

2

La cellula procariotica e la crescita microbica

1 Dimensioni, forma e aggregazioni dei batteri

Nei procarioti (*Archaea* e *Bacteria*) si rinviene il modello più semplice di **organizzazione cellulare**, sia dal punto di vista strutturale che funzionale. Comparsi sulla scena della vita sulla Terra circa 3,8 miliardi di anni fa, sono stati per altri due miliardi di anni gli unici esseri viventi sul pianeta fino alla comparsa delle prime cellule eucariotiche, e da quei tempi lontanissimi continuano ad essere coinvolti in processi biogeochimici fondamentali.

Pur con un'ampia variabilità, le dimensioni delle cellule batteriche oscillano intorno a $0,1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$ di diametro, mentre la lunghezza varia da circa $0,1$ a $8\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ ($1\text{ }\mu\text{m} = 0,001\text{ mm}$). La variabilità delle dimensioni si accompagna naturalmente alla varietà delle forme. Le dimensioni medie delle cellule eucariotiche sono decisamente superiori, con diametri che oscillano da circa 2 a $200\text{ }\mu\text{m}$; le cellule procariotiche mostrano dunque un rapporto superficie/volume assai elevato, il che garantisce loro un'elevata possibilità di scambi con l'ambiente esterno. Ciò spiega la rapidità della risposta al

variare delle condizioni ambientali, che si riflette a sua volta su un metabolismo particolarmente veloce e sulla conseguente velocità di crescita.

I batteri possono presentarsi nelle forme principali di (figura 2.1):

- **cocchi** (cellule sferiche);
- **bacilli** (cellule cilindriche più o meno allungate);
- **coccobacilli** (cellule a forma intermedia rispetto alle precedenti);
- **vibrioni** (cellule di forma ricurva, dotate di flagello);
- **spirilli** (cellule di aspetto spiraliforme o elicoidale, con corpo relativamente rigido, dotate di diversi flagelli);
- **spirochete** (cellule di aspetto spiraliforme ma con struttura flessibile, mobili per la presenza di un filamento assiale contenuto in una guaina esterna avvolto attorno al corpo batterico).

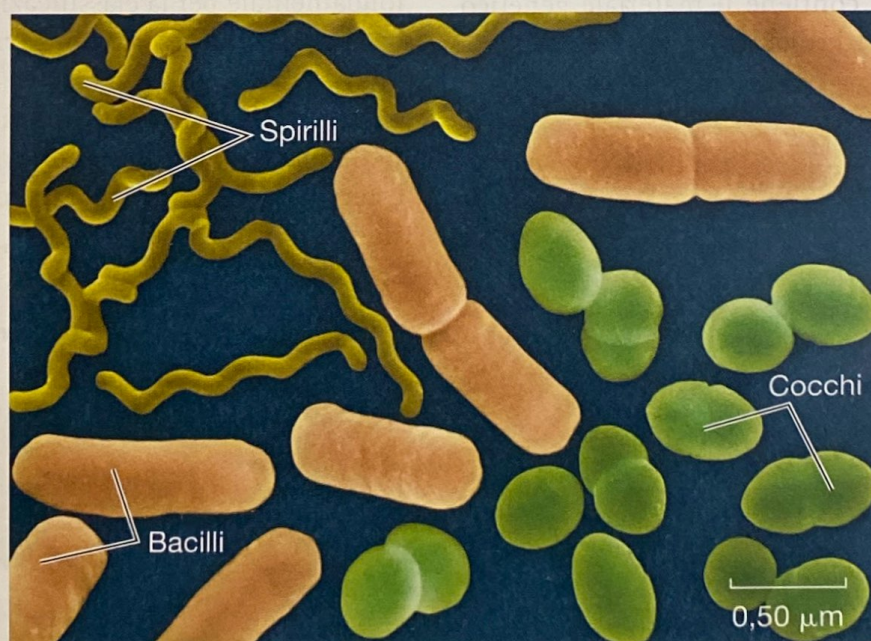


Figura 2.1 Esempi di forme batteriche: bacilli, cocchi e spirilli.

Al momento della riproduzione le singole cellule batteriche possono rimanere unite alla cellula madre, formando aggregati diversi in relazione al piano di divisione cellulare.

Fra i cocci si distinguono quindi:

- **diplococchi** (cocchi disposti a coppie);
- **streptococchi** (cocchi disposti in catene più o meno lunghe);
- **stafilococchi** (cocchi che si dividono su più piani diversi formando un grappolo);
- **tetradi** (cocchi che si dividono secondo due piani ortogonali disponendosi a gruppi di quattro);
- **sarcine** (cocchi che si dividono secondo i tre piani ortogonali disponendosi a gruppi di otto a formare un cubo).

2 La struttura generale delle cellule procariotiche

Molto schematicamente è possibile individuare nelle cellule procariotiche tre distinte regioni (figura 2.2).

- Una più esterna, dove si possono trovare appendici superficiali (**flagelli, pili, fimbrie**);
- Procedendo verso l'interno la **parete cellulare** e la **membrana plasmatica**. In alcuni casi è presente esternamente alla parete un ulteriore rivestimento detto **capsula**, **glicocalice** o strato mucoso, a seconda della composizione e, a volte, uno **strato S** (*S-layer*);
- Il **citoplasma**, che contiene il materiale genetico (cromosoma batterico), i **ribosomi**, granuli o inclusio-

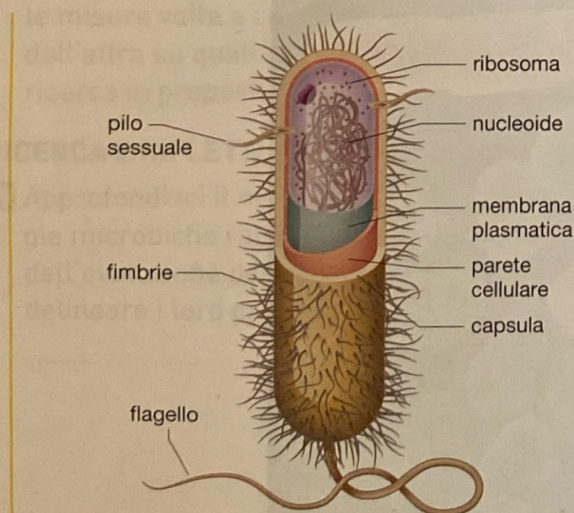


Figura 2.2 Una cellula procariotica.

I bacilli danno origine a un numero minore di aggregazioni morfologiche:

- **diplobacilli** (uniti a coppie dopo la divisione);
- **streptobacilli** (riuniti in catene più o meno lunghe).

I bacilli possono presentare estremità arrotondate, piatte o a forma di sigaro. Queste caratteristiche sono importanti per l'identificazione dei batteri e si possono apprezzare solo al microscopio con ingrandimenti di almeno 1000 volte, in genere dopo opportune colorazioni oppure «a fresco», come nei batteri mobili come spirilli e spirochete. Alcuni batteri, come *Rhizobium*, *Proteus*, *Corynebacterium*, sono pleiomorfi, possono cioè cambiare la loro forma, ma in genere la forma di un batterio rimane quella tipica, ed è geneticamente codificata.

ni citoplasmatiche quali magnetosomi, carbosomi, clorosomi e vescicole (figura 2.3).

In genere, tutti i batteri possiedono parete, membrana, citoplasma, cromosoma e ribosomi. Solo alcuni presentano annessi quali capsula, strato mucoso, strato S, pili, fimbrie, flagelli, magnetosomi e vescicole.

In microbiologia, inoltre, una distinzione estremamente importante è quella fra batteri **Gram positivi** e batteri **Gram negativi**, in relazione al diverso comportamento alla colorazione di Gram, decisamente fondamentale per la classificazione e l'identificazione batterica. Come descritto più avanti, la suddivisione in queste due categorie ha origine nella diversa composizione e struttura degli involucri cellulari (*cell envelope*): i Gram negativi possiedono infatti una "membrana esterna", molto simile alla membrana plasmatica, che riveste la parete cellulare; tale membrana non è presente nei Gram positivi.

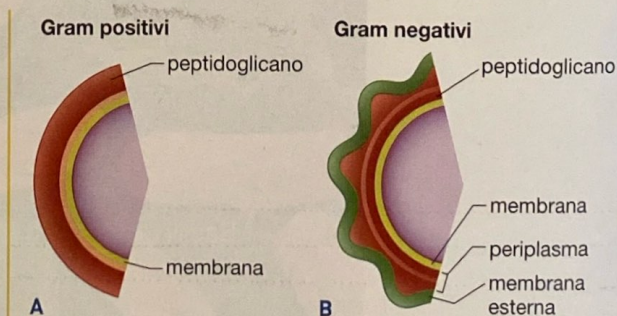


Figura 2.3 Parete cellulare. Schema della parete cellulare di batteri Gram positivi [A] e Gram negativi [B].

3 La membrana cellulare dei procarioti

Pur con alcune differenze rispetto agli eucarioti, nelle cellule procariotiche la struttura della membrana cellulare è analoga a quella di tutte le membrane biologiche: è infatti formata da un doppio strato di lipidi (fosfolipidi) e proteine. Nei procarioti, privi di organuli cellulari e di strutture membranose specializzate, la membrana cellulare svolge ulteriori funzioni vitali:

- è la sede dei processi di formazione dell'energia nella fosforilazione per trasporto di elettroni (catene di trasporto degli elettroni e forza proton-motrice);
- si organizza in strutture vescicolari o pluristratificate alle quali aderiscono i pigmenti e i trasportatori di elettroni per la fotosintesi ossigenica e anossigenica; partecipa alle fasi finali della sintesi del peptidoglicano della parete cellulare;
- è sede del complesso enzimatico responsabile della replicazione del cromosoma batterico;
- contribuisce alla ripartizione alle cellule figlie delle due molecole di DNA ottenute dalla duplicazione, durante la scissione batterica;
- impedisce la fuoriuscita di acqua in ambienti ad alta concentrazione salina in batteri alofili;
- comunica con altre cellule batteriche vicine attraverso processi di *quorum sensing*.

La membrana cellulare degli *Archaea* è diversa da quella dei *Bacteria*, con differenze legate alle varie specie in relazione al loro habitat e che riguardano in particolare i **componenti lipidici** (figura 2.4):

- sono presenti catene alifatiche isoprenoidi (fitano e bifitano) a struttura ramificata o ad anello invece delle catene di acidi grassi dei *Bacteria* e degli *Eukaria*;
- il legame fra il gruppo terminale delle catene carboniose e il glicerolo è un legame etere e non estere, come quello che lega gli acidi grassi al glicerolo;
- sono presenti membrane monostratificate e non a doppio strato, per la presenza di fosfolipidi senza estremità libere.

Tali caratteristiche conferiscono alla membrana plasmatica degli *Archaea* una maggior rigidità e una più elevata resistenza alle alte temperature proprie di alcuni habitat estremi in cui questi batteri vivono, che permette anche alle proteine cellulari di non essere denaturate già a 60 °C, come in genere si verifica. Ciò

risulta di particolare importanza per le proteine enzimatiche, che infatti sono costituite da termozimi (enzimi termoresistenti).

La membrana plasmatica dei batteri è l'obiettivo specifico degli antibiotici che degradano i fosfolipidi come le polimixine, ma anche di disinfettanti come i sali d'ammonio quaternario e l'alcol, che danneggiano in modo specifico la membrana portando alla morte della cellula.

Nelle membrane delle cellule animali il **colesterolo** (che risulta invece *assente* nelle membrane di procarioti, alcuni protisti, piante e funghi) è un componente presente in percentuale notevole (fino al 25%) e con un ruolo importante nell'aumentarne la resistenza e l'elasticità. Nei procarioti (con l'unica eccezione dei micoplasmi, dove invece sono presenti) gli steroli sono sostituiti dagli **opanoidi**, molecole a struttura pentaciclica. Nel genere *Mycoplasma*, dove manca la parete cellulare, gli steroli sono invece presenti e conferiscono alla membrana plasmatica la necessaria consistenza e rigidità.

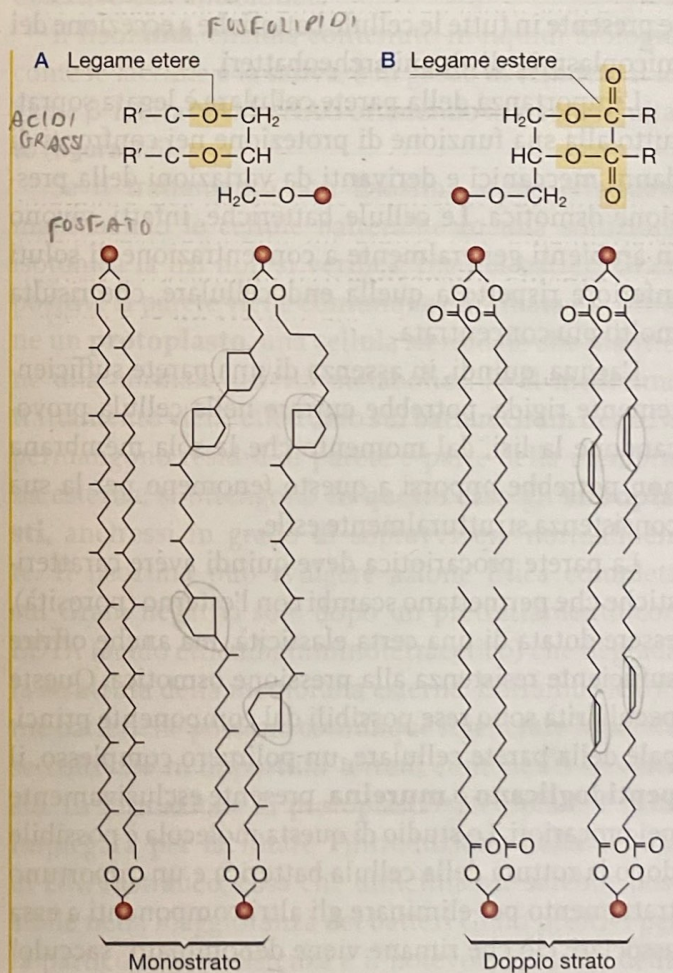


Figura 2.4 I costituenti della membrana. (A) I lipidi di membrane negli *Archaea* e (B) nei *Bacteria*.

Quorum sensing

Il *quorum sensing* è un fenomeno molto importante per i microrganismi: permette di regolare l'operatività di una serie di geni in relazione alla densità di individui di una popolazione batterica per mezzo del rilascio di una molecola-segnaletto (autoinduttore). Individuato originariamente in vibrii luminescenti (*Vibrio fischeri* e *V. harveyi*), la produzione dell'autoinduttore aumenta proporzionalmente alla densità batterica e aumenta anche la probabilità che questa molecola segnaletto diffonda da una cellula all'altra. La densità di popolazione controlla l'espressione dei geni per la bioluminescenza che viene innescata solo quando la popolazione batterica raggiunge una certa densità (un certo «quorum»).

Vivono in simbiosi con organismi marini conferendo loro fluorescenza; il secondo concorre alla generazione di fenomeni di bioluminescenza nelle acque marine, note come il "mare di latte", che si verificano soprattutto nell'oceano Indiano.

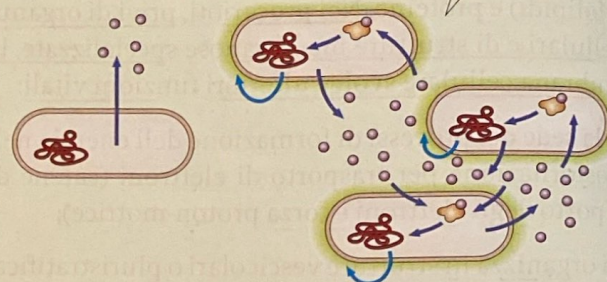


Figura A *Vibrio fischeri* e *V. harveyi*.

4 Funzione e struttura della parete cellulare nei procarioti

La parete cellulare è un involucro rigido ma permeabile presente in tutte le cellule batteriche a eccezione dei micoplasmi e di alcuni archeobatteri.

L'importanza della parete cellulare è legata soprattutto alla sua funzione di protezione nei confronti di danni meccanici e derivanti da variazioni della pressione osmotica. Le cellule batteriche, infatti, vivono in ambienti generalmente a concentrazione di soluti inferiore rispetto a quella endocellulare, che risulta molto più concentrata.

L'acqua, quindi, in assenza di una parete sufficientemente rigida, potrebbe entrare nella cellula provocandone la lisi, dal momento che la sola membrana non potrebbe opporsi a questo fenomeno per la sua consistenza strutturalmente esile.

La parete procariotica deve quindi avere caratteristiche che permettano scambi con l'esterno (porosità), essere dotata di una certa elasticità, ma anche offrire sufficiente resistenza alla pressione osmotica. Queste peculiarità sono rese possibili dal componente principale della parete cellulare, un polimero complesso, il **peptidoglicano** o **mureina**, presente esclusivamente nei procarioti. Lo studio di questa molecola è possibile dopo la rottura della cellula batterica e un opportuno trattamento per eliminare gli altri componenti a essa associati; ciò che rimane viene denominato "sacculo" e può essere analizzato nelle sue proprietà fisiche e chimiche.

La parete cellulare della cellula batterica svolge diverse funzioni importanti:

- offre protezione nei confronti della lisi e determina la forma del batterio;
- è alla base delle diverse affinità tintoriali (colorazione di Gram);
- determina i caratteri antigenici e la sensibilità verso gli agenti esterni;
- costituisce il bersaglio di vari antibiotici e dei virus batteriofagi.

Nella composizione del peptidoglicano si individuano unità che si ripetono regolarmente, comuni a tutti i batteri, formate da carboidrati azotati: **acido N-acetilmuramico** (NAM o M) e **N-acetilglucosammina** (NAG o G) legati fra loro con legami glicosidici β -1,4. Sono presenti inoltre vari aminoacidi, di cui almeno tre (acido D-glutammico, D-alanina e acido diaminopimelico) non compaiono mai nella composizione delle proteine, e contribuiscono alla peculiarità del peptidoglicano.

NAM e NAG si alternano e si legano formando lunghe file affiancate le une alle altre e costituiscono la frazione «glicanica» del peptidoglicano (figura 2.5). Le file di NAM e NAG sono legate trasversalmente da catene peptidiche (che costituiscono la frazione «peptidica» del peptidoglicano) in cui compare costantemente

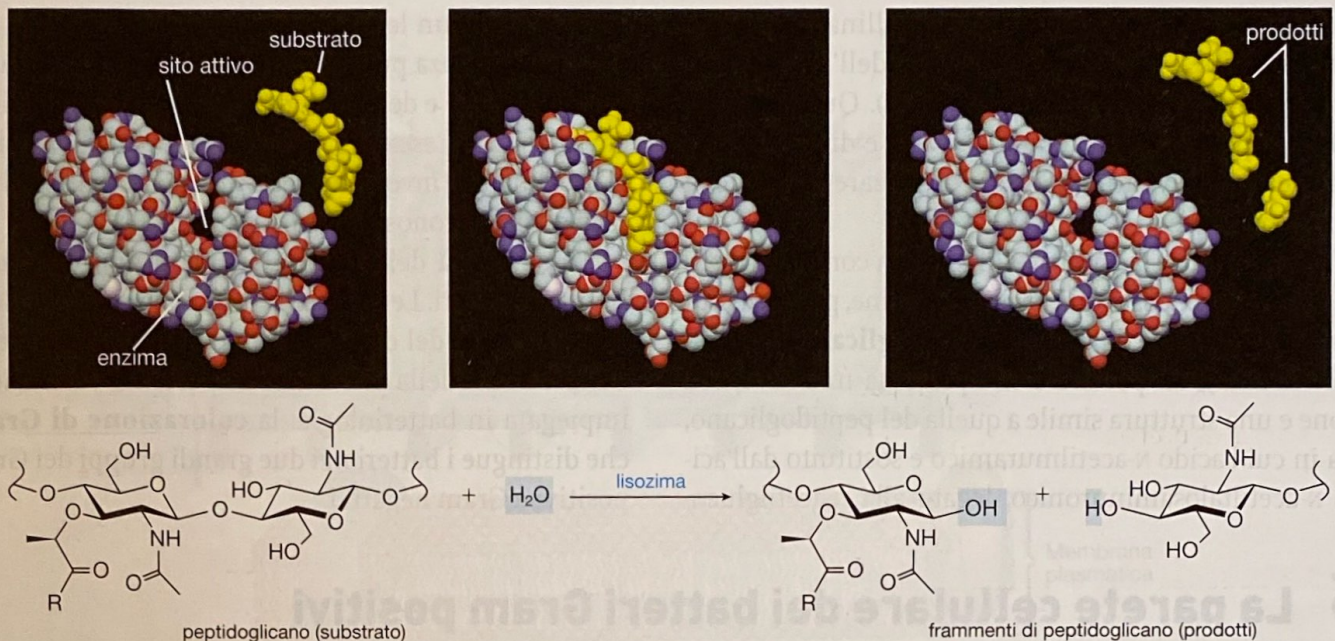


Figura 2.5 Enzima e substrato Una reazione catalizzata dal *lisozima*, un enzima presente nella saliva che catalizza la rottura di legami nei peptidoglicani delle pareti cellulari batteriche.

un corto peptide formato da 4 aminoacidi (solitamente fra L-alanina, D-alanina, acido D-glutammico, acido diaminopimelico) legato al gruppo carbossilico di ogni molecola di NAM. Questi tetrapeptidi, legati alle molecole di NAM e disposti parallelamente fra loro, sono legati gli uni agli altri da legami peptidici detti "crociati" o trasversali che consistono in:

- **tipici legami peptidici diretti** nei batteri Gram negativi, fra il gruppo carbossilico di un tetrapeptide e quello aminico dell'acido diaminopimelico del tetrapeptide adiacente come in *Escherichia coli*;
- **ponti aminoacidici** trasversali o crociati di aminoacidi come serina e glicina, nei Gram positivi; in *Staphylococcus aureus* tali ponti sono formati da cinque molecole di glicina.

Il numero dei legami crociati è diverso da un microrganismo all'altro; più questo è elevato, maggiore è la rigidità della parete cellulare.

Può variare anche il numero degli strati di peptidoglicano, che in alcuni batteri Gram positivi può arrivare fino a 40.

Antibiotici come la **penicillina** interferiscono con la formazione dei legami fra le catene peptidiche trasversali, causando l'indebolimento dell'intera struttura, la rottura della membrana plasmatica e la lisi della cellula batterica. La penicillina è particolarmente efficace nei confronti dei batteri Gram positivi, mentre i batteri Gram negativi risultano meno sensibili per la presenza della membrana esterna e di

un numero inferiore di legami peptidici trasversali, obiettivo dell'antibiotico.

Il **lisozima**, enzima contenuto in liquidi biologici come le lacrime e la saliva, è in grado di scindere il legame β -1,4 fra NAM e NAG ottenendo lo stesso risultato (**figura 2.5**).

Se il trattamento con lisozima viene effettuato mantenendo le cellule batteriche in una soluzione isotonica la lisi non si verifica, ma nei batteri Gram positivi la parete viene comunque eliminata e si ottiene un **protoplasto**, una cellula sferoidale che mantiene una normale attività metabolica. Se il medesimo trattamento viene effettuato sui batteri Gram negativi permangono residui di parete e parte della membrana esterna; si ottengono in questo caso gli **sferoplasti**, anch'essi in grado di sopravvivere normalmente. Il lisozima può svolgere azione litica completa sui Gram negativi solo dopo un pretrattamento con EDTA (acido etilendiamminotetracetico) che degrada la struttura della membrana esterna. Entrambe le forme batteriche possono comunque rigenerare la parete se coltivate in opportuni terreni contenenti saccarosio. La formazione di protoplasti e sferoplasti è stata impiegata per facilitare l'introduzione nella cellula di DNA estraneo, cosa che difficilmente sarebbe possibile nella maggioranza dei batteri Gram positivi per la particolare consistenza e il notevole spessore della parete cellulare integra.

Alcune specie batteriche, in particolare del genere *Proteus*, possono perdere la parete cellulare in seguito a

mutazioni o al trattamento con penicillina o lisozima, dando origine a **forme L** (dall'iniziale dell'istituto londinese Lister in cui vennero studiate). Queste forme cellulari possono continuare a vivere e dividersi normalmente ed eventualmente sintetizzare una nuova parete cellulare.

Negli *Archaea* la parete cellulare non contiene peptidoglicano, ma è costituita da glicoproteine, polisaccaridi e proteine nonché da **pseudopeptidoglicano** (o **pseudomureina**), un polimero che presenta una composizione e una struttura simile a quella del peptidoglicano, ma in cui l'acido N-acetilmuramico è sostituito dall'acido N-acetilalosaminuronico, legato alla N-acetilgluco-

sammina con un legame glicosidico β -1,3 e non β -1,4. Questa differenza può spiegare la diversa sensibilità del peptidoglicano e dello pseudopeptidoglicano all'azione enzimatica. Per esempio, gli *Archaea* non sono sensibili al lisozima, che invece nei *Bacteria* provoca la lisi cellulare in quanto riconosce solo il legame β -1,4.

La struttura della parete cellulare non è identica in tutti i batteri. Le differenze nella sua composizione sono alla base del diverso comportamento dei batteri nei confronti della più nota e importante colorazione impiegata in batteriologia: la **colorazione di Gram**, che distingue i batteri nei due grandi gruppi dei Gram positivi e Gram negativi.

5 La parete cellulare dei batteri Gram positivi

Nella parete cellulare dei Gram positivi il peptidoglicano ha una struttura rigida e spessa (15-80 nm), cui sono associati gli acidi teicoici, presenti in gran parte dei batteri Gram positivi. Gli **acidi teicoici** sono costituiti da polimeri di ribitolo (derivato del ribosio) o glicerolo-fosfato, legati a residui di D-alanina. Comprendono:

- **acidi teicoici di parete**, legati al peptidoglicano con legami covalenti e disposti perpendicolarmente alla superficie della parete;
- **acidi lipoteicoici**, ancorati sulla membrana ma con parti della molecola (catene di poliglicerolfosfato) che penetrano nella parete.

Gli acidi teicoici contribuiscono a rendere la parete cellulare dei batteri Gram positivi particolarmente consi-

stente e stabile, e al contempo elastica e porosa; sono inoltre responsabili della specificità antigenica della cellula batterica, importante per l'identificazione e la definizione del suo potere patogeno. Gli streptococchi (cocchi Gram positivi con disposizione a catenella) possono per esempio essere suddivisi in diversi tipi antigenici in base ai polisaccaridi della parete, aspetto molto importante dal punto di vista sanitario. La classificazione di R. Lancefield individua 18 tipi diversi dell'**antigene polisaccaridico C** che conferisce ad altrettanti gruppi di streptococchi specificità sierologica antigenica.

Nella parete dei micobatteri (che contengono i batteri della tubercolosi e della lebbra) è presente fino al 60% di **acidi micolici**. Questi acidi sono lipidi che contengono cere e sono responsabili della resistenza di questi batteri.

6 La parete cellulare dei batteri Gram negativi

Nei **batteri Gram negativi** gli involucri cellulari mostrano un'organizzazione strutturale più complessa: sopra alla membrana plasmatica lo strato di peptidoglicano è notevolmente più sottile rispetto ai Gram positivi (1-3 nm) e forma uno strato mono- o bimolecolare con pochi legami trasversali. Più esternamente è presente un'ulteriore membrana a doppio strato fosfolipidico dello spessore di 7-8 nm (**membrana esterna**), composta anche da proteine e **lipolisaccaridi**, che va a costituire, insieme con lo strato sottostante di peptidoglicano, la parete cellulare di questi batteri. Lo spazio compreso fra la faccia interna dello strato di lipopolisaccaridi (strato LPS) e quella esterna della membrana plasmatica è chiamato **spazio peripla-**

smico o **periplasma**, in cui sono contenuti peptidoglicano, enzimi idrolitici e proteine di trasporto deputate all'assunzione di nutrienti (**figura 2.6**).

I lipopolisaccaridi della membrana esterna dei batteri Gram negativi (**strato LPS**) presentano un lipide particolare, il **lipide A**, composto da acidi grassi e N-acetilglucosammina, la cui regione centrale (core polisaccaridico) è caratterizzata dalla presenza del polisaccaride O (**antigene O somatico**). Da questo polisaccaride cui dipende il comportamento antigenico dei Gram negativi e che ne costituisce l'**endotossina**, responsabile della patogenicità di batteri come quelli del genere *Salmonella*; la cui endotossina provoca febbre (effetto pirogeno), dissenteria e stato di shock. Un altro esempio

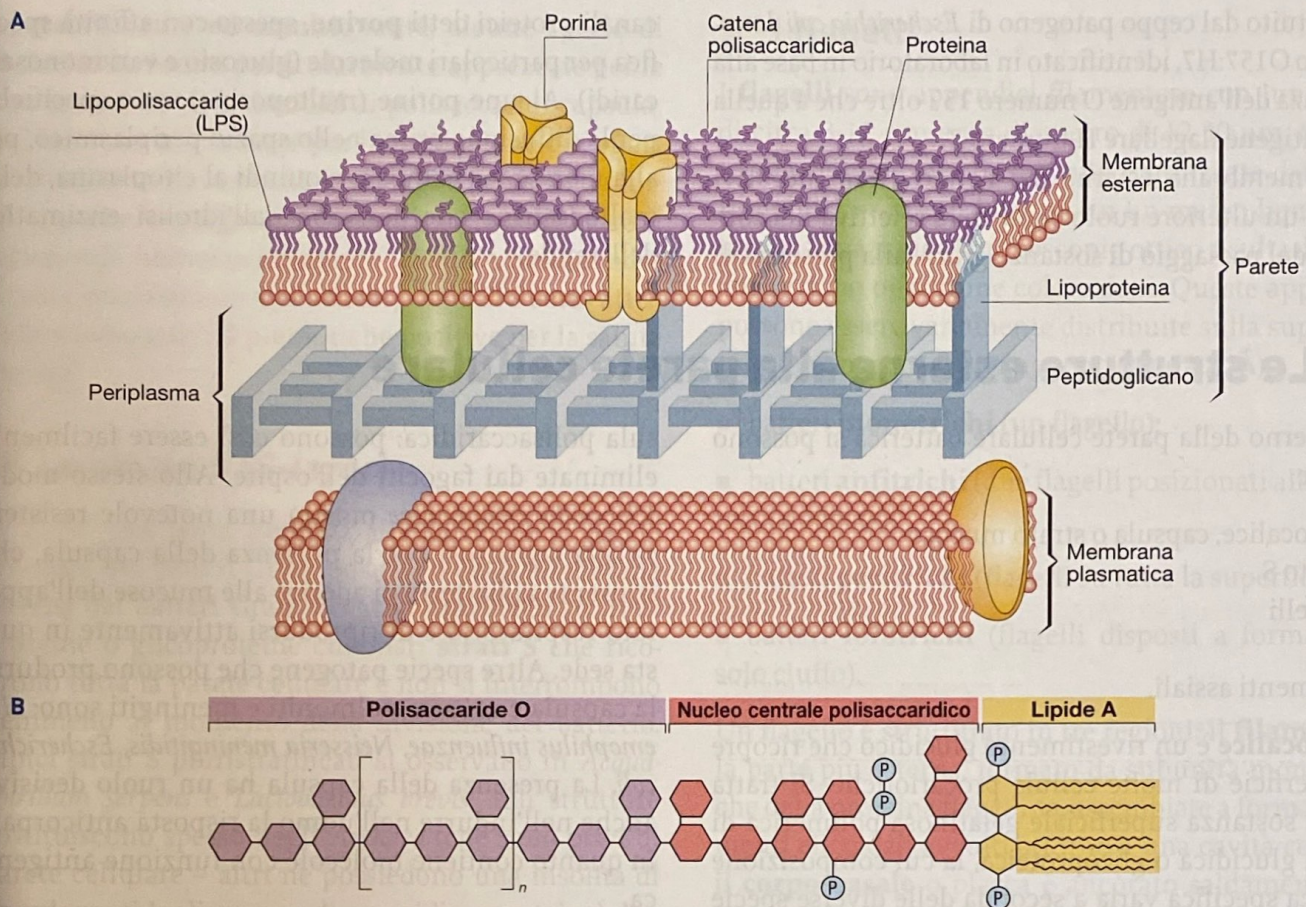


Figura 2.6 (A) Modello di struttura della parete dei Gram negativi e (B) particolare di una molecola di lipopolisaccaride.

Colorazione di Gram

È la colorazione policromatica più importante in batteriologia per la possibilità di differenziare i batteri in Gram positivi (che si colorano in blu/violetto) e Gram negativi (colorati in rosso) in base alla diversa composizione della parete cellulare. La colorazione prevede in successione l'impiego di un primo colorante (cristalvioletto), di un mordenzante (Lugol), dell'alcol come agente decolorante e infine di un colorante di contrasto rosso (fucsina).

Il primo colorante colora in blu/violetto sia i Gram positivi che i Gram negativi, poiché penetra nel citoplasma cellulare di entrambi. La successiva aggiunta del mordenzante a base di iodio (Lugol) forma con il violetto dei complessi che non possono uscire dalla parete.

Nei **Gram positivi** il peptidoglicano forma una struttura spessa e compatta a più strati, cui sono associati acidi teicoici, aminoacidi, mono- e polisaccaridi. Tale struttura viene fortemente disidratata dall'azione dell'alcol, che ne riduce la permeabilità impedendo così l'allontanamento del primo colorante

impiegato (cristalvioletto) e l'assorbimento del secondo colorante (rosso). Dopo decolorazione, i Gram positivi mantengono quindi il primo colorante e si presentano blu-viola.

I **Gram negativi** hanno una membrana esterna che manca nei Gram positivi e la cui componente lipidica viene solubilizzata dall'azione dell'alcol, che danneggia anche il sottile strato di peptidoglicano sottostante. Attraverso la parete cellulare messa a nudo e anch'essa danneggiata dall'alcol, i cristalli del complesso violetto-iodio possono fuoriuscire dalla cellula che diventa quindi incolore. Il colorante di contrasto rosso (safranina, fucsina, eosina), successivamente aggiunto, può quindi penetrare nel citoplasma e colorare in rosso la cellula.

La distinzione tra Gram positivi e Gram negativi non è solo di valore tassonomico, ma riporta immediatamente anche a notevoli differenze riguardo al potere patogeno e alla sensibilità nei confronti degli antibiotici, parametri di enorme importanza in campo sanitario.

è costituito dal ceppo patogeno di *Escherichia coli* denominato O157:H7, identificato in laboratorio in base alla presenza dell'antigene O numero 157 oltre che a quella dell'antigene flagellare H numero 7.

La membrana esterna dei batteri Gram negativi svolge un ulteriore ruolo di barriera selettiva nei confronti del passaggio di sostanze grazie alla presenza di

canali proteici detti **porine**, spesso con affinità specifica per particolari molecole (glucosio e vari monosaccaridi). Alcune porine (malto porine) sono specifiche per la diffusione prima nello spazio periplasmico, poi alla membrana cellulare e quindi al citoplasma, delle maltodestrine che derivano dall'idrolisi enzimatica dell'amido.

7 Le strutture esterne alla parete cellulare

All'esterno della parete cellulare batterica si possono trovare:

- glicocalice, capsula o strato mucoso
- strato S
- flagelli
- pili
- filamenti assiali.

Il **glicocalice** è un rivestimento glucidico che ricopre la superficie di molte cellule procariotiche. Si tratta di una sostanza superficiale gelatinosa polimerica di natura glucidica o glicoproteica, la cui composizione chimica specifica varia a seconda delle diverse specie batteriche. Il glicocalice viene prodotto dalla cellula e quindi depositato sulla superficie esterna. In alcune specie batteriche (per esempio, *Streptococcus pneumoniae*) il glicocalice assume una struttura più organizzata con una trama particolarmente consistente e prende il nome di **capsula**, strettamente aderente alla superficie cellulare ed evidenziabile tramite varie colorazioni, fra cui quella all'inchiostrato di china. In altri casi, il glicocalice mostra una consistenza meno densa e organizzata e una meno decisa adesione alla parete cellulare: in questo caso si preferisce parlare di **strato mucoso**.

La presenza di una capsula in diversi batteri è associata alla capacità di resistere alla fagocitosi e alla loro **virulenza** (la virulenza esprime il grado di patogenicità). Per esempio, solo le forme capsulate del *Bacillus anthracis* causano il carbonchio o antrace (una zoonosi, cioè una malattia degli animali che può trasmettersi anche alla specie umana). Può essere interessante notare che questa capsula (di natura proteica e non polisaccaridica, come comunemente avviene) è formata da acido D-glutammico, una forma di aminoacido che, come tutte quelle D, risulta rara in natura. Anche *Yersinia pestis* produce una capsula proteica.

Le cellule di *Streptococcus pneumoniae* perdono la propria patogenicità e non sono più in grado di causare la polmonite quando vengono private della cap-

sula polisaccaridica: possono così essere facilmente eliminate dai fagociti dell'ospite. Allo stesso modo, *Klebsiella pneumoniae* mostra una notevole resistenza alla fagocitosi per la presenza della capsula, che consente al batterio di aderire alle mucose dell'apparato respiratorio e di riprodursi attivamente in questa sede. Altre specie patogene che possono produrre la capsula e causare polmoniti e meningiti sono: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*. La presenza della capsula ha un ruolo decisivo anche nell'indurre nell'uomo la risposta anticorpale in quanto contiene molecole con funzione antigenica.

La capsula può permettere al batterio di superare situazioni critiche come la disidratazione, dato che il rivestimento polisaccaridico è in grado di assorbire acqua, o la mancanza di nutrienti: i batteri capsulati possono infatti utilizzare gli zuccheri del glicocalice come riserva nutritiva.

Il glicocalice polisaccaridico viene chiamato anche **EPS** (*Extracellular Polymeric Substances*) e permette l'adesione batterica ai più svariati substrati, contribuendo alla formazione di **biofilm**, popolazioni batteriche che formano comunità racchiuse in matrici polimeriche prodotte dagli stessi batteri e strettamente aderenti a substrati di varia natura.

Il glicocalice di *Streptococcus mutans* permette a questo batterio di aderire alla superficie dei denti, dove scinde il saccarosio in glucosio e fruttosio utilizzando quest'ultimo per la produzione di destrano, un polimero con caratteristiche di adesività e viscosità che contribuisce alla formazione della placca dentaria e della carie. L'adesività dello strato EPS viene sfruttata anche da altri batteri che crescono sulle radici delle piante o colonizzano ambienti "difficili", come condotte idriche o rocce e sassi in acque correnti.

In alcuni casi la produzione della capsula può avere risvolti positivi interessanti dal punto di vista dell'industria alimentare. Il destrano prodotto da *Leuconostoc mesenteroides* è impiegato come addensante

te, stabilizzante ed emulsionante; alcune specie di batteri lattici sono particolarmente apprezzate per le loro proprietà riconducibili ai polisaccaridi capsulari e vengono selezionate per la produzione di yogurt particolarmente cremosi, formaggi e prodotti da forno, o anche impiegati nella lavorazione delle carni (i lattobacilli hanno per esempio un ruolo nella produzione e maturazione dei salami). Agli EPS sono attribuite anche attività prebiotiche positive per la salute umana.

Lo strato S (S-layer)

In molti casi sono presenti all'esterno della parete cellulare dei batteri Gram positivi o della membrana esterna dei batteri Gram negativi uno o più strati di proteine o glicoproteine chiamati **strati S** che ricoprono tutta la parete cellulare e non si interrompono nemmeno al momento della divisione del batterio. Tipici strati S pluristratificati si osservano in *Acquaspirillum serpens* e *Lactobacillus brevis*. Tali strutture costituiscono spesso negli *Archaea* (che sono privi di parete cellulare – altri ne possiedono una insolita di pseudopeptidoglicano, polisaccaridi e proteine) l'unico involucro esterno alla membrana cellulare, formando guaine tubulari come in *Methanospirillum* e *Methanothrix* e rendendo questi batteri notevolmente resistenti ad agenti chimici o insulti meccanici.

I flagelli

I **flagelli** sono appendici filamentose con lunghezza di circa 3-12 μm e un diametro di 12-30 nm, ancorate alla cellula con un'estremità e utilizzate dai batteri mobili per lo spostamento in un mezzo liquido. La loro osservazione al microscopio ottico risulta difficile anche dopo opportune colorazioni. Queste appendici possono essere variamente distribuite sulla superficie cellulare, per cui si distinguono (figura 2.7A):

- batteri **monotrichi** (un flagello);
- batteri **anfotrichi** (due flagelli posizionati alle estremità opposte);
- batteri **peritrichi** (flagelli su tutta la superficie);
- batteri **lofotrichi** (flagelli disposti a formare un solo ciuffo).

Un flagello è strutturato in tre regioni: il **filamento** è la parte più esterna, formato da subunità monomeriche della proteina flagellina, assemblate a formare filamenti elicoidali avvolti attorno a una cavità centrale; il **corpo basale** o placca è ancorato saldamente alla superficie della cellula; l'**uncino** lega il filamento alla placca. Il corpo basale è responsabile non solo dell'ancoraggio, ma anche del movimento del flagello e mostra un'organizzazione piuttosto complessa e differenziata nei batteri Gram positivi e Gram negativi.

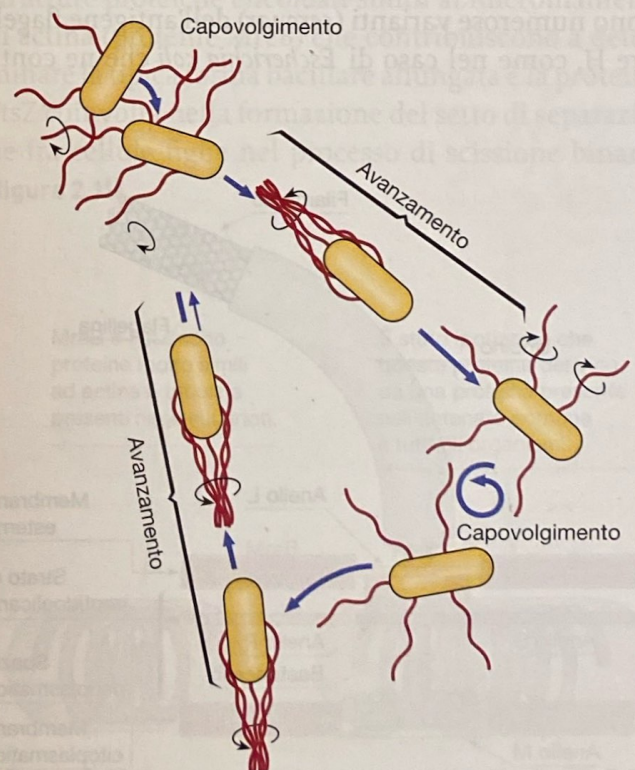
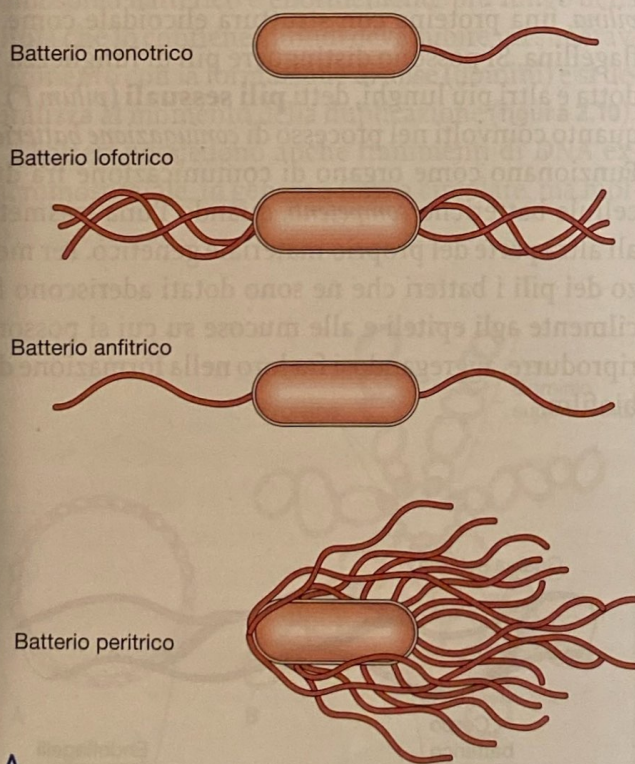


Figura 2.7 (A) Tipi di batteri flagellati. (B) Movimenti di un batterio peritrico.

Il corpo basale (**figura 2.8**) è costituito da una struttura centrale inserita in anelli proteici posizionati a livello della membrana plasmatica e della parete. Nei batteri Gram negativi si distinguono quattro anelli proteici: L, situato nella membrana esterna; P, associato allo strato di peptidoglicano; S e D nello spazio periplasmico, adesi alla membrana plasmatica. Le prime due unità (L e P) sono assenti nei Gram positivi per la diversa composizione della parete cellulare. Il movimento dei flagelli, originato dalla rotazione del corpo basale, consiste in una rotazione intorno al proprio asse come un'elica, diversamente dal movimento dei flagelli delle cellule eucariotiche che è ondulatorio (**figura 2.7B**). La motilità dei batteri flagellati è notevolmente ampia e permette alla cellula di allontanarsi o dirigersi verso stimoli luminosi (fototassi) o chimici (chemiotassi): ciò è possibile grazie alla presenza di particolari recettori posti sotto la parete cellulare.

Nella chemiotassi sono attive proteine di membrana MCP (*methil-accepting chemotaxis protein*) che rispondono al legame con le sostanze chimiche inviando segnali di repulsione o attrazione sotto forma di modificazioni conformazionali delle proteine motrici dei flagelli.

La composizione in aminoacidi della flagellina, che differisce da batterio a batterio, costituisce l'**antigene H**, in base alla cui tipologia è possibile in alcuni casi l'identificazione sierologica del batterio. Spesso esistono numerose varianti (*serovar*) dell'antigene flagellare H, come nel caso di *Escherichia coli* che ne conta

almeno 50. Fra queste, particolarmente importante è quella denominata O157:H7, responsabile di infezioni alimentari anche molto gravi.

Le specie appartenenti al genere *Proteus* possono muoversi sui terreni di coltura agarizzati con un caratteristico movimento a ondate successive (colonie sciamanti).

I filamenti assiali

Nelle spirochete, batteri elicoidali fra cui *Treponema pallidum*, agente eziologico della sifilide, il movimento si compie per mezzo di un filamento assiale, formato da fibre che si ripiegano sul corpo cellulare e uniscono le estremità opposte della cellula; il filamento è avvolto da una struttura membranosa flessibile avvolta a spirale attorno alla cellula (**figura 2.9**). Il movimento di questi batteri è quindi a spirale, simile a quello del cavatappi. Un altro batterio dotato di filamento assiale è *Borrelia burgdorferi*, agente della malattia di Lyme.

I pili e le fimbrie

Sono appendici tipiche dei batteri Gram negativi, sottili, con lunghezze di circa 1 μm e diametro di 3-5 nm. La loro struttura è simile a quella dei flagelli, rispetto ai quali sono molto più corti, più rigidi, distribuiti il più delle volte sull'intera superficie cellulare e non utili per il movimento (**figura 2.10**). Sono composti da *pilina*, una proteina con struttura elicoidale come la flagellina. Si possono distinguere pili di lunghezza ridotta e altri più lunghi, detti **pili sessuali** (*pilum F*) in quanto coinvolti nel processo di *coniugazione batterica*. Funzionano come organo di comunicazione fra due cellule batteriche *competenti*, quando l'una trasmette all'altra parte del proprio materiale genetico. Per mezzo dei pili i batteri che ne sono dotati aderiscono facilmente agli epiteli e alle mucose su cui si possono riprodurre, aggregandosi fra loro nella formazione del biofilm.

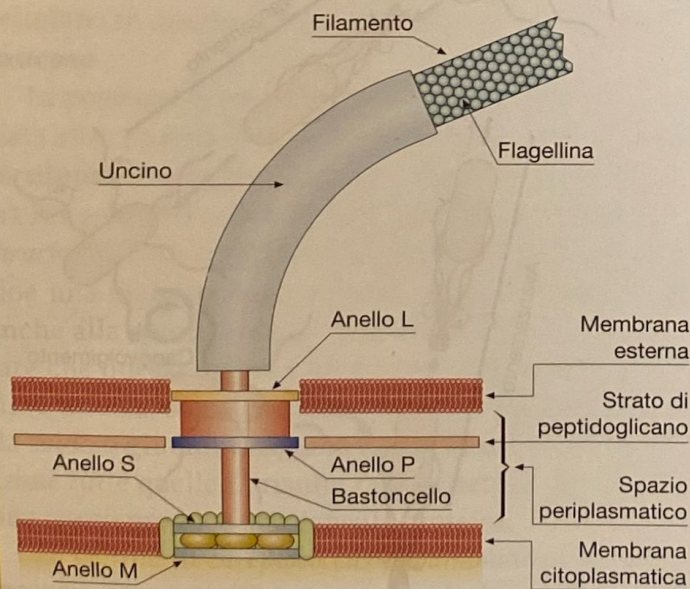


Figura 2.8 Struttura del corpo basale.

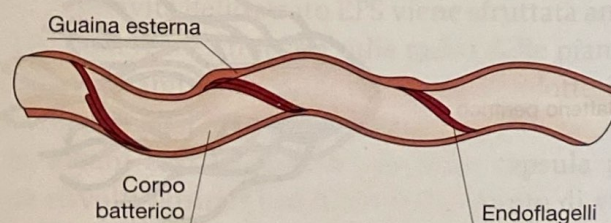


Figura 2.9 Disposizione dei filamenti assiali delle spirochete.

8 Il citoplasma, il cromosoma batterico e i plasmidi

Il citoplasma è formato per circa l'80% da acqua, ha consistenza di un sol/gel semitrasparente e contiene soprattutto proteine, carboidrati, lipidi, sostanze inorganiche e altri composti a basso peso molecolare. Nel citoplasma delle cellule procariotiche si individua una zona che comprende il **cromosoma batterico** (nucleoide), che nelle cellule in crescita può arrivare a occupare fino al 20% del citoplasma, in quanto vi si svolgono attività di sintesi del nuovo DNA destinato alla cellula figlia. In tali attività potrebbero essere coinvolte anche proteine di membrana, nei punti in cui il cromosoma batterico è a contatto con la parte interna della membrana cellulare. Contrariamente a quanto avviene negli eucarioti, il DNA batterico non è legato a istoni, ma ad altre proteine che regolano l'espressione dei geni; è a doppio filamento e ha forma circolare, con un numero di geni dell'ordine di qualche migliaio (3000-6000). La cellula procariotica è aploide, cioè possiede una sola copia del corredo genetico, ma in alcuni batteri sono stati osservati più cromosomi e in altri (*Borrelia burgdorferi* e *Agrobacterium tumefaciens*) sono stati individuati cromosomi lineari. La struttura circolare del cromosoma batterico implica un modello particolare di duplicazione del DNA, in cui si creano due forcelle di replicazione che procedono in direzioni opposte fino a incontrarsi al termine del processo. Il cromosoma batterico è enormemente più lungo della cellula che lo contiene, quindi deve subire un superavvolgimento con la formazione di anse (domini) e si despiralizza al momento della duplicazione (**figura 2.10**).

I batteri possiedono anche frammenti di DNA extracromosomiale, in genere a forma circolare, ma mol-

to più piccoli del cromosoma, denominati **plasmidi** (plasmidi lineari sono stati osservati in *Borrelia*). Questi sono in grado di autoduplicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico, possiedono solitamente non più di un centinaio di geni che il più delle volte non risultano indispensabili alla sopravvivenza delle cellule, ma che possono recare l'informazione per caratteristiche genetiche particolari quali la resistenza agli antibiotici, la sintesi di enzimi, la produzione di tossine. Plasmidi particolari sono i **fattori F** (fertilità), che portano i geni codificanti per la sintesi dei **pili sessuali** (*pilum F*) e per il trasferimento di geni fra cellule batteriche competenti.

I plasmidi possono essere trasferiti da una cellula all'altra: attraverso i pili (coniugazione); tramite virus (trasduzione); o ancora essere trasferiti liberamente attraverso l'ambiente esterno (trasformazione). Per queste loro caratteristiche di trasferibilità sono impiegati nelle biotecnologie per inserire geni estranei nelle cellule batteriche.

Oltre al cromosoma batterico e ai plasmidi sono presenti nel citoplasma i **ribosomi** e gli **inclusi**, che consistono generalmente in sostanze di riserva. Nei procarioti è assente un vero e proprio citoscheletro come quello degli eucarioti, ma in alcuni batteri (*Bacillus subtilis* ed *Escherichia coli*) sono state individuate strutture proteiche elicoidali simili ai microfilamenti di actina (proteine MreB) che contribuiscono a determinare la tipica forma bacillare allungata e la proteina FtsZ coinvolta nella formazione del setto di separazione fra cellule figlie nel processo di scissione binaria (**figura 2.11**).

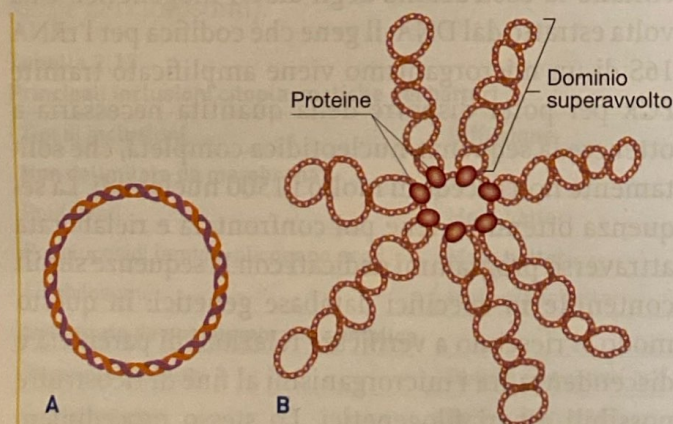


Figura 2.10 Possibili forme del DNA batterico: **(A)** circolare e rilassata, **(B)** superavvolta.

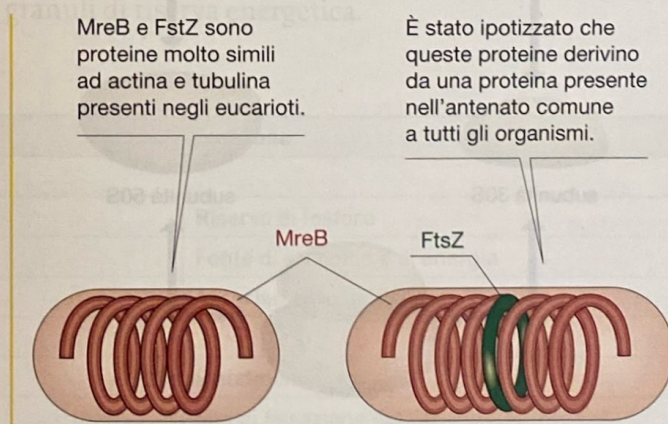


Figura 2.11 Schematizzazione delle proteine MreB e FtsZ del citoscheletro batterico.

9 I ribosomi: struttura, funzione e ruolo nella filogenesi

I **ribosomi** sono praticamente gli unici veri organuli presenti all'interno del citoplasma batterico, a dimostrarne l'universale importanza nella sintesi delle proteine.

Nei procarioti i ribosomi sono liberi e non legati al reticolo endoplasmatico, assente nei batteri. Risultano costituiti da due subunità asimmetriche come negli eucarioti, con alcune differenze nelle dimensioni (sono più piccoli) e nella composizione delle due frazioni.

I ribosomi procariotici hanno un coefficiente di sedimentazione 70S e non 80S come quelli eucariotici, e sono costituiti da due frazioni, rispettivamente 30S e 50S. La frazione 30S è formata da 21 diverse proteine e da una molecola di rRNA 16S, mentre la 50S è costituita da 34 proteine e da due molecole di rRNA, 5S e 23S (**figura 2.12**).

La lettera S indica il **coefficiente di sedimentazione** in unità **Svedberg**, parametro che indica la velocità di sedimentazione nella centrifugazione a ultravelocità. Tale parametro non dipende esclusivamente dal peso molecolare, ma anche da altri fattori come grandezza, peso e forma: per queste ragioni il coefficiente

70S non coincide con la somma matematica delle due frazioni (30S + 50S).

Diversi antibiotici hanno nei ribosomi l'obiettivo della loro azione antibatterica. Tetraciclina, kanamicina, streptomycin e gentamicina bloccano la sintesi proteica legandosi alla subunità 30S; eritromicina e cloramfenicolo agiscono invece legandosi all'unità 50S.

Questi antibiotici, che in misura diversa sono attivi sia sui Gram positivi sia sui Gram negativi, sono invece inefficaci sulla sintesi proteica degli *Archaea*, il che fa pensare che, pur essendo dotati anch'essi di ribosomi 70S, abbiano però struttura e/o composizione diverse.

È molto importante sottolineare che la differenza fra i ribosomi procariotici e quelli eucariotici permette l'impiego degli antibiotici senza che questi agiscano contro i ribosomi dell'organismo eucariota che ospita il batterio.

I geni che codificano per le subunità ribosomiali nei procarioti sono tre:

- gene per l'rRNA 16S
- gene per l'rRNA 5S
- gene per l'rRNA 23S.

È possibile identificare la sequenza nucleotidica dei geni codificanti per gli rRNA dei procarioti: in questo modo è stato possibile ricollocare filogeneticamente molti procarioti sulla base delle sequenze geniche dell'rRNA 16S e 23S, all'origine anche dell'attribuzione ai domini diversi degli *Archaea* e dei *Bacteria*. Si tratta di molecole altamente conservate nel corso dell'evoluzione e presenti con piccole variazioni in tutti i procarioti: sono cioè "sequenze-firma" che facilitano la costruzione degli alberi filogenetici. Una volta estratto dal DNA, il gene che codifica per l'rRNA 16S di un microrganismo viene amplificato tramite PCR per poter disporre della quantità necessaria a ottenere la sequenza nucleotidica completa, che solitamente non eccede di molto i 1500 nucleotidi. La sequenza ottenuta viene poi confrontata e rielaborata attraverso programmi dedicati con le sequenze simili contenute in specifici database genetici: in questo modo si riescono a verificare relazioni di parentela e discendenza fra i microrganismi al fine di ricostruire possibili alberi filogenetici. Lo stesso procedimento può essere effettuato negli eucarioti con l'analisi dell'rRNA 18S.

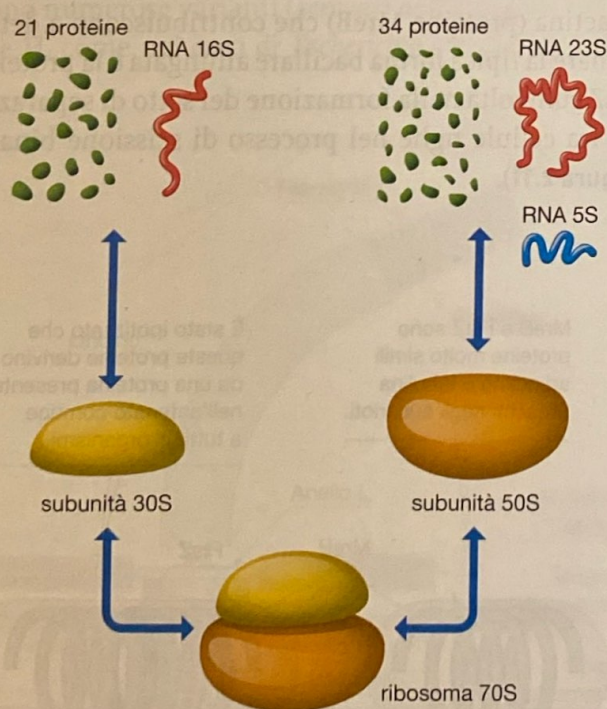


Figura 2.12 Ribosomi di *Escherichia coli* (70S) osservati al microscopio elettronico e rappresentazione dei vari componenti dei ribosomi stessi.

10 Inclusioni citoplasmatiche: struttura e funzioni

Le inclusioni citoplasmatiche sono distinte in base alla funzione e alla composizione (tabella 2.13).

I granuli metacromatici

Queste inclusioni (**granuli di volutina**) devono il loro nome al particolare comportamento tintoriale: appaiono rossi se vengono colorati con coloranti come il blu di metilene. Costituiscono una riserva di polifosfati inorganici e sono caratteristici nel *Corynebacterium diphtheriae* (bacillo di Loeffler), agente della difterite, e quindi importanti per la sua identificazione. Inclusioni metacromatiche si rinvenivano anche in protozoi, alghe e miceti.

I carbossisomi

Queste inclusioni, contenute in una membrana monostratificata, contengono l'enzima ribulosio 1,5-difosfato carbossilasi, enzima del *ciclo di Calvin* che permette l'utilizzo di CO₂ come unica fonte di carbonio (fissazione di CO₂). I carbossisomi sono presenti nei cianobatteri, nei tiobacilli e nei batteri nitrificanti.

I clorosomi

Nei batteri verdi sulfurei e nei batteri verdi filamentosi si trovano i **clorosomi**, sistemi di membrane coinvolti nel processo fotosintetico, di forma ellittica appiattita e aderenti alla membrana plasmatica, delimitati a loro volta da una membrana monostratificata. Nei clorosomi si trovano i *pigmenti antenna*, in grado di captare radiazioni luminose anche deboli e di trasferirne l'energia ai centri di reazione (molecole di clorofilla), collocati nella membrana plasmatica. I batteri verdi contengono batterioclorofilla *a* e clorofilla *c*, *d*, o *e* (clorofille dei clorosomi).

Tabella 2.13

Principali inclusioni citoplasmatiche nei batteri

Tipi di inclusioni	Diffusione	Funzione
Non delimitate da membrana		
Polifosfati	Molti batteri	Riserva di fosforo
Poliglucosidi (amido, glicogeno ecc.)	Molti batteri	Fonte di carbonio e di energia
Ficobilisomi	Molti cianobatteri	Assorbimento dell'energia luminosa
Delimitate da una membrana semplice		
Vescicole gassose	Batteri acquatici	Galleggiamento
Carbossisomi	Batteri autotrofi	Sito di fissazione del CO ₂
Clorosomi	Batteri fotosintetici	Centro di assorbimento dell'energia luminosa
Globuli di zolfo	Batteri che ossidano l'H ₂ S e batteri fotosintetici rossi sulfurei	Riserva energetica

I tilacoidi

Nei cianobatteri i pigmenti fotosintetici sono contenuti nei tilacoidi, sistemi di membrane a doppio strato che originano da invaginazioni della membrana plasmatica. I tilacoidi contengono ficobilisomi, inclusi granulari contenenti ficobiliproteine e pigmenti accessori (ficobiline) fra cui la ficocianina di colore azzurro e la ficoeritrina rossa. Questi pigmenti captano le radiazioni luminose e le trasferiscono alla clorofilla dei centri di reazione.

I vacuoli gassosi

Sono cavità vuote presenti in batteri acquatici come i cianobatteri, nei batteri fotosintetici anossigenici e in alcuni archeobatteri (alobatteri). In ciascuna cavità si individuano vescicole gassose disposte in file che permettono il galleggiamento delle cellule al fine di catturare il massimo di energia luminosa e quantità ottimali di nutrienti e ossigeno.

I granuli polisaccaridici di riserva

Sono inclusioni di amido e glicogeno, rivelabili con una colorazione a base di iodio: i granuli di amido si colorano di blu, mentre quelli di glicogeno appaiono rossastri. La presenza di questi polimeri ricopre un elevato interesse in microbiologia industriale per la possibilità di ottenere plastiche biodegradabili.

I granuli di zolfo

Alcuni solfobatteri del genere *Thiobacillus* ricavano energia dall'ossidazione dello zolfo e da composti solforati che vengono depositati nel citoplasma come granuli di riserva energetica.

Le inclusioni lipidiche di riserva

Si trovano in batteri dei generi *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Spirillum* e altri. L'acido poli- β -idrossibutirrico (PHB) è una delle inclusioni lipidiche più comuni ed esclusive dei batteri. Sono evidenziabili impiegando coloranti come il Sudan nero.

I magnetosomi

Sono inclusioni costituite da magnetite (Fe_3O_4) o Fe_3S_4 , che rendono le cellule suscettibili a orientarsi all'interno di un campo magnetico. Si trovano per esempio in *Aquaspirillum magnetotacticum* (batterio acquatico Gram negativo; **figura 2.14**). Questi batteri e altri affini utilizzano i magnetosomi per infiltrarsi nei sedimenti fino a trovare condizioni ottimali per la loro sopravvivenza (scarsa concentrazione di ossigeno e presenza di ossido di azoto). Il ferro trivalente è insolubile ed entrerebbe con difficoltà nella cellula, per cui i batteri producono specifiche sostanze chelanti, note come **siderofori**, che lo legano rendendolo solubile.



Figura 2.14 Magnetosomi di *Aquaspirillum magnetotacticum*, osservato al TEM (microscopio elettronico a trasmissione) a 13535 ingrandimenti. È un batterio Gram negativo, di forma elicoidale e microaerofilo.