

MICROORGANISMI

Tassonomia : scienza che studia la classificazione degli esseri viventi

- **Cellula** : unità strutturale della materia vivente : 2 tipi procariote(semplce) , eucariote(complesse)

Cellule procariote : parete, membrana plasmatica, citoplasma(acqua + proteine /zuccheri + Ribosomi di RNA + genoma DNA organizzato in un filamento detto cromosoma a sua volta costituito da porzioni detti geni)

Cellule eucariote : + complesse delle procariote : non hanno capsula come i batteri procarioti , hanno parete , membrana e citoplasma + NUCLEO (contenente DNA + nucleoli) + MITOCONDRIO

Mitocondrio: permette la respirazione cellulare

Respirazione cellulare : il mitocondrio acquista ossigeno, sostanze nutritive e le trasforma in energia e ATP

Virus : i virioni sono rivestiti da un involucro proteico contenente DNA o RNA

Come si nutrono i batteri : batteri autotrofi (ricavano C da CO₂) batteri eterotrofi (digeriscono e ricavano C da sostanze organiche complesse)

Come si riproducono i batteri:

Riproduzione asessuata :Scissione(duplica DNA formando una cellula uguale=batteri); Gemmazione(duplica il DNA formando una cellula più piccola o gemma= lieviti);per spore(esempio funghi)

Riproduzione sessuata : negli eucarioti avviene per fusione di due cellule = gameti che formano una nuova cellula detta

Zigote

- **Procarioti** : si dividono in batteri e cianobatteri (o alghe azzurre)

Batteri : si dividono in micoplasmi(privi di parete), cocci(parete sferica),bacilli(parete a bastoncini) , spirilli(a spirale)

Gram :positivi(trattengono il 1° colore),negativi (decolorano e trattengono un 2° colore)

Gram positivi (parete unica = con mureina ,peptidoglicano)

Gram negativi(parete doppia formata da= mureina + lipopolisaccaridi ; che contiene uno spazio detto periplasma

Riproduzione procarioti = asessuata

Trasferimento genico : i procarioti possono scambiare DNA per trasformazione (la cellula donatrice emette DNA che viene incorporato da altre cellule)per coniugazione(lo scambio avviene attraverso pili)per trasduzione (lo scambio avviene attraverso virus o fagi)

- **Protisti** : organismi unicellulari a cellula eucariota si dividono in1)Protozoi,2)Protisti algali,3)Eterotrofi plurinucleati

Protozoi : monocellulari, eucarioti, eterotrofi , si muovono con ciglia, usati nella depurazione delle acque

Esempio di protozoo : Paramecio, usa ciglia, sintetizza proteine, scambia DNA per coniugazione

Tipi di protozoi = Flagellati, Sarcodini, Ciliati, Opaline, Sporozoi

Protisti algali : Euglenofite (autotrofe), Crisofite (esempio diatomee con corpo siliceo), Dinoflagellati (fitoplancton)

Clorofite

- **Eterotrofi polinucleati**: funghi mucilluginosi e muffe d'acqua

Funghi: organismi eterotrofi (esempio *Saccharomyces cerevisiae* trasforma glucosio in alcool)

Tipi di funghi : lieviti unicellulari, specie a filamenti (ife) pluricellulari (micelio)

Parete cellulare dei funghi : contiene chitina

Differenze nella parete cellulare : funghi (parete contiene chitina), vegetali (parete contiene cellulosa), procarioti (peptidoglicano)

Differenze tra funghi saprofiti e parassiti : saprofiti = si nutrono di materiale in decomposizione; parassiti = si nutrono a spese degli organismi viventi (usano ife dette austeri)

Esempi di simbiosi? : fungo che vive sulla pianta (assorbe nutrimento e cede sali); licheni (fungo + alga)

COLTIVAZIONE E CRESCITA DEI BATTERI

- **terreni** : base nutritiva per uno o più ceppi batterici

TVC = Total Viable Count su SPCA (MICROORGANISMI/g o ml)

CMT = carica microbica totale

SPCA = Standard Plate Count Agar

Culture : Fonti di carbonio : da acetati a 2C a monosi come glucosio a polisaccaridi, anche oli e idrocarburi

Culture : Fonti di azoto : inorganiche (NO₃, NO₂, NH₄), organiche (proteine, amminoacidi, urea)

Culture : Fonti di ioni : K, Mg, Ca, S, P, funzionano da catalizzatori (es P per acidi nucleici) e oligoelementi come Zn, Fe, Mn

- **Resa di un processo di accrescimento microbico di un terreno** :

resa = cellule formatesi / concentrazione del carbonio iniziale

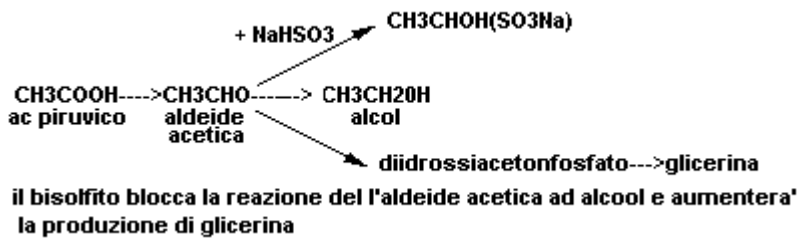
- **Fattori di crescita microbica** : composti organici essenziali alla crescita servono per regolare e favorire la crescita del microorganismo.

Tipi di fattori : vitamine, amminoacidi, basi puriniche e pirimidiniche

Come agiscono : come precursori, inibitori o induttori

Precursori: es ac fenilacetico aggiunto al terreno favorisce la prod di penicillina

Inibitori : aggiunti al terreno favoriscono la produzione di prodotti diversi (Es :se aggiungo bisolfito alla fermentazione alcolica.....



induttori : stimolano gli enzimi che presiedono alla loro produzione

- **Controllo della crescita e influenza di alcune variabili**

Influenzano la crescita :temperatura,pH , pressione osmotica,areazione,

Influenza della temperatura : un aumento della temperatura influenza la velocita' di crescita ,ogni microorganismo avrà una temperatura massimale,ottimale e minimale di crescita

Leggi della sterilizzazione :

1°legge di Bigelow a temp.cost.: $\ln N_0/N = k \cdot \text{tempo} = \text{tempo}/D$ (N_0 =conc iniziale; D =tempo di riduzione decimale) e curva di sopravvivenza ($\log N$ contro tempo a temperatura costante)

2°legge di bigelow : $\log D_1/D_2 = (t^2 - t^1)/z$ (z = costante)

e curva di distruzione termica (D contro temperatura)

Influenza del pH :il pH influenza gli enzimi dai quali dipende la crescita dei microbi :

categorie di microrganismi influenzati da pH :neutrofili (pH 6-8),acidofili(5-7),basofili(7-11)

influenza della pressione osmotica:i microbi mantengono una press osmot. Interna superiore alla esterna : una variaz elevata di press osmotica esterna provoca plasmolisi (contrazione) ,plasmoptisi (scoppio) : microorganismi osmofili sopportano altissime press osmotiche.

Influenza della areazione : i microbi hanno un metabolismo respiratorio

- **Antimicrobici** : ossidanti (H_2O_2 , KMnO_4 , Cl_2 ..)denaturanti(iodio, fenolo,) solventi della parete lipidica(ammoni quaternari...),alchilanti, antibiotici e sulfamidici di sintesi
- **Processi di coltivazione**

Crescita limitata : si ha quando il nutrilita è insufficiente o quando si accumulano prodotti tossici

Crescita non limitata : segue la legge già vista **$\ln N/N_0 = k \cdot \text{tempo}$**

(la curva si chiama di sviluppo cellulare $\ln N$ contro tempo)

e fissando $N=2$ (cioè la concentrazione finale doppia) si avrà :

$\text{tempo} = \ln 2/k = \text{tempo di raddoppio}$ (con k = **tasso di crescita specifico**)

Crescita in discontinuo o batch :si inocula il nutrilita e si attende il completamento del processo che sintetizza il prodotto 1)durante lo sviluppo delle cellule,2) a meta' dello sviluppo,3)alla fine della crescita

Crescita in continuo : si aggiunge nutrimento al processo e si toglie prodotto mantenendo la crescita batterica regolare

METABOLISMO CELLULARE

- **respirazione aerobica (agente ossidante o accettore di elettroni = ossigeno)** nutrienti o nutrienti vengono ossidati da coenzimi (NAD e FAD) con formazione di energia e recupero degli stessi coenzimi

$C_6H_{12}O_6$ -----GLICOLISI-ANAEROBICA----->AC PIRUVICO+ATP+NADH+H+-----KREBS-AEROBICO-----> ACETILCOENZIMA A ----->+
 $CO_2+NADH+FADH_2+CO_2$ ----- + O_2 -----> NAD + FAD + H_2O + ATP + CALORE

- **respirazione anaerobica : (agente ossidante = anione)** alcuni microorganismi respirano in assenza di ossigeno ad esempio i batteri denitrificanti : es $NO_2 + NADH + H^+ \rightarrow N_2 + NAD + H_2O + ENERGIA$ oppure $CO_2 + NADH + H^+ \rightarrow CH_4 + NAD + H_2O + ENERGIA$ OPPURE $SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-}$.
- **fermentazione :(agente ossidante = molecola organica):** piruvato+NADH+H+----->lattato + NAD

Esempio $C_6H_{12}O_6$ -----> $CO_2 + H_2O + 700$ KCAL/MOLE = RESPIRAZIONE

Esempio $C_6H_{12}O_6$ -----> $CO_2 + C_2H_5OH + 20$ KCAL/MOLE = FERMENTAZIONE

- **Tipi di fermentazione**

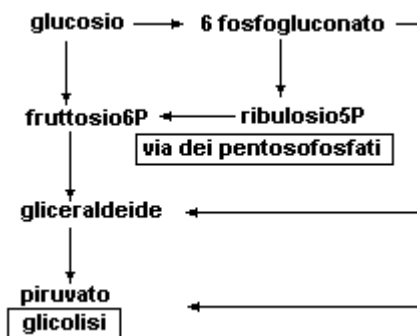
Fermentazione omolattica : piruvato + NADH + H+-----> $CH_3CHOHCOOH$ (ac lattico) + NAD

Fermentazione alcolica : piruvato + NADH + H+-----> CH_3CH_2OH (alcol) + CO_2 + NAD

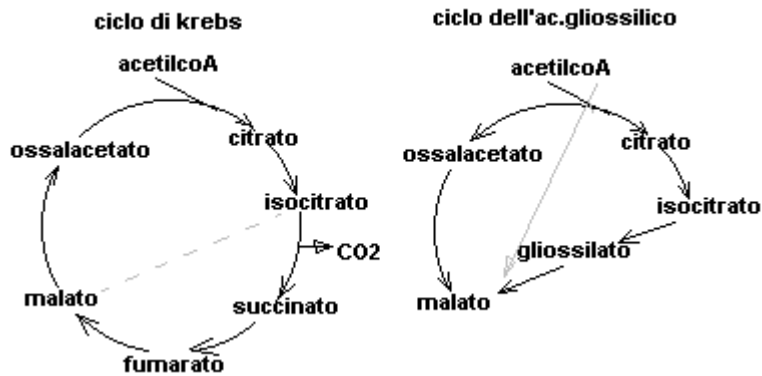
Fermentazione eterolattica : glucosio----->alcol + ac lattico + acetato + glicerolo

Metaboliti: PRIMARI(prodotti finali della fermentazione);secondari(prodotti della respirazione)

- **Ciclo dei pentosi** :(avviene nel citoplasma) è processo alternativo alla glicolisi



- **Ciclo dell'ac glicossilico** : alternativo al ciclo di krebs



- **Fissazione dell'azoto**

Alcuni microorganismi che vivono nei noduli radicali trasformano N_2 in $2N$ e grazie all'energia dall'ATP e all'enzima trasforma $2N$ in NH_3 ; NH_3 +acglutammino----->glutammina; glutammina + chetoacidi ----->amminoacidi (fonte di azoto)+ac chetoglutarico

- **Metabolismo protidico** : porta alla formazione del citoplasma

GENETICA

- **DNA**:macromolecola formata da due filamenti a spirale e costituiti da sequenza di nucleotidi,tenuti insieme da legami di idrogeno

(nucleotide = ac fosforico+zucchero+base azotata (Guanina,Citosina,Adenina,Timina)

- **codice genetico** :serie di informazioni genetiche trasmesse da padre a figlio e che detta la biosintesi degli enzimi e delle proteine .(corrispondenza tra tre basi azotate e amminoacidi)
- **sintesi proteica** :il DNA stampa(trascrizione) l'RNA messaggero che induce l'RNA trasportatore a rilasciare(traduzione) un determinato amminoacido (cellule eucariote si riproducono per via sessuale, le cellule procariote invece per via asessuale)
- **mutazione** : modificazione della sequenza delle basi del DNA e puo' essere puntiforme(sostituzione di una sola base)---la mutazione cambia il genotipo (insieme dei geni presenti) e spesso il fenotipo(caratteristiche osservabili dall'esterno)
- **modificazione fenotipica** : il microorganismo si trasforma(perchè vuole adattarsi all'ambiente) non per mutazione ma per differente lettura dei geni
- **ricombinazione**: tra due cellule avviene uno scambio di porzioni di DNA : avviene con 4 meccanismi principali :**trasformazione** : il DNA donatore entra nella cellula ospite nella fase di crescita logaritmica(di competenza);**coniugazione** :la cellula immette DNA attraverso un condotto detto PILO; **trasduzione** : trasferimento di DNA da una cellula ad un'altra attraverso un virus;**fusione cellulare** : se la parete della cellula viene distrutta da enzimi rimane il protoplasto che puo' fondere con un'altro protoplasto e riformare parete sulla nuova cellula
- plasmidi : piccoli tratti di DNA circolare presenti nel citoplasma,contengono informazioni non importanti sulla vita del batterio
- episomi : simili ai plasmidi pero' si possono riprodurre

cap 5 BIOINGEGNERIA E MANIPOLAZIONE

- **manipolazione dei geni** :**la tecniche** di manipolazione usano enzimi litici (nucleasi di restrizione) che tagliano il DNA nel punto prescelto,altri enzimi(ligasi) ricompongono il DNA **manipolazione dei geni** : **come**: l'enzima di restrizione taglia il DNA in un tratto detto palindroma che ha la caratteristica di avere le sequenze azotate della

doppia elica in simmetria e cioè es: in alto CAATTG e sotto GTTAAC : l'enzima taglierà CA__ATTG sia sopra che sotto ;si potrà innestare frazione DNA e ricombinare facilmente :CA__frazDNA__ATTG

- **trasferimento materiale genetico :dove** : il DNA ricombinato è trasferito in una cellula ospite mediante un plasmide ricombinante o un virus o cosmide (ibrido virus plasmide) : il trasferimento avviene o con la tecnica della fusione dei protoplasti o per microiniezione nel nucleo della cellula
- **clonazione** : processo di riproduzione di una cellula che mantiene inalterate le sue caratteristiche genetiche **selezione delle cellule ricombinate e clonate** : poichè le cellule si trovano assieme ad altre , per separarle e selezionarle si introduce nel plasmide un gene resistente ad un antibiotico (l'antibiotico successivamente distruggerà le cellule non ricombinate) oppure un gene radioattivo.
- **utilizzo del prodotto** : la proteina sintetizzata può essere estratta dalla cellula e separata per cromatografia o filtrazione **ibridazione degli acidi nucleici** : DNA costituito da filamenti appartenenti a diverse cellule : si ottiene ibridando un plasmide con un lievito e il plasmide che si forma si riproduce sia nella cellula batterica che in quella del lievito.

ENZIMI

- **enzima** : proteina che catalizza una reazione biochimica
 - **enzimi immobilizzati** : poichè gli enzimi sono instabili si è provveduto a inglobarli in supporti inerti e insolubili in acqua per poter farne uso ripetuto ,per non inquinare il prodotto ,per maggior rapidità di produzione, gli enzimi più conosciuti sono le idrolasi e possono essere extracellulari o intracellulari(e devono essere quindi estratti)
 - **metodi di immobilizzazione** : sono 4 :
1. immobilizzazione per inclusione in matrice :enzima inglobato in polimero insolubile immobilizzazione per inclusione in capsula : usato in farmacia e le capsule sono fosfolipidi immobilizzazione per legame ad adsorbimento: nell'adsorbente l'enzima è fissato da legami ad idrogeno, e idrofobici immobilizzazione per legame covalente :l'enzima reagisce (con un suo gruppo funzionale es amminico, carbossilico, fenolico,) con l'adsorbente.

proprietà degli enzimi immobilizzati : capacità catalitica diminuita(per la immobilizzazione), stabilità dell'enzima aumentata

- **applicazioni industriali** : 1) produzione di sciroppo di zucchero invertito da saccarosio; 2) idrolisi del lattosio(galattosio e fruttosio); 3) uso della beta-glucosidasi per idrolizzare terpeni che aumentano l'aroma del vino
- **applicazioni analitiche** : l'enzima viene adsorbito su un elettrodo che misura ad esempio il dosaggio del glucosio; in medicina diversi elettrodi a enzimi misurano parametri biologici,

cap12 CELLULE IMMOBILIZZATE

- **Cellule immobilizzate** : cellule intrappolate in gel o polimeri, o strutture porose con lo scopo di prolungarne la vita e l'attività catalitica.
- **tecniche di immobilizzazione**: adsorbimento : su un polimero; per attacco multiplo : adsorbimento + legame covalente; per flocculazione : esempio alginato in una soluzione di calcio precipita il sale calcico con formazione di sfere ; per pellettizzazione : formazione di masse sferiche dette pellets; per intrappolamento : in gel poroso, per incapsulamento in fibre
- **caratteristiche e vantaggi delle cellule immobilizzate**: attività catalitica elevata, più resistenti, consente lavorazioni in continuo

PRODUZIONE INDUSTRIALE

- **finalità della microbiologia industriale**: 1) produrre microorganismi, 2) enzimi, 3) metaboliti primari e secondari, 4) trasformazione microbiologiche di prodotti chimici
- **tipi di funghi** usati nell'industria: lieviti (unicellulari) e muffe (pluricellulari)
- **lieviti** : funghi unicellulari aerobi facoltativi (vivono anche in anaerobiosi) sono ascomiceti, basidiomiceti, deuteromiceti

1) ascomiceti : esempi sono il *Saccharomyces cerevisiae* usato per la panificazione, vino, birra prod alcoli (in anaerobiosi da' alcool, con ossigeno da' CO₂ e acqua)

2) deuteromiceti : esempi candida che si sviluppa nei residui di lavorazione della carta e metabolizza zuccheri (vedi muffe)

- **inibizione dei lieviti** : effetto Pasteur (l'ossigeno inibisce la fermentazione); effetto glucosio (glucosio inibisce)
- **produz di lieviti ad uso alimentare** : i lieviti sono selezionati per una resa qualitativa migliore e sono prodotti da melasse zuccherine di barbabietola in un ambiente ossigenato per evitare che inizino a fermentare (si blocca l'effetto Pasteur)
- **fermentazione alcolica** : si trattano vegetali ricchi di zucchero e amido e avviene ad opera di lieviti *Saccharomyces* e *Candida* da 20 a 30° e pH da 4 a 5,5 : iniziale aerobiosi e successiva anaerobiosi per tre giorni in un fermentatore

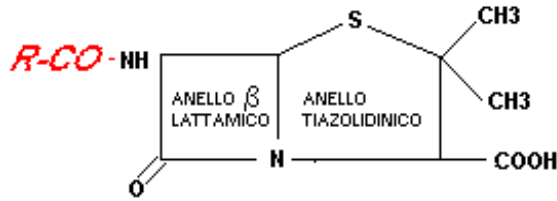
zucchero ----> piruvato CH₃COCOO⁻----decarbossilasi---->acetaldeide CH₃CHO---deidrogenasi-->alcol . CH₃CH₂OH

- **muffe** : micorganismi eucarioti struttura filamentosa come i funghi e possono essere Zigomiceti, Ascomiceti, Deuteromiceti ; applicazioni produzione di acido citrico, antibiotici, steroid
 - **fermentazione citrica** : l'ac citrico COOH-CH₂-C(OH)(COOH)-CH₂-COOH è usato nell'industria come acidulante (alimentare), nei bagni galvanici, nella produz di plastificanti , come sequestrante di Ca e Mg nei detersivi. Si ottiene:
1. La muffa *Aspergillus niger* produce ac citrico che utilizza nel ciclo di Krebs ; se il terreno è privo di Ferro si blocca l'aconitasi , il ciclo si interrompe e si ottiene accumulo di ac citrico (sono importanti oligoelementi come Fe, Mn, Cu, Zn)



- **Produzione di antibiotici :**

1. antibiotico : sostanze prodotte da microorganismi che distruggono o inibiscono altri microorganismi ; produzione effettuata per via fermentativa
2. tipi : **oligopeptidici** : penicilline bloccano la sintesi della parete cellulare, **chinolonici** : tetracicline agiscono sulla sintesi proteica, **macrolidi** : come eritromicina agiscono sul DNA; **glicosidici, polipeptidici, polienici** .
3. penicillina : scoperta nel 1929 da Fleming ,ricavata da muffe *Penicillium*, *Aspergillus*, la formula comune è



4.

la penicillina agisce la sintesi proteica della parete cellulare bloccando gli enzimi che formano legami tra catene peptidiche, alcuni enzimi (betalattamasi) di batteri resistenti addirittura attaccano l'antibiotico

- **specie batteriche usate nei processi industriali :**

1. acetobacter per prod aceto, ossidazione ad aldeide acetica e succ ac acetico
2. lactobacillus per prod ac Dlattico,(glucosio--->piruvato----->CH3CHOHCOOH)
3. brevibacterium flavum per prod di lisina (AAminoacido)
4. corynebacterium glutamicum per prod ac glutammico(AA e aromatizzante)
5. acetobacter per produrre vitamina C

- **microrganismi come fonte proteica :** si chiamano SCP(single celle proteins) e sono stati studiate :alghe,batteri,muffe,lieviti

DEPURAZIONE DELLA ACQUE

Depurazione mediante microorganismi : nel processo a fanghi attivi i microorganismi trasformano le sostanze in prodotti insolubili e gas

Importante è il substrato nutritivo per i batteri , se manca si ha eutrofissazione

Puo' avvenire in presenza di aria o no.

Trattamenti : primario(grigliatura, desabbiatura, disoleazione)secondario(uso di fanghi attivi, digestione, denitrificazione, defosfatazione) terziario(uso di disinfettanti, coagulanti, adsorbenti)

Standard internazionale = 30 ppm di sostanze solide sospese ; 20 ppm in BOD (mg di ossigeno dischiesto dalla sost organica= ossigeno presente al tempo iniziale - ossigeno presente dopo 5 giorni; diverso da COD che è la richiesta di ossigeno da materiale ossidabile))

Refluo biodegradabile = prodotto che ha un rapporto BOD/COD >0,6 indica che la quantita' di sostanze biodegradabili è alta ; con un BOD basso si lavora in aerobiosi, alto in anaerobiosi

LABORATORIO

tecniche di colorazione dei BATTERI :

1. colorazione al blu di metilene
2. colorazione di gram : i gram - hanno parete ricca di lipidi , dunque se colorati con cristal violetto e trattati con alcool perdono il colore, quindi; batteri + cristal violetto -----> si

colorano-----> + alcool-----> rimangono colorati i gram + con parete povera di lipidi e perdono colore i gram-----> trattati con fucsina si colorano solo i gram-
3. gram + = esempiu lactobacilli clostridi; gram- pseudomonas, KES ,

conta batterica : effettuata dopo incubazione , misura le ufc (unita' formanti colonie)

analisi delle acque :

TVC (total viable count) carica totale : 1 ml di campione messo in capsula di petri + SPCA (standard plate count agar) e incubazione per 48 ore a 30° (72 ore a 22°)

Metodo della epifluorescenza : 100 ml di acqua filtrati sotto vuoto in filtro assoluto successivam trattato con colorante e osservato al microscopio dopo 30 min.

Metodo MF(membrana filtrante)

Metodo MPN(most probable number)prove ripetute e risultati confrontati con tabelle per coliformi:
prova presuntiva : acqua da analizzare + laurilriptose broth (contenente lattosio che viene attaccato dai coliformi) ; prova di conferma : acqua da analizzare + brodo verde brillante e la capsula di durham immersa capovolta nel provino si riempie di gas prodotti dalla fermentazione del lattosio da parte dei soli coliformi