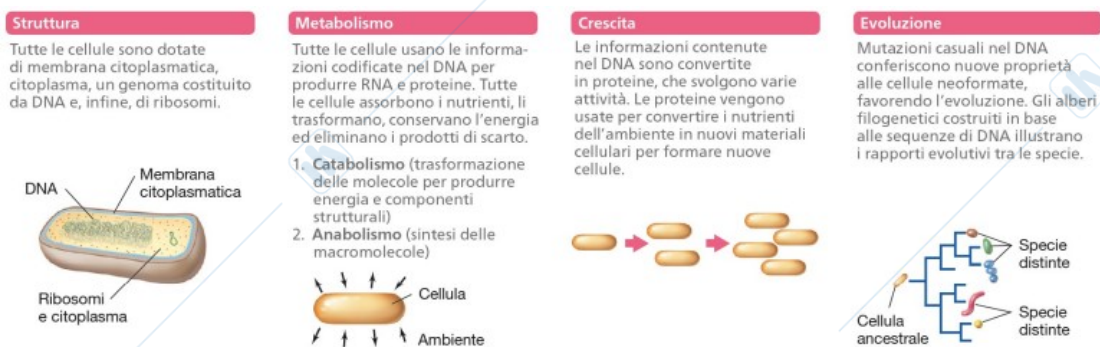


CELLULE MICROBICHE

Le cellule microbiche sono compartimenti viventi che interagiscono in modo dinamico con il loro ambiente e con altre cellule. Nel cominciare ad analizzare le loro caratteristiche, si escludono i virus, poiché non sono considerati cellule ma appartengono ad un'altra categoria di microrganismi.

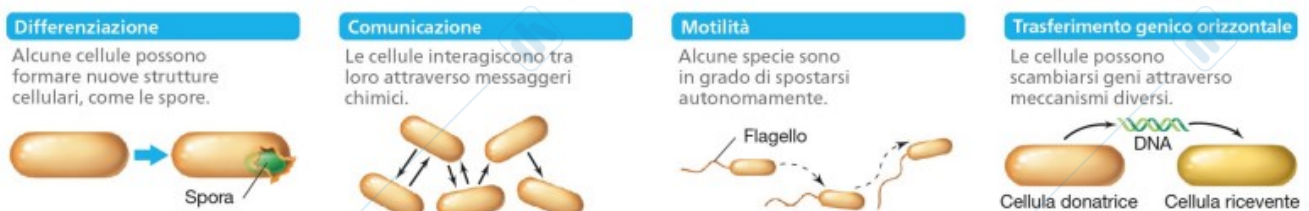
Caratteristiche/funzioni appartenenti a **tutte le cellule microbiche**:

- **Struttura composta da:**
 - o **Membrana citoplasmatica:** separa l'ambiente interno della cellula da quello esterno;
 - o **Citoplasma:** è una miscela acquosa di macromolecole e piccole molecole presente all'interno della cellula;
 - o **Genoma:** DNA o RNA, circolare o esteso
 - o **Parete cellulare:** non presente solo in alcune cellule animali, conferisce forza strutturale alla cellula;
 - o **Ribosomi** che svolgono la sintesi proteica;
 - o **Metabolismo:** tutte le cellule interagiscono con l'ambiente grazie al succedersi di eventi catalitici e genetici;
 - o **Crescita:** aumento del numero di microrganismi in seguito a divisione cellulare;
 - o **Evoluzione:** processo di discendenza con modificazioni in cui vengono scelte varianti genetiche in base al successo riproduttivo.



Caratteristiche/funzioni appartenenti ad **alcune** cellule microbiche:

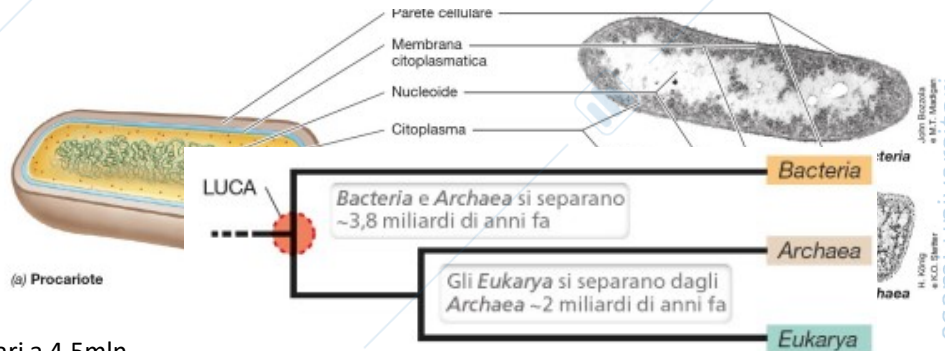
- **Differenziazione:** che può portare a cellule specializzate per la crescita/disseminazione/sopravvivenza (es. formazione di spore)
- **Motilità**
- **Comunicazione:** generazione di una risposta in seguito a contatti con altri organismi, segnali chimici, ...
- **Trasferimento genico orizzontale**



È stato ipotizzato che tutti gli esseri viventi discendano da un antenato comune detto **LUCA (Last Universal Common Ancestor)**. Lungo il percorso, l'evoluzione e lo scambio genetico hanno dato origine a due principali varianti con particolari caratteristiche che gli hanno garantito la sopravvivenza. Ad oggi suddividiamo tutti gli organismi viventi in **3 domini: Bacteria, Archaea**, che comprendono gli organismi **PROCARIOTI**, ed **Eukarya** che comprende tutti gli organismi **EUCARIOTI**

➤ Le **cellule procariotiche** sono cellule strutturalmente piuttosto semplici e di dimensioni molto minori rispetto a quelle eucariotiche (**1-10 μm VS 10-100 μm**)

- Parete cellulare
- Membrana citoplasmatica
- Citoplasma
- **Nucleoide:** è diverso da un nucleo, poiché rappresenta solo la zona dove è situato il genoma (DNA batterico di basi pari a 4.5mln es. Escherichia coli)

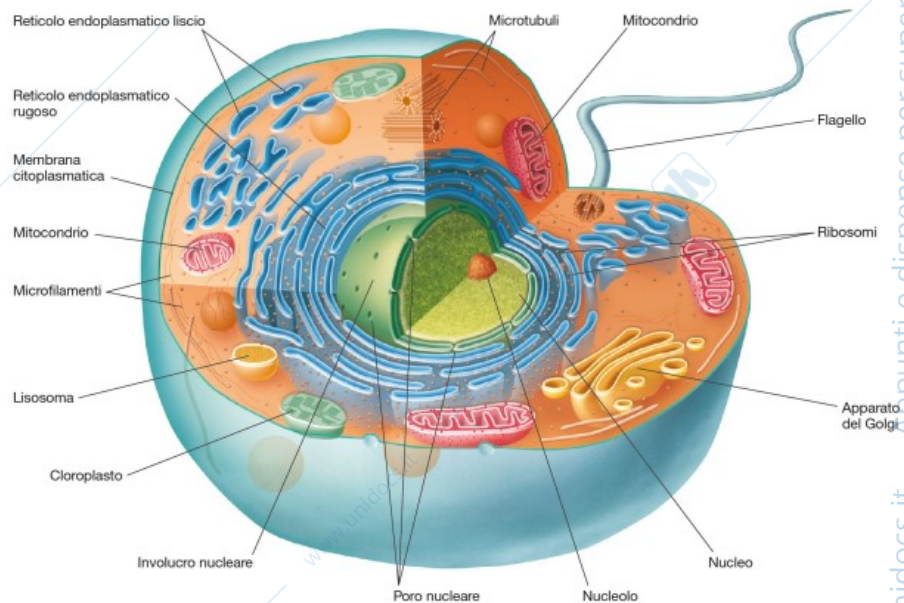


- **Plasmide:** sono molecole di DNA circolare molto piccole (tra 5000-200.000 nucleotidi vs 1mld di un genoma di una cellula umana)

- Ribosomi

Per le **eucariotiche:**

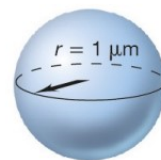
- Parete cellulare
- Membrana citoplasmatica
- Citoplasma
- **Nucleo:** involucro del genoma DNA che è legato/avvolto a delle proteine dette istoni
- **Membrana Nucleare**
- **Mitocondrio:** serve per la respirazione, e la produzione di ATP
- **Reticolo endoplasmatico:**
- **Apparato del Golgi**
- Ribosomi



Il perché delle **dimensioni cellulari** di procarioti ed eucarioti trova risposta nella costruzione del rapporto Superficie/Volume, che deve essere tale da:

- permettere un buon apporto costante di energia e nutrienti
- permettere lo scambio di sostanze tra le componenti interne e con l'ambiente

Questo è anche il motivo per cui molti batteri hanno trovato il modo di aumentare la loro dimensione senza penalizzare il rapporto S/V,

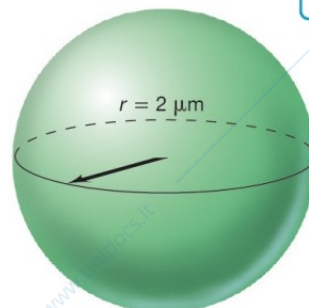


$$r = 1 \mu\text{m}$$

$$\text{Superficie } (4\pi r^2) = 12,6 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Volume } (\frac{4}{3}\pi r^3) = 4,2 \mu\text{m}^3$$

$$\frac{\text{Superficie}}{\text{Volume}} = \frac{3}{r} = 3$$



$$r = 2 \mu\text{m}$$

$$\text{Superficie} = 50,3 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Volume} = 33,5 \mu\text{m}^3$$

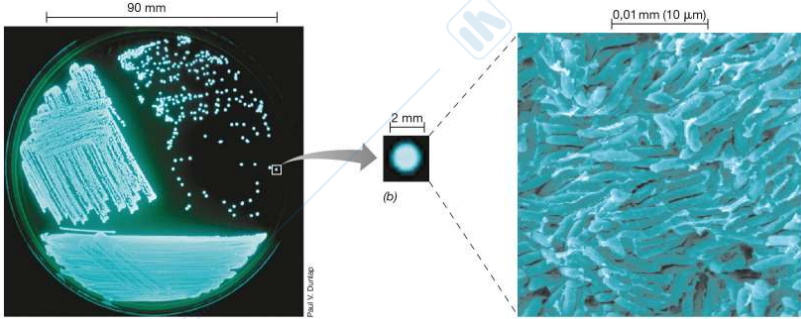
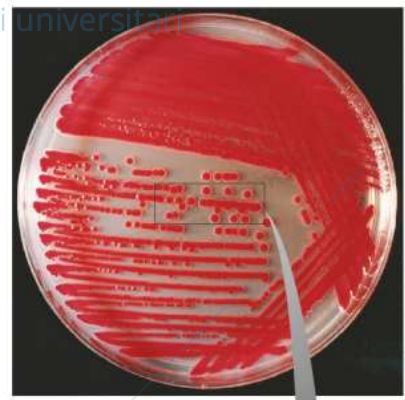
$$\frac{\text{Superficie}}{\text{Volume}} = \frac{3}{r} = 1,5$$



allungandosi. **La forma ovale infatti è tipica**, e grazie a questo sistema alcuni batteri riescono a raggiungere dimensioni pari a centinaia di μm (max 600 μm).

CARATTERISTICHE DEI BATTERI

- I microrganismi/batteri si organizzano in comunità, e ciò siamo in grado di vederlo grazie a microscopi **a contrasto di fase**, che sono in grado di visualizzare anche questi batteri meno individuabili perché non "colorati".



Altri esempi di colonie batteriche su piastre Petri:

- Vivono in **ogni tipo di habitat** (aerobi o anaerobi), anche estremi (a livelli di T, Pressione o pH estremi) e per questo vengono classificati in base a ciò:

- Termofili:** resistenti a elevate temperature
- Psicrofili:** resistenti a basse temperature
- Acidofili:** resistenti a pH acidi (<4)
- Alcalofili:** resistenti a pH basici (>10)
- Alofili:** resistenti a elevate concentrazioni marine

- Hanno varie **forme**:

- **Forma sferica:**

- Cocchi;
- Diplococchi se 2 sfere agganciate
- Streptococchi: sfere attaccate l'una all'altra fino a formare una catena
- Stafilococchi: se vivono in cluster (gruppetti)

- **Bastoncelli:**

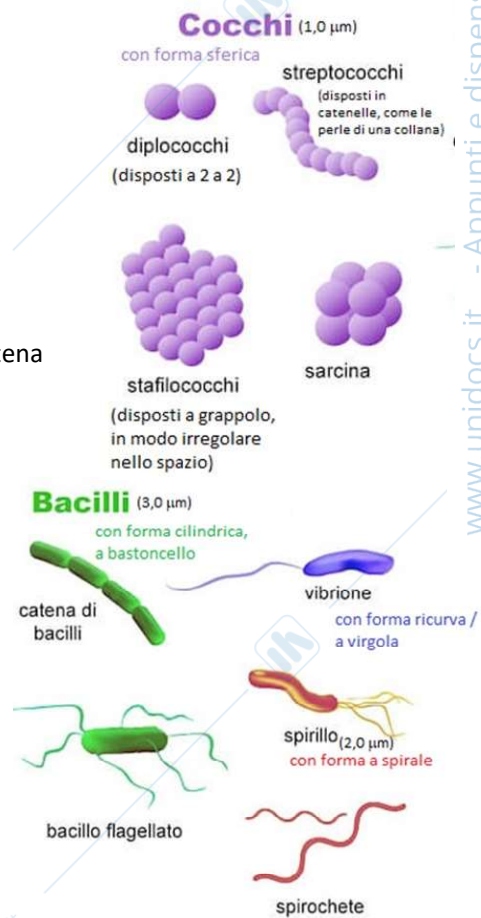
- Bacilli
- Streptobacilli se in catene

- **Cavatappi rigido:** → forma che permette tramite la roteazione di penetrare attraverso membrane/altre strutture

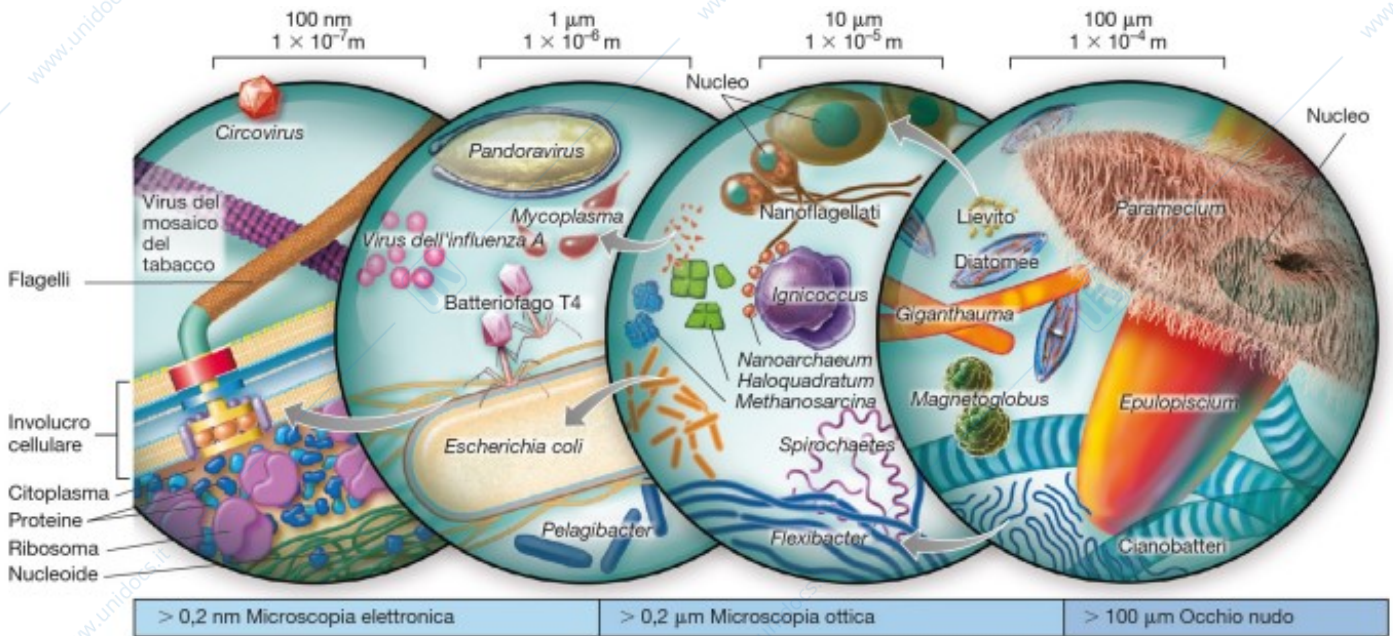
- Spirilli
- Spirocheti se flessibili

- **A forme gemmate o pedunculato**

- **Filamentosa:** molto flessibili e allungati



Tipologie di microscopi e sensibilità relativa:



Questi esempi sopra mostrati mostrano le varie unità di misura cellulari e come siano osservabili. Si parla infatti di microscopi ottici ed elettronici: i primi permettono la visione di cellule ad un ingrandimento relativamente basso (limite di risoluzione = 0,2μm), mentre il secondo consente di osservare le cellule e le strutture cellulari ad un ingrandimento molto elevato (limite di risoluzione = 0,2nm).

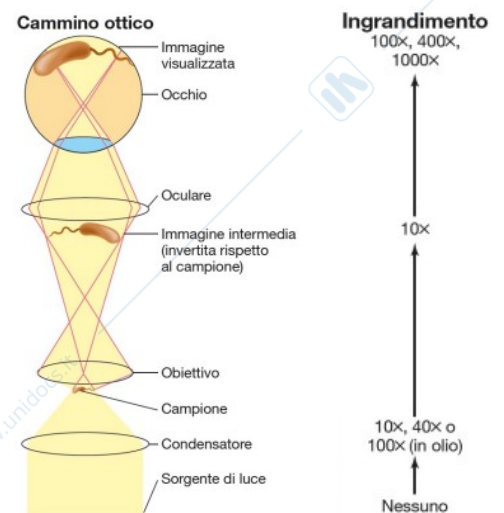
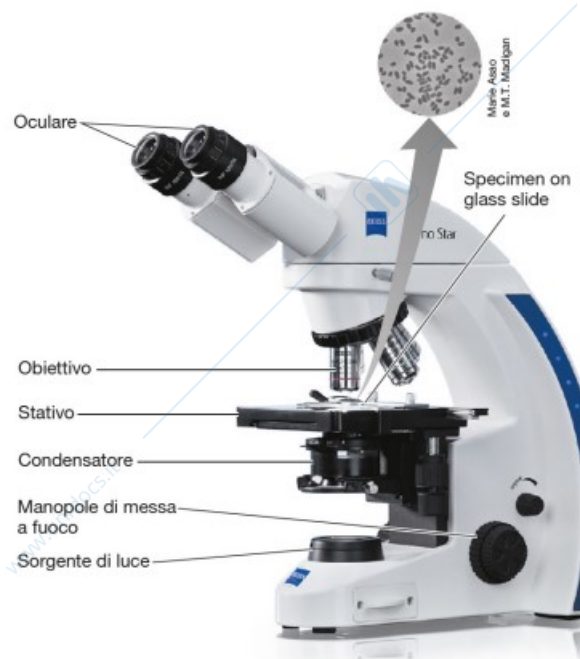
MICROSCOPIA OTTICA = limite di risoluzione 0,2μm

Un microscopio è composto da:

- **Oculare:** lenti senza supplementi ingrandisce di un ordine di grandezza (solitamente 10x, ma può arrivare a 30x)
- **Tamburo:** supporto metallico con alloggiamento per obiettivi. Esso ruota e grazie a ciò si può selezionare la tipologia di obiettivo
- **Obiettivo:** lente solitamente a contrasto di fase → è il punto focale
 - o può ingrandire 10x, 50x, 100x
- **Sorgente di luce** focalizzata sul preparato mediante il condensatore

L'ingrandimento totale è dato da **oculare x obiettivo**

Si può iniziare a vedere un batterio con un ingrandimento totale pari a 400x, mentre con 1000x si vede molto bene, anche se scuro.



Esistono **vari tipi** di microscopio ottico, che sono:

- **In campo chiaro**
 - **A contrasto di fase**
 - **In campo oscuro**
 - **A fluorescenza**
 - **A contrasto di fase interferenziale**
 - **Confocale a scansione laser**
- } visione 3D

! ogni microscopio permette di vedere certe cose mentre altre le oscura !

- *Ognuno possiede vantaggi e svantaggi*

MICROSCOPIA IN CAMPO CHIARO:

La microscopia in campo chiaro è la più semplice delle tecniche di microscopia. Questa tecnica è utile per tutti quei campioni che possiedono un contrasto sufficientemente elevato per essere distinti dallo sfondo del preparato, o per gli esemplari che possono essere facilmente colorati con coloranti.

Il contrasto del soggetto è causato dall'assorbimento di una parte della luce trasmessa in aree ad alta densità del campione, il risultato è un'immagine scura su uno sfondo luminoso, da cui il nome.

Icoloranti organici: hanno affinità con certe componenti/materiali cellulari rispetto ad altre. I cosiddetti *coloranti basici* sono coloro che hanno cariche positive e un

loro esempio sono il **blu di metilene**, **il cristal-violetto**, **la safranina**.

Essi si legano fortemente a componenti cellulari con carica negativa (acidi nucleici e polisaccaridi acidi) e anche ad altre strutture superficiali della cellula e ciò li rende ottimi coloranti generici (uso di coloranti per la **colorazione di Gram**).

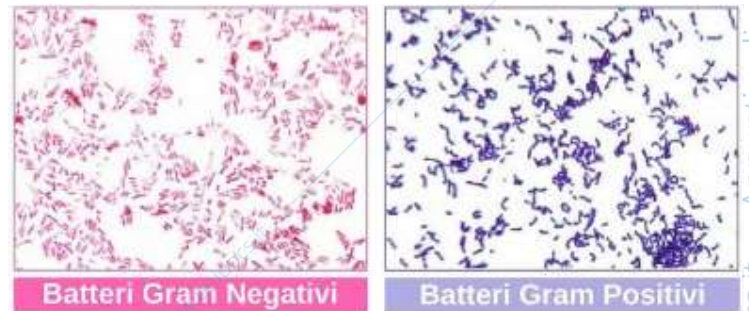
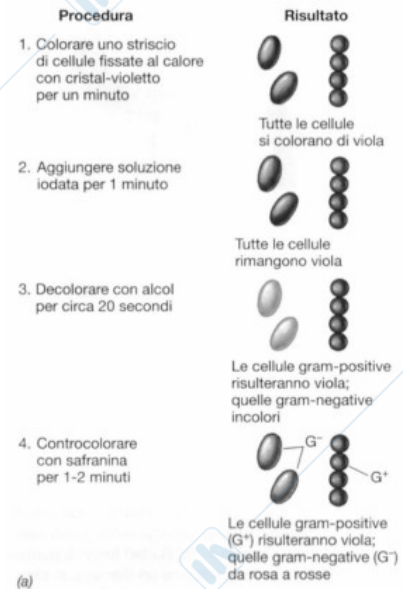
MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE E IN CAMPO OSCURO:

La colorazione, sebbene sia una procedura ampiamente usata, uccide le cellule e può distorcere le strutture.

La **microscopia a contrasto di fase** è basata sul principio che le cellule hanno un diverso indice di rifrazione rispetto al mezzo circostante. Questa sottile differenza è amplificata da un dispositivo presente nella lente dell'obbiettivo chiamato anello di fase.

Nel **microscopio in campo oscuro** la luce che raggiunge il campione proviene da un solo lato, e l'unica luce che raggiunge la lente è quella dispersa dal campione, che così appare chiaro in campo oscuro.

Questi due sistemi sono utili per osservare bene la motilità microbica, poiché evidenziano bene strutture come i fasci di flagelli.



MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Utilizzano una sonda che, attraverso la proiezione di certe lunghezze d'onda, donano colori ai diversi tipi di batteri. Possono essere usate insieme anche delle **sonde aventi cromofori** che incrementano questo effetto.

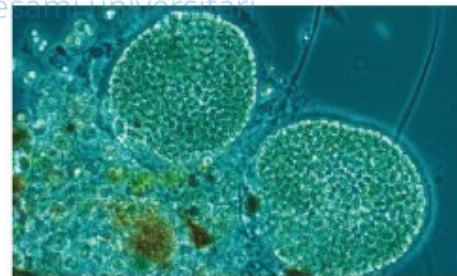
Le sostanze risultano fluo sia perché contengono sostanze fluo come clorofilla o altri componenti, sia in seguito a **colorazione con coloranti fluorescenti**, di cui il più usato è il **DAPI** che colora le cellule di un bel **blu brillante** in quanto **si lega al DNA cellulare**.

È usata in ambito diagnostico in microbiologia clinica, ma anche in ecologia microbica per quantificare i batteri in un ambiente naturale o in una sospensione cellulare.

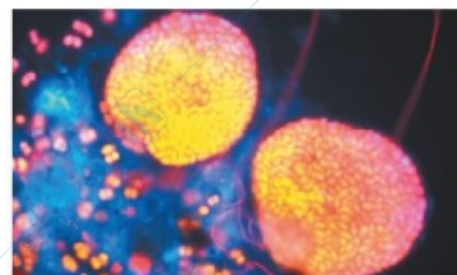
Contrasto di fase in alto VS fluorescenza →

MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE INTERFERENZIALE (DIC)

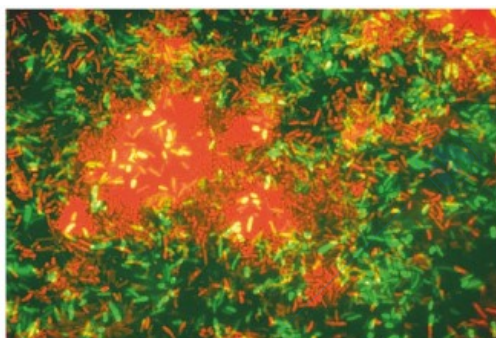
Fa uso di un polarizzatore nel condensatore per produrre luce polarizzata che, passa attraverso un prisma che genera 2 fasci distinti che colpiscono il campione ed entrano nella lente dell'obbiettivo, dove si riuniscono. A questo punto non sono più totalmente in fase e ciò comporta che strutture cellulari come nucleo, endospore, vacuoli, ..., assumano un **aspetto più tridimensionale** che le rende più visibili senza coloranti alcuni.



(c)



(d)



(a)



(b)

MICROSCOPIA CONFOCALE A SCANSIONE LASER (CSLM)

Accoppia un laser alla microscopia a fluorescenza: il laser genera brillanti immagini 3D e consente all'osservatore di accedere a **diversi piani di messa a fuoco del campione**. In questo modo si elimina la dispersione di luce degli altri piani di fuoco.

Questa microscopia consente di aumentare la risoluzione del microscopio ottico da 0,2 a 0,1 μ m.

Ampiamente utilizzato in ecologia microbica, in generale il CSLM è molto utile dovunque si debbano esaminare campioni con un certo spessore per valutare la variazione del contenuto microbico in funzione della profondità.

MICROSCOPIA ELETTRONICA limite di risoluzione = 0,2 nm

I microscopi elettronici utilizzano elettroni al posto della luce visibile. Gli elettromagneti svolgono la funzione della luce e tutto il sistema opera sottovuoto.

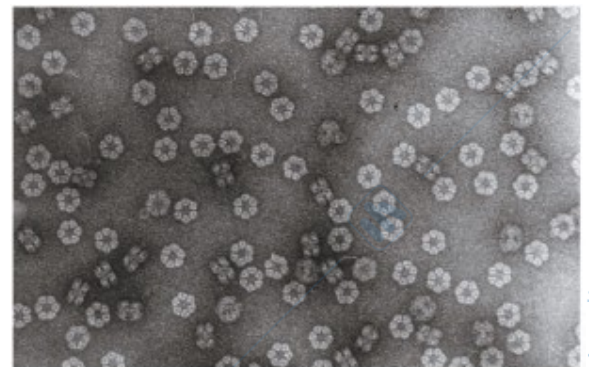
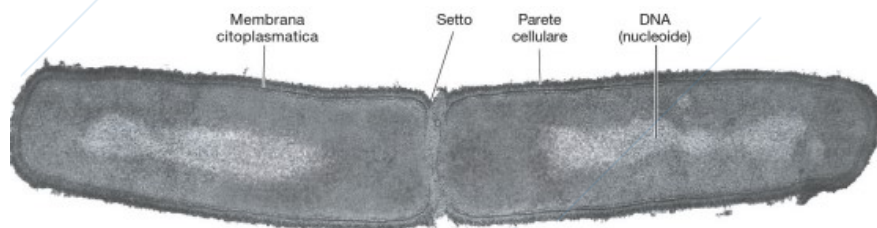
Per questo, nonostante sia in grado di mostrare strutture complesse ad ingrandimento notevole, il microscopio elettronico consente l'osservazione di soli organismi MORTI.

Tipi di microscopi elettronici

- **Microscopia elettronica a trasmissione (T.E.M.)**
- **Microscopia elettronica a scansione (S.E.M)**

**MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE**

Il **T.E.M. (Transmission Electron Microscope)**, permette la visione di piccole sezioni di un batterio (20-60nm) e quindi la visualizzazione di strutture come singole proteine e singoli acidi nucleici. Per ottenere un contrasto sufficiente, le sezioni sono trattate con coloranti particolari come acido osmico, permanganato, sali di uranio/lantanio/piombo, ...

**MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE**

Il **S.E.M. (Scanning Electron Microscope)** permette la visione di campioni anche molto grandi, e la profondità di campo (la porzione dell'immagine che resta a fuoco) è molto elevata.

Le micrografie sono originariamente in b/n, ma il microscopio, collegato al computer, è capace di donare alle immagini dei colori "fasulli" che aiutano a distinguerne i vari tipi.

