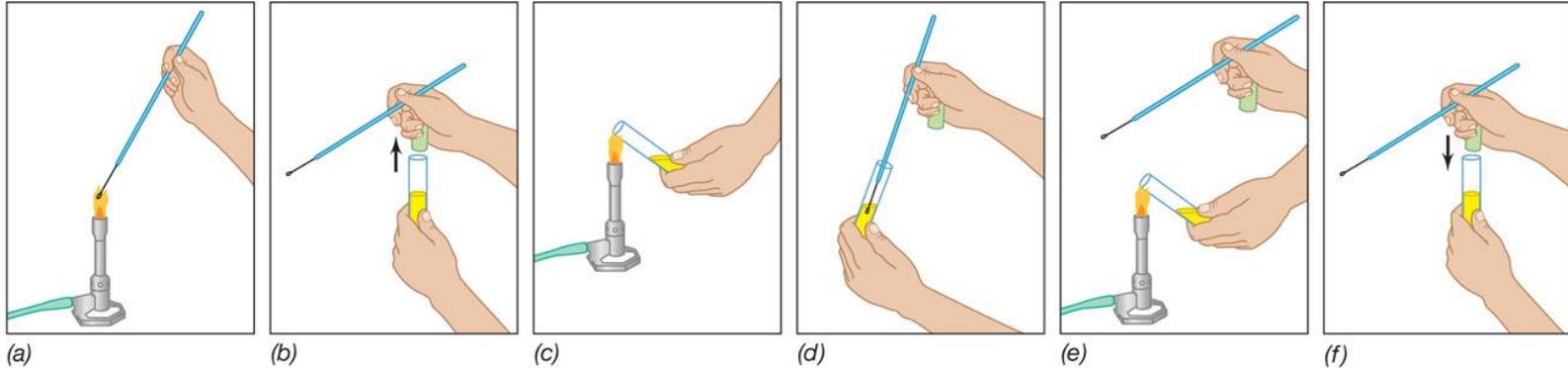


### Problema dei contaminanti

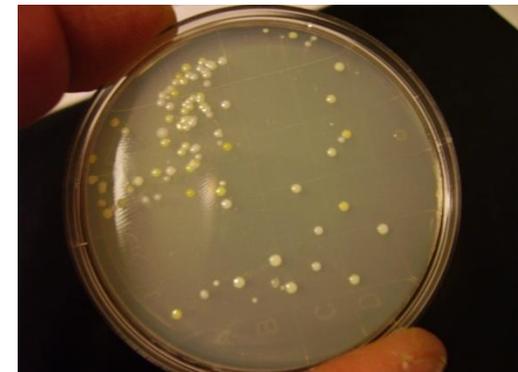


I microrganismi sono **ubiquitari!**

## Trasferimento asettico liquido-liquido di colture microbiche

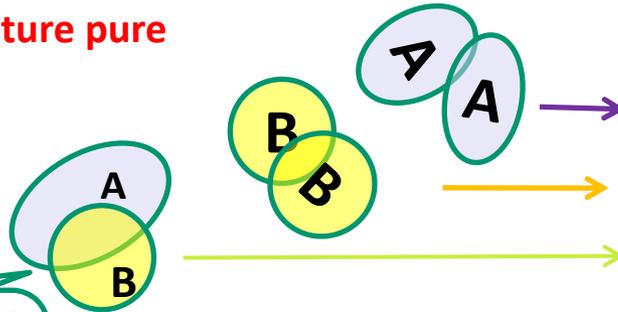


L'impiego di **terreni di coltura solidi** consente di ottenere colonie ben isolate o in forma pura (colture pure), di osservare la morfologia delle colonie, etc.



## Tecnica di semina liquido-solido (piastramento)

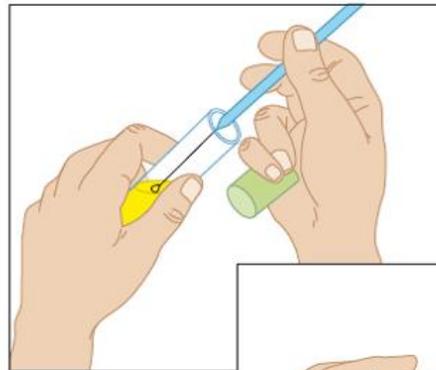
- per sviluppo ed osservazione colonie
- per ottenere **colture pure**
- ...



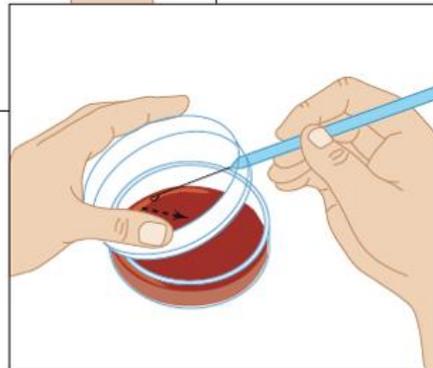
Effettuando test enzimatici su una coltura mista si otterrebbe un profilo corrispondente alla somma delle attività enzimatiche dei diversi batteri.

## Per identificare o studiare le caratteristiche di un batterio è necessario lavorare su colture pure!

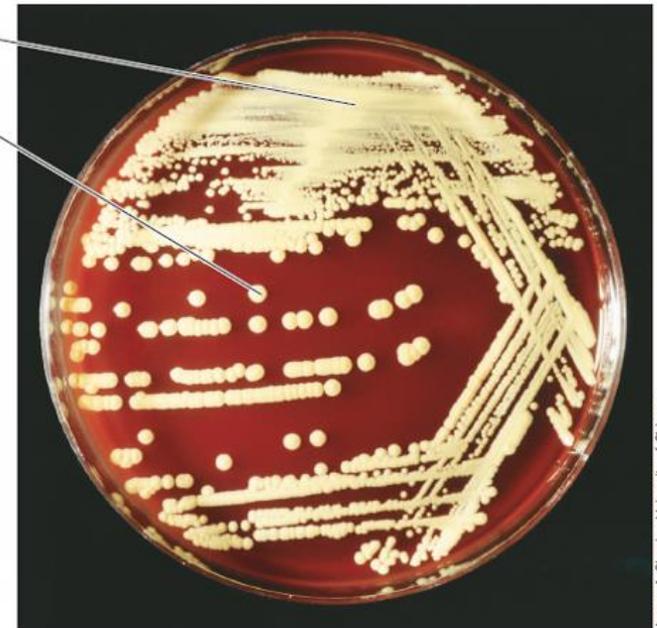
glu	lac	sor	ino	identificazione
+	+	-	-	Specie A
-	+	+	-	Specie B
+	+	+	-	Specie C



Crescita confluenta all'inizio dello striscio  
Colonie isolate alla fine dello striscio

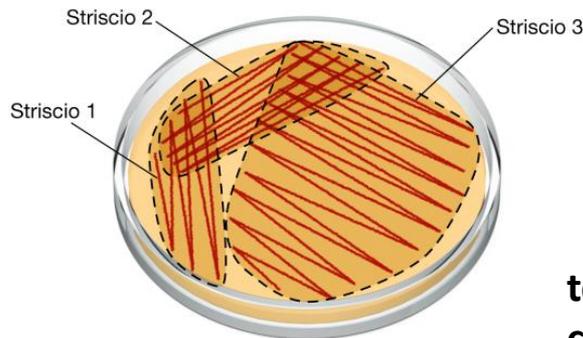


(b)



(c)

James A. Shapiro, University of Chicago

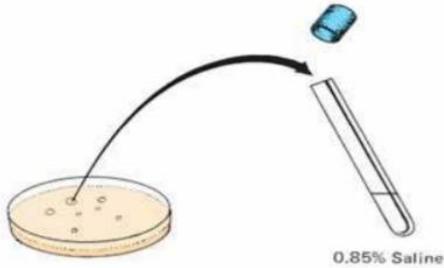


tecnica semina terreno solido con ansa da microbiologia

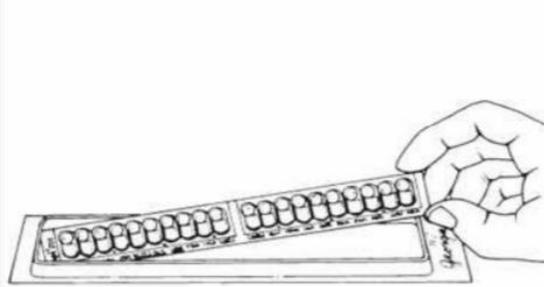
Il terreno solido permette di immobilizzare e separare le cellule

Black, *Microbiology: Principles and Explorations*, copyright 2012, John Wiley & Sons, Inc. Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.





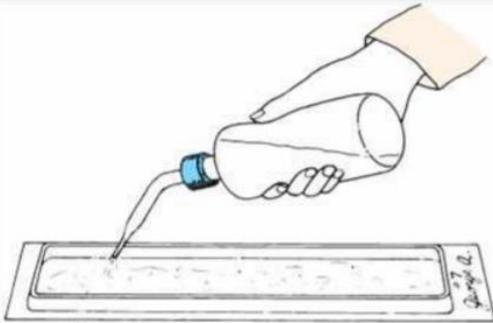
**1** Select one well-isolated colony to make a saline suspension of the unknown organism. Suspension should be well dispersed with a Vortex mixer.



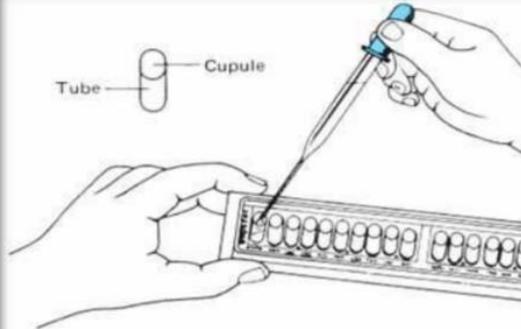
**3** Place an API 20E test strip into the bottom of the moistened tray. Be sure to seal the pouch from which the test strip was removed to prevent contamination of remaining strips.



**5** To provide anaerobic conditions for chambers ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, and URE, completely fill cupules of these chambers with sterile mineral oil. Use a fresh cupule.



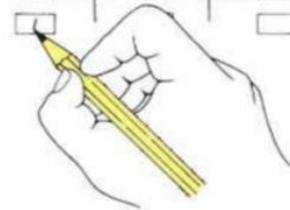
**2** After labeling the end tab of a tray with your name and unknown number, dispense approximately 5 ml. of tap water into bottom of tray.



**4** Dispense saline suspension of organisms into cupules of all twenty compartments. Slightly *underfill* ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, and URE. *Completely fill* cupules of CIT, VP, and GEL.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	SUL	MAN
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

5



**6** After incubation and after adding test reagents to four compartments, record all results and total numbers to arrive at 7-digit code. Consult the *Analytical Profile Index* to find the unknown.

# Identificazione batteri



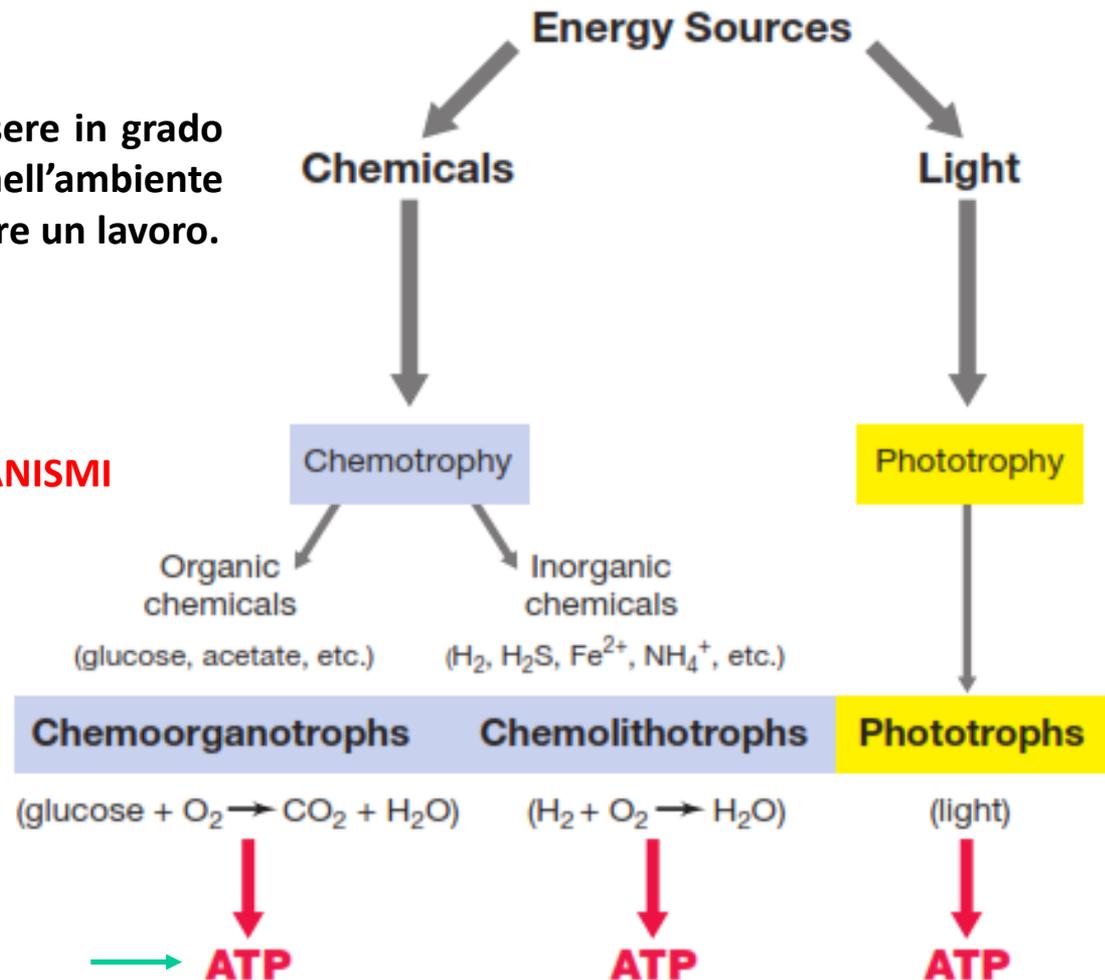
## api 20E Interpretation of biochemical tests

TEST	BETA-GALACTOSIDASE	ARGININE DIHYDROLASE	LYSINE DECARBOXYLASE	ORNITHINE DECARBOXYLASE	SIMMONS CITRATE	PRODUCTION OF H <sub>2</sub> S	UREASE (FERGUSON)	TRYPTOPHANE DESAMINASE	INDOLE	VOGES PROSKAUER		PROTEOLYSIS OF GELATIN	GLUCOSE	MANNITOL	INOSITOL	SORBITOL	RHAMNOSE	SUCROSE	MELIBIOSE	AMYGDALINE	L (+) ARABINOSE		CYTOCHROME OXIDASE	PRODUCTION OF NITRITES	PRODUCTION OF NITROGEN
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP		GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA		OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
NEGATIVE																									
POSITIVE																									

## ENERGETICA DEI MICRORGANISMI

Per moltiplicarsi le cellule devono essere in grado di trasformare l'energia disponibile nell'ambiente in una forma di energia utile a compiere un lavoro.

## CLASSI ENERGETICHE DEI MICRORGANISMI



## CONSERVAZIONE DELL'ENERGIA

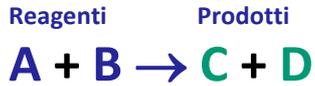
**FPM** → fosforilazione ossidativa → ATP  
Meccanismo comune a tutti i microrganismi  
(ad eccezione dei fermentanti)

Alcuni microrganismi, in funzione delle condizioni ambientali, sono in grado di utilizzare diverse fonti di energia.

# Concetti di Bioenergetica

**Energia:** "capacità di compiere un lavoro"  
 kilojoule (Kj) → 1 Kj = ~0,239 Kcal

$$J = \text{Kg} \cdot \text{m}^2 / \text{s}^2$$



Le reazioni chimiche sono accompagnate da cambiamenti di energia

Energia disponibile per compiere un lavoro utile

calore + **energia libera (G)**

$\Delta G^{0'}$  → variazione di energia libera in condizioni standard

pH → 7  
 T → 25°C  
 M → 1  
 P → 1 atm

$\Delta G^{0'}$  negativo → liberazione di energia libera (reazione esoergonica)  
 $\Delta G^{0'}$  positivo → richiesta di energia libera (reazione endoergonica)

Utilizzabile per effettuare un lavoro o produrre ATP

Per calcolare  $\Delta G^{0'}$  è necessario conoscere i valori dell'**energia libera di formazione** di reagenti e prodotti ( $G_f^{0'}$ ).

**Energia libera** rilasciata o richiesta per la formazione di una molecola a partire dagli elementi che la compongono.

$G_f^{0'}$  degli elementi nella forma elementare o elettricamente neutra (C, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) è uguale a zero.



$$\Delta G^{0'} = \underbrace{G_f^{0'} [C + D]}_{\text{prodotti}} - \underbrace{G_f^{0'} [A + B]}_{\text{reagenti}}$$

Compound	Free energy of formation ( $G_f^{0'a}$ )
Water (H <sub>2</sub> O)	-237.2
Carbon dioxide (CO <sub>2</sub> )	-394.4
Hydrogen gas (H <sub>2</sub> )	0
Oxygen gas (O <sub>2</sub> )	0
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	-79.4
Nitrous oxide (N <sub>2</sub> O)	+104.2
Acetate (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	-369.4
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	-917.3
Methane (CH <sub>4</sub> )	-50.8
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	-175.4

per la sua formazione è necessario fornire energia

**Composti con  $G_f^{0'}$  negativa tendono a formarsi spontaneamente, con rilascio di energia**

Le reazioni chimiche sono accompagnate da cambiamenti di energia



calore + energia libera (G)

In natura raramente esistono ambienti che rispettano le condizioni standard.

Per i calcoli bioenergetici sarebbe più opportuno considerare il  $\Delta G$  delle reazioni.

Tiene conto delle **effettive condizioni ambientali** (pH, temperatura, pressione, concentrazioni specie chimiche, ...) in cui i microrganismi vivono.

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \ln K_{eq}$$

Pur essendo  $\Delta G \neq \Delta G^{0'}$ , per comprendere i flussi energetici nei microrganismi è, comunque, sufficiente far riferimento a  $\Delta G^{0'}$ .

$\Delta G^{0'}$

variazione di energia libera in condizioni standard

pH  $\rightarrow$  7  
T  $\rightarrow$  25°C  
M  $\rightarrow$  1  
P  $\rightarrow$  1 atm

$\Delta G^{0'}$  consente di definire se una reazione è **endoergonica** o **esoergonica**





$$\Delta G^{0'} = -237 \text{ KJ}$$

ENZIMI

Reazione spontanea?

Energia di attivazione

Prima che la reazione possa avvenire è necessario fornire energia per rompere i legami chimici dei reagenti.

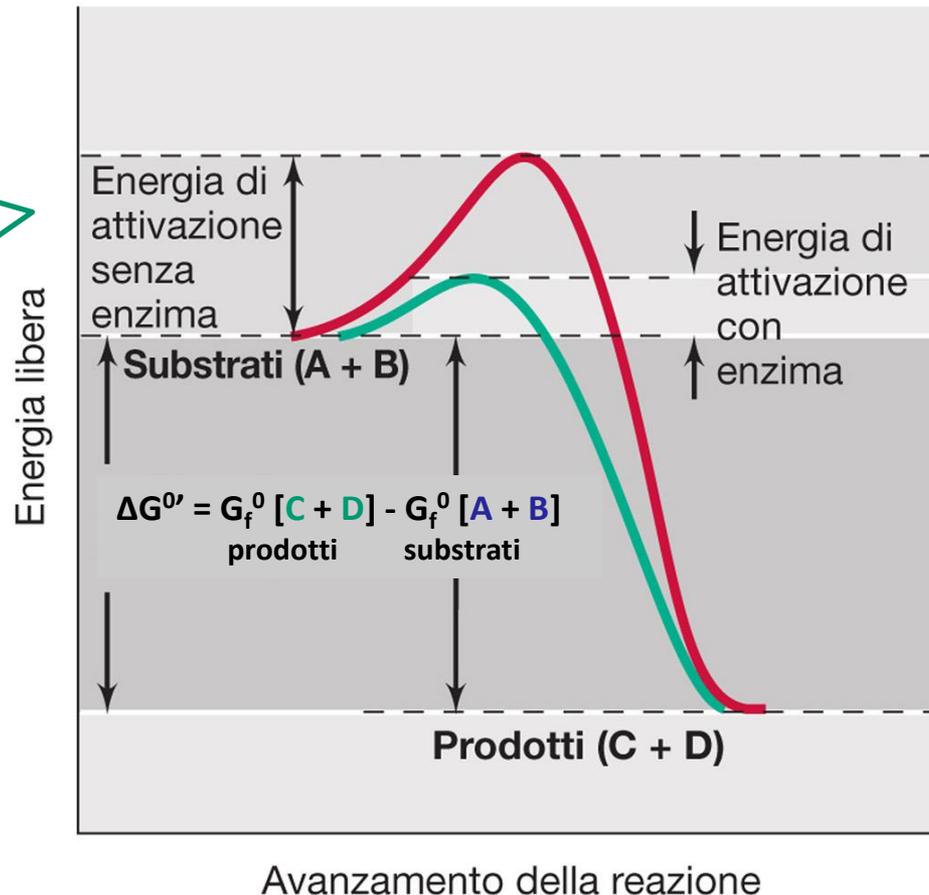


L'intervento di un catalizzatore (enzima) consente di

- ridurre l'energia di attivazione,
- portare in uno stato reattivo i reagenti,
- aumentare la velocità della reazione.



Complesso enzima-substrato



Gli **enzimi** (proteine, RNA)  $\longrightarrow$  aumento della velocità della reazione di  $10^8$ - $10^{20}$  volte la velocità spontanea. riducono l'energia di attivazione.

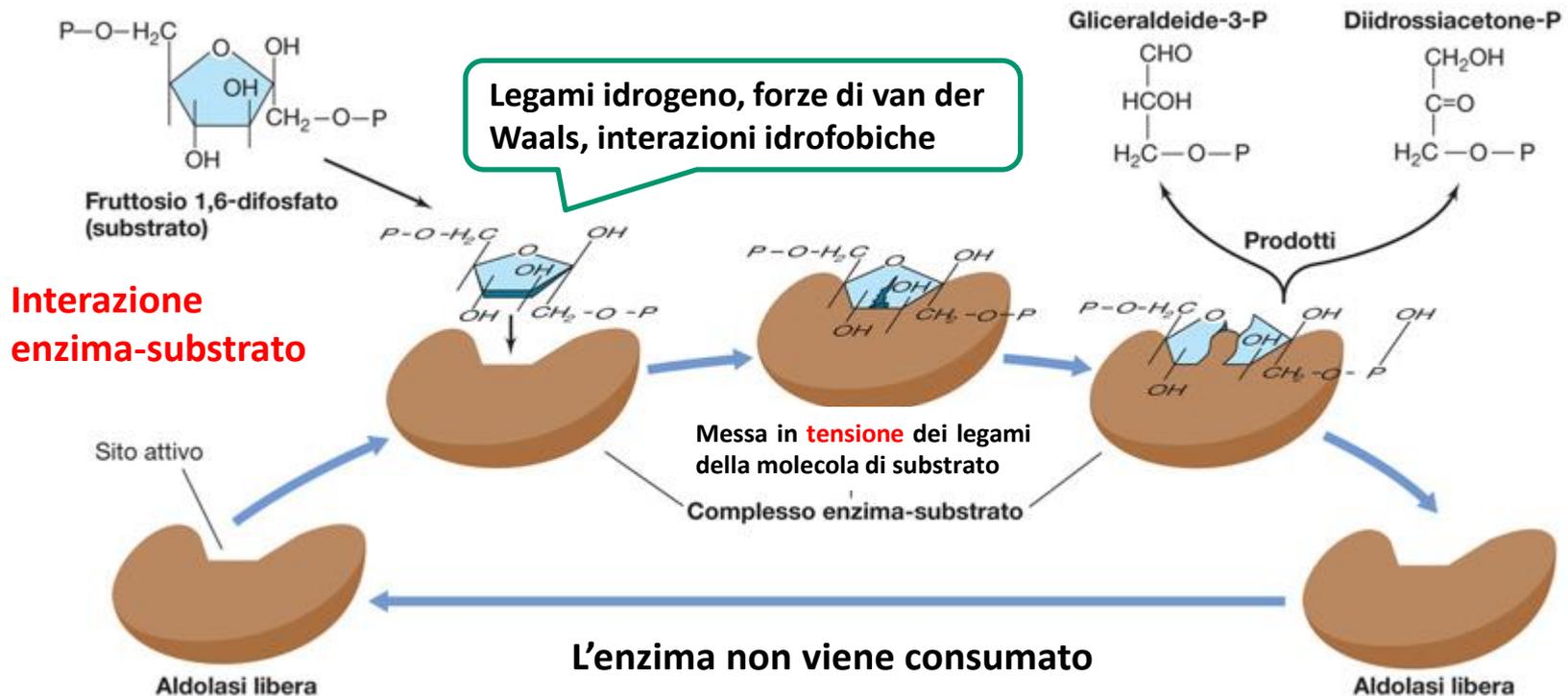
Molti enzimi contengono piccole **molecole non proteiche** importanti per l'attività enzimatica.

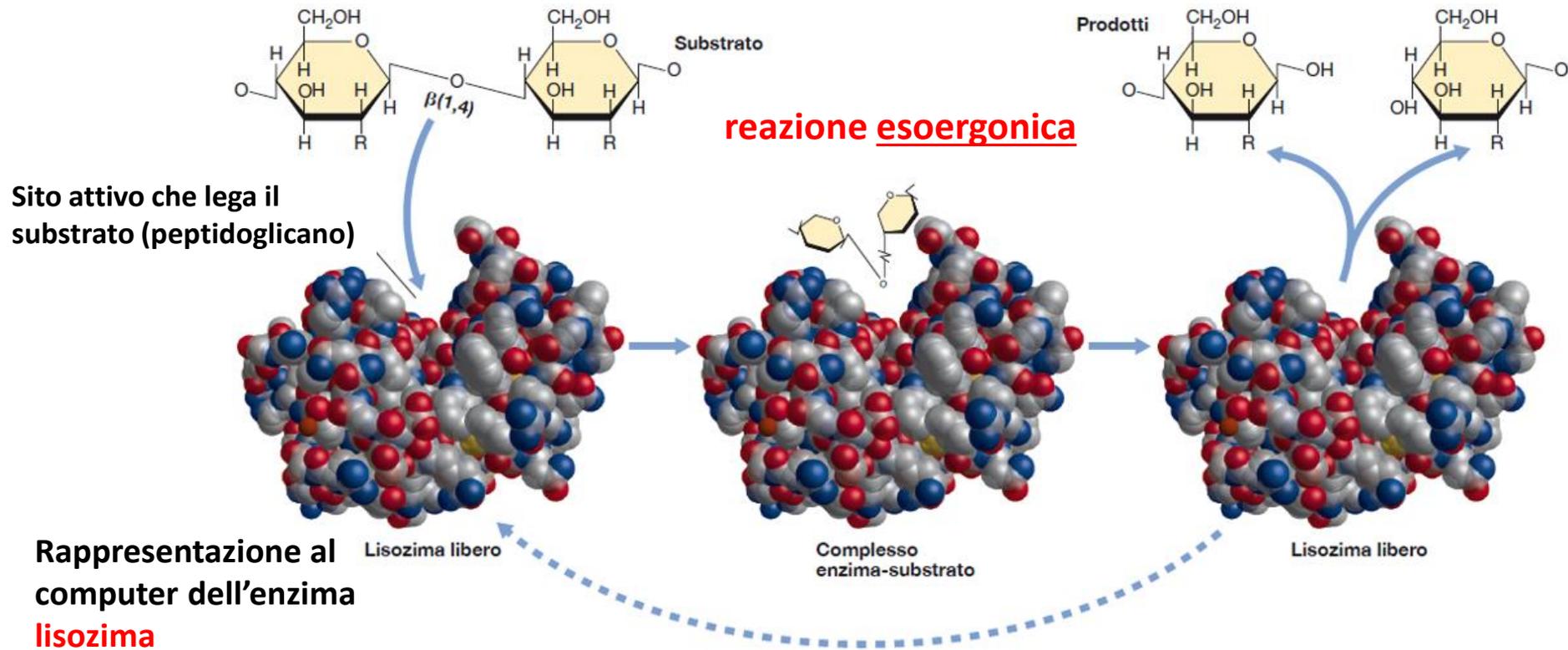
### gruppi prostetici

Molecole legate fortemente all'enzima, spesso in modo permanente e con legami covalenti.

### coenzimi

Molecole legate debolmente all'enzima; una singola molecola di coenzima, inoltre, può legarsi anche ad enzimi diversi (**NAD<sup>+</sup>/NADH**).





Molti enzimi catalizzano **reazioni endoergiche:** possono convertire substrati a bassa energia in prodotti ad alta energia.



**Accoppiamento con reazioni che liberano energia (idrolisi ATP)**

- per superare la barriera dell'energia di attivazione
- per trasformare i substrati in prodotti con un alto livello energetico.

## REAZIONI DI OSSIDO-RIDUZIONE (reazioni redox)

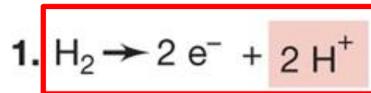
Nella cellula la conservazione dell'energia è legata a **reazioni di ossido-riduzione**, con formazione di **composti ad alta energia (ATP)**.

I processi biochimici di ossido-riduzione, di solito, consistono nel **trasferimento** di un  $e^-$  associato ad un  $H^+$ .

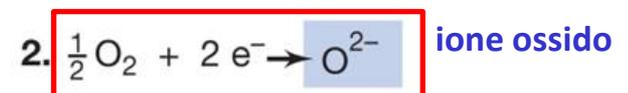
Gli  $e^-$  non possono essere presenti nella cellula come tali, ma come parti di atomi/molecole.



Somma di 2 semireazioni



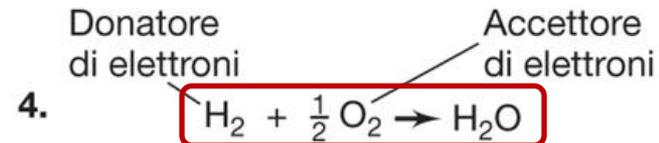
Semireazione della donazione di elettroni



Semireazione dell'accettazione di elettroni



Formazione di acqua



Reazione netta

Nelle reazioni redox è importante considerare il **potenziale di riduzione!**

La **tendenza a ridursi** di sostanze diverse viene definita **potenziale di riduzione** della semireazione.

$E_o'$  → potenziale di riduzione in condizioni standard.

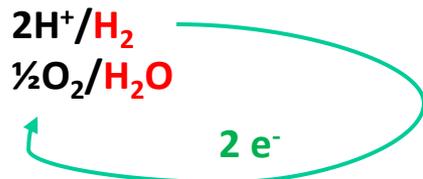


Il potenziale di riduzione è misurato in volt (V), con riferimento ad  $H_2$  come **sostanza standard**.

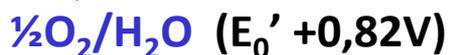


Molte molecole possono comportarsi sia da **donatore** che da **accettore di e<sup>-</sup>** in funzione delle sostanze con cui reagiscono.

Le **semireazioni** delle diverse sostanze possono essere raggruppate sotto forma di **coppie redox**.



La sostanza ridotta di una **coppia redox**, il cui  $E_0'$  è più negativo, dona e<sup>-</sup> alla sostanza ossidata di una coppia redox il cui  $E_0'$  è più positivo.



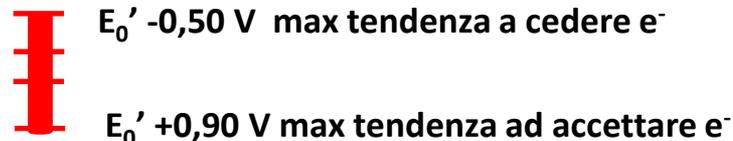
O<sub>2</sub> ha una elevata  
tendenza ad accettare e<sup>-</sup>

H<sub>2</sub>O ha una bassa  
tendenza a donare e<sup>-</sup>

In natura esistono numerose  
coppie redox con diversi  $E_0'$ .

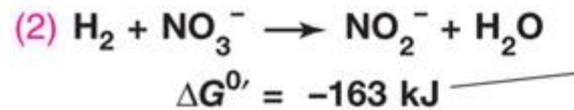
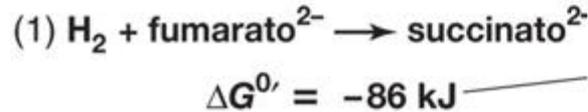
Per spiegare il **trasferimento di e<sup>-</sup>** che avviene nelle cellule è stata ideata la **TORRE DEGLI ELETTRONI** (o **torre redox**).

Nella torre degli e<sup>-</sup> le diverse coppie redox sono ordinate secondo il loro  $E_0'$ , dal più negativo (in alto) al più positivo (in basso).



La differenza di potenziale di riduzione tra due sostanze (o due coppie redox) sulla torre degli elettroni viene indicata come  $\Delta E_0'$

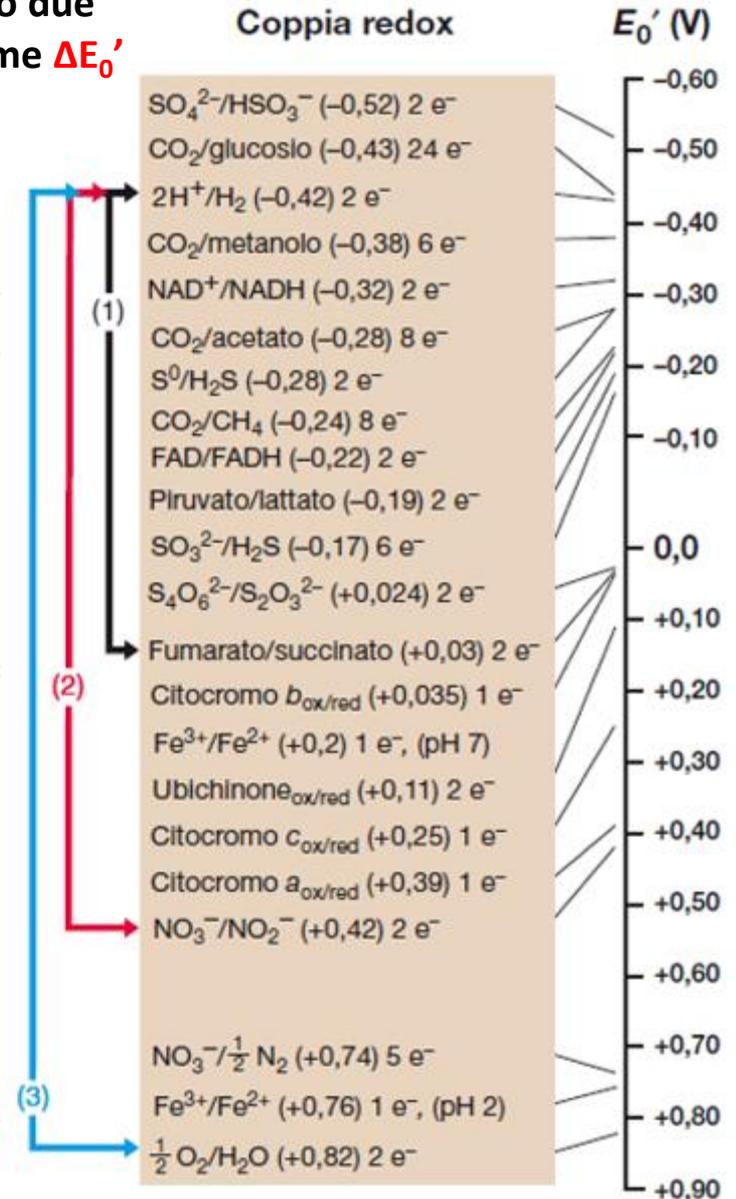
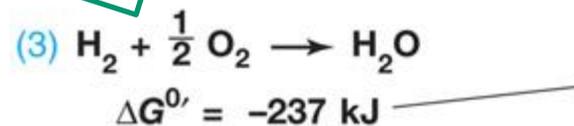
Esempi di energia rilasciata nel **trasferimento di e<sup>-</sup>** da H<sub>2</sub> ad accettori diversi (fumarato, nitrato, ossigeno).



**Maggiore è la distanza tra donatore ed accettore di elettroni maggiore è la quantità di energia rilasciata.**



$\Delta E_0'$  è proporzionale a  $\Delta G^{0'}$



Perché NO<sub>3</sub><sup>-</sup> è un accettore di e<sup>-</sup> migliore del fumarato?

## Donatori di elettroni → potenziali fonti di energia

Passando allo stato ossidato  
**liberano energia**

In realtà non è il donatore in sé a contenere energia, ma è la reazione chimica (ossido-riduzione) a rilasciare energia.

Quanto maggiore è la differenza tra i potenziali di riduzione delle due semireazioni, tanto maggiore sarà l'energia liberata durante la reazione di ossido-riduzione.

Il **TRASFERIMENTO DI ELETTRONI**, nel corso delle reazioni redox, avviene mediante **trasportatori**.

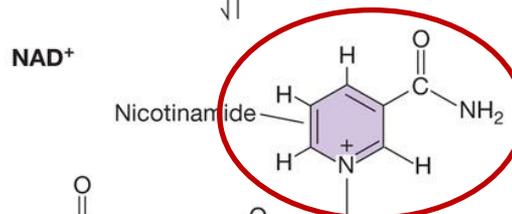
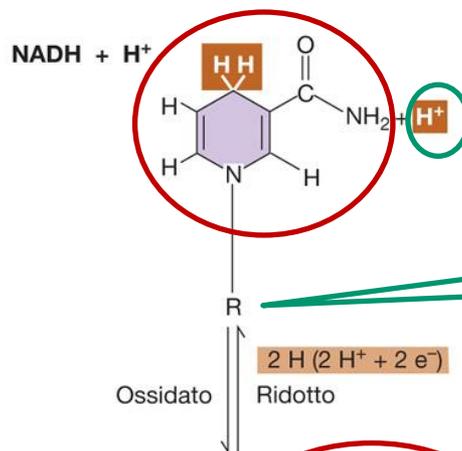
I trasportatori possono essere legati all'enzima (**gruppo prostetico**) o diffusibili liberi (**coenzimi**)

Coenzimi: **NAD<sup>+</sup>**, **NADP<sup>+</sup>**

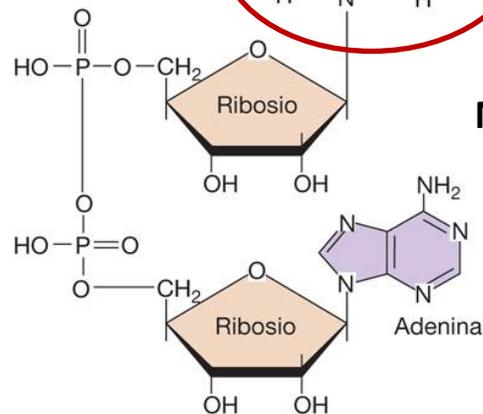
Accettano elettroni e protoni (**2 e<sup>-</sup> ed 1 H<sup>+</sup>**, mentre l'altro H<sup>+</sup> viene rilasciato nel citoplasma)

Potenziale di riduzione  
**NAD<sup>+</sup>/NADH (NADP<sup>+</sup>/NADPH) -0,32 V**

**Buoni donatori di elettroni**  
(nella forma ridotta)

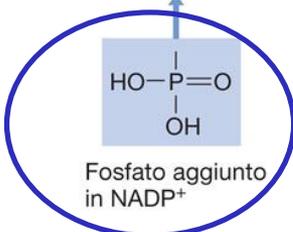


**Nicotinamide adenina dinucleotide**



**NAD<sup>+</sup>/NADH**  
coinvolto nelle reazioni cataboliche

**NADP<sup>+</sup>/NADPH**  
Soprattutto nelle reazioni anaboliche



## NAD<sup>+</sup>/NADH nelle reazioni di ossido-riduzione

Reazione redox in cui due diversi enzimi richiedono coenzima NAD<sup>+</sup> o NADH.

Il **coenzima** funziona da intermediario

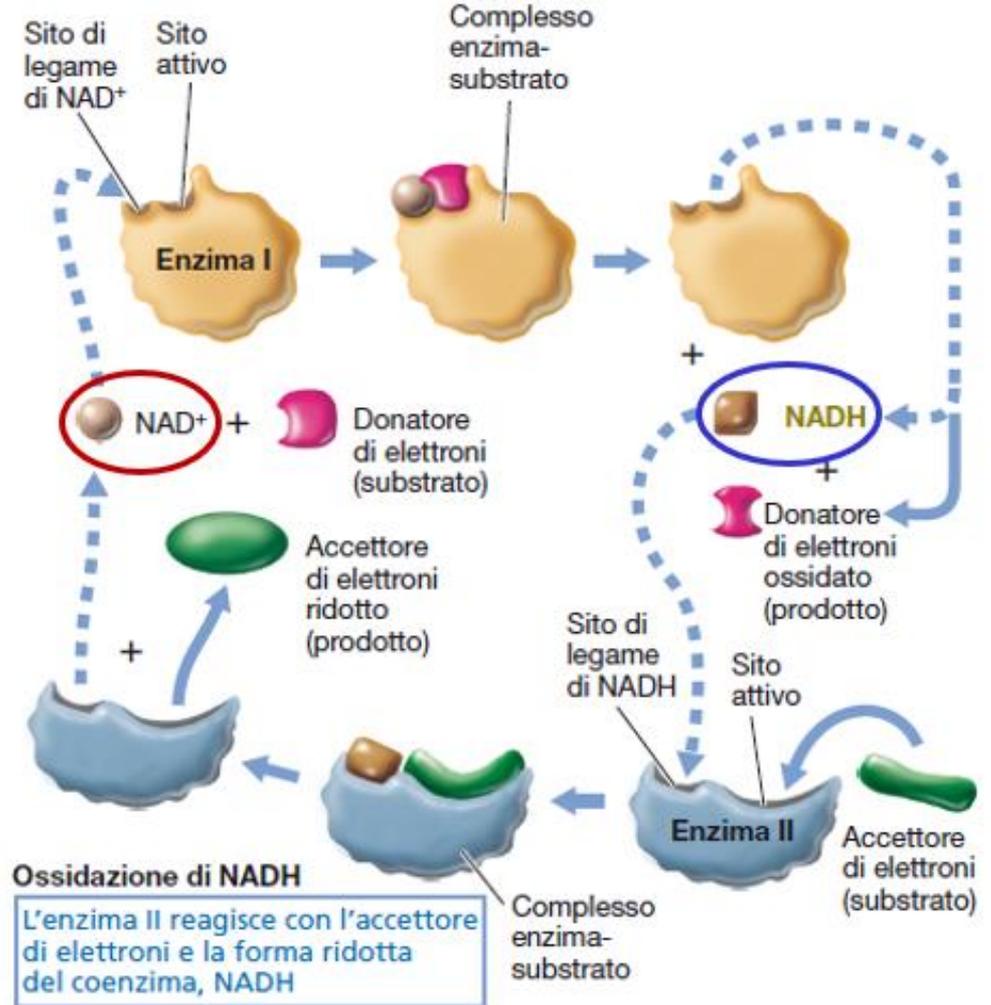


facilita la reazione ma non viene consumato.

La molecola di un coenzima può legarsi anche ad enzimi diversi (NAD<sup>+</sup>/NADH).

### Riduzione di NAD<sup>+</sup>

L'enzima I reagisce con il donatore di elettroni e la forma ossidata del coenzima, NAD<sup>+</sup>

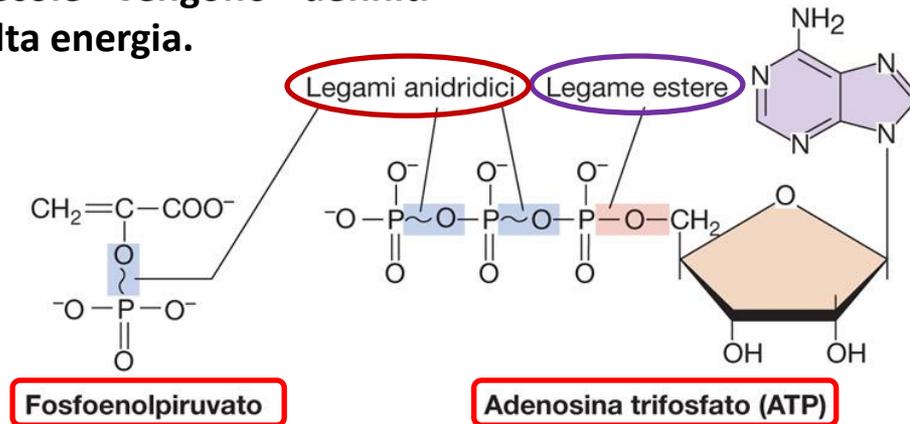


**La cellula possiede un numero limitato di molecole di coenzimi NAD<sup>+</sup>/NADH!!!**

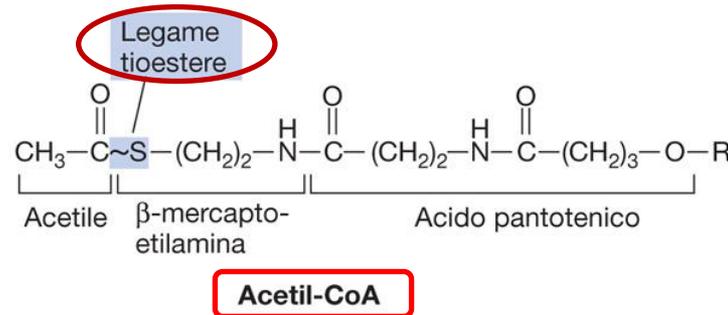
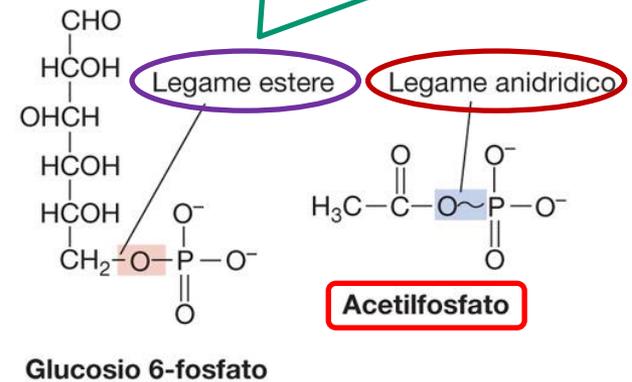
## COMPOSTI AD ALTA ENERGIA

L'energia chimica, liberata nel corso delle reazioni redox, viene convertita in **molecole ad alta energia**.

Alcuni legami di queste molecole vengono definiti ad alta energia.



Il legame estere non è un legame ad alta energia



Composto	G <sup>0'</sup> kJ/mole
<b>ΔG<sup>0'</sup> &gt; 30kJ</b>	
Fosfoenolpiruvato	-51,6
1,3-difosfoglicerato	-52,0
Acetilfosfato	-44,8
ATP	-31,8
ADP	-31,8
Acetil-CoA	-31
<b>ΔG<sup>0'</sup> &lt; 30kJ</b>	
AMP	-14,2
Glucosio 6-fosfato	-13,8

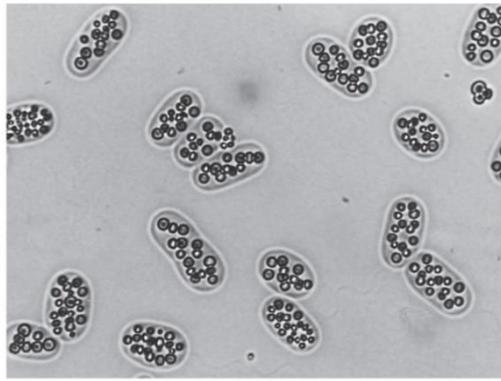
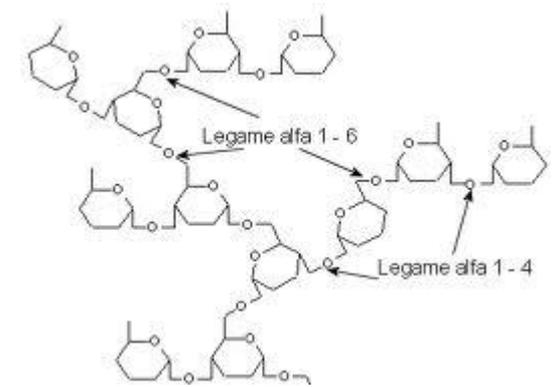
I derivati del coenzima A sono importanti per le richieste energetiche degli **anaerobi**.

L'idrolisi del legame tioestere è sufficiente per la sintesi di un legame fosfato ad alta energia.

Le molecole ad alta energia contengono legami con ΔG<sup>0'</sup>>-30 KJ/mole.

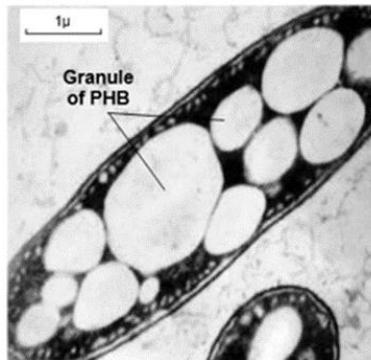
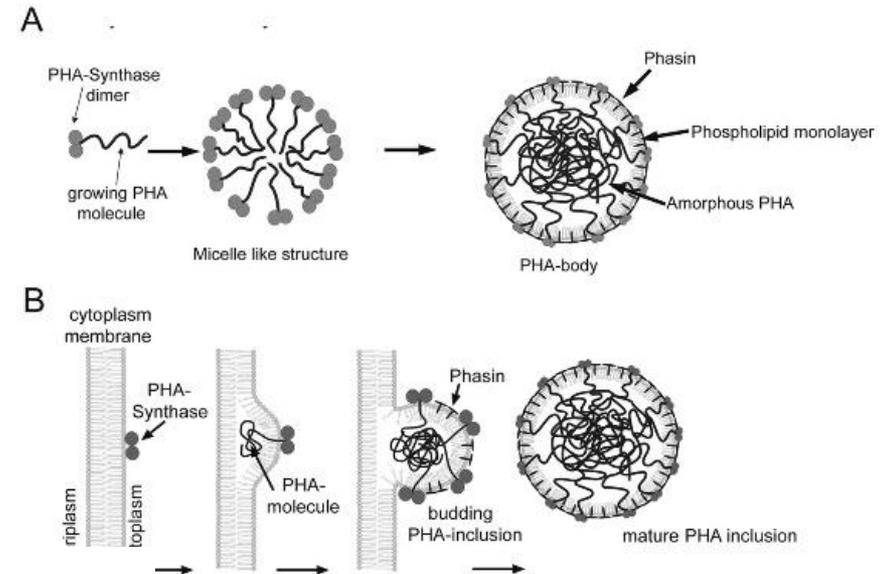
Nella cellula l'**ATP** è un'entità dinamica presente in basse concentrazioni (~2 mM)

Per la conservazione dell'energia a lungo termine i microrganismi sintetizzano **polimeri insolubili** (**glicogeno**, **poli-β-idrossibutirrato (PHB)**, **zolfo elementare**) che vengono accumulati sotto forma di **granuli**.

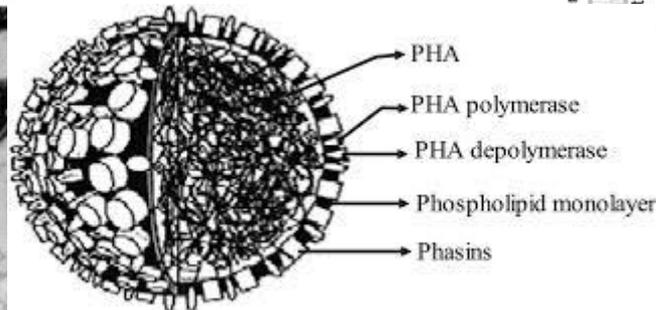


Norbert Pfennig

M.T. Madigan, J.M. Martinko Brock, *Biologia dei Microrganismi* Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana



(a)



(b)

Questi polimeri possono essere ossidati per produrre **ATP**.

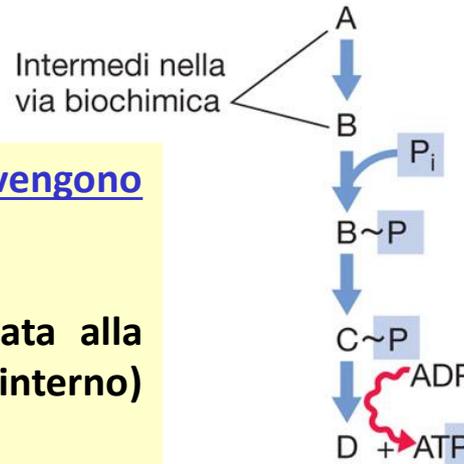
## Reazioni redox

## FERMENTAZIONE e RESPIRAZIONE

(due processi deputati alla conservazione dell'energia nei chemiorganotrofi).

Nella fermentazione non intervengono accettori finali di elettroni esterni.

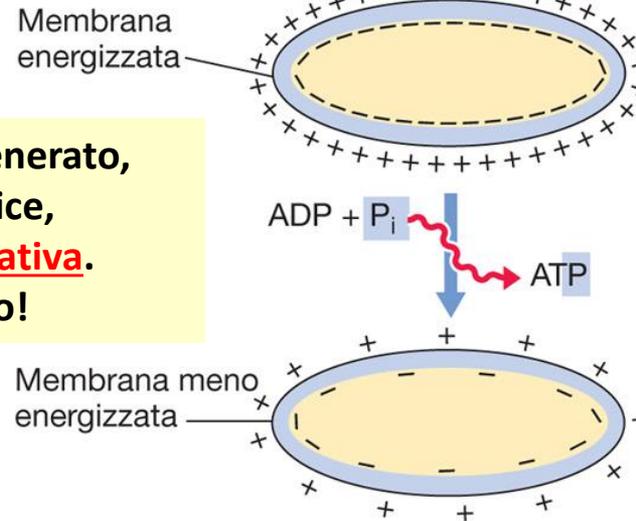
La reazione di ossidazione è accoppiata alla riduzione di un composto organico (interno) derivato dal donatore di elettroni.



Nella **fermentazione** la sintesi di ATP avviene mediante fosforilazione a livello del substrato.

**Non è coinvolta la catena di trasporto!**

(a) Fosforilazione a livello del substrato



(b) Fosforilazione ossidativa

Nella **respirazione** l'ATP viene generato, sfruttando la forza proton-motrice, mediante la fosforilazione ossidativa. È coinvolta la catena di trasporto!

Nei **fototrofi** l'ATP viene prodotto attraverso la fotofosforilazione: la **forza proton-motrice, generata dalla luce**, viene sfruttata per generare ATP.

# GLICOLISI (via di Embden-Meyerhof-Parnas)

## Glicolisi + Fermentazione processo, diviso in 3 stadi, che non richiede O<sub>2</sub>

### STADIO I: REAZIONI PREPARATORIE



### STADIO II: PRODUZIONE DI ATP E PIRUVATO

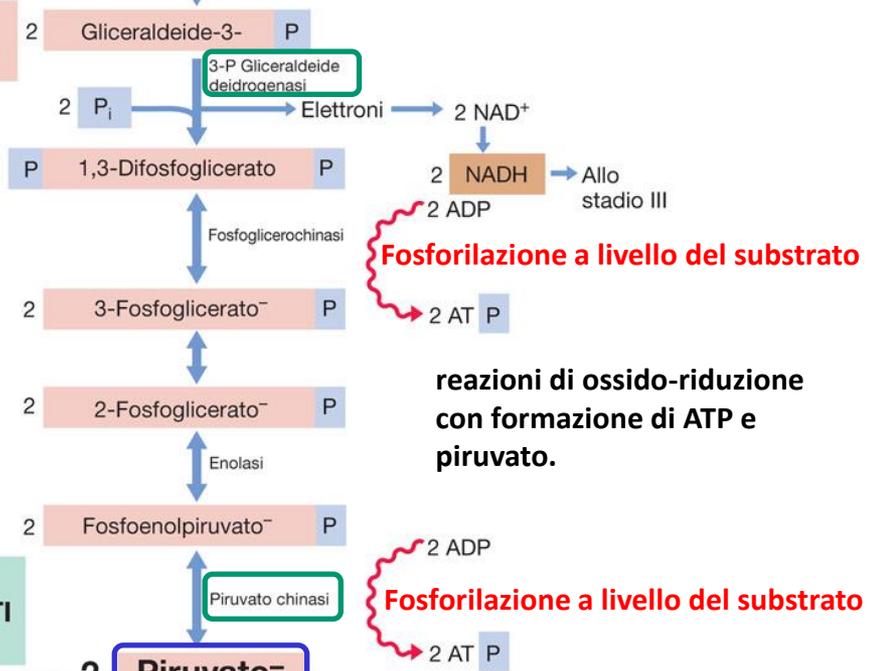
#### Quadri riassuntivi

**I. Consumo e generazione di ATP nella glicolisi**

Reazione	ATP (guadagno/perdite)	ATP netto
1. Glucosio → Glucosio-6-P	-1	-1
2. Fruttosio-6-P → Fruttosio-1,6, bisfosfato	-1	-2
3. 2 (1,3-Bisfosfoglicerato) → 2 (3-Fosfoglicerato)	+2	0
4. 2 (Fosfoenolpiruvato) → 2 Piruvato	+2	+2

**II. Sommario dell'energetica della glicolisi per lievito e batteri acido lattici**

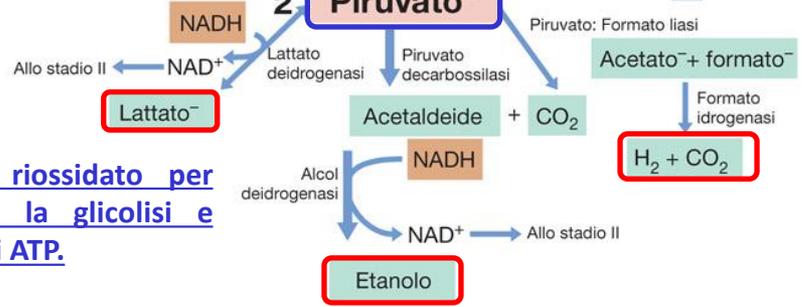
Esempi di stechiometrie globali:	Organismi:	Produzione di energia libera:
(1) Glucosio → 2 etanolo + 2 CO <sub>2</sub>	Lievito	1. Etanolo/CO <sub>2</sub> : -238,8 kJ/mole di glucosio fermentato. Vengono conservati circa 64 kJ come ATP, pari a un'efficienza del 27%.
(2) Glucosio → 2 lattato <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup>	Batteri acido lattici	2. Lattato: -196 kJ, pari a un'efficienza del 32%.



reazioni di ossido-riduzione con formazione di ATP e piruvato.

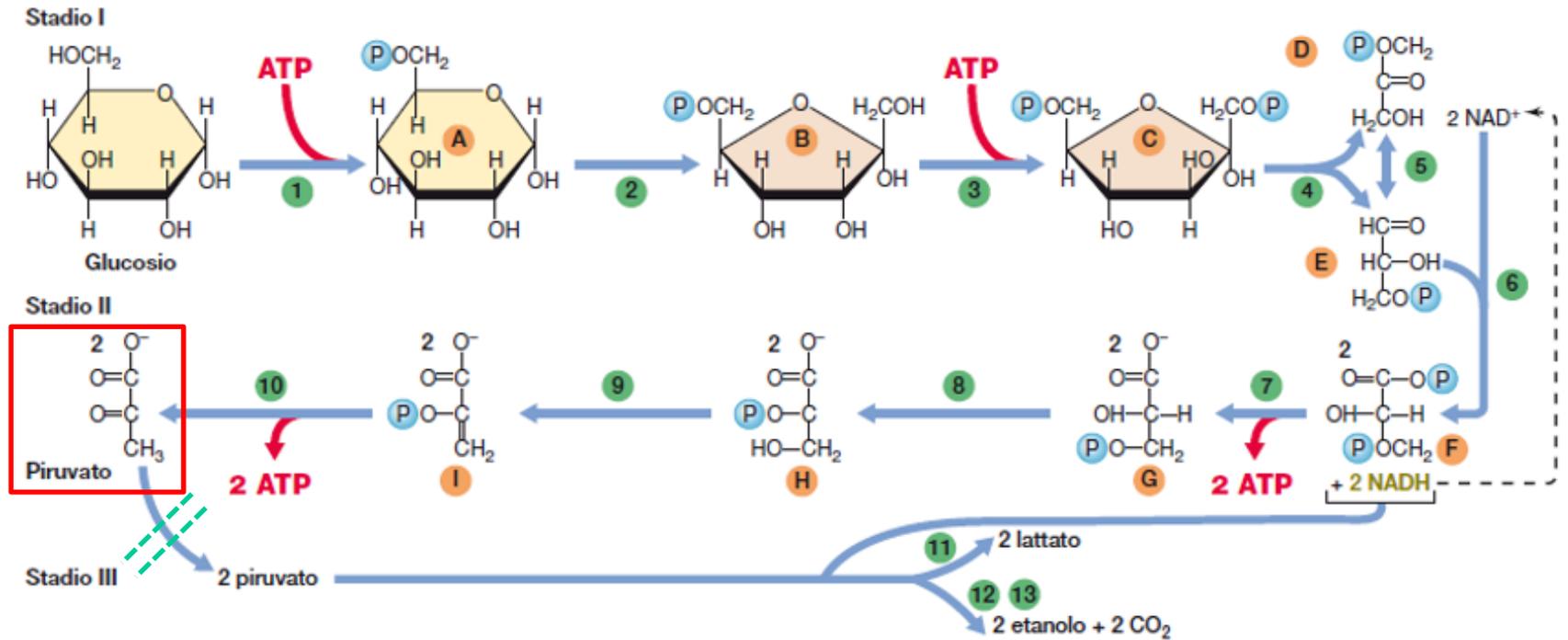
### STADIO III: PRODUZIONE DEI PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE

Reazioni di ossido-riduzione con formazione dei prodotti di fermentazione (contenenti ancora energia libera non sfruttata dalle cellule).

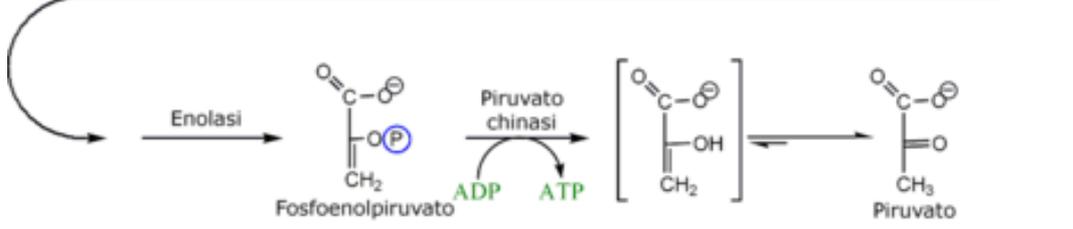
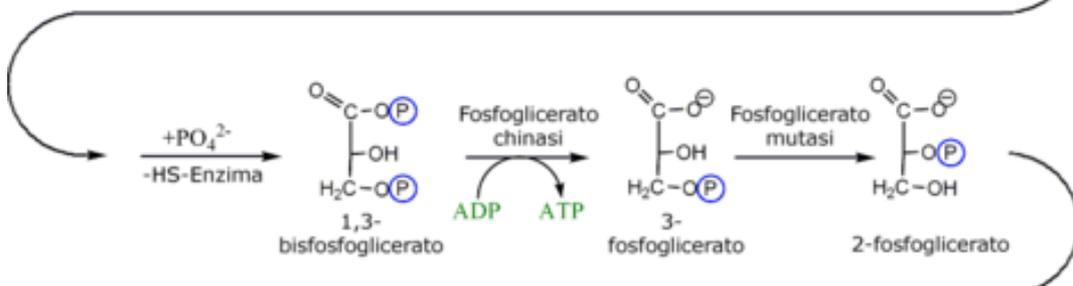
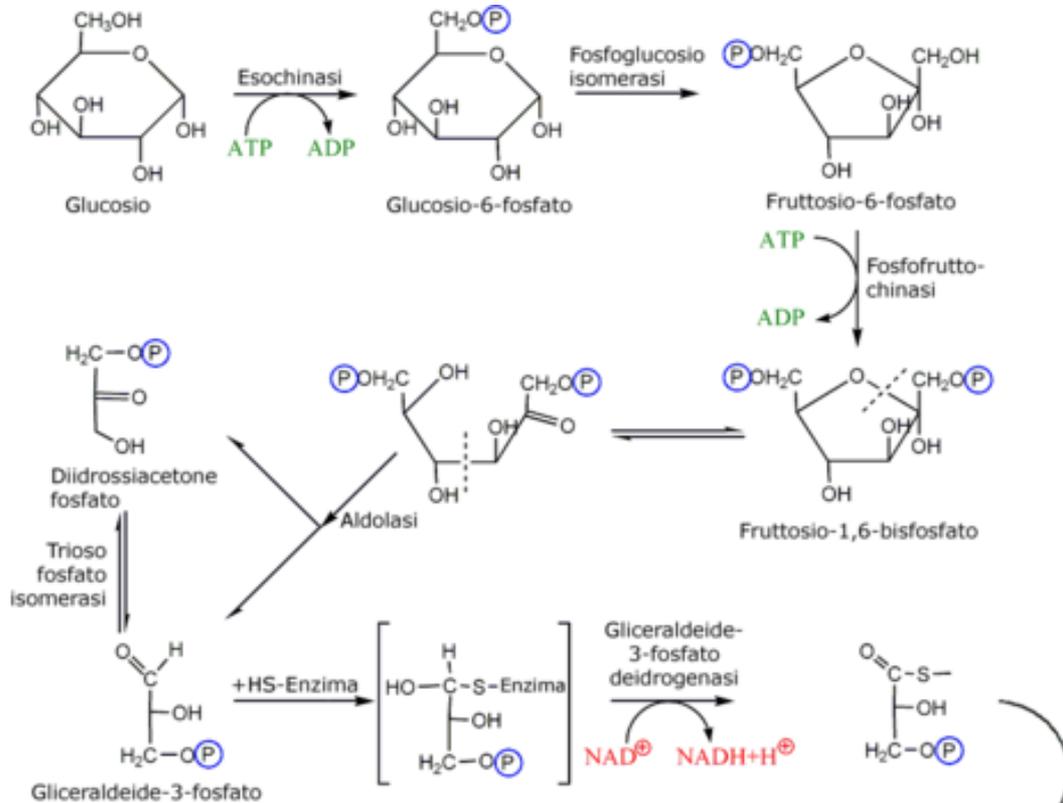


- Consumo di glucosio
- Sintesi di 2 ATP (netto)
- Prodotti di fermentazione (prodotti di scarto)

NADH deve essere riossidato per poter far procedere la glicolisi e consentire la sintesi di ATP.

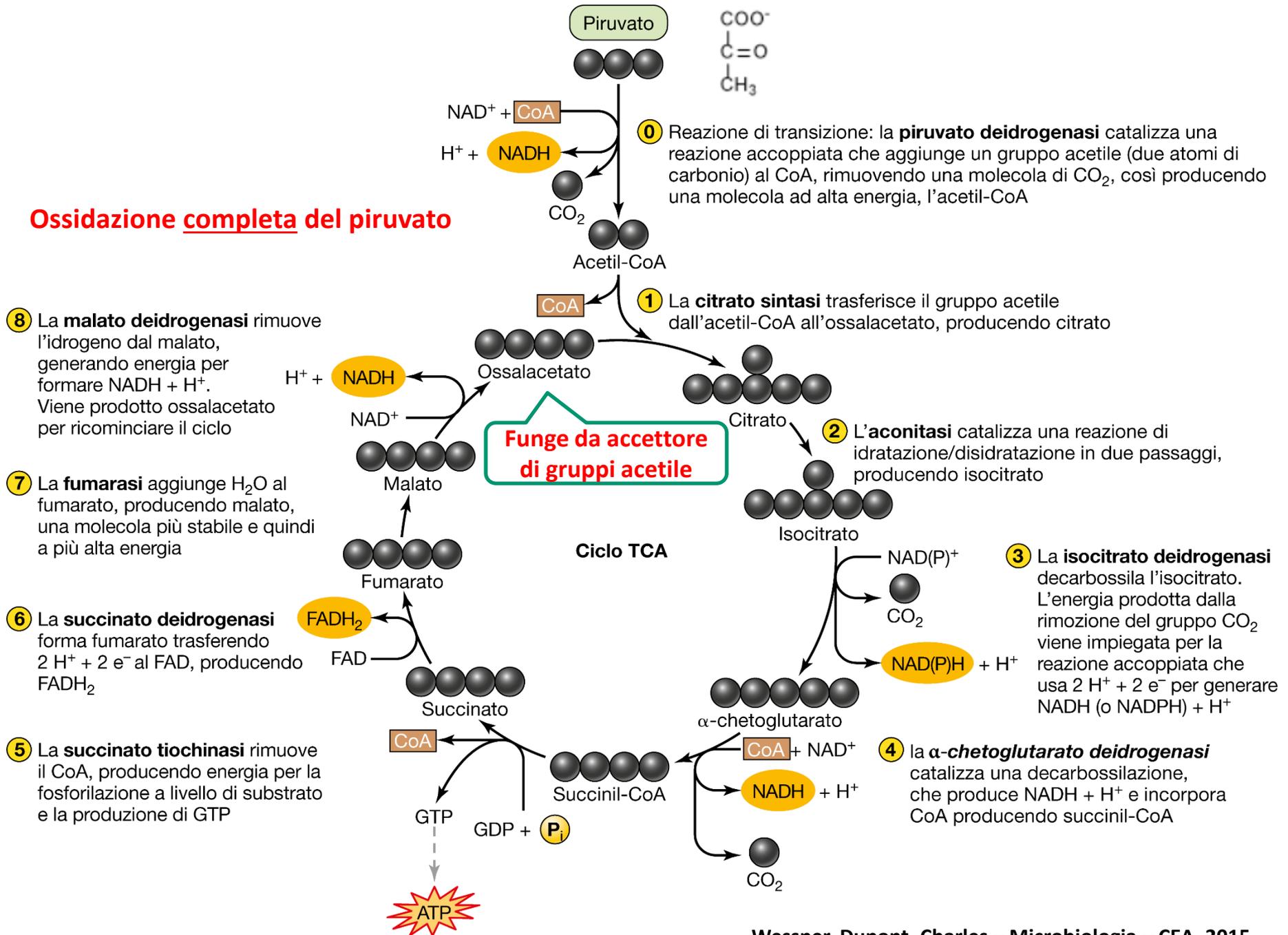


Intermedi		Enzimi	
A	Glucosio 6-P	1	Esochinasi
B	Fruttosio 6-P	2	Isomerasi
C	Fruttosio 1,6-P	3	Fosfofruttochinasi
D	Diidrossiacetone-P	4	Aldolasi
E	Gliceraldeide-3-P	5	Triosofosfato isomerasi
F	1,3-Difosfoglicerato	6	Gliceraldeide-3-P deidrogenasi
G	3-P-Glicerato	7	Fosfoglicero chinasi
H	2-P-Glicerato	8	Fosfoglicero mutasi
I	Fosfoenolpiruvato	9	Enolasi
Energetica		10	Piruvato chinasi
Lievito	Glucosio → 2 etanolo + 2 CO <sub>2</sub>	11	Lattato deidrogenasi
Batteri lattici	Glucosio → 2 lattato	12	Piruvato decarbossilasi
		13	Alcol deidrogenasi





## Ossidazione completa del piruvato



Alcune molecole C<sub>4</sub> (**malato, succinato, fumarato**) e C<sub>6</sub> (**citrato**), eventualmente disponibili nell'ambiente, possono entrare direttamente nel CAC come fonte di energia!

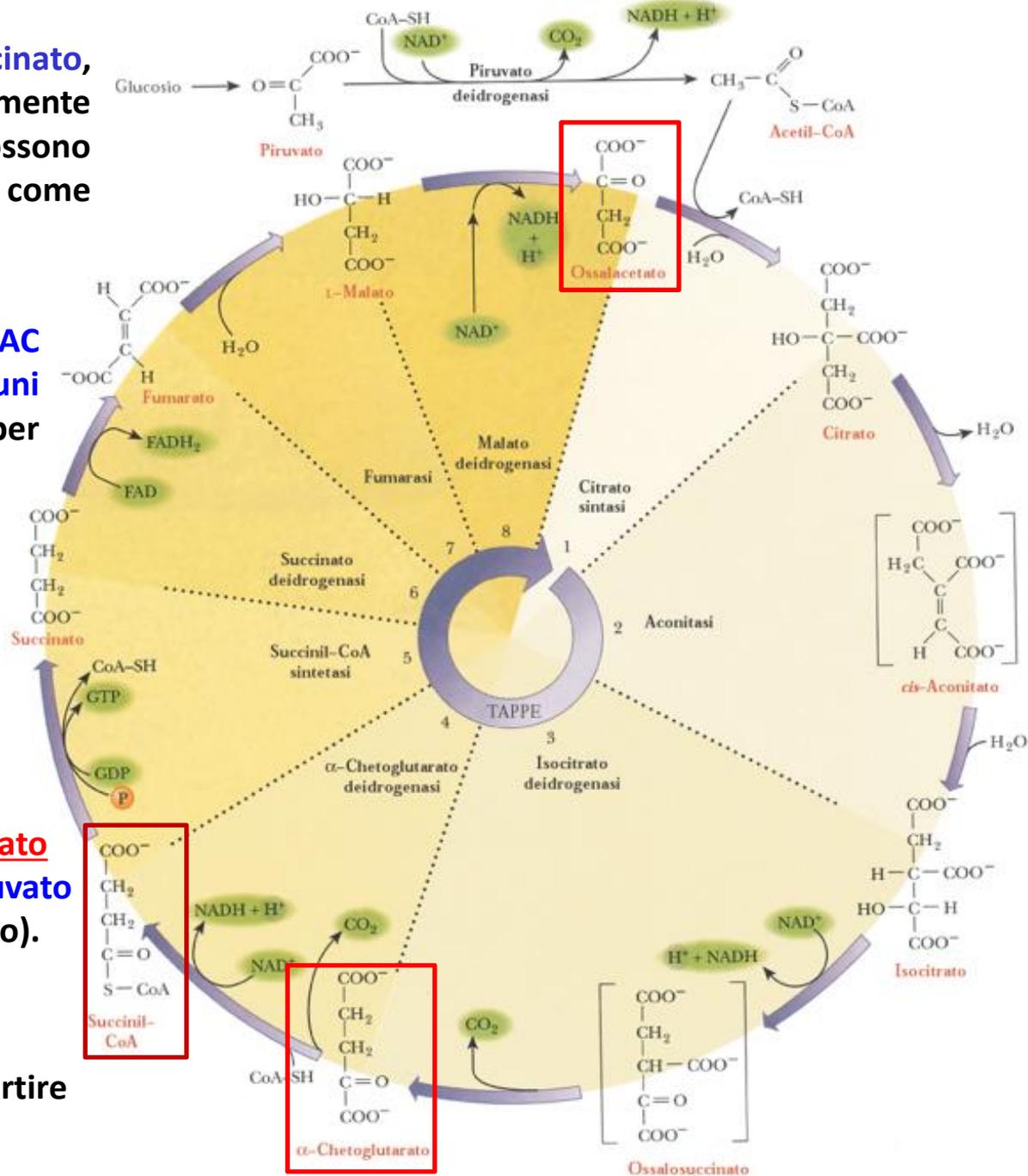
Oltre che per fini energetici, il CAC rifornisce la cellula di alcuni intermedi che vengono utilizzati per la sintesi di importanti metaboliti.

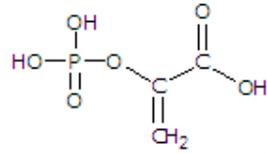
α-chetoglutarato e ossalacetato:  
sintesi alcuni aminoacidi.

Succinil~CoA:  
sintesi citocromi, clorofilla, tetrapirroli.

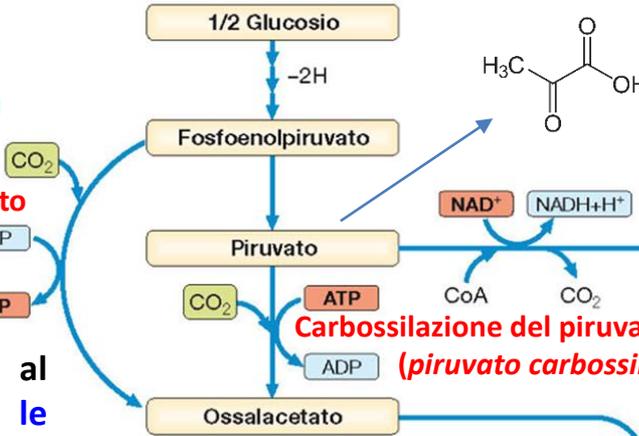
La decarbossilazione dell'ossalacetato consente di produrre **fosfoenolpiruvato** (precursore per la sintesi di glucosio).

Dall'acetato (acetil~CoA) può partire la biosintesi degli acidi grassi.





Carbossilazione del fosfoenolpiruvato  
(fosfoenolpiruvato carbossilasi)



Carbossilazione del piruvato  
(piruvato carbossilasi)

Dalla crescita su acetato o acidi grassi come donatori di e<sup>-</sup>

Il TCA (ciclo non chiuso) provvede anche al rifornimento di molecole essenziali per le biosintesi. Se l'ossalacetato viene utilizzato per la biosintesi di glucosio e precursori aminoacidici, esso deve essere rigenerato attraverso reazioni anaplerotiche (di riempimento):

- Carbossilazione del piruvato (aggiunta CO<sub>2</sub>)
- Carbossilazione fosfoenolpiruvato
- Ciclo del gliossilato

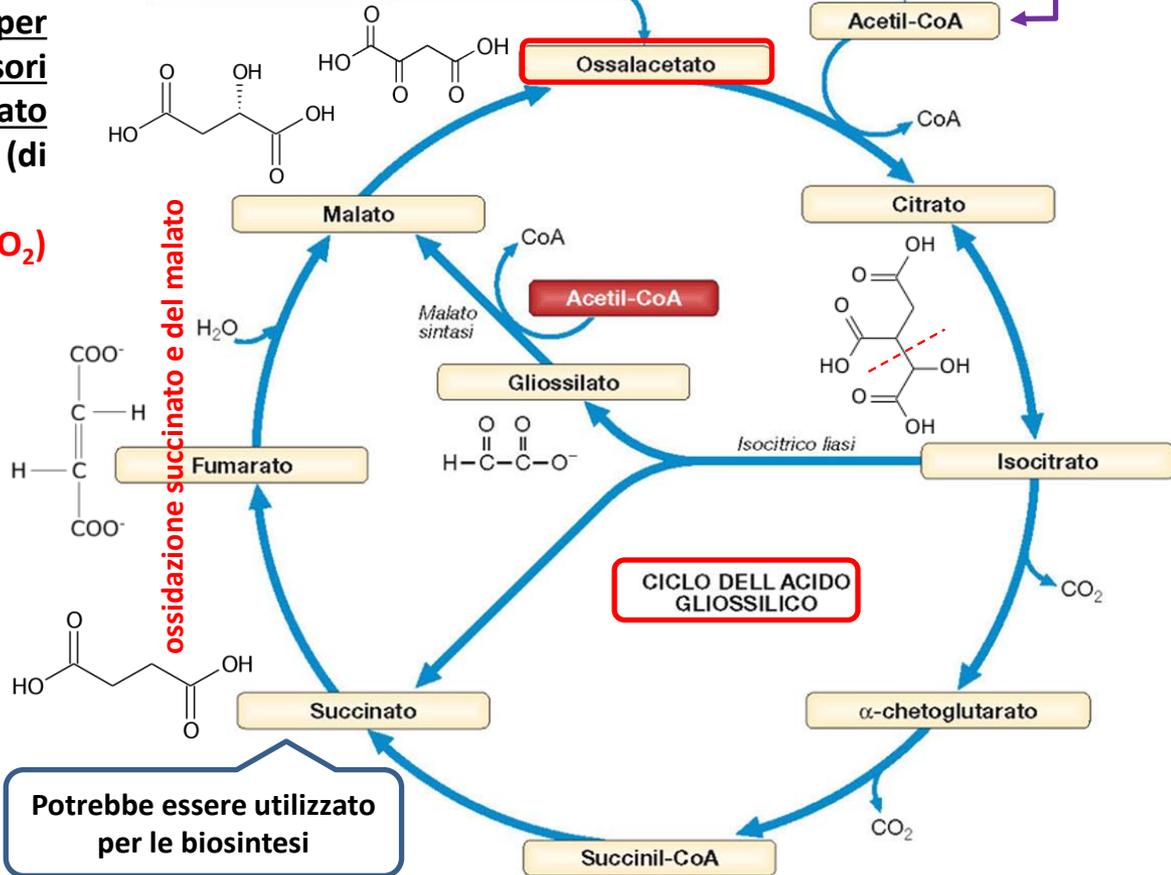


Per i microrganismi che crescono utilizzando acetato o acidi grassi, con produzione di acetil~CoA, non è possibile la formazione di ossalacetato se vengono prelevati intermedi del CAC.

Ne conseguirebbe il blocco del TCA!



Ripristino del TCA: ossidazione di succinato e malato (ciclo del gliossilato).



ossidazione succinato e del malato

CICLO DELL'ACIDO GLIOSSILICO

Potrebbe essere utilizzato per le biosintesi

# Glicolisi

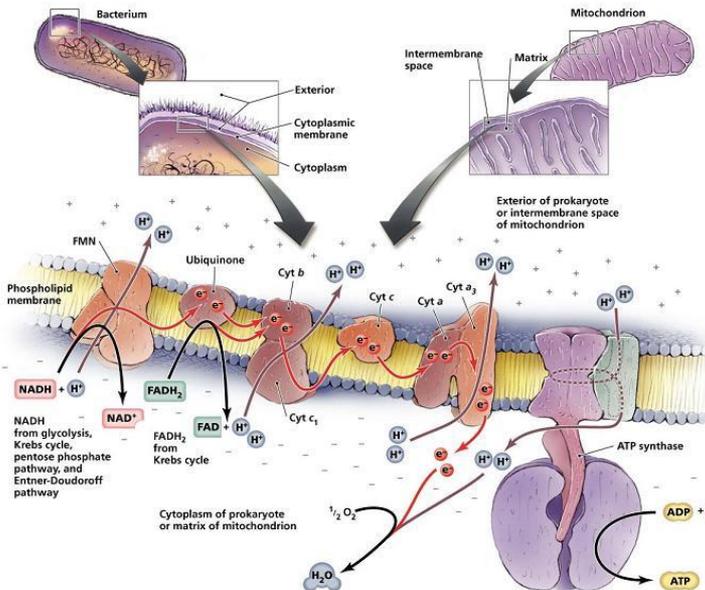
## Fermentazione

modesta quantità di energia

## Ciclo dell'acido citrico

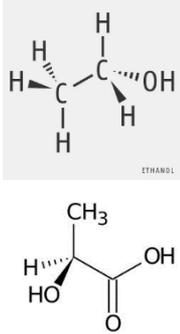
## Respirazione (aerobica o anaerobica)

In presenza di  $O_2$  (o accettori diversi da  $O_2$ ) il glucosio può essere ossidato completamente a  $CO_2$  con una maggiore resa energetica.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- Gli atomi di carbonio del glucosio sono solo parzialmente ossidati.
- La differenza dei potenziali di riduzione, tra donatori ed accettori finali di elettroni, è modesta (cfr. *torre redox*).



## Trasferimento degli elettroni!

Per il trasferimento degli elettroni all'accettore finale è necessaria la presenza di molecole trasportatrici associate alla membrana.

enzimi

- NADH-deidrogenasi*
- Flavoproteine*
- Proteine ferro-zolfo*
- Citocromi*
- Chinoni (molecole non proteiche)*

## NADH deidrogenasi

- enzimi legati al lato interno della membrana citoplasmatica.
- Legano NADH.
- Accettano:  $2 e^-$  ed  $1 H^+$  dal NADH (liberano  $NAD^+$ ).

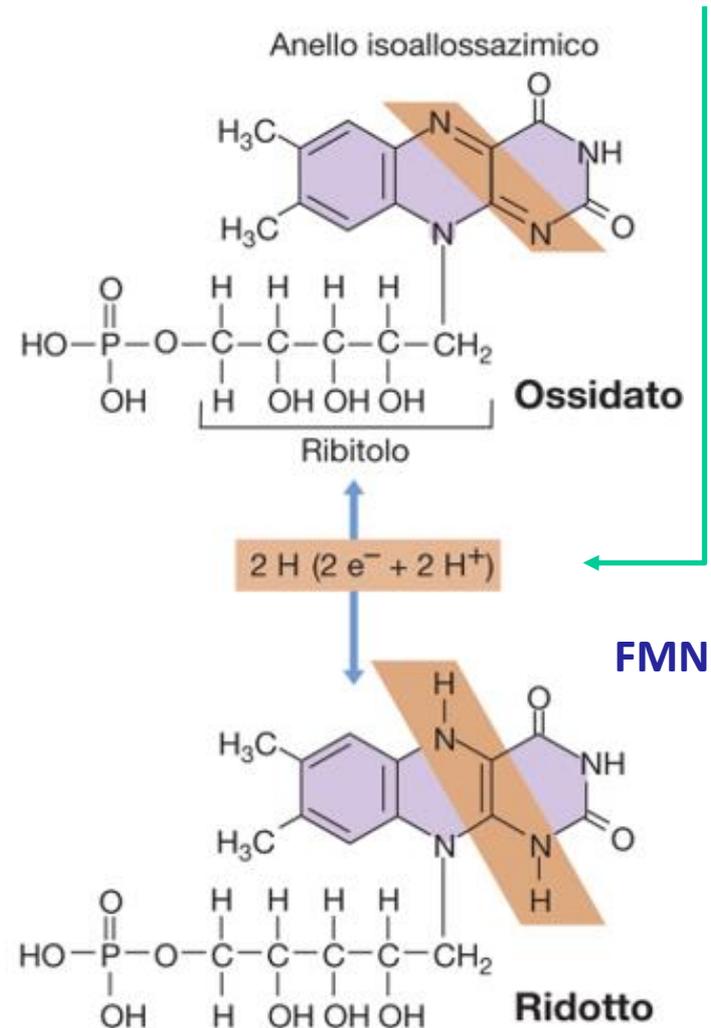
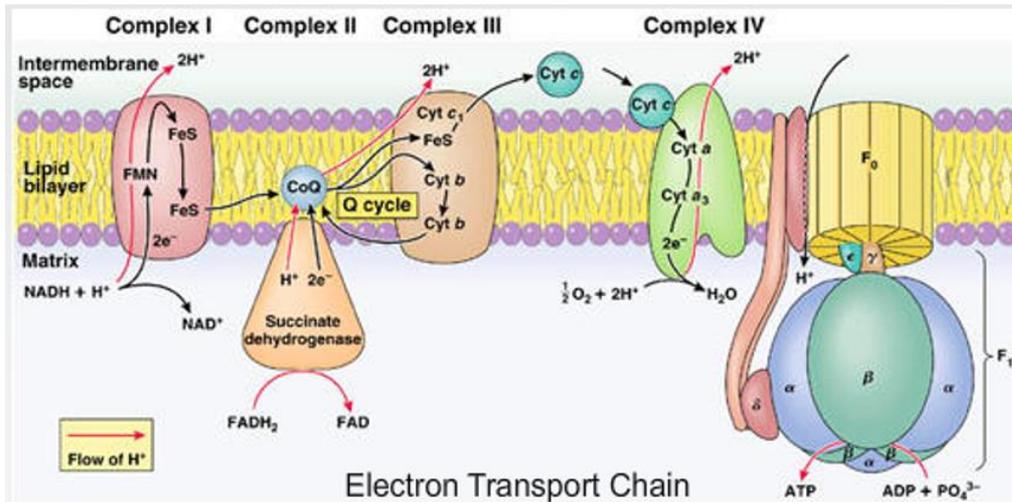
# Flavoproteine

**FMN** (flavin mononucleotide)  
**FAD** (flavin adenin dinucleotide)

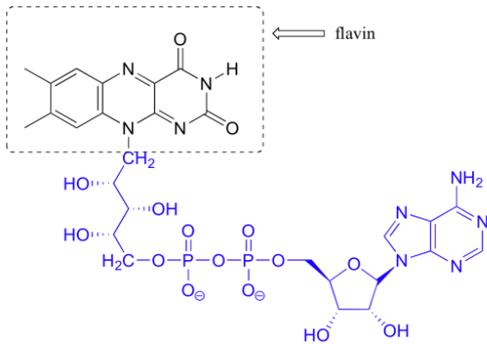
} contengono un **gruppo prostetico** derivato della riboflavina (vit. B<sub>2</sub>).

Le flavoproteine **accettano 2 e<sup>-</sup> + 2 H<sup>+</sup>**  
 (2 e<sup>-</sup> + 1 H<sup>+</sup> dall'NADH-deidrogenasi ed 1 H<sup>+</sup> dal citoplasma).  
**Cedono 2 e<sup>-</sup> agli altri complessi** e rilasciano 2 H<sup>+</sup>.

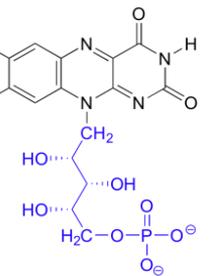
Il **gruppo prostetico** (parte flavinica) si ossida e si riduce alternativamente.



Stesso sito di ossido-riduzione, sia per **FAD** che **FMN**



flavin adenine dinucleotide (FAD)



flavin mononucleotide (FMN)

## Proteine ferro-zolfo non-eme

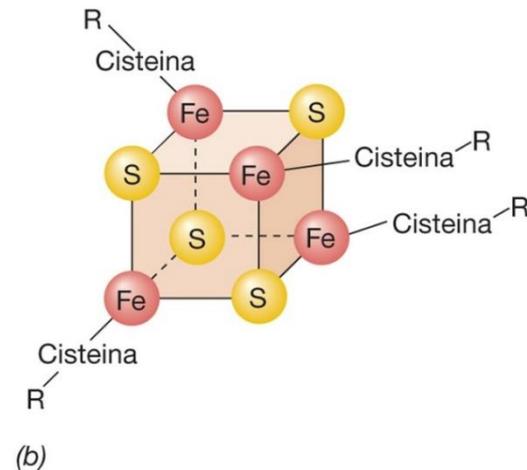
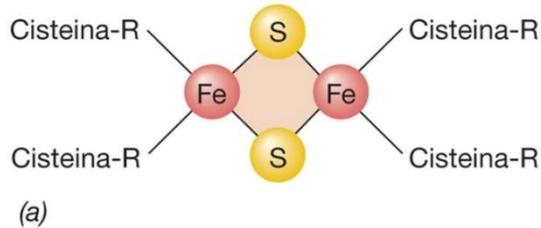
Proteine, con **gruppi prostetici** contenenti atomi di **ferro** e **zolfo**, presenti nella catene di trasporto degli elettroni.

**Trasportano solo e<sup>-</sup>!**  
(come i citocromi)

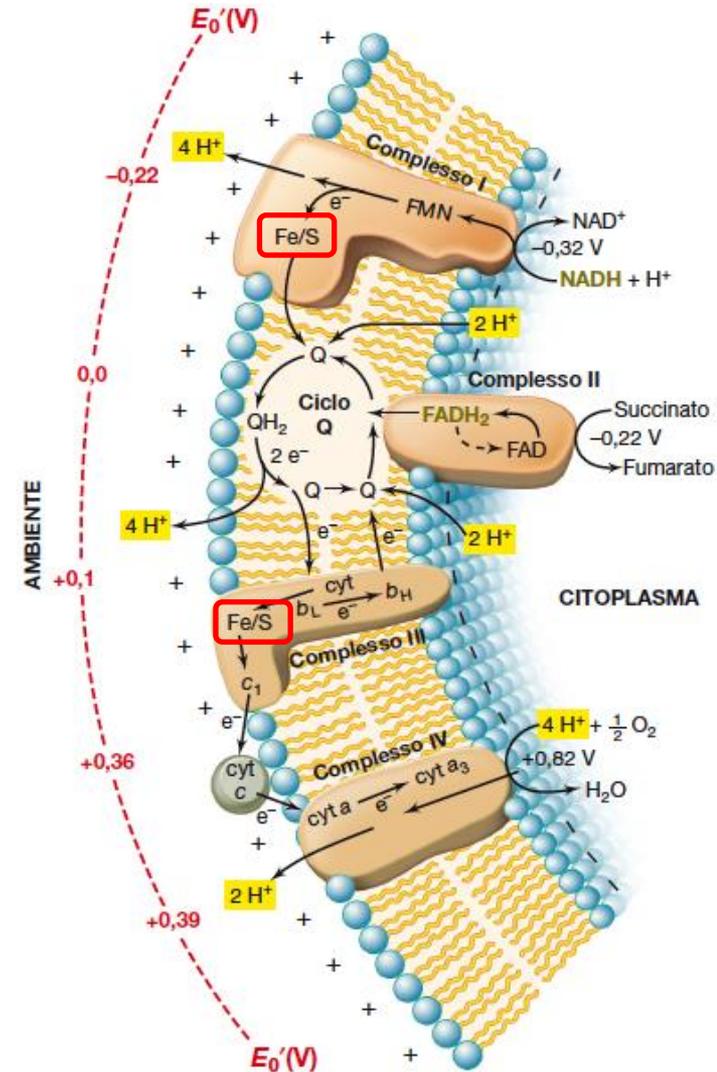
Gruppi prostetici più frequenti nelle proteine Fe/S

**Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>**, **Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>**, **Fe<sub>8</sub>S<sub>8</sub>**,

es. ferrodossina



Esistono diverse classi di proteine ferro-zolfo non-eme con **diversi potenziali di riduzione**.



**Citocromi** → proteine con anelli porfirinici (**gruppi prostetici tipo eme**) contenenti Fe.

Le reazioni di ossido-riduzione a carico dei citocromi coinvolgono **un solo e<sup>-</sup>** (come le Fe/S)!

Il ferro può trovarsi nella forma ridotta (Fe<sup>2+</sup>) o ossidata (Fe<sup>3+</sup>):  
**Citocromo-Fe<sub>2</sub><sup>+</sup> ↔ Citocromo-Fe<sub>3</sub><sup>+</sup> + e<sup>-</sup>**

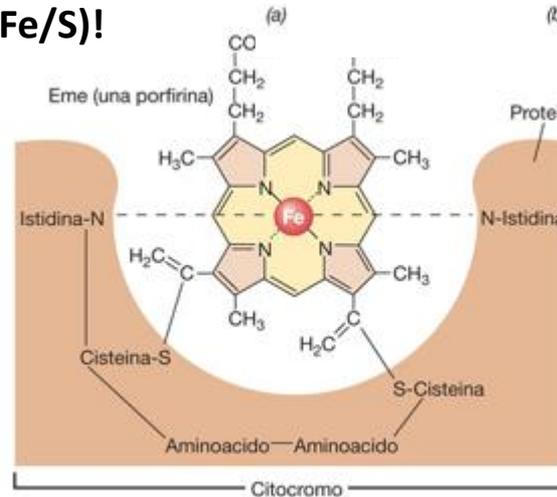
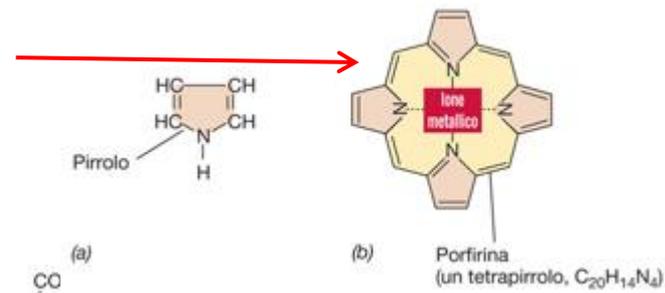
A seconda del tipo di eme, si distinguono varie classi di citocromi con **potenziali di riduzione diversi**:

- Cyt b
- Cyt c
- Cyt a

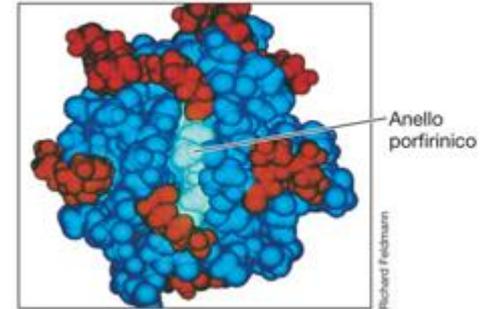
Nell'ambito della stessa classe si possono distinguere citocromi diversi:  
**Cyt a<sub>1</sub>, Cyt a<sub>2</sub>, Cyt a<sub>3</sub>, ...**

In alcuni casi i citocromi si aggregano, formando **complessi compatti**:

**Cyt bc<sub>1</sub>, aa<sub>3</sub>, ...**

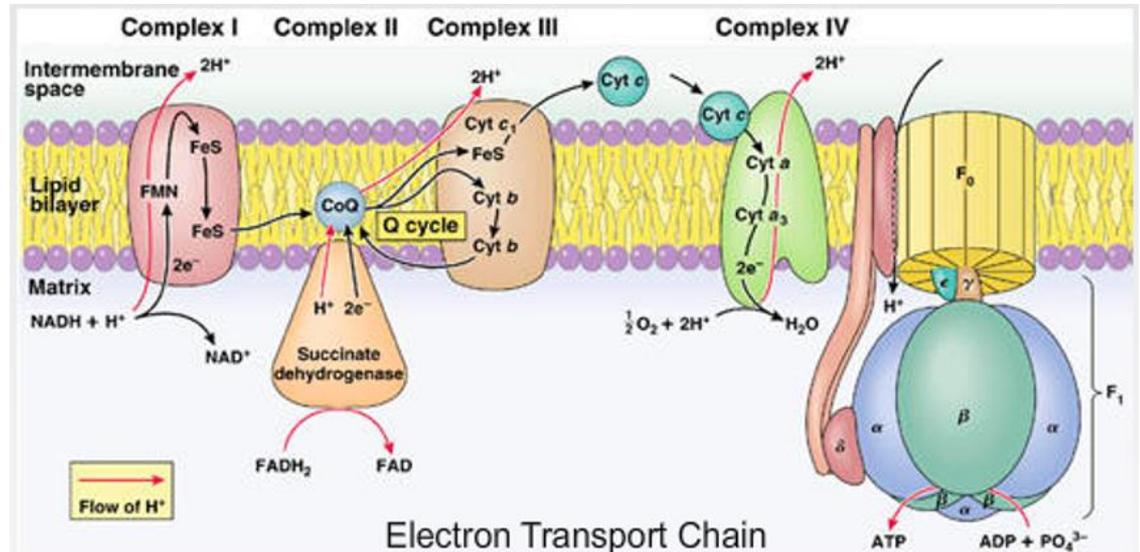


### Struttura del citocromo



Brock, Biologia dei Microorganismi

### I citocromi trasportano solo e<sup>-</sup>!



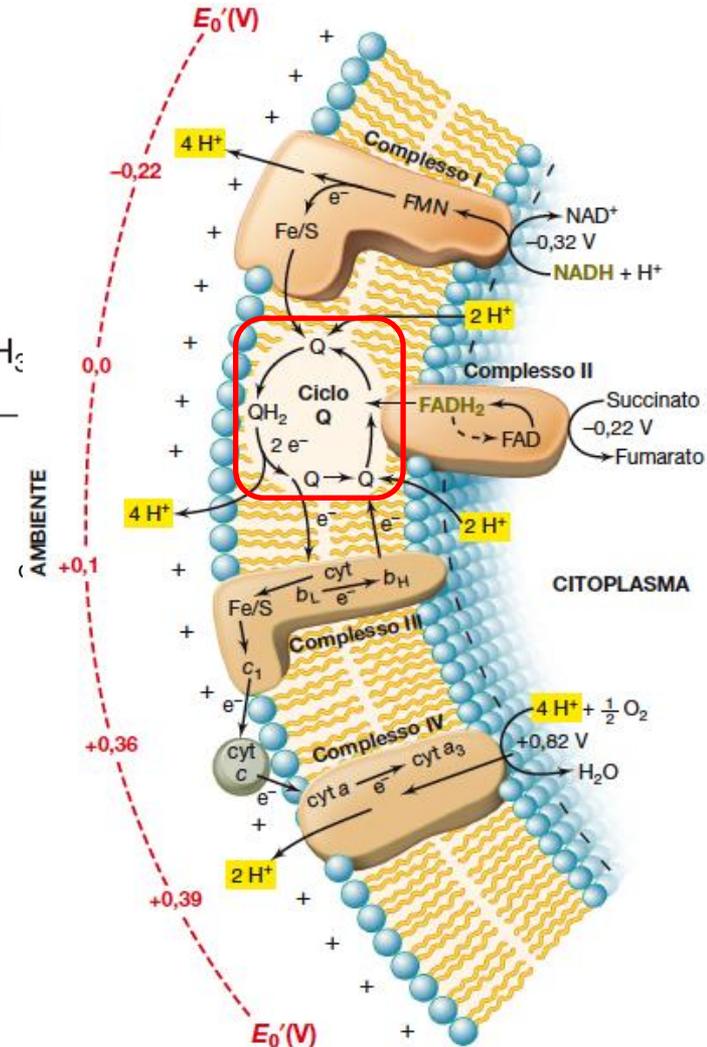
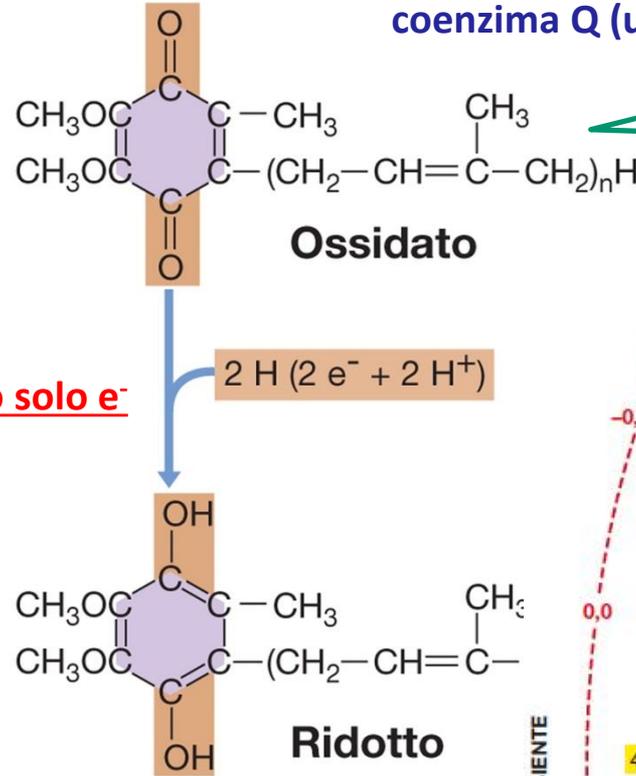
**Chinoni** → piccole molecole idrofobiche, non proteiche, che entrano a far parte della catena di trasporto degli elettroni.

- Ubichinone (coenzima Q)
- Metachinone
- Menachinone
- ...

I chinoni accettano  $2 e^- + 2 H^+$   
e cedono al trasportatore successivo solo  $e^-$   
 (come le flavoproteine).

Poiché per la riduzione dei chinoni servono  $e^-$  ed  $H^+$ , i protoni sono recuperati dal citoplasma.

Struttura  
 coenzima Q (ubichinone)

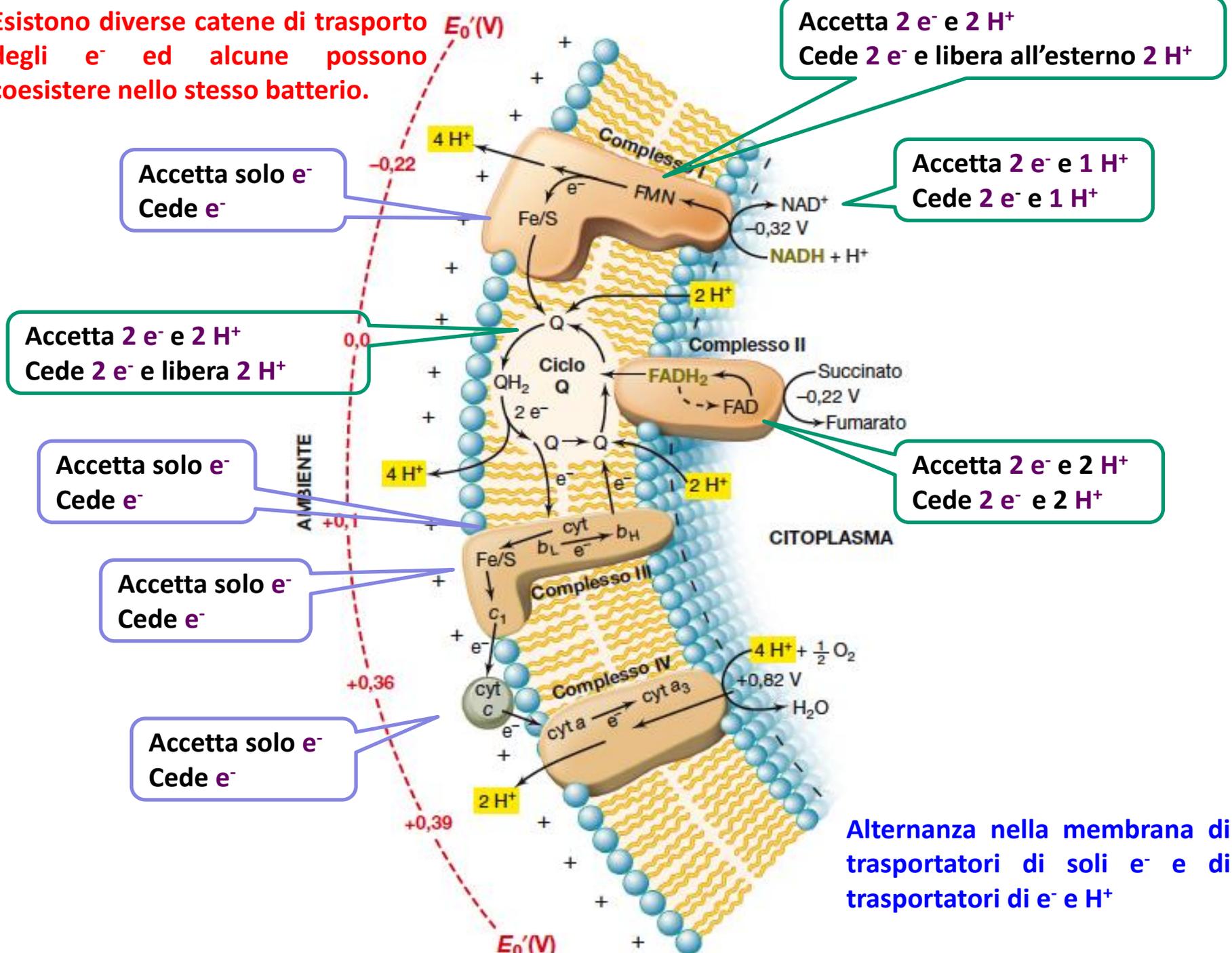


M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, Biologia dei Microrganismi

trasportatore	accetta	Cede
<i>NAD(P)</i>	$2 e^- + 1 H^+$	$2 e^- + 1 H^+$
<i>FAD</i>	$2 e^- + 2 H^+$	$2 e^- + 2 H^+$
<i>Flavoproteine (FMN, FAD)</i>	$2 e^- + 2 H^+$	$2 e^- (+ 2 H^+)$
<i>Proteine ferro-zolfo</i>	$e^-$	$e^-$
<i>Citocromi</i>	$1 e^-$	$1 e^-$
<i>Chinoni</i>	$2 e^- + 2 H^+$	$2 e^- (+ 2 H^+)$

Esistono diverse catene di trasporto degli  $e^-$  ed alcune possono coesistere nello stesso batterio.



Alternanza nella membrana di trasportatori di soli  $e^-$  e di trasportatori di  $e^-$  e  $H^+$

## Componenti delle catena di trasporto degli elettroni con relativi $E_0'$ .

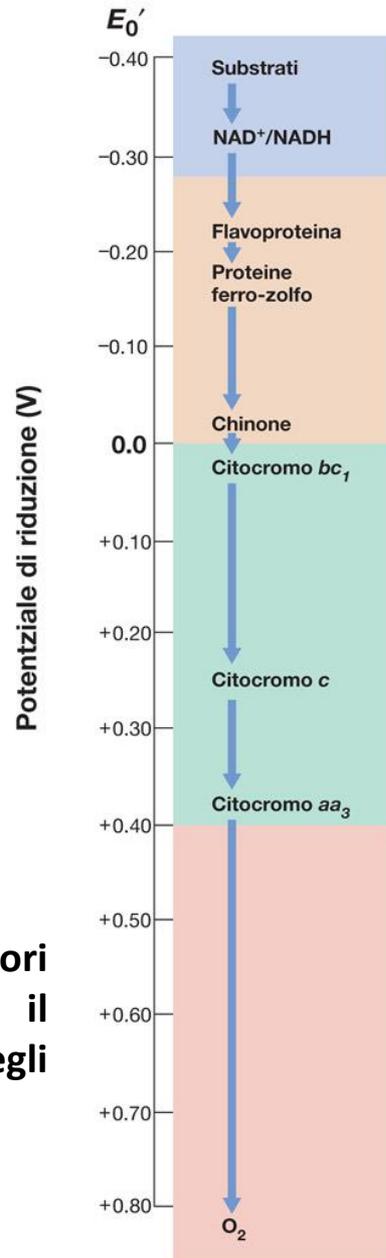
Sequenza tipica dei **mitocondri** e di **alcuni batteri** (*Paracoccus denitrificans*).

Durante il trasporto degli elettroni si creano le basi per la produzione di ATP (fosforilazione ossidativa)



E' possibile la conservazione dell'energia mediante la formazione della **FORZA PROTON-MOTRICE** che porta alla sintesi dell'ATP (teoria della chemiosmosi).

All'interno della membrana i trasportatori sono orientati in modo che durante il trasporto avvenga la separazione degli elettroni dai protoni.



I protoni vengono pompati sul lato esterno della membrana citoplasmatica (o nel periplasma).



Generazione di un **gradiente di pH** e un **potenziale elettrochimico ( $\Delta\mu H^+$ )** attraverso la membrana.

L'interno del citoplasma è elettricamente negativo e l'esterno della membrana è elettricamente positivo ed acido.

Il gradiente di pH ed il potenziale elettrochimico, che contribuiscono alla FPM, sono alla base dell'**energizzazione della membrana**.

Nella respirazione aerobica, al termine della catena di trasporto, gli elettroni vengono trasferiti all'**accettore finale (O<sub>2</sub>)** con formazione di **H<sub>2</sub>O**.

## Generazione delle forza proton-motrice

NADH cede  $2 e^- + H^+$  a FMN con  $E_0'(V)$  formazione di FMNH<sub>2</sub>.

Gli H<sup>+</sup> vengono pompati all'esterno quando FMNH<sub>2</sub> cede 2 e<sup>-</sup> ad una ferro-proteina non eme (Fe/S).

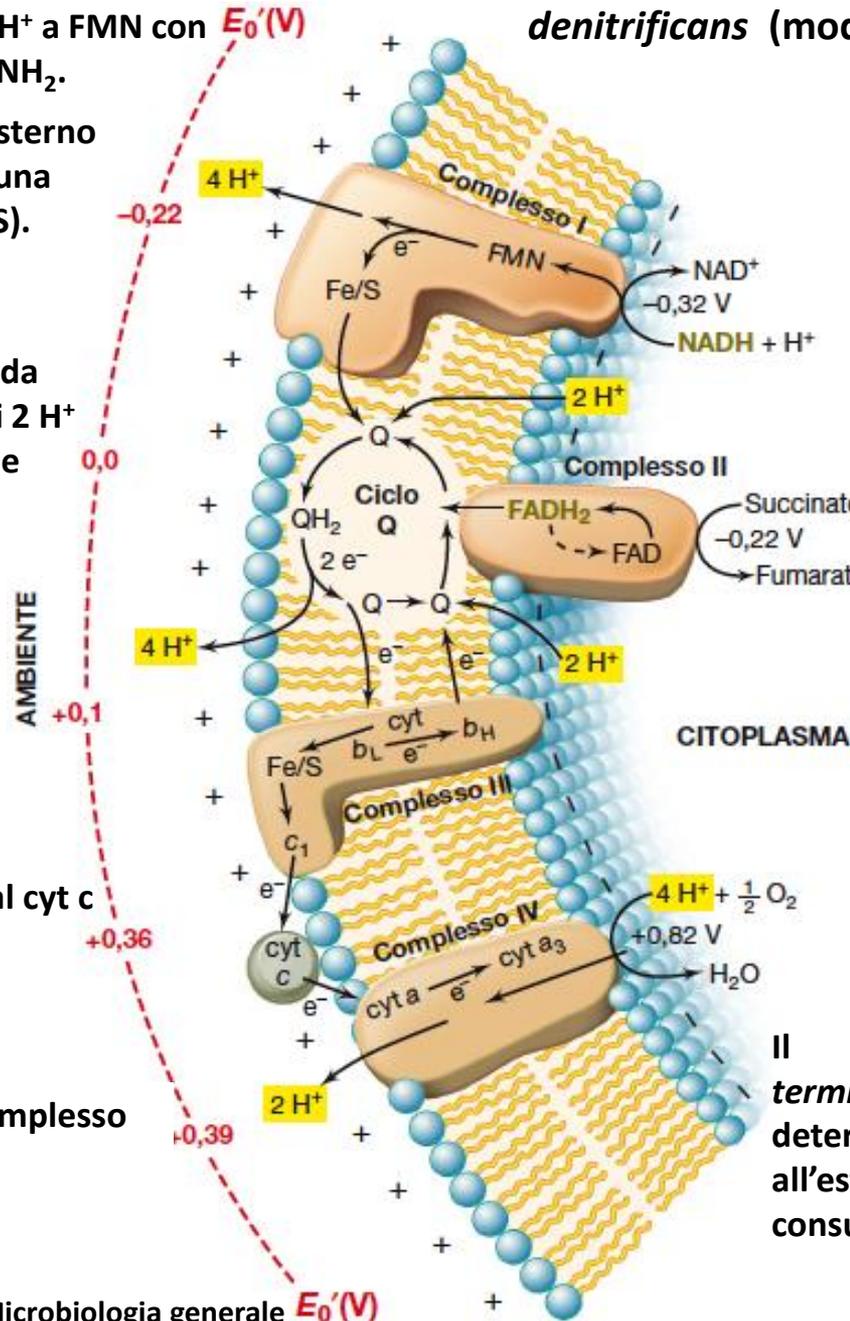
Con la riduzione del coenzima Q da parte di Fe/S vengono recuperati 2 H<sup>+</sup> dal citoplasma dalla dissociazione dell'H<sub>2</sub>O.

Il coenzima Q ridotto cede gli e<sup>-</sup>, uno alla volta, al complesso III (complesso bc<sub>1</sub>). Il complesso III comprende i citocromi b e c<sub>1</sub>, separati da una Fe/S.

Il complesso bc<sub>1</sub> trasferisce e<sup>-</sup> al cyt c periplasmatico.

Gli e<sup>-</sup> dal cyt c passano al complesso IV (citocromi aa<sub>3</sub>).

## Catena di trasporto in *Paracoccus denitrificans* (modello nei procarioti)



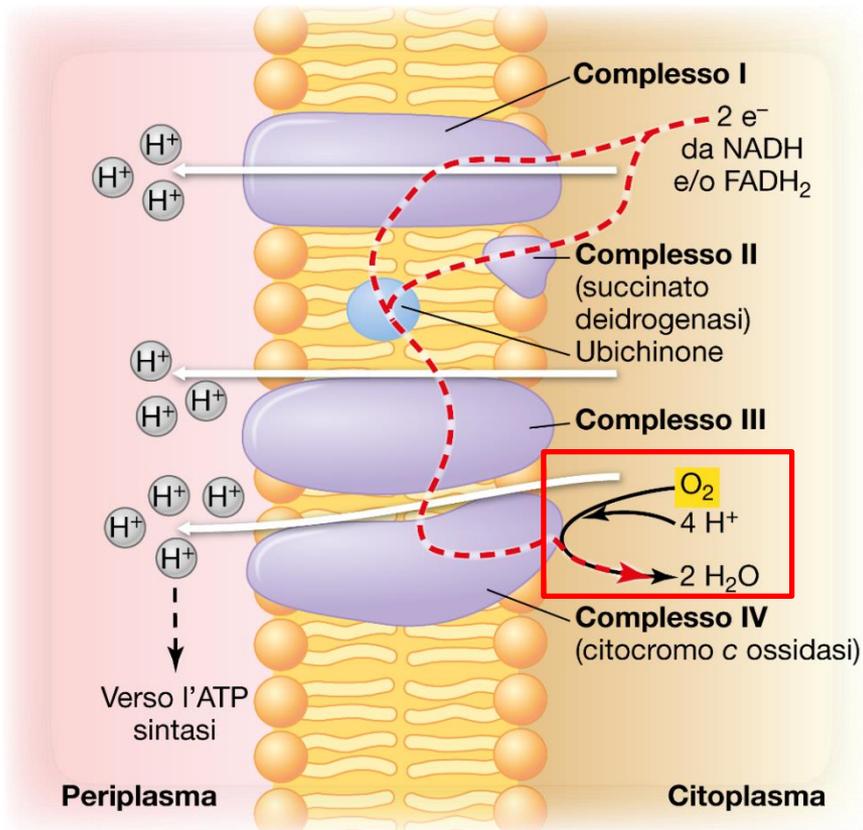
Attraverso la coppia **FAD/FADH<sub>2</sub>**, il complesso II fornisce 2 e<sup>-</sup> e 2 H<sup>+</sup> al pool dei chinoni.

Il complesso IV (*ossidasi terminale*) riduce O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O e determina il passaggio di 2 H<sup>+</sup> all'esterno per ogni 2 e<sup>-</sup> consumati.

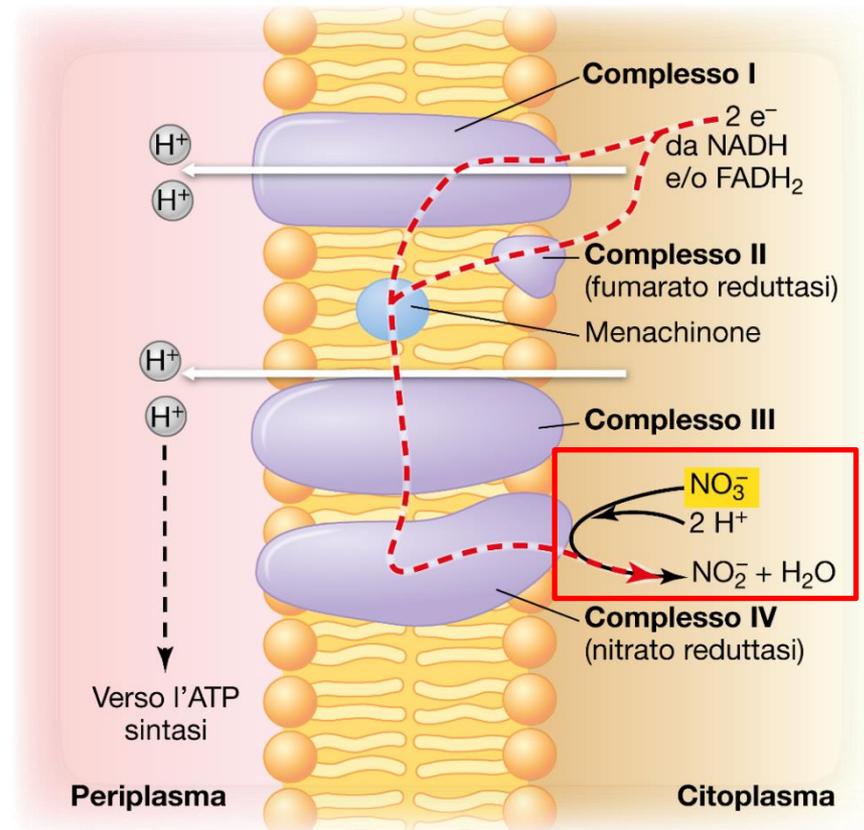
## *E. coli* può effettuare

- respirazione aerobica
- respirazione anaerobica
- fermentazione

### confronto tra respirazione aerobica e anaerobica



A. Sistema aerobico di trasporto degli elettroni di *E. coli*



B. Sistema anaerobico di trasporto degli elettroni di *E. coli*

## ATPasi → sintesi ATP

Un grande complesso enzimatico di membrana (**ATP sintasi** o **ATPasi**) converte la forza proton-motrice in ATP.



Il passaggio dei protoni, attraverso il canale formato da  $F_0$ , provoca una rotazione delle **proteine c** (8-15), generando una torsione che, attraverso le subunità  $\epsilon\gamma$ , viene trasmessa a  $F_1$ . Il cambiamento di conformazione di  $\beta$  permette di legare  $\text{ADP} + \text{P}_i$ ; il ritorno alla conformazione originale consente di formare ATP.

Le subunità  $b_2\delta$  fungono da statore, impedendo alle subunità  $\alpha\beta$  di ruotare assieme alle subunità  $\epsilon\gamma$ .

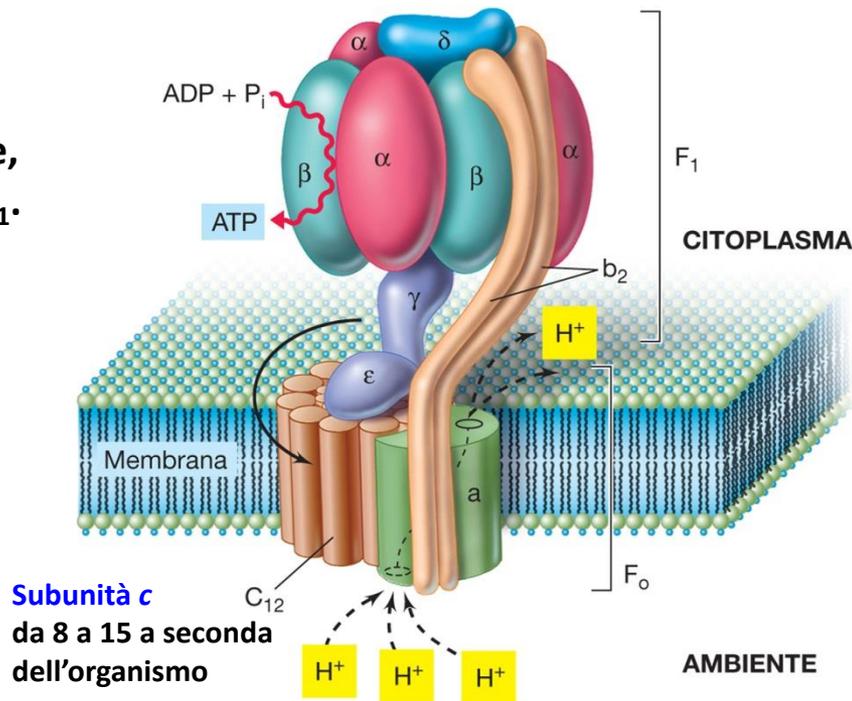
Nei sistemi respiratori la sintesi di ATP, mediata dall'ATPasi, viene definita **FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA** (**fotofosforilazione** nei fototrofi).



*E. coli*

$F_1 \rightarrow \alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$  cinque polipeptidi

$F_0 \rightarrow ab_2c_{12}$  tre polipeptidi



M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, Biologia dei Microrganismi

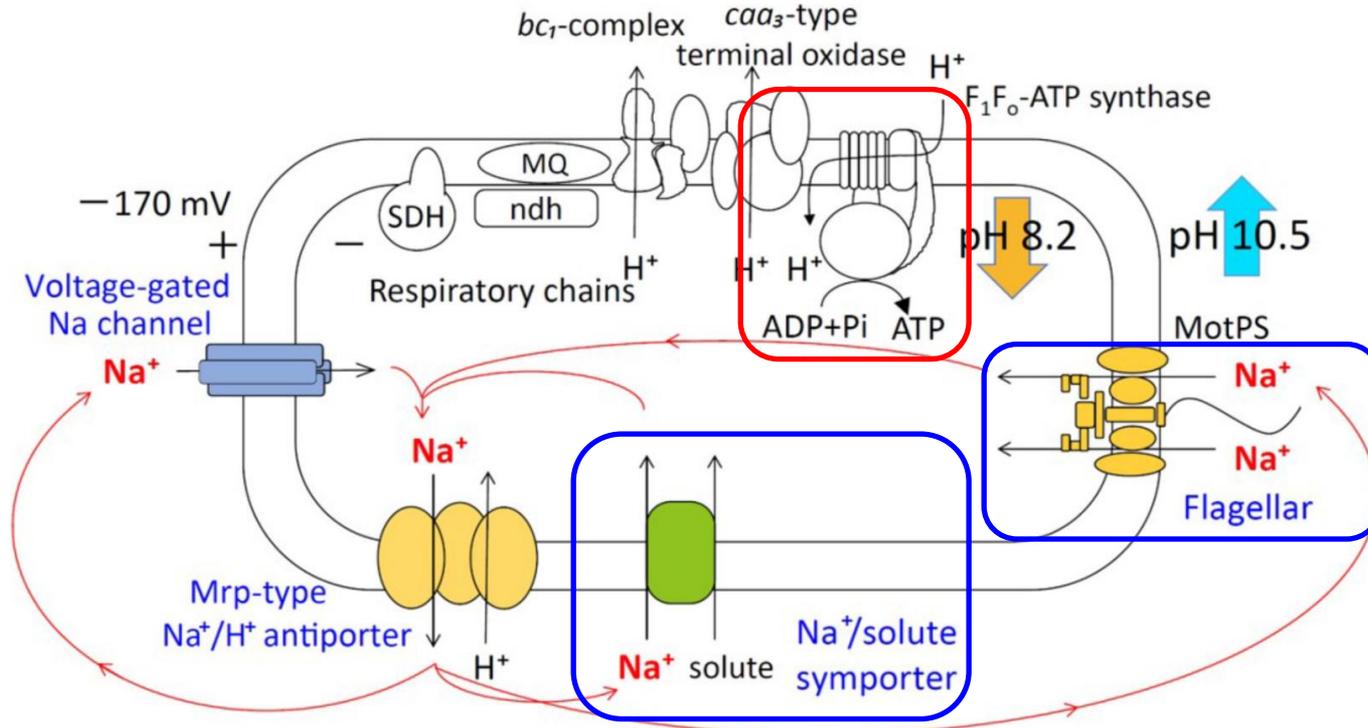
Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

**L'attività biologica dell'ATPasi è reversibile** (i batteri fermentanti stretti, privi di catena di trasporto, ma contenenti ATPasi, possono generare forza proton-motrice).

- Rotazione flagelli
- Trasporti

Alcuni batteri, sia *Bacteria* che *Archaea*, in ambienti alcalini, possiedono **ATPasi** legate ad un gradiente di sodio (**forza sodio-motrice**). Lo stesso gradiente viene sfruttato anche per alimentare i trasporti e per ruotare i flagelli.

*Bacillus firmus* (basofilo), tuttavia, pur sfruttando la forza sodio-motrice per i trasporti e per il movimento flagellare, utilizza la forza proton-motrice per sintetizzare ATP.



Akahashi et al. (2018). Hydrophobic Small Protein, BpOF4\_01690, Is Critical for Alkaliphily of Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Frontiers in Microbiology*, 9.

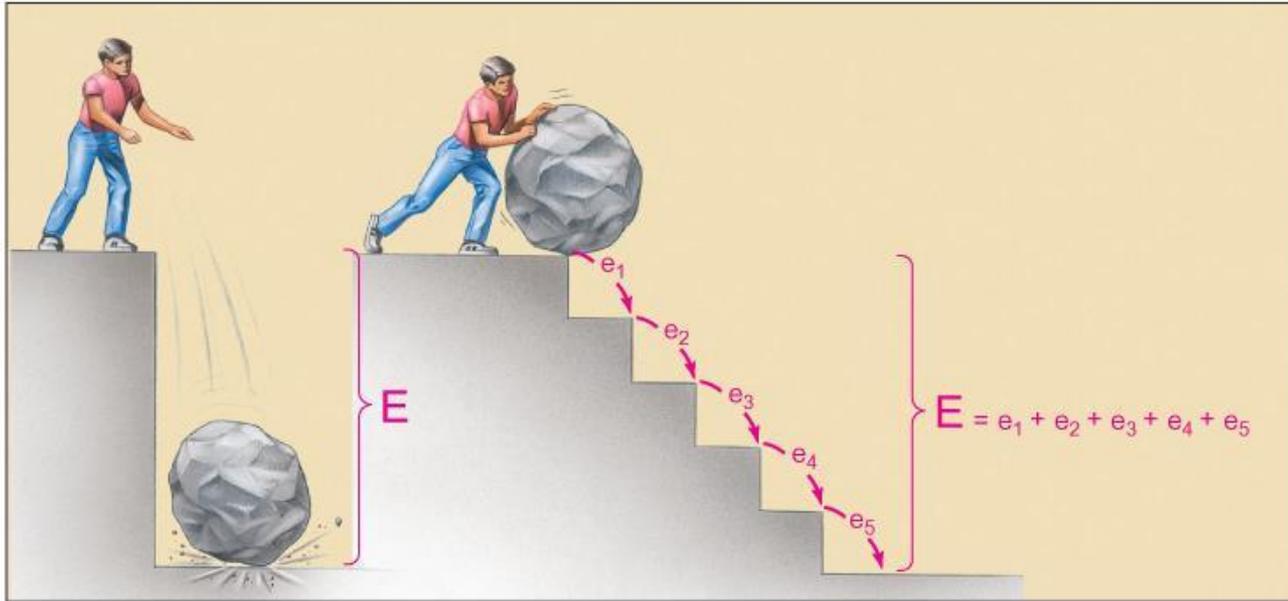


FIGURA 7-1

### Variazioni di energia libera

Il rilascio di energia da una molecola di glucosio è analogo alla liberazione di energia da parte di un oggetto che cade. L'energia totale liberata ( $E$ ) è la stessa, sia che essa venga rilasciata tutta in una volta, attraverso il passaggio su una serie di gradini.

# I procarioti sono caratterizzati da una elevata **diversità metabolica (catabolica)**

Diverse strategie metaboliche per la produzione di ATP e per le biosintesi: sfruttano **diverse fonti di energia (donatori e<sup>-</sup>)**, **diversi accettori di e<sup>-</sup>** e **diverse fonti di C**

Alternative alla fermentazione ed alla respirazione aerobica:

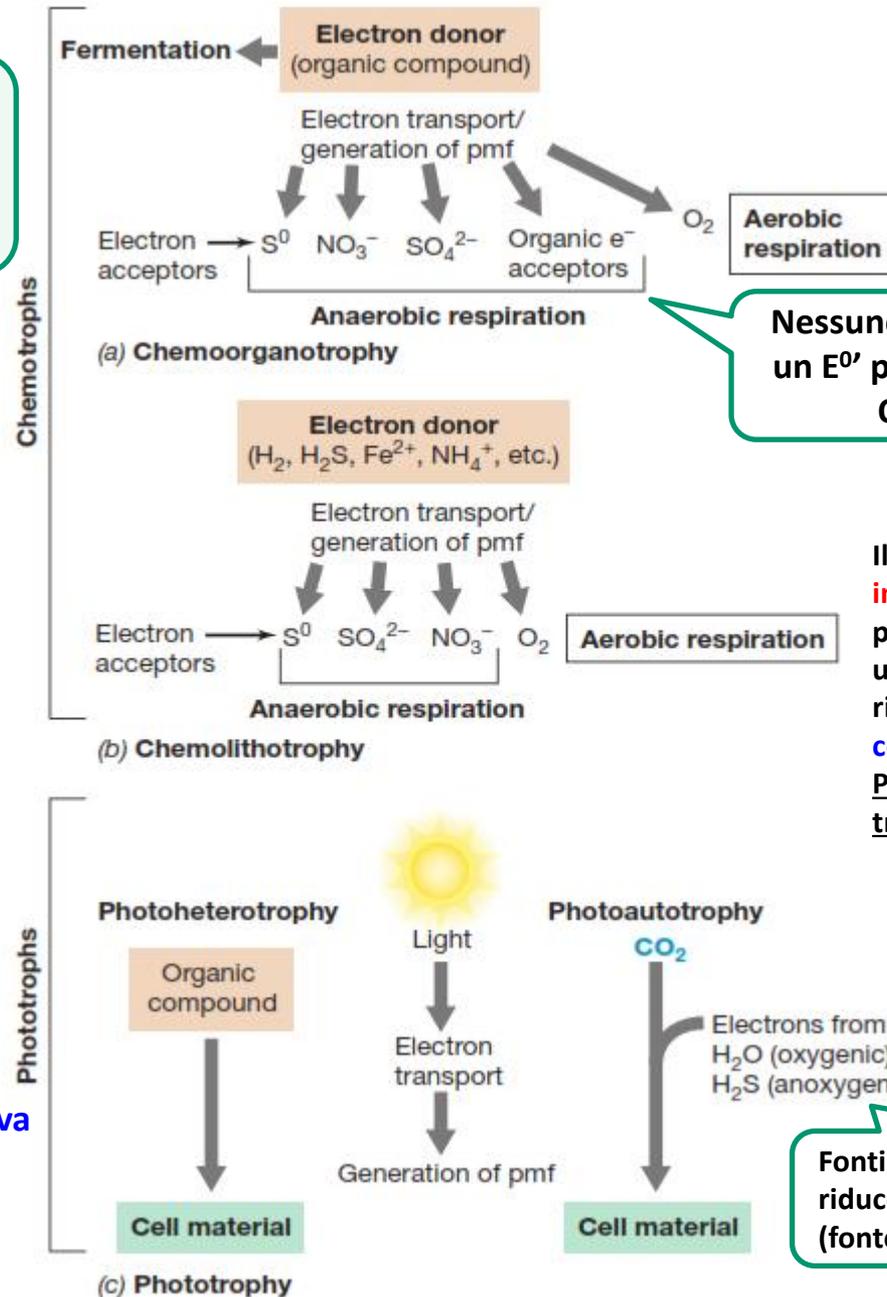
- **Respirazione anaerobica**
- **Chemiolitotrofia**
- **Fototrofia**

La **respirazione anaerobica** pur fornendo meno energia, consente a questi batteri di respirare in ambienti anossici.

Chemiotrofi: **fosforilazione ossidativa**

Fototrofi: **fotofosforilazione**

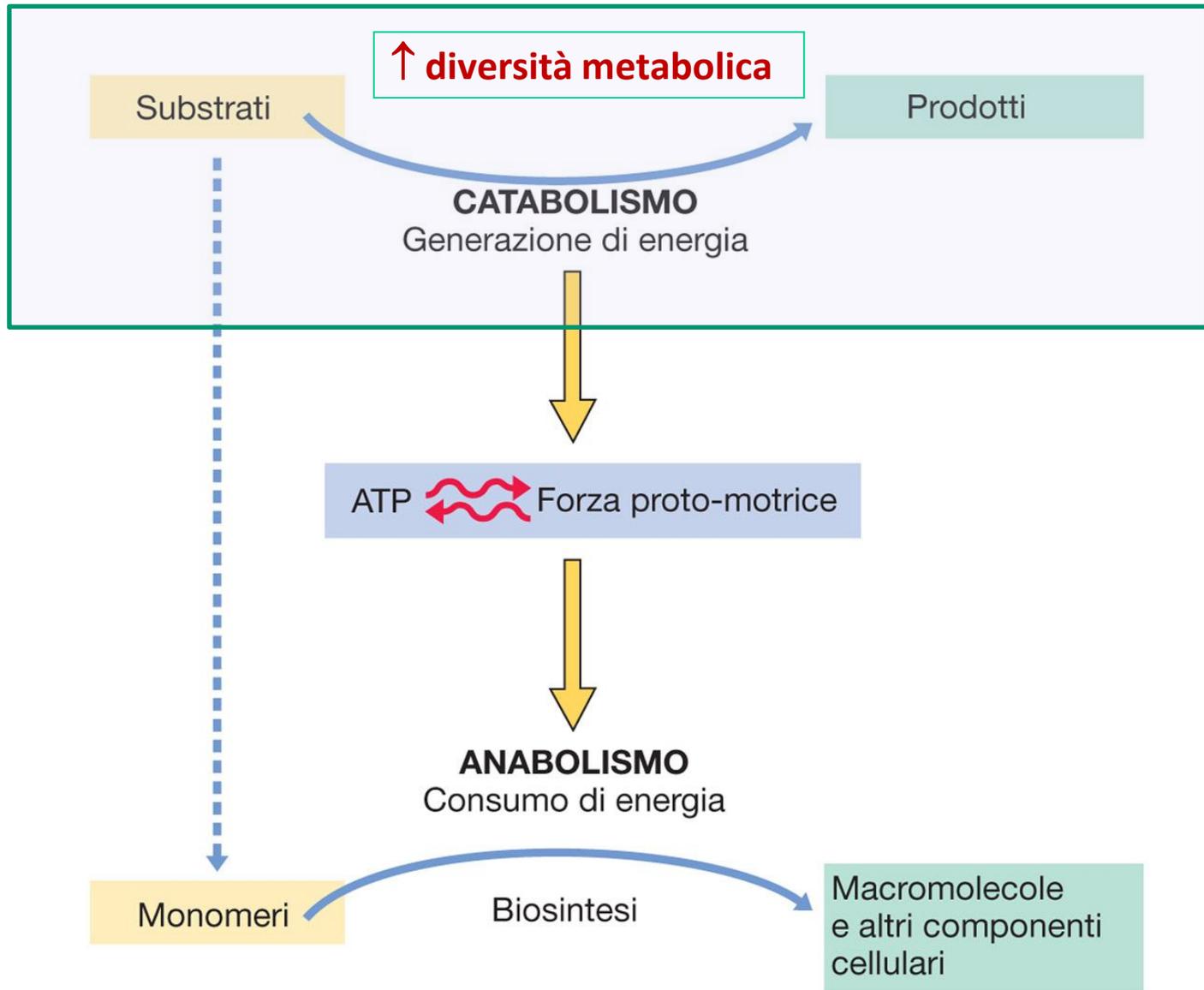
Brook, Biologia dei microrganismi  
Microbiologia generale - Pearson



Nessuno di questi accettori ha un E<sup>0</sup> positivo come la coppia O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (+0,82V)

Il ricorso a **sostanze inorganiche** come fonte di potere riducente costituisce un secondo sistema per ricavare **energia in assenza di composti organici**.  
Presenza di una catena di trasporto degli e<sup>-</sup>!

Fonti di e<sup>-</sup> per generare potere riducente per assimilare la CO<sub>2</sub> (fonte di C per le biosintesi)



## BIOSINTESI

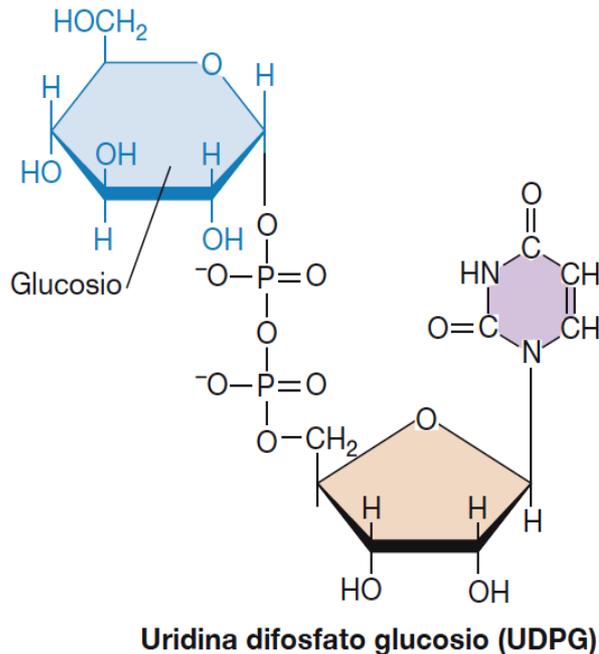
**Carboidrati**  
**Aminoacidi**  
**Nucleotidi**  
**Acidi grassi**

In assenza di glucosio nell'ambiente di crescita, **i batteri sintetizzano i carboidrati a partire da altri composti organici.**

**I polisaccaridi possono essere sintetizzati a partire da forme attivate del glucosio:**

**Uridina difosfato glucosio - UDPG (→derivati glucosio)**

**Adenosina difosfato glucosio - ADPG (→glicogeno)**



(a)

Il CAC è importante anche a fini biosintetici (ciclo TCA riduttivo)

## Gluconeogenesi

Composti C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>

Ciclo dell'acido citrico

Ossalacetato

Fosfoenolpiruvato + CO<sub>2</sub>

Passaggi inversi alla glicolisi

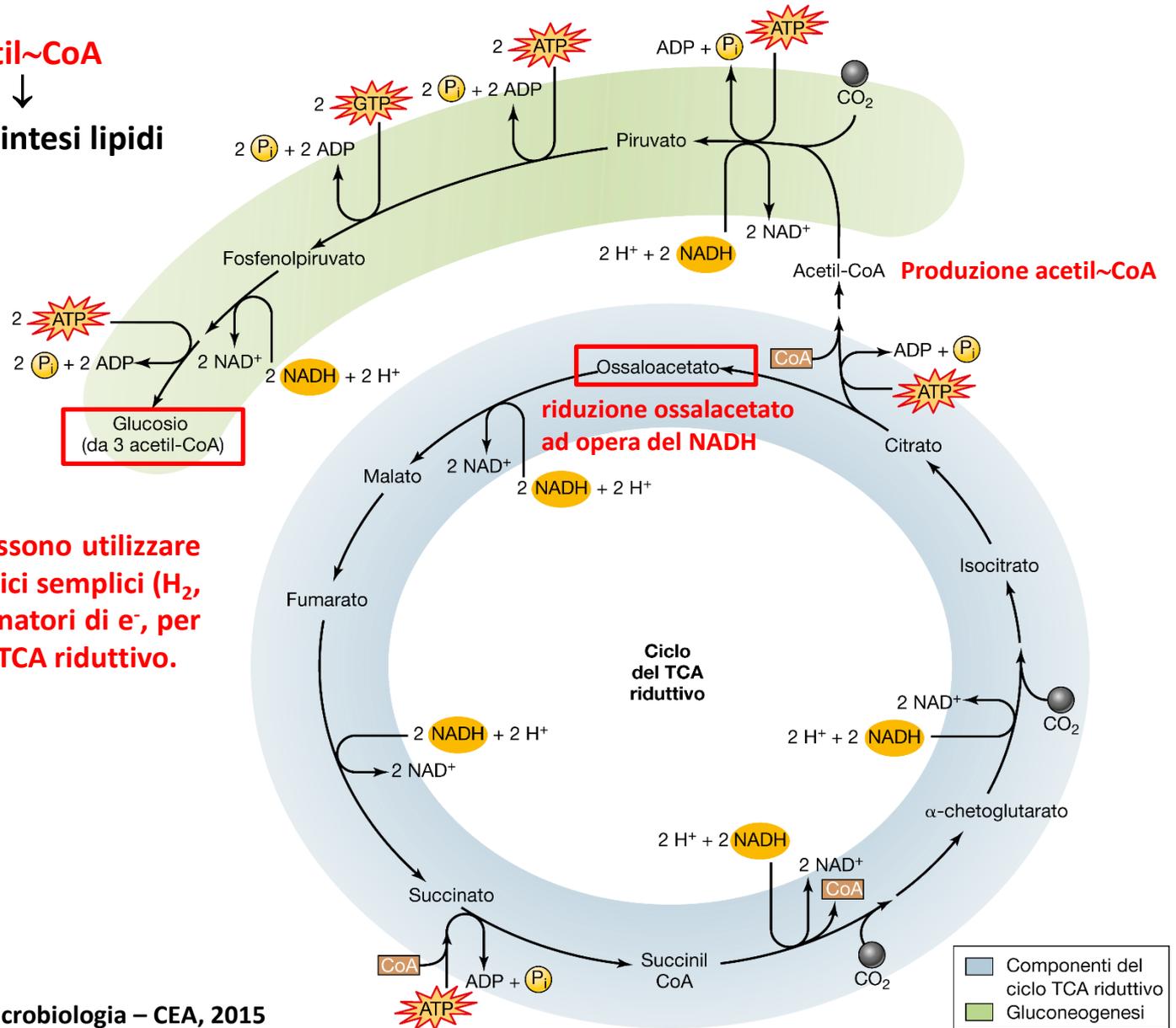
Glucosio-6-P

**La biosintesi dei carboidrati può partire dal PEP**

**Ciclo del TCA riduttivo**  
(che consuma e<sup>-</sup>)

**Ciclo dell'acetil~CoA**

**Gluconeogenesi Sintesi lipidi**



**Alcuni batteri possono utilizzare composti inorganici semplici (H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, ...), come donatori di e<sup>-</sup>, per sostenere il ciclo TCA riduttivo.**

Molti batteri contengono alcuni o tutti gli enzimi della **via dei pentosi fosfati (shunt esoso monofosfato)**.

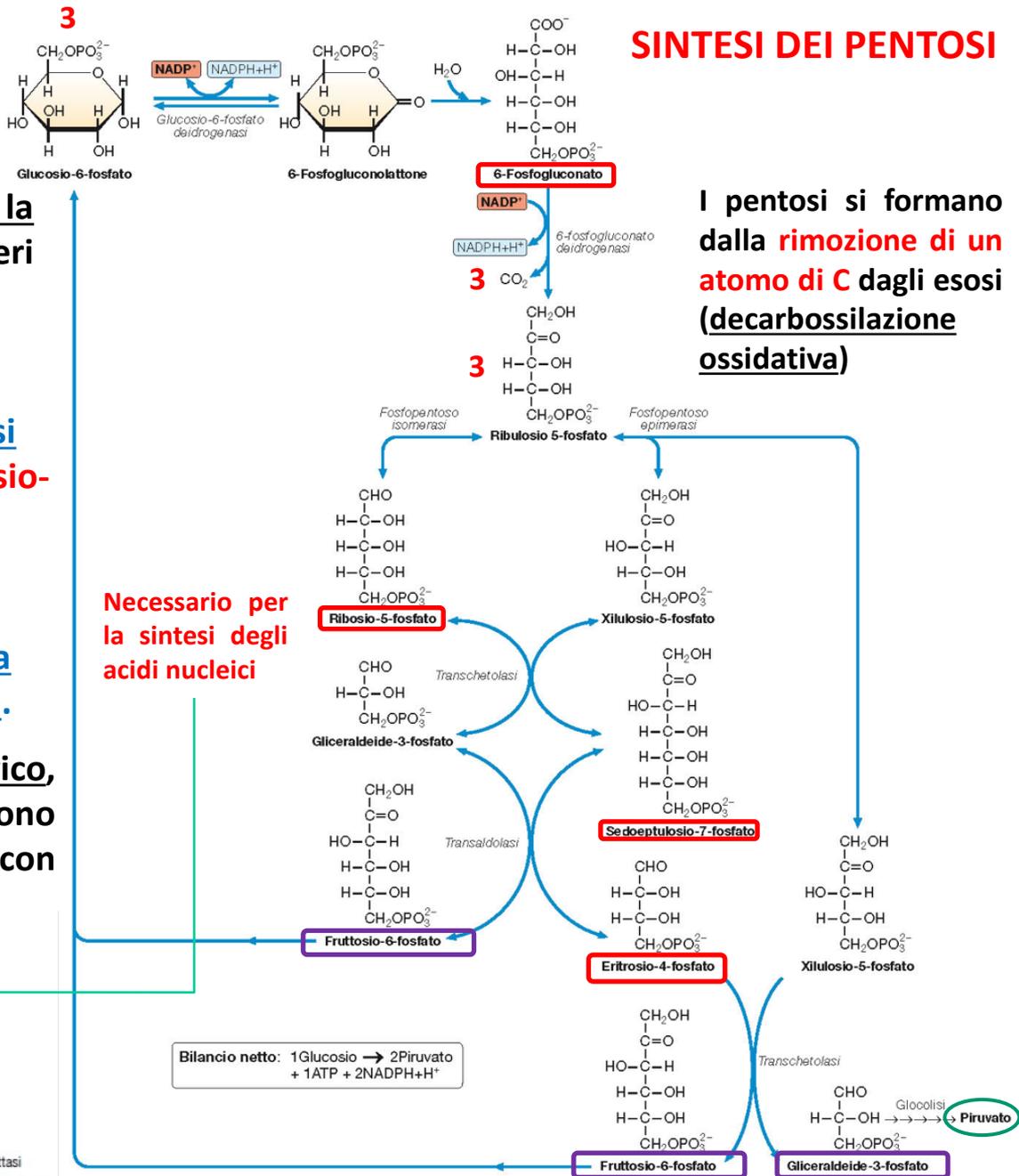
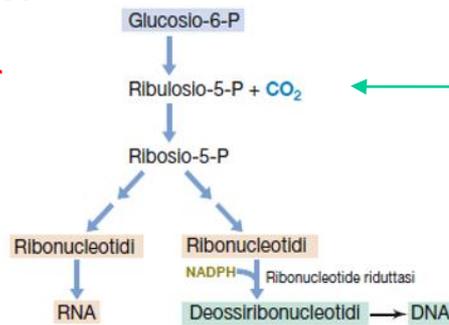
Questa rappresenta la via principale per la **SINTESI DEI PENTOSI**. Solo alcuni batteri utilizzano questo ciclo per fini energetici.

Importanza del ciclo dei pentoso fosfati:

- **Formazione di precursori per le biosintesi (sedoepulosio-7-P, ribosio-5-P ed eritrosio-4-P).**
- **Produzione di NADPH (utilizzato nelle biosintesi).**
- **Sintesi di zuccheri (C<sub>6</sub>) che riforniscono la glicolisi o utilizzati per la gluconeogenesi.**

In questa via non si forma ac. piruvico, tuttavia gli enzimi della glicolisi possono produrlo dalla gliceraldeide-3-P con formazione di ATP.

Sintesi pentosi per acidi nucleici



## SINTESI DEI PENTOSI

I pentosi si formano dalla **rimozione di un atomo di C** dagli esosi (**decarbossilazione ossidativa**)

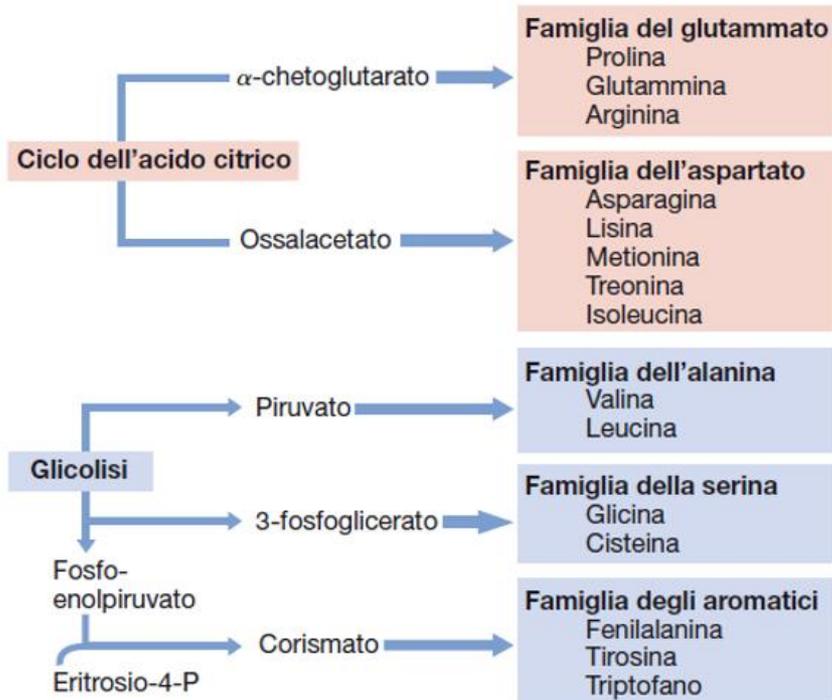
Necessario per la sintesi degli acidi nucleici

Bilancio netto: 1 Glucosio → 2 Piruvato + 1 ATP + 2 NADPH+H<sup>+</sup>

## SINTESI AMINOACIDI (22 aa)

→ Quando non disponibili dall'ambiente

Esistono diverse famiglie di aa caratterizzate da precursori comuni



Il **gruppo aminico** del glutammato o della glutammina può, poi essere, trasferito (**transaminasi**) ad altre molecole per formare altri aa.

## Sintesi scheletro carbonioso aminoacidi

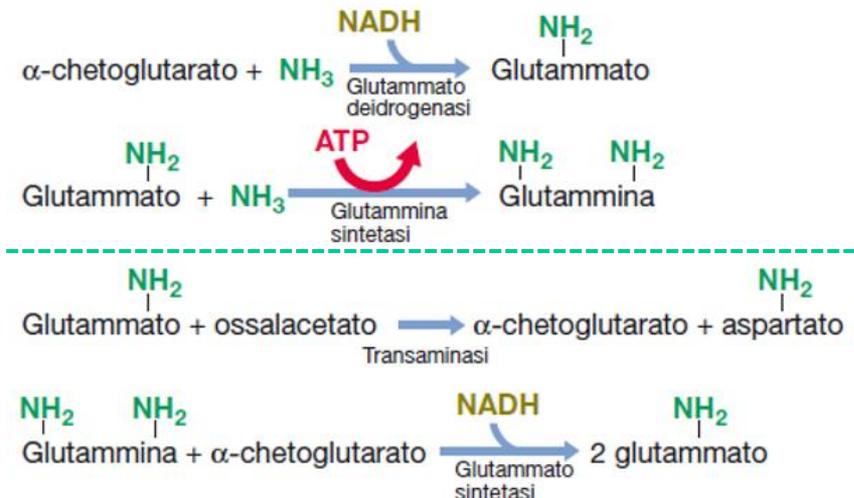
Gli **scheletri carboniosi** degli aa derivano da intermedi della glicolisi e del CAC.

### Assimilazione ammoniacca

$\text{NH}_3$  o la sua forma protonata  $\text{NH}_4^+$  sono le forme di azoto presenti nell'ambiente e direttamente incorporabili nelle molecole biologiche.

$\text{NH}_3$  diffonde liberamente attraverso la membrana,  $\text{NH}_4^+$  necessita di trasportatori.

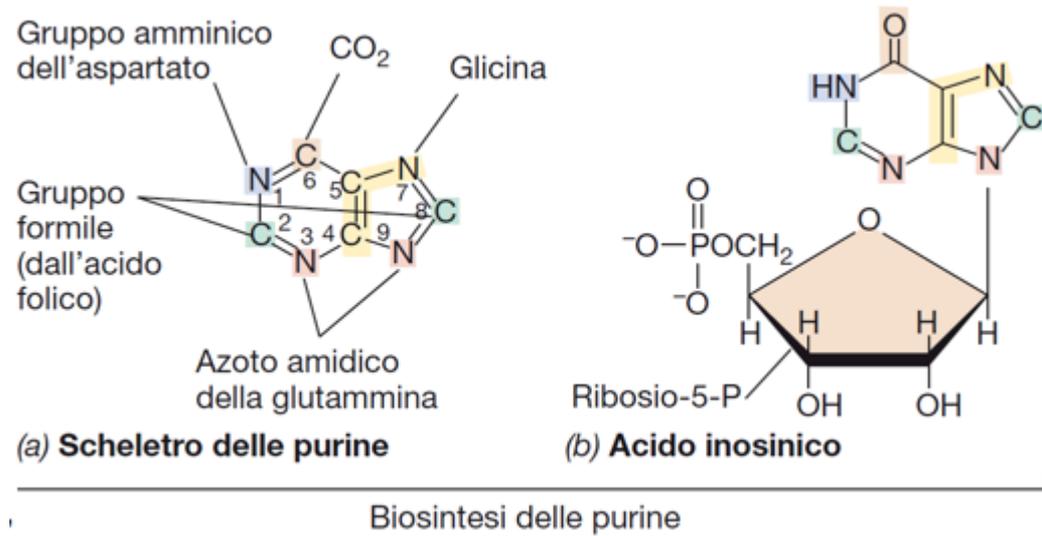
Il **gruppo aminico**, derivante da  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ , viene incorporato nel glutammato o nella glutammina.



## SINTESI NUCLEOTIDI

Le **purine** (**adenina, guanina**) vengono sintetizzate da fonti di carbonio organico ed inorganico.

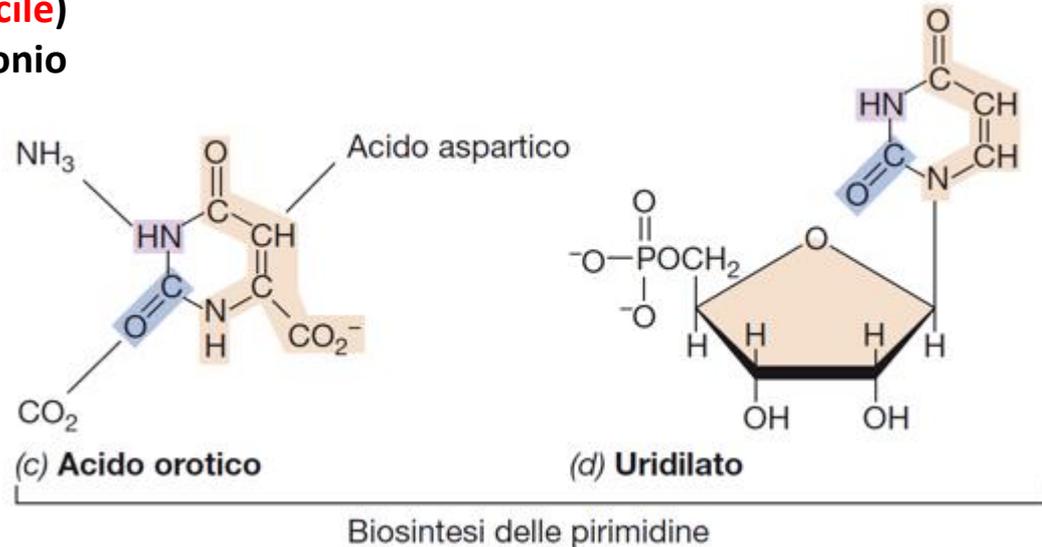
L'acido inosinico è il precursore di tutti i nucleotidi purinici. Dall'**acido inosinico**, si procede con la sintesi di **adenina** e **guanina** (in forma trifosfato e legate al ribosio).



I nucleotidi (ribonucleotidi), quindi, possono essere utilizzati per sintetizzare RNA o, dopo l'azione della **ribonucleotide reduttasi**, DNA.

Le **pirimidine** (**citrosina, timina, uracile**) vengono sintetizzate da fonti di carbonio organico ed inorganico.

Una volta sintetizzato il precursore ciclico (**uridilato**), si procede con la sintesi di **citrosina, timina, uracile** (in forma trifosfato e legate al ribosio).



## Biosintesi ACIDI GRASSI

È coinvolta la **proteina ACP**  
(**proteina di trasporto di acile**)

All'**acetil-ACP** vengono aggiunti, man mano, **unità di acetile** messe a disposizione dal **malonil-ACP**. Nel corso della reazione di condensazione viene liberata  $\text{CO}_2$ .

Successivamente, la disponibilità di **potere riducente (NADPH)** consente l'eliminazione di un atomo di O sotto forma di  $\text{H}_2\text{O}$ .

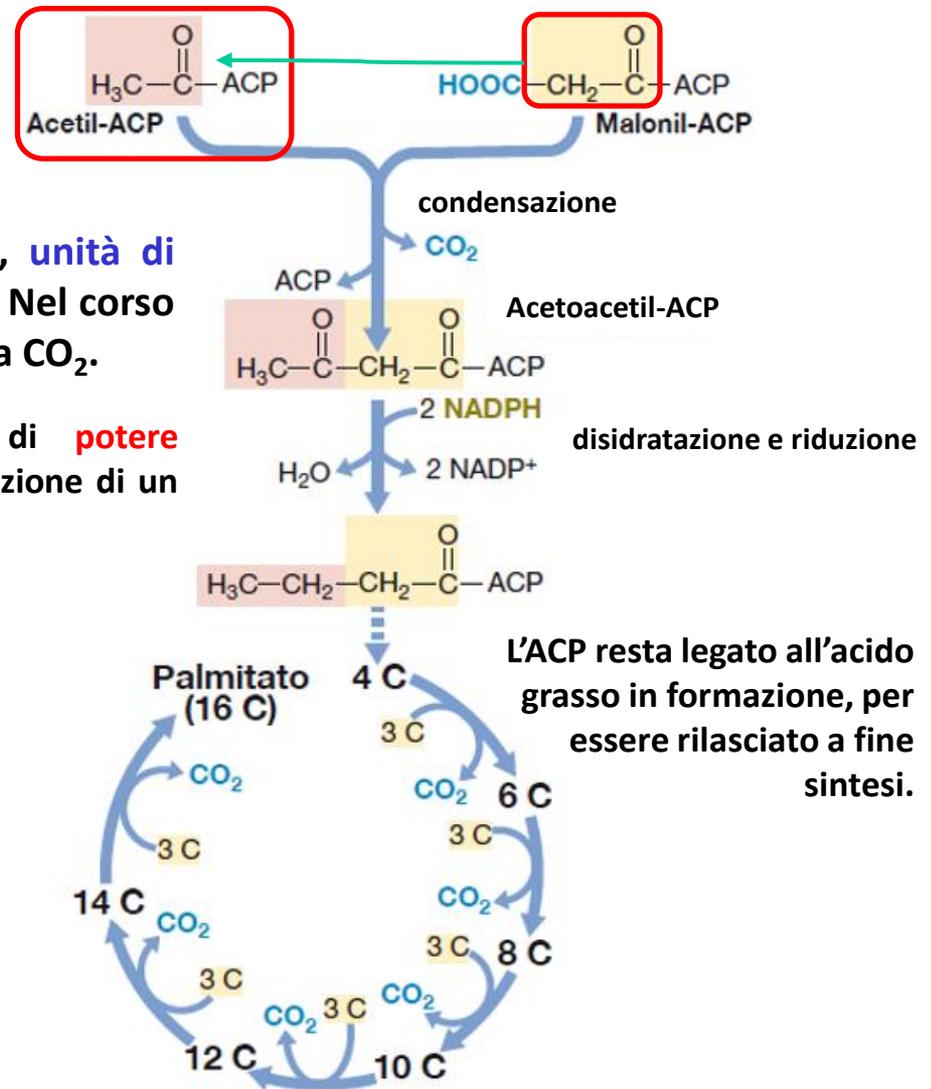
Per gli **acidi grassi a numero dispari** di atomi di C, la sintesi parte con un **gruppo propionile (C<sub>3</sub>)**.

**Acidi grassi insaturi** (specie- o gruppo-specifici) vengono generati per desaturazione dell'acido grasso saturo.

La composizione in acidi grassi è specie-specifica, ma in risposta a diverse condizioni ambientali, essa può variare anche nell'ambito della stessa specie.

↑T: favorita sintesi acidi grassi a catena lunga

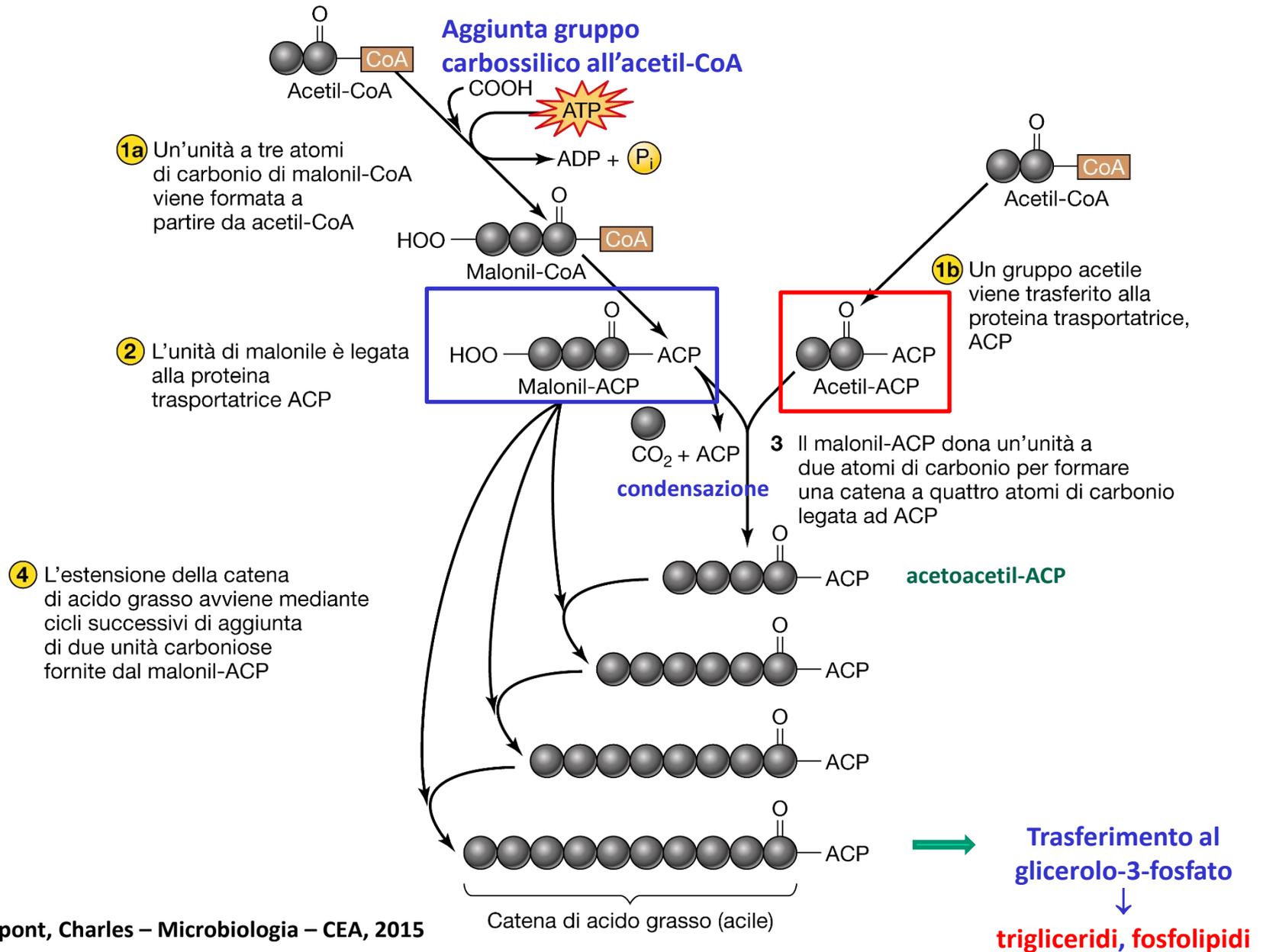
↓T: favorita sintesi acidi grassi a catena corta



Gli **acidi grassi**, mediante legami estere, possono essere legati al glicerolo per formare i **LIPIDI**.

**Lipidi complessi** possono essere formati quando al gruppo fosfato, legato ad uno degli atomi di C del glicerolo, si aggiunge una sostanza polare.

# Biosintesi ACIDI GRASSI



## FISSAZIONE DELL'AZOTO ( $N_2$ )

Formazione di ammonica ( $NH_3$ )



Assimilazione per la sintesi di

**aminoacidi**

**acidi nucleici**

**altre molecole organiche**

Le cellule per la loro crescita, oltre a fonti di carbonio, hanno bisogno di azoto ( $NH_3$ ,  $NO_3^-$ ).

Solo poche specie batteriche (*Bacteria*, *Archaea*), aerobi o anaerobi, a vita libera o simbiotici, sono in grado di fissare l'azoto.

**NON SONO NOTI EUCARIOTI AZOTOFISSATORI!**

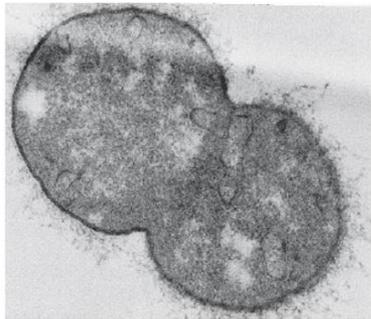
Complesso enzimatico

**NITROGENASI**

← Cofattore ferro-molibdeno (*FeMo-co*)

**dinitrogenasi + dinitrogenasi reductasi**

Esistono nitrogenasi alternative

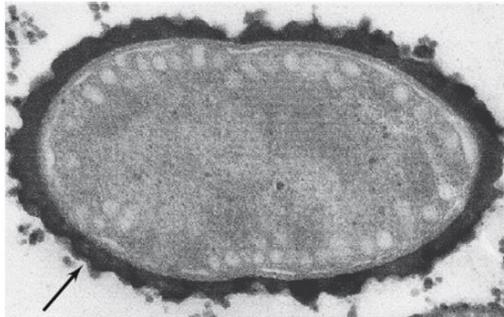


Wael Sabra

La dinitrogenasi reductasi è inattivata dall' $O_2$ .  
Batteri azotofissatori aerobi proteggono l'enzima mediante produzione di **strati mucilluginosi** o **consumo rapido dell' $O_2$** .



Eterocisti →



Wael Sabra

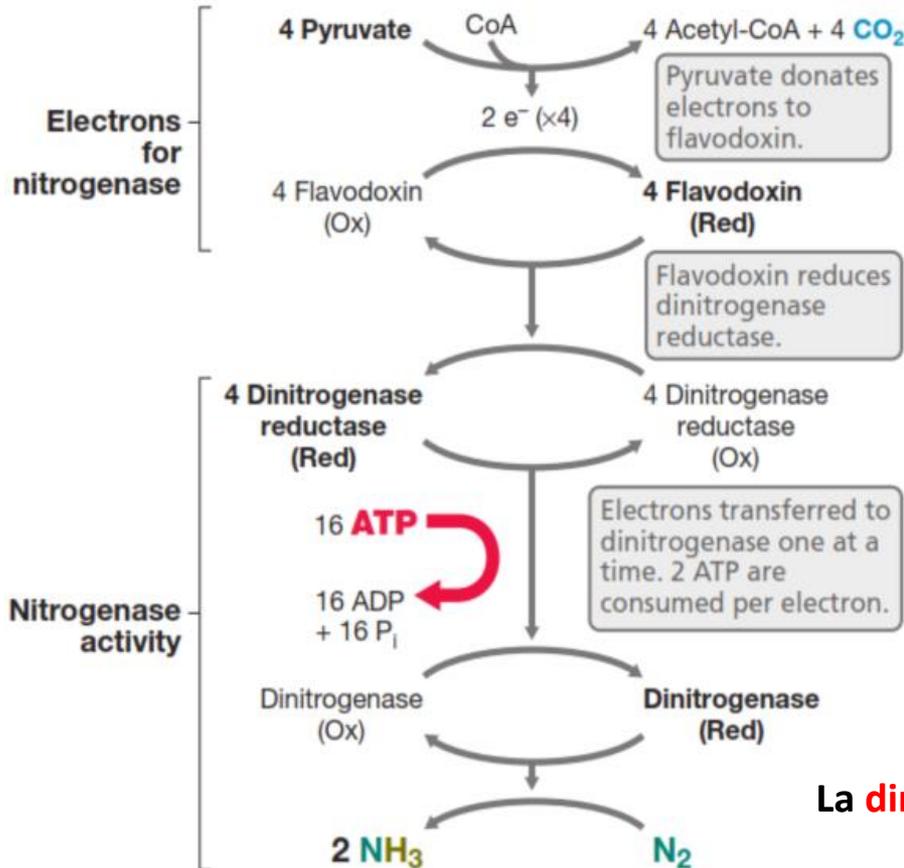
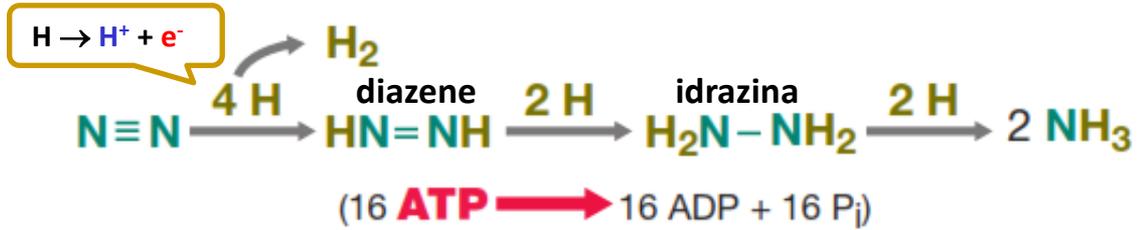
Nei cianobatteri, l'**eterocisti** è una cellula differenziata, con spesse pareti, specializzata nella fissazione dell' $N_2$ .

L'interno delle eterocisti è anaerobico (non avviene fotosintesi). Sono spaziate ogni 10-15 cellule e non si dividono. Le eterocisti condividono le molecole organiche azotate con le cellule adiacenti.

## FISSAZIONE N<sub>2</sub>



- Per ridurre N<sub>2</sub> ad NH<sub>3</sub>, in totale, sono necessari **8 e<sup>-</sup>**.
- È richiesta una grande impegno energetico (16 ATP).



Una **proteina Fe/S** (ferredossina o flavodossina) cede e<sup>-</sup> alla dinitrogenasi riduttasi.

La **dinitrogenasi riduttasi** ridotta, idrolizzando ATP, trasferisce un e<sup>-</sup> alla volta alla dinitrogenasi. Sono necessari **2 ATP per ogni ciclo di trasferimento dell'e<sup>-</sup>**.

La **dinitrogenasi** ridotta dona gli e<sup>-</sup> ad N<sub>2</sub>.

## Test riduzione dell'acetilene

La riduzione dell'acetilene ad etilene è un metodo per mettere in evidenza la presenza dell'attività nitrogenasica (fissazione dell'azoto).

Le nitrogenasi possono ridurre anche sostanze con tripli legami diverse da  $N_2 \rightarrow$  acetilene

