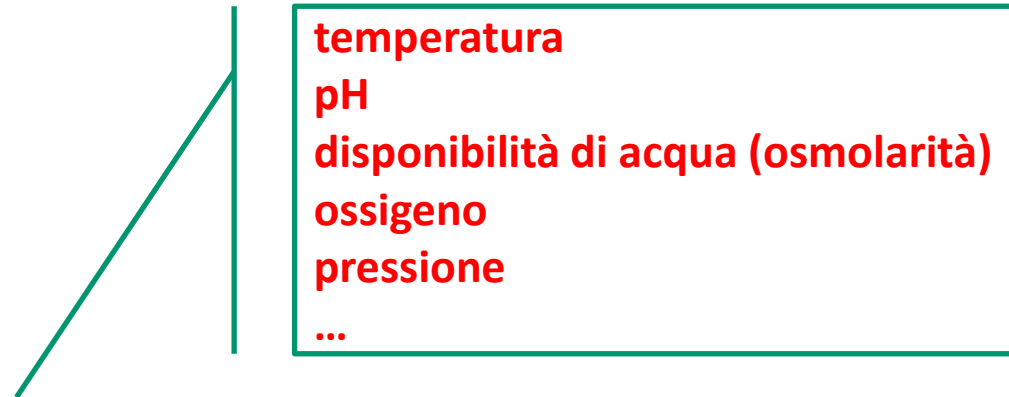


# Principali **fattori ambientali** che intervengono nel controllo della crescita batterica



Condizioni ottimali garantiscono una **rapida crescita dei microrganismi!**

In alcuni ecosistemi, una **rapida crescita** si traduce in un **vantaggio selettivo**, soprattutto quando i microrganismi interagiscono con specie diverse o entrano in competizione per le fonti di nutrienti.



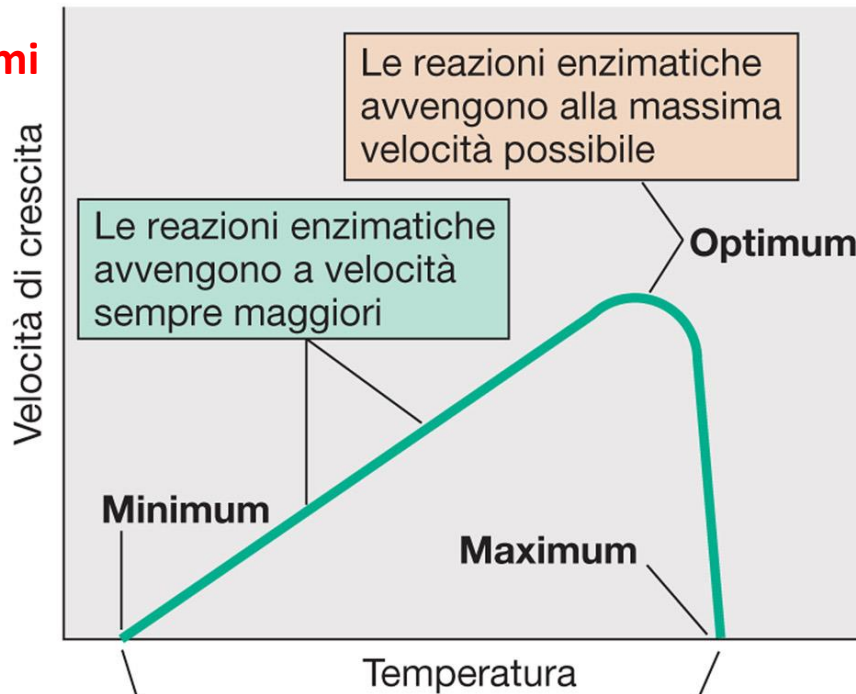
La conoscenza dei fattori che condizionano la crescita microbica possono essere sfruttati per **favorire** o **controllare** le attività microbiche.

# TEMPERATURA

Influenza notevolmente la velocità di crescita

Aumento della temperatura → aumento velocità reazioni chimiche ed enzimatiche

## Microrganismi

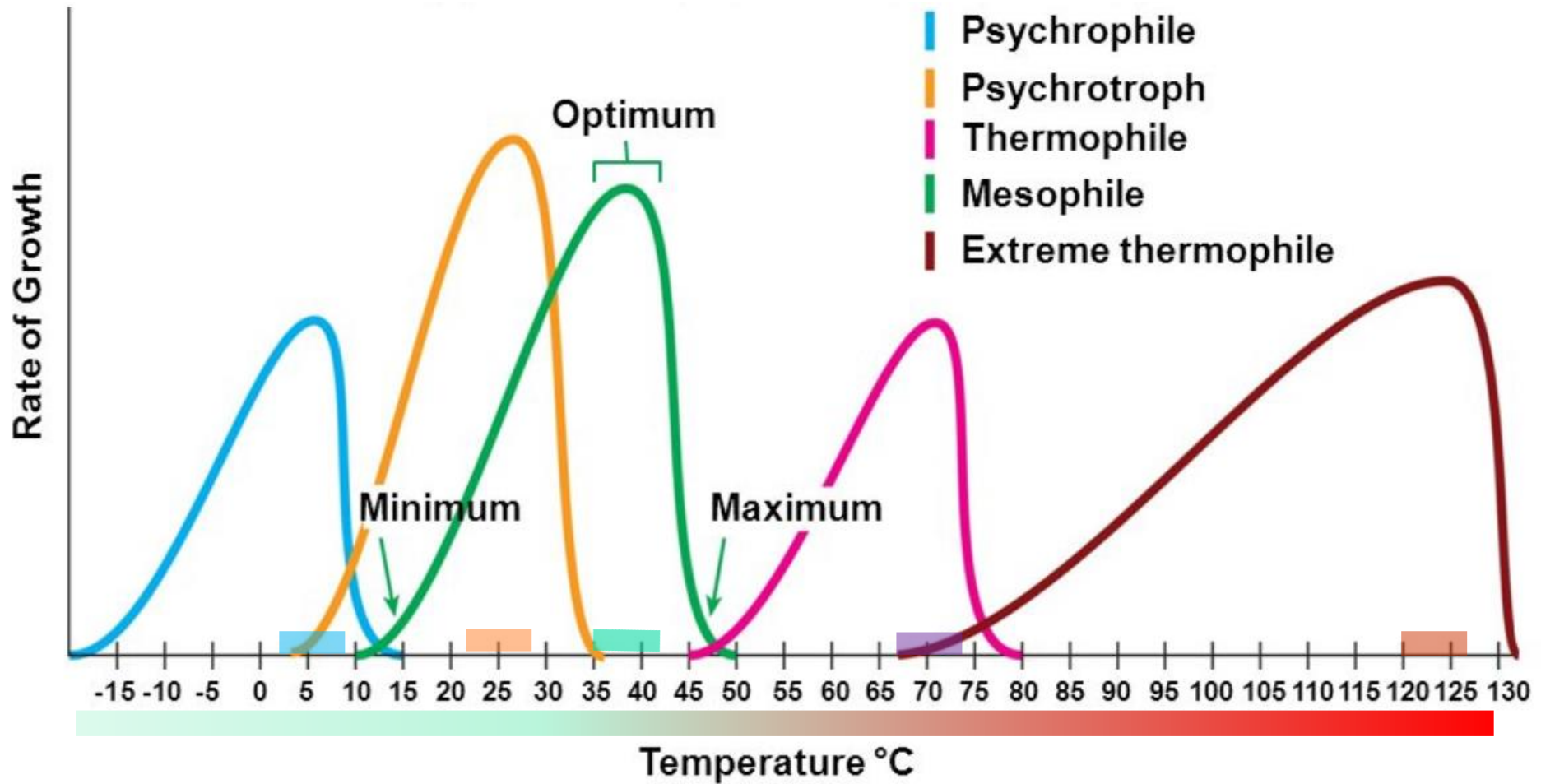


I valori *minimum*, *optimum* e *maximum* definiscono le **temperature cardinali** di un microorganismo.

Gelificazione delle membrane; i processi di trasporto sono così lenti da non rendere possibile la crescita

Denaturazione delle proteine; collasso della membrana citoplasmatica; lisi termica

## Temperature alla quali i microrganismi possono crescere

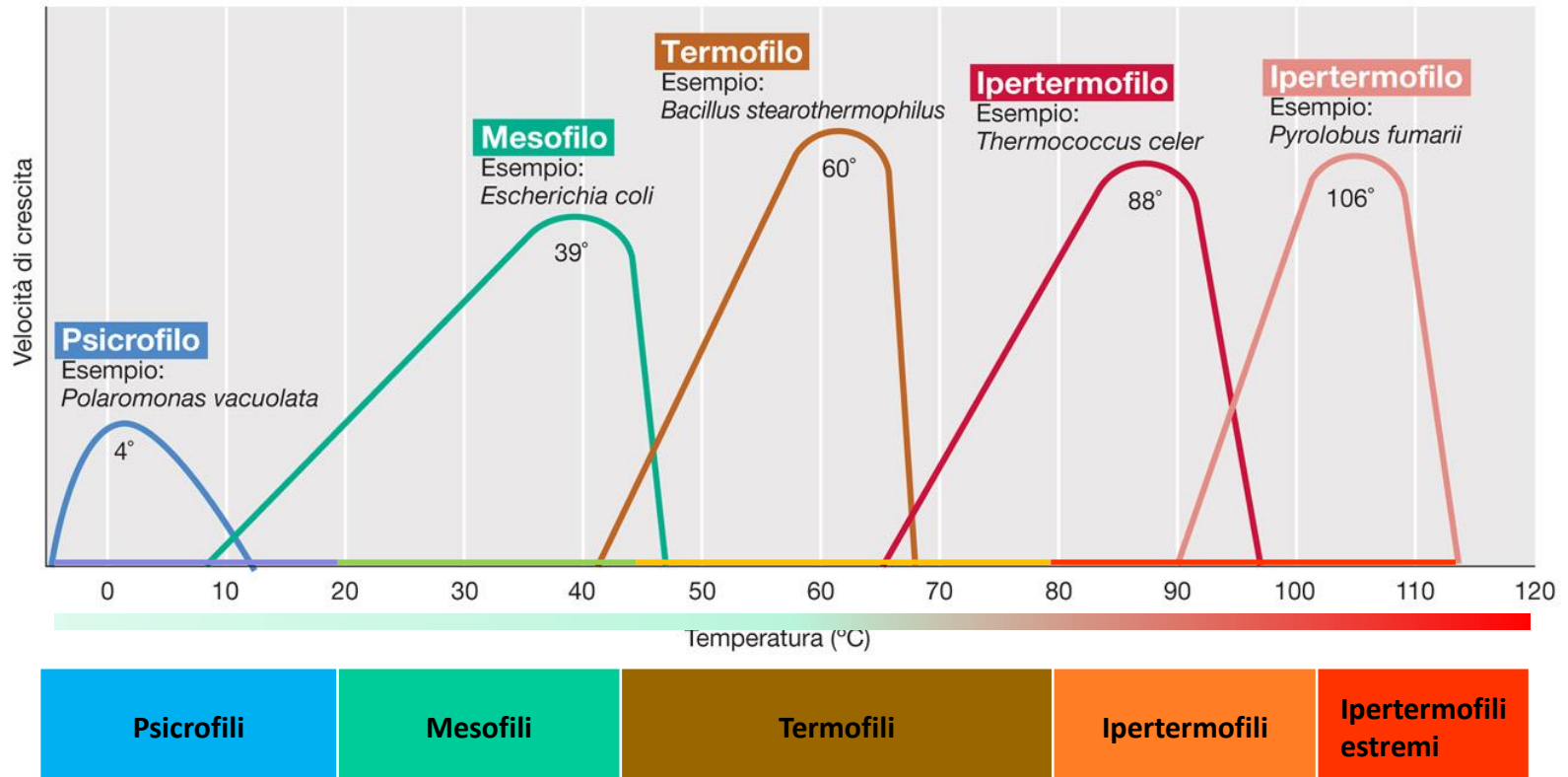


In generale, un microrganismo, per la sua crescita, tollera oscillazioni della temperatura nell'ambito di un range inferiore a 40°C.

Per ogni microrganismo è possibile definire **3**  
**temperature cardinali**

- temperatura minima
- temperatura massima
- temperatura ottimale

### Temperature cardinali per alcune specie batteriche



**Non esistono limiti ben definiti!**

In funzione

dell'**intervallo di temperatura di crescita** e della **temperatura ottimale**  
i microrganismi possono essere divisi in

- **Psicrofili** →  $\leq 0 \div \leq 20^{\circ}\text{C}$   $\sim 15^{\circ}\text{C}$
- **Mesofili** →  $20 \div 45^{\circ}\text{C}$   $30 \div 37^{\circ}\text{C}$
- **Termofili** →  $45 \div 80^{\circ}\text{C}$   $45 \div 55^{\circ}\text{C}$
- **Ipertermofili** →  $80 \div 110^{\circ}\text{C}$   $80 \div 100^{\circ}\text{C}$

### Estremofili x T di crescita

$>100^{\circ}\text{C}$  (*Methanopyrus* →  $122^{\circ}\text{C}$ )

$<-10^{\circ}\text{C}$  (*Psycromonas* →  $-12^{\circ}\text{C}$ , *Planococcus halocryophilus* →  $-15^{\circ}\text{C}$ )

### PSICROFILI

Temperatura minima  $\sim 0^{\circ}\text{C}$

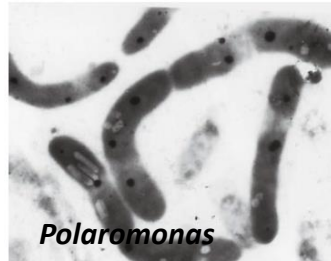
Temperatura ottimale  $\leq 15^{\circ}\text{C}$

Temperatura massima  $< 20^{\circ}\text{C}$

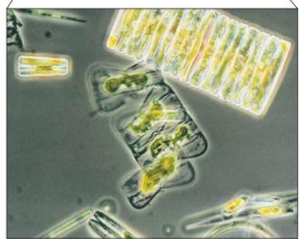
Vivono in ambienti costantemente freddi (ghiacciai polari, nevai, etc.).



(a)



(c)



(b)



(d)

### Psicrotolleranti (o psicrotrofi)

Alcuni batteri, pur proliferando meglio a temperature tra  $20-40^{\circ}\text{C}$ , riescono a crescere anche a basse temperature (prossime a  $0^{\circ}\text{C}$  →  $0-5^{\circ}\text{C}$ ).

Vivono in ambienti caratterizzati da climi temperati (suolo, acqua, alimenti, etc.)

Alcune specie patogene possono comportarsi anche da psicrotrofi (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, ...).

## Adattamenti molecolari alla psicrofilia

<b>Enzimi</b>	↑ Quantità di $\alpha$ -eliche (maggiore flessibilità in ambiente freddo). ↑ Contenuto in <b>aminoacidi polari</b> ; ↓ aminoacidi idrofobici. ↓ Numero di legami deboli e di interazioni tra i loro domini.
<b>Membrane</b>	↑ Contenuto di <b>acidi grassi insaturi a catena corta</b> . Presenza di <b>acidi grassi polinsaturi</b> (restano più fluidi a basse temperature).
<b>Proteine</b>	Sintesi <b>proteine dello stress da freddo</b> ( <i>cold-shock proteins</i> ): mantengono le altre proteine in fase attiva, facilitano la sintesi proteica legando mRNA). Sintesi <b>proteine crioprotettrici</b> (anticongelamento).
<b>Altro</b>	Sintesi <b>crioprotettori</b> (glicerolo, zuccheri specifici, ...). Sintesi di <b>esopolissacaridi di superficie</b> ad attività crioprotettiva.

Esiste un limite di temperatura al di sotto del quale la riproduzione diventa impossibile. Secondo recenti studi alcuni psicrofili potrebbero potenzialmente crescere fino a circa  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



La crescita microbica è possibile fino a quando c'è disponibilità di **acqua allo stato liquido**.

**Il congelamento non sempre induce la morte dei microrganismi!**

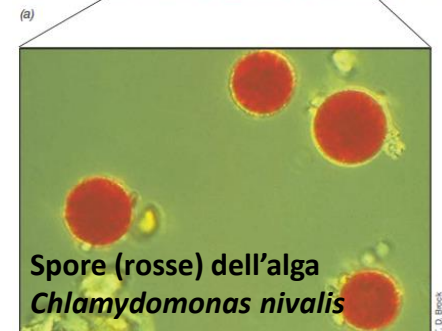
← Ceppi microbici possono essere conservati in forma vitale per lungo tempo a basse temperature ( $-20\div-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Per preservare la vitalità dei ceppi è prevista l'aggiunta di crioconservanti al brodo di coltura:

**DMSO (10%)**

**glicerolo (10-15%)**



Conservazione ceppi mediante congelamento



Spore (rosse) dell'alga *Chlamydomonas nivalis*

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104607>

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105652>



# TERMOFILFI

## Crescita microbica ad elevate temperature

Termofili → 45 ÷ 80°C

$T_{\text{ott}} > 45$  (~55) °C

Ipertermofili → 80 ÷ 110°C

$T_{\text{ott}} > 80$  (~90-100) °C

Ad oggi, fino a 95°C sono stati coltivati sia *Bacteria* che *Archaea*, mentre oltre i 95°C sono stati coltivati solo *Archaea*.

Colonizzano sorgenti termali e vulcaniche.  
Sia chemiorganotrofi che chemiolitotrofi.  
Molte specie appartengono agli *Archaea*.

### Parco di Yellowstone (Boulder spring)

Sorgente con batteri che crescono a temperature prossime al punto di ebollizione.

Batteri termofili adesi alla superficie di un vetrino portaoggetti.



(a)



(b)

## Adattamenti molecolari alla **termofilia**

### Proteine (enzimi)

↑ Legami ionici tra aa acidi e basici.  
↑ Legami ionici all'interno dei domini idrofobici.  
Sostituzione di alcuni amminoacidi con altri che conferiscono una conformazione con maggiore resistenza al calore.

### Membrane

↑ Contenuto di **acidi grassi saturi** (formano legami idrofobici forti) ed a **catena più lunga**.  
Negli *Archaea* presenza di **idrocarburi C<sub>40</sub>** composti da unità ripetute **isoprene (bifitanile)**.  
Negli *Archaea* presenza di membrane con una **struttura a monostrato** lipidico.

### Altro

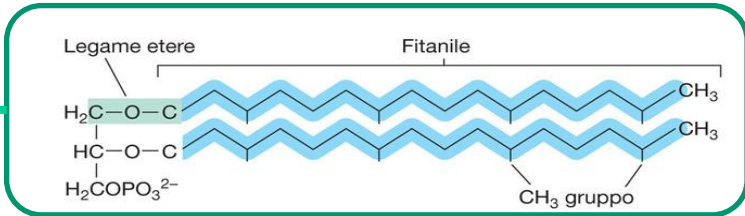
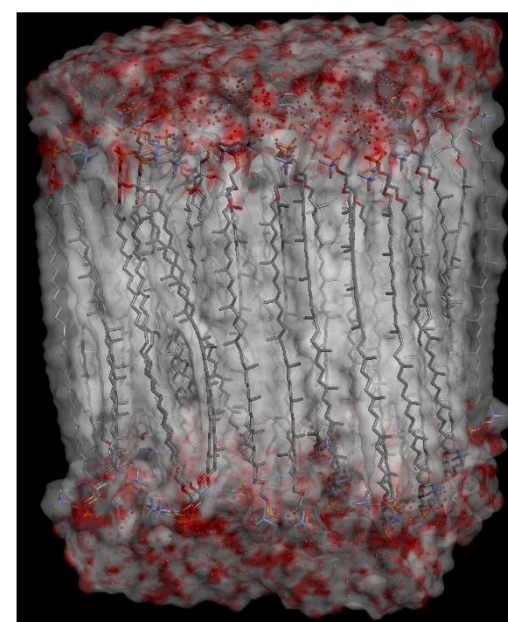
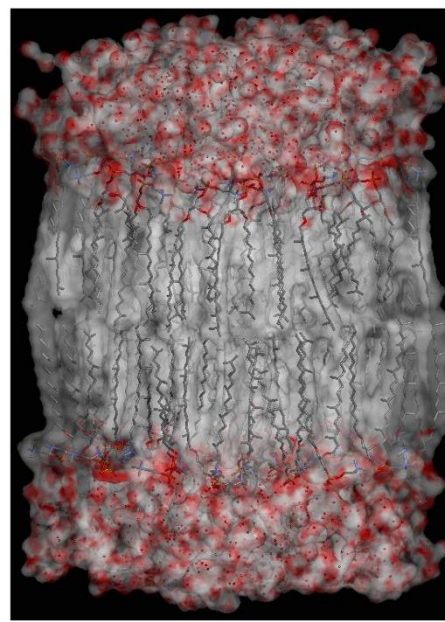
Sintesi di alcune molecole (di-inositolo fosfato, di-glicerol fosfato, mannosil-glicerato) che stabilizzano le proteine alle alte temperature.



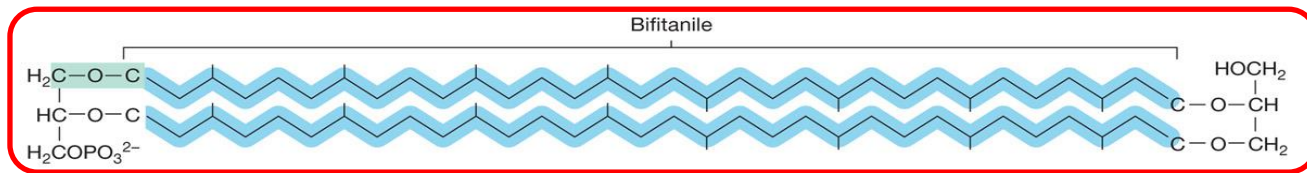
Nancy L. Spear



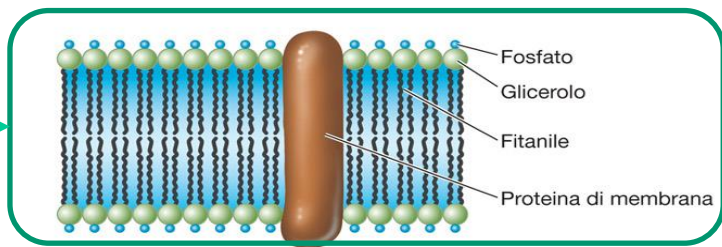
# Lipidi e struttura della membrana citoplasmatica degli *Archaea*



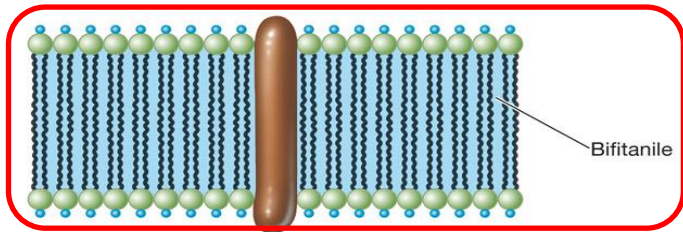
(a) Glicerolo dietere



(b) Glicerolo tetraetere



(c) Doppio strato lipidico



(d) Monostrato lipidico

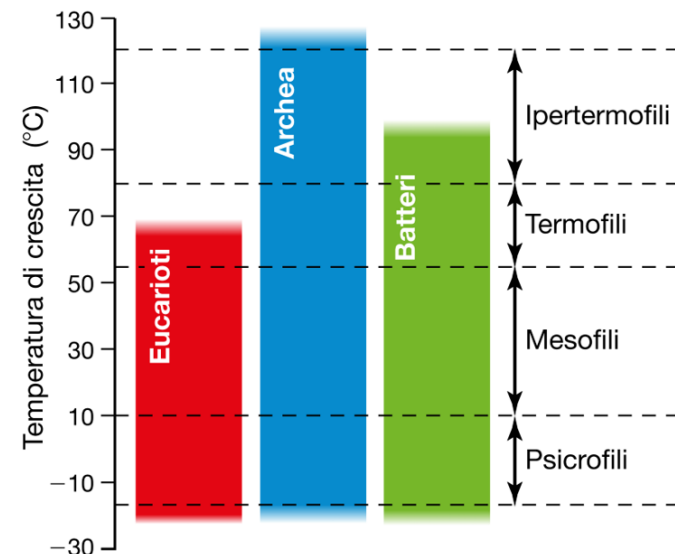
## Limiti superiori di temperatura per la crescita di diversi organismi

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

<sup>a</sup> Limite superiore di temperatura per la crescita dell'organismo *Pyrolobus fumarii*. Specie correlate di *Pyrodictium* possono crescere fino a 121 °C.

Brook, Biologia dei microrganismi – 1 Microbiologia generale - Pearson

Considerando la temperatura, i **batteri definiscono i limiti della vita!**

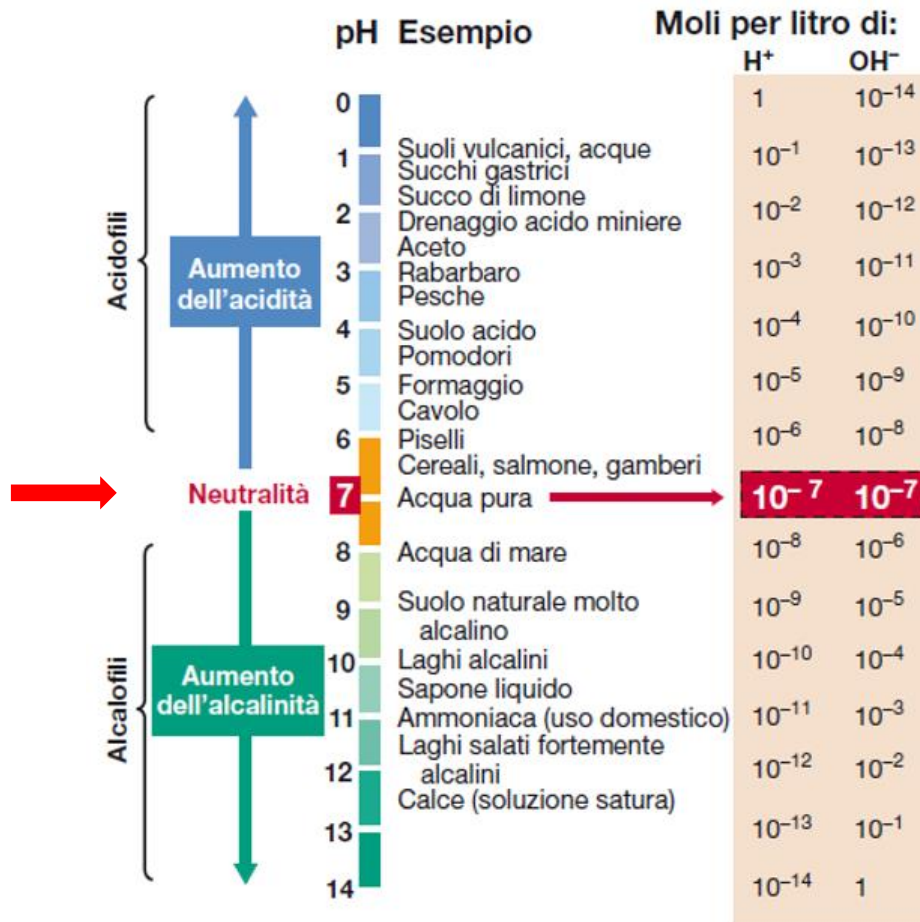


Wessner, Dupont, Charles – Microbiologia – CEA, 2015

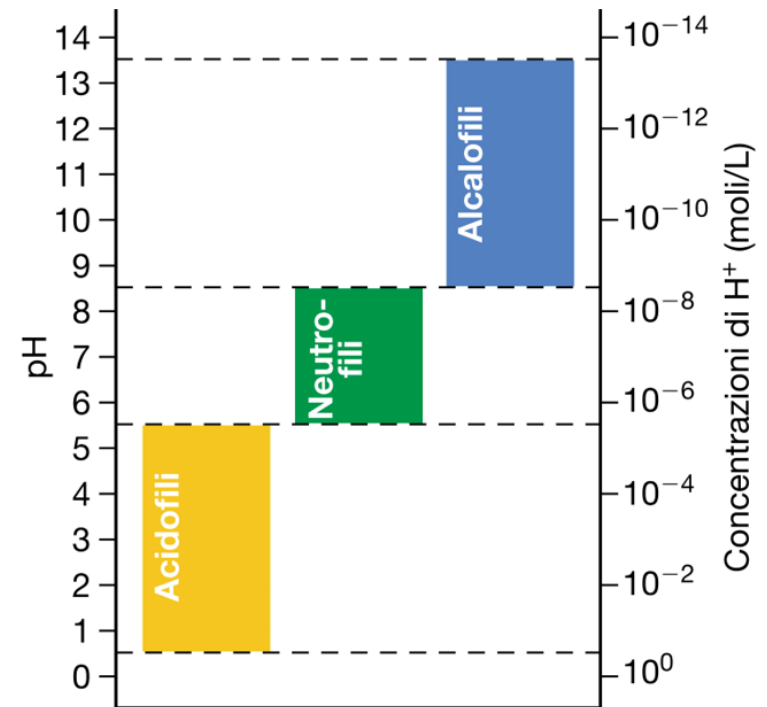
# pH (pondus Hydrogenii)

Il pH è una funzione logaritmica (negativa) della concentrazione di H<sup>+</sup> di una soluzione.

→ Alla variazione di una unità nella scala di pH corrisponde ad una variazione della [H<sup>+</sup>] di 10 volte.



Brook, Biologia dei microrganismi – 1 Microbiologia generale - Pearson



Wessner, Dupont, Charles – Microbiologia – CEA, 2015

La maggior parte degli ambienti naturali → pH 3-9.

**Ambienti alcalini:** laghi alcalini e suoli con elevate [carbonati].

**Ambienti acidi:** sorgenti vulcaniche.

Ogni microrganismo ha un suo **pH di crescita ottimale**, nell'ambito di un determinato intervallo di pH (~ 2-3 unità).

### Acidofili

Microrganismi con pH ottimale di crescita <5,5.

**Acidofili obbligati** (possono vivere solo a pH molto bassi)

*Thiobacillus, Solfobolus, Thermoplasma, Ferroplasma.*

### **Acidotolleranti**

Molti batteri ed i funghi.

Alcuni microrganismi acidofili sono **termo-acidofili**

***Picrophilus oshimae*: T ottimale 60°C**

**pH ottimale 0,7 (pH >4 → lisi)**

Batteri fortemente acidofili, se esposti a pH neutro, vanno incontro a lisi.

### Neutrofilo

Microrganismi con un valore di pH ottimale di crescita compreso, approssimativamente, tra 6 (5,5) e 7,9.

### Basofili

Batteri con pH ottimali i crescita ≥8 (fino a ~11). Alcuni possono essere **basofili obbligati**. Esistono **basofili estremi** anche **alofili**, soprattutto tra gli *Archaea*.

Data l'elevata [OH<sup>-</sup>] nell'ambiente, i basofili possono incontrare problemi bioenergetici nella costituzione della FPM.

*Bacillus firmus*, oltre alla FPM (x sintesi ATP), ricorre ad un **gradiente di Na<sup>+</sup> (forza sodio-motrice)** per fornire l'energia necessaria per il trasporto e la motilità.

**Specie batteriche estremofile** possono crescere a

**pH ottimale ≤2**

**pH ottimale ≥9-10**

*Helicobacter pylori*: batterio patogeno, Gram negativo, microaerofilo, colonizza la mucosa gastrica.

Salvo alcuni casi, il pH intracellulare dei batteri deve mantenersi intorno alla neutralità (range 5 e 9), per evitare danni alle macromolecole → DNA (acido-labile) ed RNA (alcali-labile).

***Picrophilus oshimae* → pH intracellulare 4,6**

**basofili estremi → pH intracellulare 9,5.**



Nelle colture in laboratorio (colture in *batch*), in seguito all'attività metabolica dei microrganismi, potrebbero intervenire delle **variazioni di pH** che potrebbero interferire con la crescita.



Rappaport Vassiliadis (RV) Broth – da sinistra: provetta non inocolata, crescita di S. Enteritidis

#### DESTINAZIONE D'USO

Terreno per l'arricchimento selettivo delle salmonelle in campioni alimentari, ambientali e clinici.

#### FORMULA TIPICA \*

Triptone	4,54 g
Potassio fosfato monobasico	1,45 g
Sodio cloruro	7,2 g
Magnesio cloruro anidro	13,3 g
Verde malachite ossalato	0,036 g
Acqua purificata	1000 mL

\* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

**pH del terreno (5,2 ±0,2)**

Durante l'incubazione, per mantenere il pH nell'ambito di un range compatibile con la crescita del microrganismo studiato, prevedere l'aggiunta al terreno di coltura di idonee **sostanze tampone**:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato di potassio) → neutrofili

$\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato di sodio) → neutrofili

Tamponi di Good (12, di natura organica) → pH 6,15÷8,35

...

#### RAPPAPORT VASSILIADIS (RV) BROTH

Il **triptone** è una fonte di energia, di azoto e di carbonio per la crescita microbica; Il **verde malachite** è inibitorio verso i coliformi; l'alta pressione osmotica del terreno dovuta alle alte concentrazioni di **magnesio cloruro**, unitamente al **pH acido (5,2 ±0,2)**, agiscono da agenti inibitori della flora saprofitica, favorendo lo sviluppo nel brodo delle **salmonelle**.

Il **potassio fosfato monobasico** agisce da **sistema tampone**.



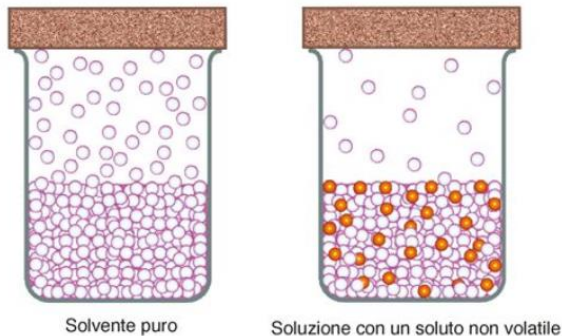
# OSMOLARITA' (disponibilità di acqua, concentrazione di soluti)

Tutti gli organismi viventi hanno bisogno di acqua per il loro metabolismo.

$H_2O \rightarrow 70-90\%$  del peso umido della cellula.

La **disponibilità di acqua** non dipende soltanto dall'umidità di un determinato ambiente o matrice, ma anche dalla concentrazione dei soluti (zuccheri, sali, etc.).

La pressione del gas in equilibrio con il liquido viene definita «**tensione di vapore**».



Effetto di un soluto non volatile sulla tensione di vapore di un solvente (ad una data temperatura).

Le **molecole del soluto** abbassano la **tensione di vapore** del solvente rispetto a quella del solvente puro, bloccando parzialmente la fuoriuscita delle molecole di solvente dalla superficie della soluzione.

L'acqua è il solvente della vita  
Solvente per gli enzimi microbici

L'acqua associata ai soluti (acqua legata) non è disponibile per le attività metaboliche dei microrganismi.

## disponibilità di acqua (attività dell'acqua $\rightarrow a_w$ )

Una parte dell'acqua è strettamente legata ai soluti e non è disponibile per le attività metaboliche dei microrganismi (i microrganismi hanno bisogno di **acqua libera**).

Il **grado di disponibilità dell'acqua**, in termini fisici, viene espresso come **attività dell'acqua ( $a_w$ )**

$$a_w = P_s / P_0 \quad 0 \leftarrow a_w \rightarrow 1$$

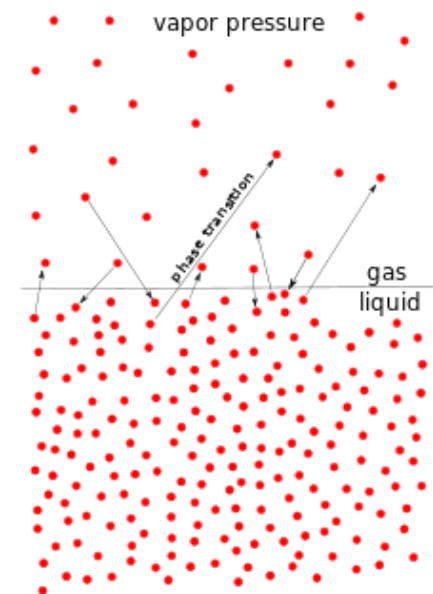
$P_s$  = pressione di vapore dell'acqua del substrato o della soluzione

$P_0$  = pressione di vapore dell'acqua pura.

L'**osmosi** è il processo in base al quale l'acqua si sposta da regioni a più bassa concentrazione di soluto a quelle a più alta concentrazione.

In genere, la concentrazione di soluti nel citoplasma batterico è superiore a quella dell'ambiente esterno, pertanto, l'acqua tende ad entrare, stabilendo un **equilibrio idrico positivo**.

Le cellule in un ambiente con una bassa attività dell'acqua tendono, invece, a perdere acqua, andando incontro a disidratazione o entrando in uno stato dormiente.



La **crecita batterica** è favorita dai substrati ad **elevato contenuto di acqua**.

L'acqua, però, deve essere in forma disponibile/accessibile ai microrganismi, non deve essere legata a componenti dei substrati.

In campo alimentare, per stabilizzare gli alimenti vengono aggiunti ingredienti (sale, zuccheri, proteine, ...) in grado di abbassare il contenuto di acqua libera.

$a_w$  → Parametro importante soprattutto in microbiologia alimentare!

### Microbiologia predittiva

Modelli di predizione delle risposte dei microrganismi al variare delle condizioni ambientali (T, pH,  $a_w$ , ...).

$a_w > 0,98$  è il valore ottimale per la maggior parte dei microrganismi.

Vengono considerati relativamente inalterabili gli alimenti con  $a_w < 0,90$

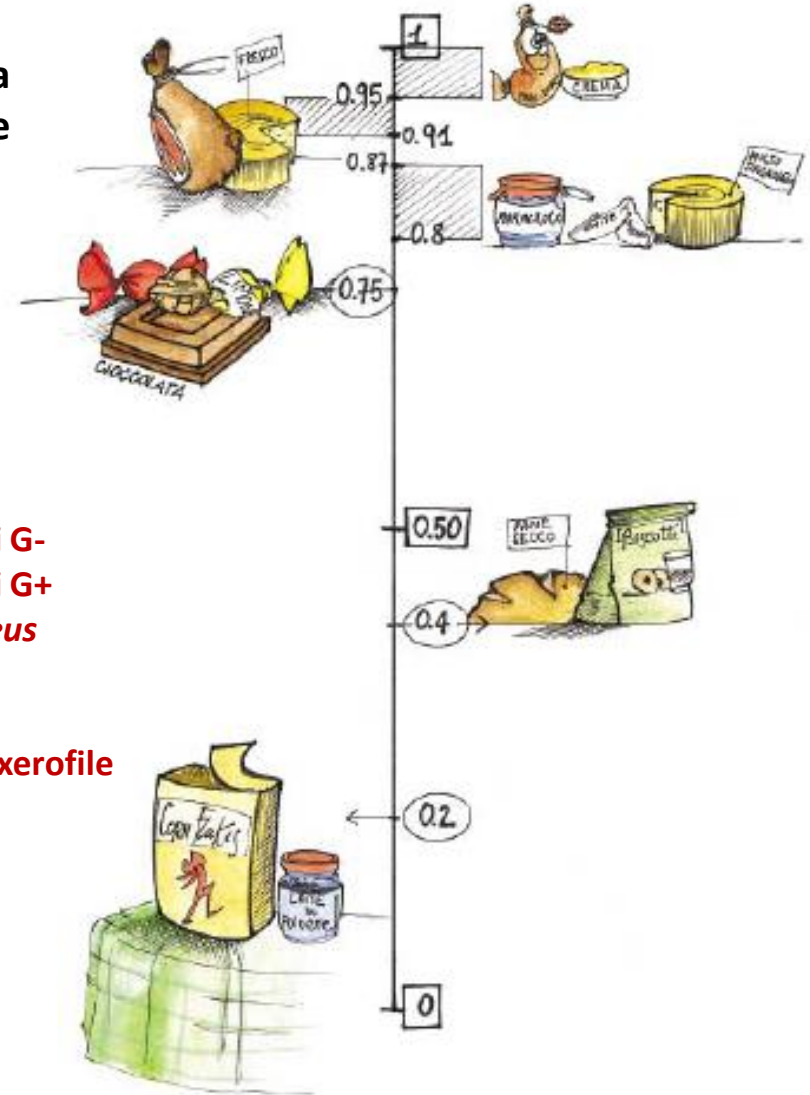
$a_w$

1,0  
0,9  
0,8  
0,7  
0,6  
0,5  
0,4  
0,3  
0,2  
0,1  
0,0

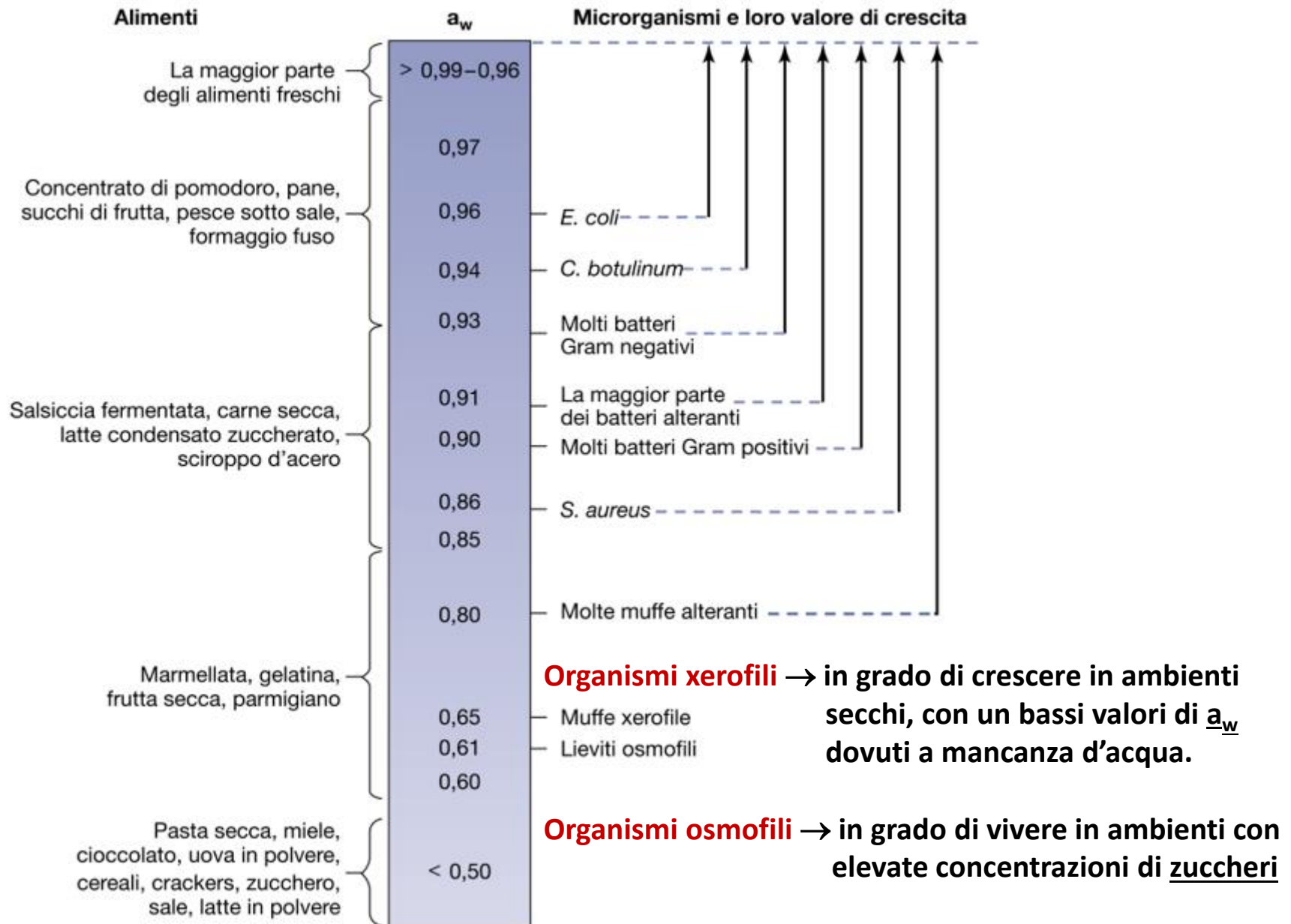
Batteri G-  
Batteri G+  
*S. aureus*  
muffe

muffe xerofile

Alimenti molto deperibili



Bassi valori di  $a_w$  inducono disidratazione (morte) dei microrganismi



**Organismi xerofili** → in grado di crescere in ambienti secchi, con un bassi valori di  $a_w$  dovuti a mancanza d'acqua.

**Organismi osmofili** → in grado di vivere in ambienti con elevate concentrazioni di zuccheri

Valori di  $a_w$  inferiori a 0,61 potrebbero rappresentare un limite alla vita degli organismi viventi (*Bacteria, Archaea, Eukarya*).

La quantità di acqua disponibile per i microrganismi può essere ridotta mediante

**Effetto osmotico** (interazione con molecole di soluto)

**Effetto matrice** (adsorbimento a superfici solide)

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

<b>Attività dell'acqua (<math>a_w</math>)</b>	<b>Materiale</b>	<b>Esempi di organismi<sup>a</sup></b>
1,000	Acqua pura	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0,995	Sangue umano	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0,980	Acqua marina	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0,950	Pane	La maggior parte dei bastoncini Gram-positivi
0,900	Sciroppo d'acero, prosciutto	Cocchi Gram-positivi come <i>Staphylococcus</i>
0,850	Salame	<i>Saccharomyces rouxii</i> (lievito)
0,800	Torte alla frutta, marmellate	<i>Saccharomyces bailii</i> , <i>Penicillium</i> (fungo)
0,750	Laghi salati, pesci salati	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0,700	Cereali, dolci, frutta secca	<i>Xeromyces bisporus</i> e altri funghi xerofili

<sup>a</sup> Esempi di procarioti o funghi capaci di crescere in un terreno di coltura con una determinata attività dell'acqua.

Evaporazione  
Essiccazione  
Congelamento  
Affumicamento  
...



**L'essiccazione** degli alimenti o **l'aggiunta di sale** (NaCl) o **zucchero** (saccarosio, sorbitolo), riducendo il valore di  $a_w$ , **prevengono il deterioramento degli alimenti**



## Concentrazione salina ed effetti osmotici

In base alle esigenze di **NaCl**, i microrganismi possono essere classificati in

- non alofili,
- alotolleranti,
- alofili,
- alofili estremi.

**Alotolleranti** → microrganismi in grado di tollerare basse concentrazioni saline (NaCl) o lievi riduzioni di  $a_w$ ; tuttavia, crescono meglio in assenza di soluti aggiunti.

**Alofili** → microrganismi, soprattutto marini, che per la loro crescita necessitano di **ioni sodio**; richiedono la presenza di NaCl (~3%), che non può essere sostituito da altri composti salini (KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ).

Optimum  $a_w$  → ~0,98.

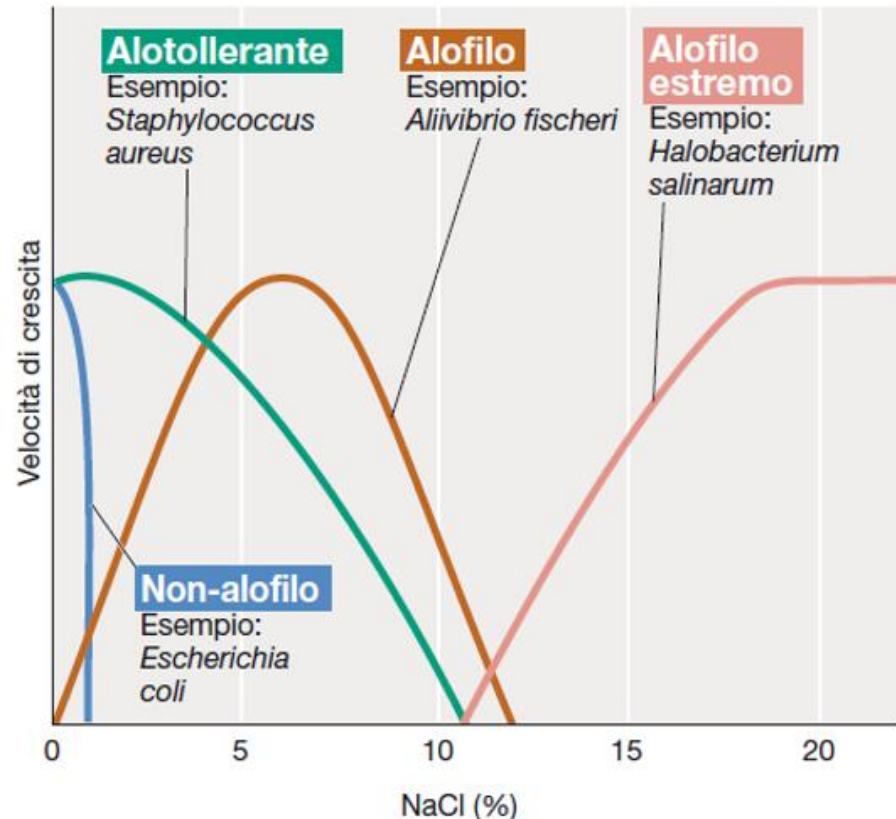
**Alofili estremi** → microrganismi (*Archaea*) che colonizzano ambienti con concentrazioni di soluti molto alte, vicino alla saturazione (NaCl ~36%).

*Halococcus* → presente nei cristalli di sale.

**Effetto della concentrazione di ioni sodio** →  
**sulla crescita di alcuni batteri**

Microrganismi diversi sono in grado di crescere entro diversi range di concentrazione di soluti.

Acqua di mare  
[NaCl] → ~3%



I batteri alofili possiedono una parete cellulare contenente una elevata percentuale di glicoproteine ricche di aminoacidi acidi (aspartato, glutammato).

Gli ioni  $\text{Na}^+$  legandosi alle cariche negative degli aminoacidi acidi stabilizzano la parete. Negli alofili, quando la concentrazione di  $\text{Na}^+$  scende al di sotto di un valore limite, le cariche negative non sufficientemente schermate si respingono.



**LISI DELLA CELLULA!**

Le proteine citoplasmatiche (molto acide) sono stabilizzate da ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mentre i ribosomi sono stabilizzati dagli ioni  $\text{K}^+$ .



© 2015

## Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications

Microbial Ecology

Editors ([view affiliations](#))

Jean-Claude Bertrand, Pierre Caumette, Philippe Lebaron, Robert Matheron, Philippe Normand,

Télesphore Sime-Ngando

### Resistance to Salt and Osmoregulation

- Accumulation of inorganic compounds in organic divalent ions ( $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) act at lower concentrations than monovalent ions ( $\text{K}^+$ ) and are therefore more effective. They have a role in maintaining the integrity of the cell envelope forming bridges between the hydrophilic poles of phospholipids or between the carbonyl groups of membrane proteins.

In extremely halophilic archaea (*Halobacterium*, etc.), there are  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  anti-ports that are very active and can replace the sodium with potassium, which in turn accumulates in the cytoplasm. This accumulation of potassium compensates the osmotic pressure due to the extreme salinity. The cell wall is stabilized by the  $\text{Na}^+$  ions that bind to negatively charged amino acids (aspartate, glutamate) glycoproteins. Thus, the cell is surrounded by sodium ions binding to the outside of the wall. When the sodium concentration decreases, the wall breaks because of the negative charge of the proteins, and the cell is lysed. The cytoplasmic proteins are also very acidic and  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  are required to maintain the internal pH. Similarly,  $\text{K}^+$  ions stabilize the ribosomes.

- Accumulation of organic compounds (cf. Sect. 10.4.2)  
In halophilic bacteria, osmotic pressure compensation is effected mainly through the accumulation of organic compounds in the cytoplasm. These osmoregulatory compounds are accumulated and do not interfere with the cellular metabolism; they are called “compatible solutes,” that is to say that their accumulation is neutral and compatible with cell life. They are generally sugars or disaccharides especially betaines which are organic compounds derived from amino acids (Fig. 9.25). The most frequently observed compound is glycine betaine. This compound is present in many halophilic or salt-tolerant bacteria and in many organisms or animals where it plays an osmoregulatory role. Glycine betaine has been detected and analyzed in aerobic heterotrophic bacteria submitted to salt stress (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*) (Galinski and Trüper 1982; Le Rudulier and Bouillard 1983; Imhoff 1988; Mouné et al. 1999).

In ambienti con bassa  $a_w$  i microrganismi avrebbero difficoltà a trattenere acqua.

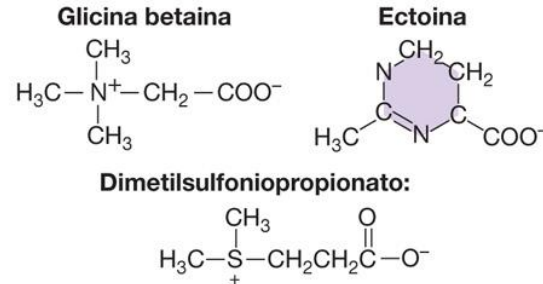
Per richiamare acqua dall'ambiente per osmosi è necessario aumentare la concentrazione di soluti all'interno della cellula.

Assunzione di soluti dall'esterno (ioni inorganici, molecole)

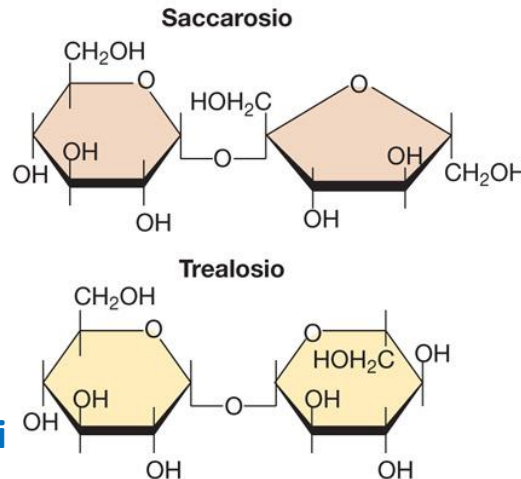
Sintetizzando soluti (soluti compatibili)

- aminoacidi e derivati
- zuccheri
- alcoli
- ...

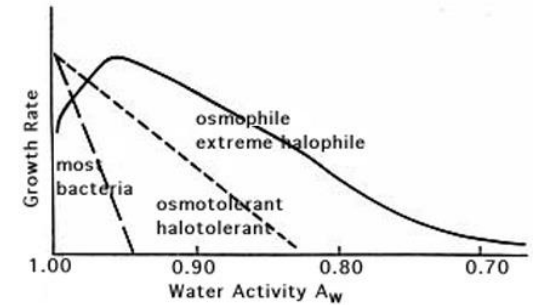
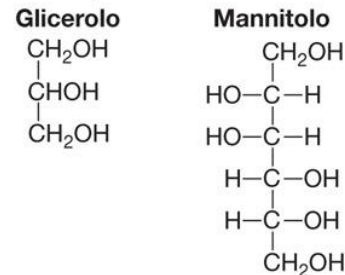
### 1. Aminoacidi soluti compatibili:



### 2. Carboidrati soluti compatibili:

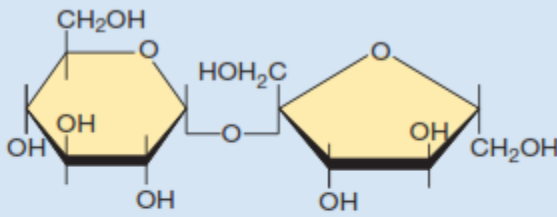
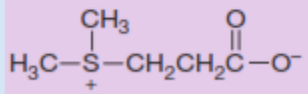
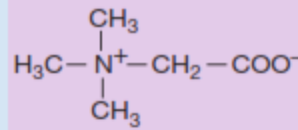
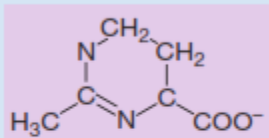
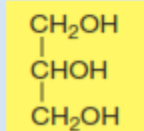


### 3. Alcoli soluti compatibili:

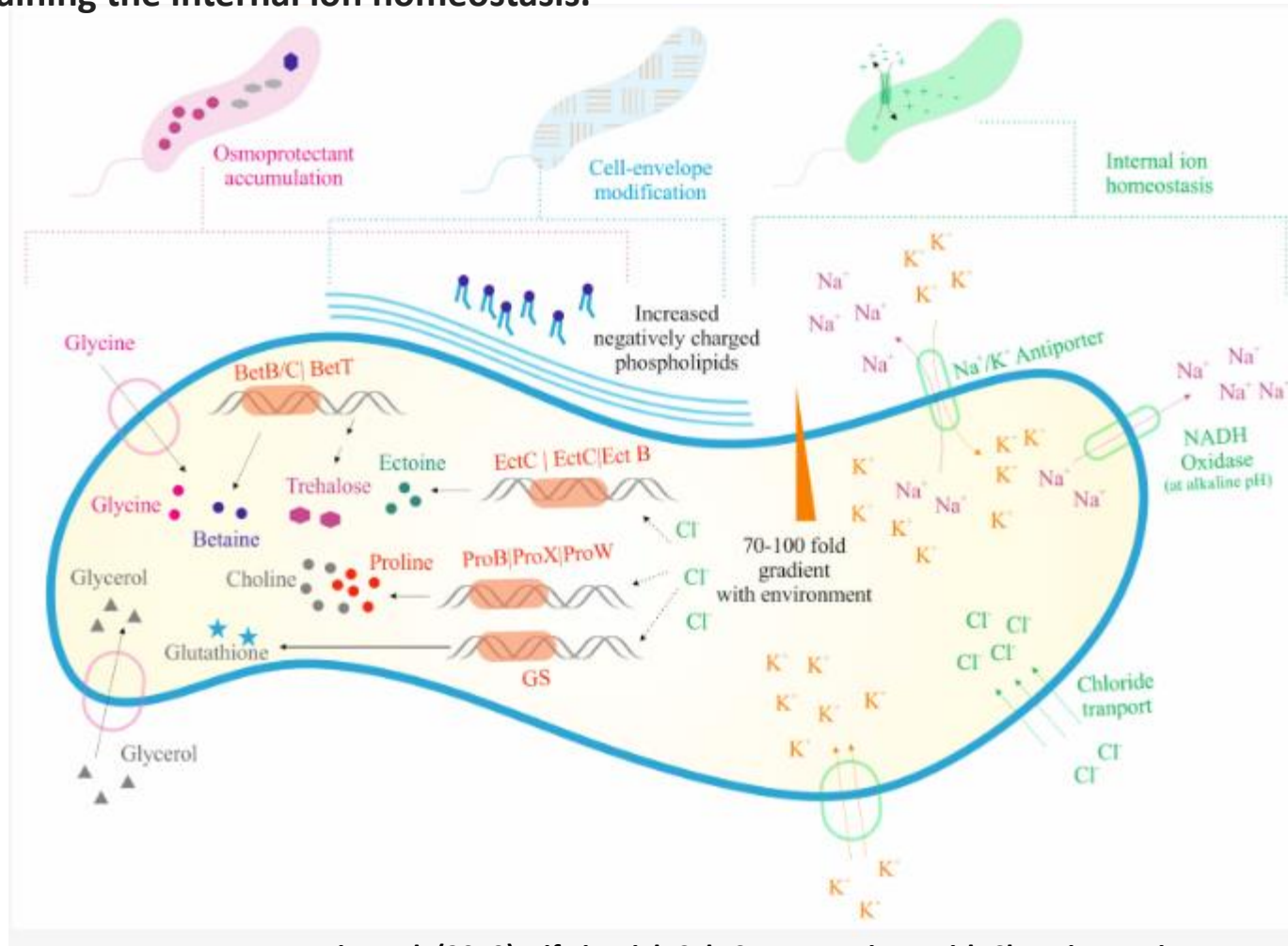


Microrganismi in grado di accumulare soluti riescono a vivere in ambienti con bassa disponibilità di acqua ( $\downarrow a_w$ ).

# Compatible solutes of microorganisms

Organism	Major cytoplasmic solute(s)	Minimum $a_w$ for growth	
Nonphototrophic <i>Bacteria</i> /freshwater cyanobacteria	Amino acids (mainly glutamate or proline <sup>a</sup> )/sucrose, trehalose <sup>b</sup>	0.98–0.90	 <p style="text-align: center;"><b>Sucrose</b></p>
Marine cyanobacteria	$\alpha$ -Glucosylglycerol <sup>b</sup>	0.92	
Marine algae	Mannitol, <sup>b</sup> various glycosides, dimethylsulfoniopropionate	0.92	 <p style="text-align: center;"><b>Dimethylsulfoniopropionate</b></p>
Salt lake cyanobacteria	Glycine betaine	0.90–0.75	 <p style="text-align: center;"><b>Glycine betaine</b></p>
Halophilic anoxygenic phototrophic purple <i>Bacteria</i>	Glycine betaine, ectoine, trehalose <sup>b</sup>	0.90–0.75	 <p style="text-align: center;"><b>Ectoine</b></p>
Extremely halophilic <i>Archaea</i> and some <i>Bacteria</i>	KCl	0.75	
<i>Dunaliella</i> (halophilic green alga)	Glycerol	0.75	
Xerophilic and osmophilic yeasts	Glycerol	0.83–0.62	
Xerophilic filamentous fungi	Glycerol	0.72–0.61	 <p style="text-align: center;"><b>Glycerol</b></p>

A schematic representation of salt tolerance mechanisms in *Salinivibrio* sp. HTSP based on genome analysis. Genes involved in **osmoprotectant accumulation** and **biosynthesis** such as ectoine, choline, betaine, glycerol, etc. are found in the cell. Various ion transporters such as the **potassium transporter**, **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> antiporter**, and **Cl<sup>-</sup> transporters** were detected for maintaining the internal ion homeostasis.



Joey et al. (2019). Life in High Salt Concentrations with Changing Environmental Conditions: Insights from Genomic and Phenotypic Analysis of *Salinivibrio* sp. - *Microorganisms*, 7(11), 577;



# Relazioni [ossigeno] ↔ crescita microbica

## Chemiotrofi

Per la conservazione dell'energia, nei processi respiratori, è necessario un sistema di trasporto degli e<sup>-</sup>



Accettore terminale di e<sup>-</sup> ottenuto dall'ambiente esterno.  
La natura dell'accettore è correlata al metabolismo del microorganismo.

## Relazioni dei microrganismi con l'ossigeno

Concentrazione atmosferica dell'O<sub>2</sub> → 21%

Gruppo	Relazione con l'O <sub>2</sub>	Tipo di metabolismo	Esempio <sup>a</sup>	Habitat <sup>b</sup>
<b>Aerobi</b>				
Obbligati	Richiesta	Respirazione aerobica	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Pelle, polvere
Facoltativi	Non richiesta, ma crescono meglio in presenza di O <sub>2</sub>	Respirazione aerobica, anaerobica, fermentazione	<i>Escherichia coli</i> (B)	Intestino dei mammiferi
Microaerofili	Richiesta ma a livelli inferiori rispetto a quelli atmosferici	Respirazione aerobica	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Acqua lacustre
<b>Anaerobi</b>				
Aerotolleranti	Non richiesta, e non crescono meglio in presenza di O <sub>2</sub>	Fermentazione	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Tratto respiratorio superiore
Obbligati	Dannosa o letale	Fermentazione o respirazione anaerobica	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Impianti di trattamento delle acque luride, sedimenti lacustri anossici

<sup>a</sup> Le lettere tra parentesi indicano lo stato filogenetico (B, Batteri; A, Archea). In ciascuna categoria sono noti rappresentanti di entrambi i domini di procarioti. La maggior parte degli eucarioti sono aerobi obbligati, ma si conoscono aerobi facoltativi (per esempio i lieviti) e anaerobi obbligati (per esempio alcuni protozoi e funghi).

<sup>b</sup> Sono elencati i tipici habitat dell'organismo preso ad esempio.

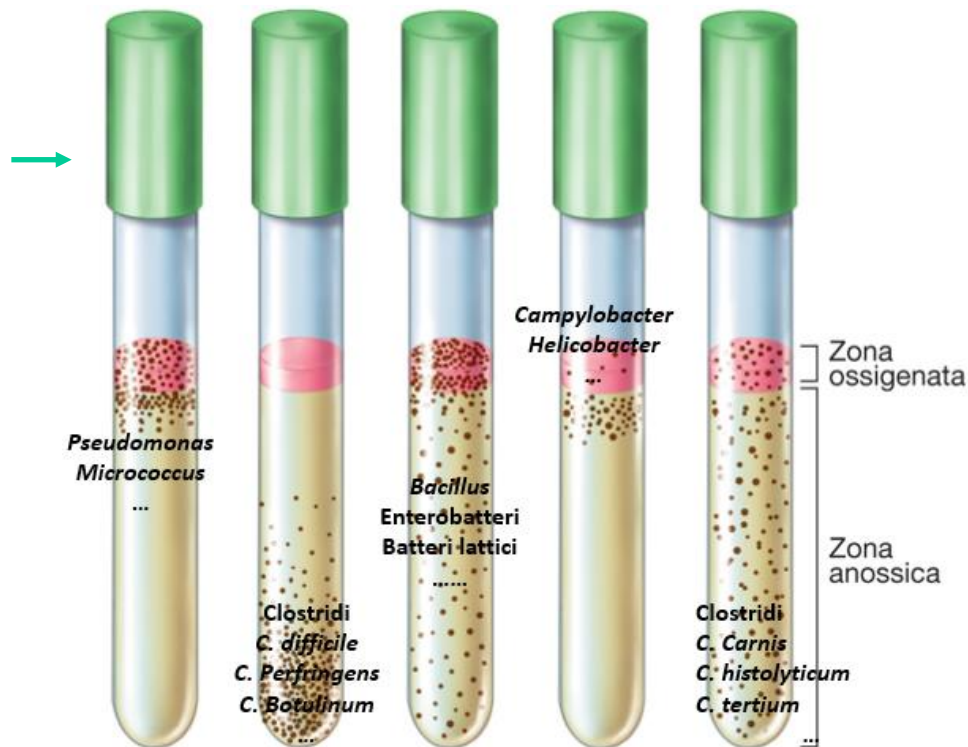
- Aerobi obbligati ( $O_2 \rightarrow 21\%$ )
  - Anaerobi stretti (inibiti o uccisi dall' $O_2$ )
  - Anaerobi facoltativi o aerobi-anaerobi facoltativi
  - Microaerofili (crescono in presenza di basse concentrazioni di  $O_2$ )
  - Anaerobi aerotolleranti (fermentanti)
- } *Bacteria (Clostridium, ...), Archaea (metanogeni, ...)*  
 } *Eukarya*  
 } Alcuni funghi  
 } Alcuni protozoi

Provette di brodo al **tioglicolato** (agente riducente), con aggiunta di **resazzurina** (indicatore redox) ed una bassa concentrazione di **agar**.  
 La resazzurina permette di rendere visibili le zone in cui è presente l' $O_2$ .

### THIOGLYCOLATE MEDIUM

Terreno liquido d'uso generale per la coltivazione di batteri aerobi, anaerobi, aerobi-anaerobi facoltativi, microaerofili, aerotolleranti da campioni clinici e da altri materiali. Indicato per il test di sterilità batterica in accordo al metodo armonizzato EP, USP, JP.

Digerito pancreatico di caseina	15 g/L
Estratto di lievito	5 g/L
Glucosio monoidrato	5,5 g/L
Sodio cloruro	2,5 g/L
L-cistina	0,5 g/L
Sodio tioglicolato	0,5 g/L
Resazzurina	0,001 g/L
Agar	0,75 g/L





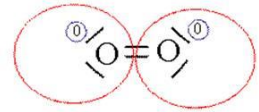
# Effects of Oxygen on Bacteria

- **Obligate Aerobes**—“strict aerobes”; oxygen required
- **Facultative Anaerobes**—both aerobic and anaerobic growth; greater growth in presence of oxygen
- **Obligate Anaerobes**—“strict anaerobes” only anaerobic growth; dies in presence of oxygen
- **Aerotolerant Anaerobes**—only anaerobic growth; but continues in presence of oxygen
- **Microaerophiles**—only aerobic growth; oxygen required in low concentration
- **Capnophiles**—microbes that grow better at high CO<sub>2</sub> concentrations; low oxygen high carbon dioxide conditions (resembles those found in the intestinal tract)

*Capnocytophaga* - genere di batteri bastoncellari Gram negativi a lenta crescita; si muovono per scivolamento e fanno parte della normale popolazione microbica del cavo orofaringeo.

**Il diverso comportamento rispetto all'O<sub>2</sub> è correlato a diversi fattori:**

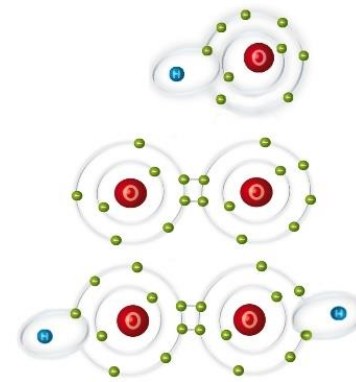
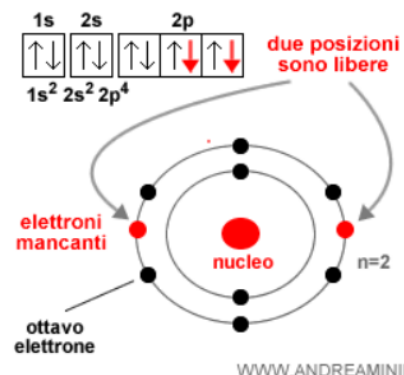
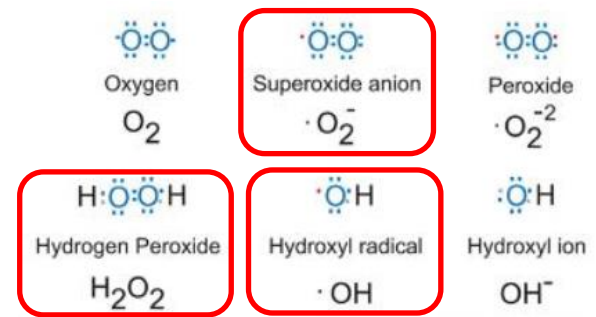
- Inattivazione delle proteine (ossidazione dei gruppi sensibili → sulfidrilici)
- Derivati tossici dell'O<sub>2</sub> durante la riduzione dell'O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O
- ...



Inattivazione dell'enzima **nitrogenasi** (fissazione dell'azoto)

L'Ossigeno ha una forte tendenza a ridursi, legata alla presenza di **2 e<sup>-</sup> spaiati** nel suo orbitale esterno. Durante la riduzione dell'O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O si formano alcuni prodotti tossici:

- **Radicale (anione) superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**
- **Perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**
- **Radicale ossidrilico o idrossile (OH<sup>•</sup>)**



= OH<sup>•</sup>  
Hydroxyl-Radikal

**Radicale ossidrilico o idrossile ha un solo elettrone spaiato**

= O<sub>2</sub><sup>•-</sup>  
Superoxid-Radikal

**Radicale (anione) superossido ha un elettrone in più**

= ·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>•</sup>  
Wasserstoffperoxid

La tossicità, legata al **forte potere ossidante dei derivati dell'ossigeno**, induce la **distruzione dei costituenti cellulari**.

# Forme tossiche dell'ossigeno

Ossigeno singoletto  $^1O_2$

Prodotto da reazioni fotochimiche e biochimiche;  
Viene inattivato dall'azione dei carotenoidi.



Forma tossica dell'ossigeno altamente reattiva  
(potente ossidante in grado di distruggere la cellula)

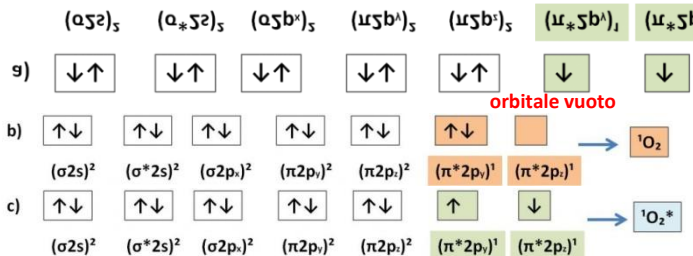
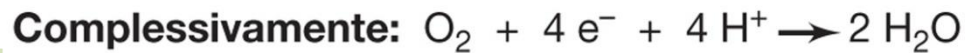
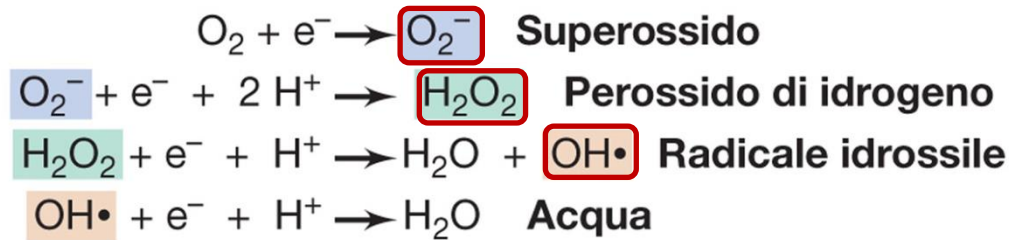


Reagisce con molte molecole di interesse biologico:

- Attacca i doppi legami dei caroteni, delle clorofille e degli acidi grassi insaturi.
- Danneggia i polipeptidi (ossidazione dei residui di metionina, triptofano, istidina e cisteina).
- Danneggia il DNA (ossidazione delle basi puriniche e pirimidiniche).

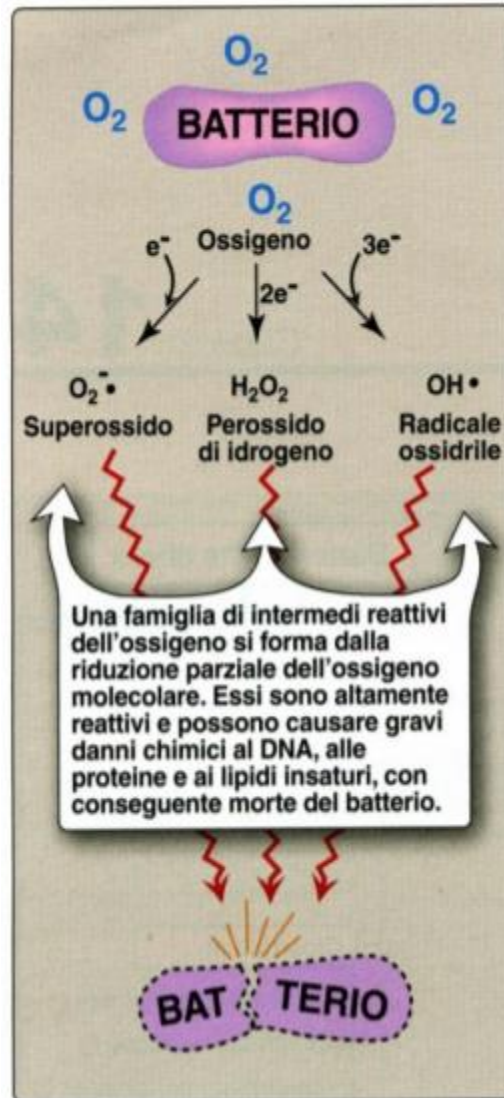
Altre forme tossiche dell'ossigeno si formano durante la respirazione come prodotti secondari della riduzione dell' $O_2$  ad  $H_2O$ .

La riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua avviene mediante l'aggiunta di 4 e<sup>-</sup>.



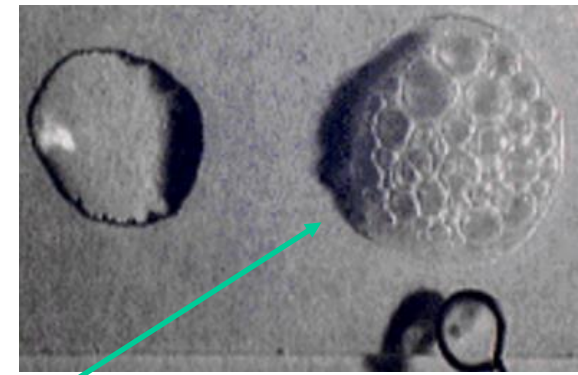
$^3O_2$  Ossigeno tripletto:  
forma con basso livello di energia e quasi mai presente in natura



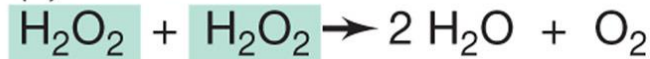


**I microrganismi che vivono in ambienti ossici hanno evoluto sistemi enzimatici per inattivare i derivati tossici dell'O<sub>2</sub>:**

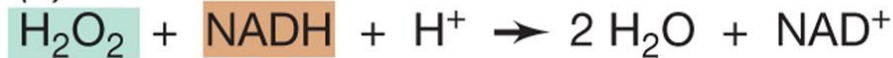
- Catalasi
- Perossidasi
- Superossido dismutasi
- Superossido reduttasi



(a) **Catalasi:**

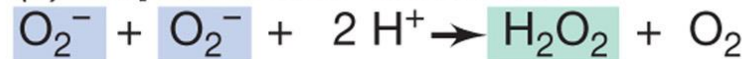


(b) **Perossidasi:**



(c) **Superossido dismutasi:**

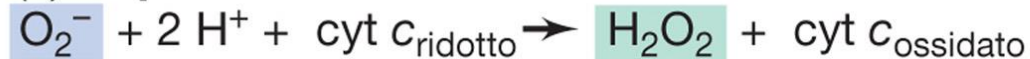
**anione superossido**



(d) **Superossido dismutasi/catalasi in combinazione:**



(e) **Superossido riduttasi:**



Alcuni procarioti **anaerobi obbligati** possiedono l'enzima **superossido riduttasi**: produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ma **non di O<sub>2</sub>**.

**Enzimi perossidasi-simili rimuovono H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con produzione di H<sub>2</sub>O**



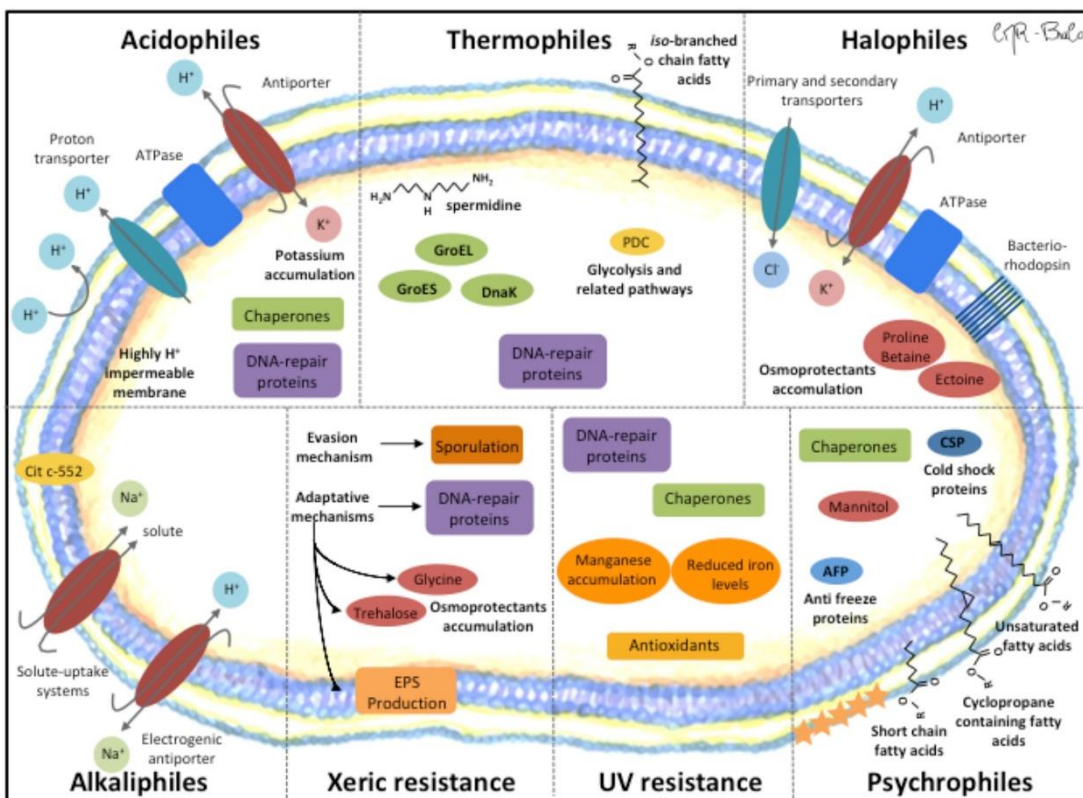
**Giare per anaerobiosi**

## **Tecniche di incubazione in condizioni di anaerobiosi e microaerofilia**



**Cappa per anaerobiosi**





Orellana et al. (2018) **Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation.** *Front. Microbiol.* 9:2309

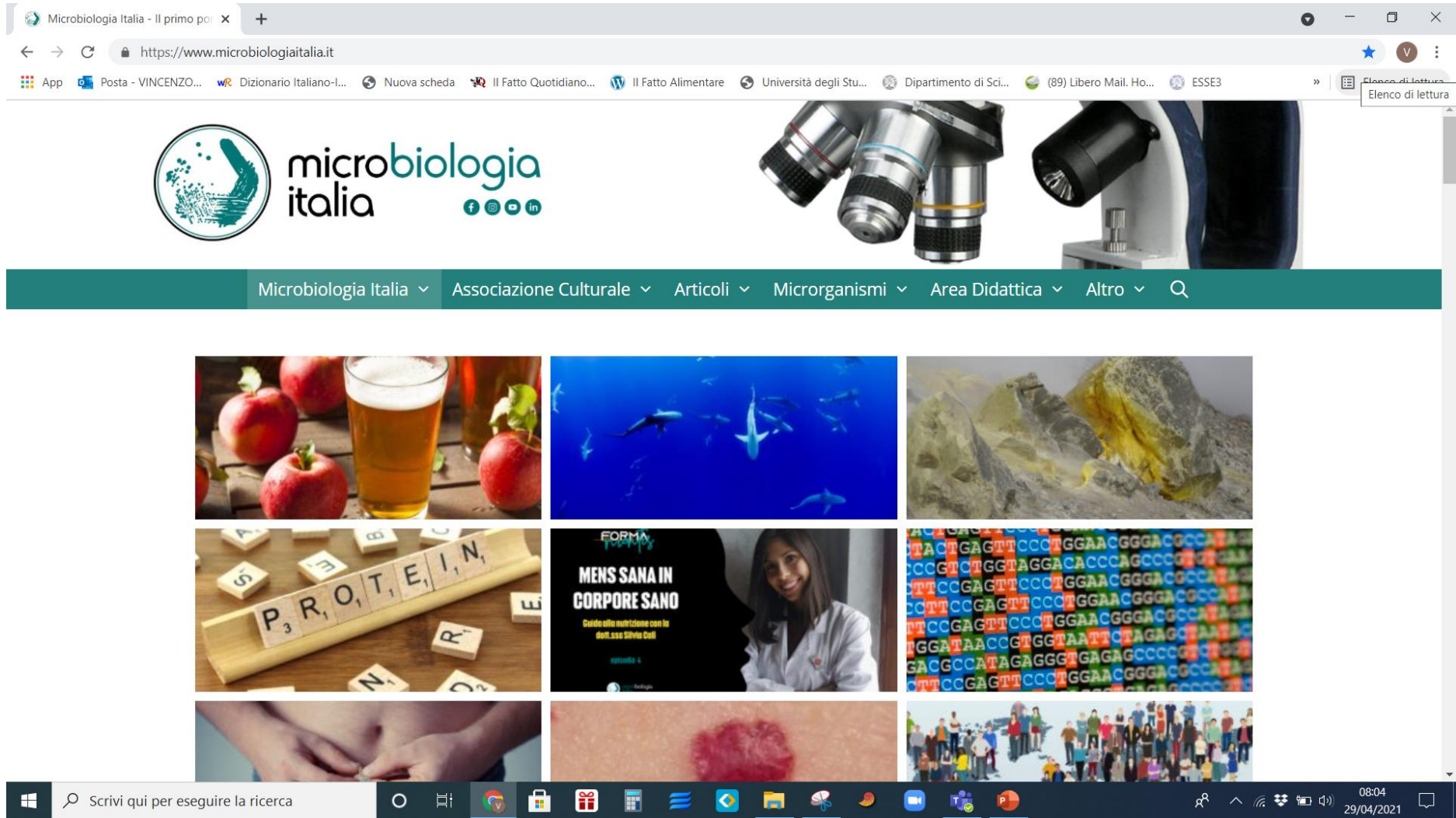
**Molecular mechanisms of extremophiles for their adaptation to extreme environmental conditions.**

**Acidophiles.** (i) Potassium antiporter releases protons towards the extracellular medium, (ii) ATP synthase, (iii) membrane highly impermeable to protons, (iv) Chaperones, and (v) DNA-repair proteins.

**Thermophiles.** (i) Upregulated glycolysis proteins (e.g., pyruvate dehydrogenase complex (PDC)), (ii) Lipids with iso-branched chain fatty acids and long chain dicarboxylic fatty acids, (iii) polyamines (spermidine), and (iv) Chaperones.

**Halophiles.** (I) **High salt-in strategy:** (i) chloride transporters (primary or secondary), (ii) potassium uptake into cells by concerted action of bacteriorhodopsin and ATP synthase. (II) **Low-salt strategy:** (i) de novo synthesis or uptake of osmoprotectants (proline-betaine, ectoine) that maintain osmotic balance and establish the proper turgor pressure under different salt concentration. **Psychrophiles.** (i) high degree of unsaturated, cyclopropane containing fatty acids and short chain fatty acids, (ii) Cold shock proteins (CSP) (iii) Chaperones, (iv) Anti-freeze proteins (AFP) restrict the ice growth on protein surfaces, (v) Mannitol and other compatible solutes accumulate in the cell cytoplasm as cryo-protectants to prevent protein aggregation, and (vi) Carotenoids (star symbols) support maintenance of membrane fluidity and prevent cell damage by UV radiation. **UV resistance.** (i) Manganese accumulation and reduced iron levels, (ii) Antioxidants (glutathione), (iii) Chaperones, and (iv) DNA-repair proteins. **Xeric resistance.** (I) Evasion mechanism: (i) bacteria sporulation. (II) Adaptation mechanism: (i) increased extracellular polymeric substances (EPS), (ii) DNA-repair proteins, and (iii) accumulation of osmoprotectants (glycine, trehalose). **Alkaliphiles.** (i) Electrochemical gradient of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> by electrogenic antiporters for proton accumulation, (ii) Na<sup>+</sup>-solute uptake system, and (iii) Cytochrome c-552 enhance terminal oxidation function by electron and H<sup>+</sup> accumulation.





<https://www.microbiologiaitalia.it/>



Sito divulgativo di microbiologia