

MICRORGANISMI

GENERALITÀ

I batteri sono organismi unicellulari, visibili al microscopio, diffusi in ogni ambiente e distinguibili tra loro per caratteristiche diverse come le esigenze nutrizionali e adattabilità ambientale. Sono microrganismi procarioti e, diversamente dagli eucarioti come alghe funghi e protozoi, non possiedono membrana nucleare.

Una caratteristica peculiare dei batteri è la presenza di un involucro rigido, salvo rare eccezioni (micoplasmi), costituito da un grosso polimero detto peptidoglicano (vedi oltre) che conferisce loro la forma, la dimensione, la protezione nei confronti dell'ambiente esterno e della pressione osmotica interna (5-20 atm ca).

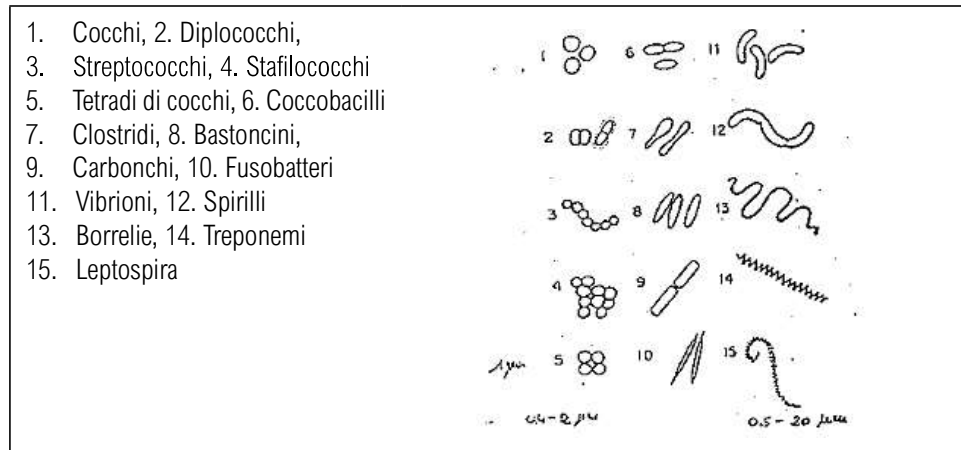
All'osservazione al microscopio ottico i batteri si presentano con forme diverse che vanno da quella sferica a quella cilindrica; i primi vengono detti cocchi e i secondi bastoncini o bacilli. Esistono poi numerose varianti e alcuni batteri appaiono, ad esempio, come corti bastoncini (coccobacilli) o con una o più curvature lungo l'asse maggiore (vibrioni e spirilli) o a spirale flessibile (spirochete). Le caratteristiche morfologiche possono essere utili a scopi identificativi ma non consentono di prevedere altre proprietà della cellula (Figura 1.1).

Le dimensioni sono piuttosto variabili da 0,4 a 2 μm nei cocchi da 0,5 a 20 μm nei bastoncini.

A causa della loro trasparenza alla luce sono difficilmente individuabili mediante l'osservazione diretta al microscopio ottico ed è necessario ricorrere a un trattamento con composti opacizzanti. Questo si ottiene mediante l'impiego di coloranti (blu di metilene, fucsina, ecc) che rendono i microrganismi chiaramente visibili al microscopio ottico. Nel 1884 un ricercatore danese H. C. Gram, nel tentativo di mettere in evidenza i microrganismi nei tessuti infetti, ideò una colorazione che si rivelò molto utile per l'individuazione di due gruppi diversi di batteri, *gram-positivi* e *gram-negativi*, sulla base della risposta alla colorazione. Le attuali informazioni consentono di affermare che i batteri *gram-positivi* e *gram-negativi* possiedono due tipi di involucro esterno o parete, attraverso il quale alcune molecole (ad es. coloranti o antibiotici) possono entrare o uscire più o meno facilmente dalla cellula, caratteristica su cui si basa appunto la risposta alla colorazione di Gram.

La colorazione di Gram si esegue su uno striscio di cellule batteriche essiccate e fissate al calore o con agenti chimici su un vetrino. Il preparato viene quindi colorato con cristalvioletto per 1 minuto e, successivamente, trattato per 45 secondi con una soluzione di iodio e ioduro di potassio in acqua (liquido di Lugol) che funge da mordente. Dopo aver sciacquato con acqua, il preparato è decolorato con alcool etilico a 95° per 30 secondi e, dopo un ulteriore risciacquo per allontanare l'etanolo, è colorato con fucsina o safranina per 1-2 minuti. I microrganismi gram-positivi non si decolora-

Figura 1.1
Morfologia dei batteri.



no e quindi trattengono il cristalvioletto mentre i gram-negativi, totalmente decolorati dall'alcool, assumono la colorazione rossa della fucsina. Questa colorazione non porta ad una individuazione di una specie, ma identifica la natura della parete batterica in generale, fatto di per sé molto importante come si avrà modo di trattare più avanti. Un esempio di colorazione più specifica è quella di Ziehl-Neelsen che risulta utile per l'identificazione dei batteri alcool-acido-resistenti, come ad esempio *Mycobacterium tuberculosis* (Vedi Capitolo 5 per ulteriori informazioni su queste colorazioni).

ANATOMIA DELLA CELLULA BATTERICA

Schematicamente dall'esterno verso l'interno i batteri presentano:

- a) glicocalice o slime o strato mucoso
- b) capsula
- c) flagelli, pili o fimbrie
- d) strato S
- e) parete
- f) membrana citoplasmatica
- g) mesosomi
- h) citoplasma che comprende:
 - cromosoma o altro materiale genetico accessorio: es. plasmidi.
 - ribosomi
 - corpi inclusi

Glicocalice e capsula

L'involucro dei microorganismi può presentare nella parte più esterna una struttura di natura polisaccaridica non ben delineata e facilmente separabile dal corpo batterico nota come glicocalice o slime o strato mucoso.

Secondo alcuni il glicocalice si suddivide in capsula (se è ben associata alla superficie) o slime/ strato mucoso (se è poco aderente) (vedi anche Capitolo 3). È generalmente sintetizzato da batteri adesi a superfici lambite da liquidi, come ad esempio i cateteri venosi e urinari. Tale struttura non appare essenziale per la sopravvivenza dei microorganismi, ma li aiuta favorendo l'adesione e formando una barriera (filtro) contro le sostanze nocive e i predatori. La sostanza polimerica esocellulare costituisce la matrice di una struttura nota come biofilm, all'interno del quale possono coesistere comunità diverse di microorganismi che risultano in questo modo al riparo dagli insulti ambientali. Per esempio quando sui cateteri è presente il biofilm l'unica soluzione terapeutica è la sostituzione del catetere stesso perché la matrice mucopolisaccaridica non permette l'eradicazione dei germi. Con-

siderando la cavità orale, la placca che si forma sulla superficie dei denti o a livello sub-gengivale responsabile della formazione della carie e delle infezioni parodontali altro non è che biofilm che impedisce l'attività degli antibiotici e dei composti che esplicano la loro azione sulla superficie dei batteri (surfattanti), antibiotici e l'intervento dei macrofagi. Più coesa alla superficie dei batteri si trova la capsula, sempre di natura polisaccaridica ma molto più compatta, importante fattore di patogenicità. La capsula protegge dalla fagocitosi e dall'azione di qualche antibiotico, gioca un ruolo fondamentale nell'adesività e nella colonizzazione di vari substrati (ad esempio la superficie dei denti). Nel caso specifico dei germi anaerobi è stato osservato che la capsula favorisca la formazione degli ascessi.

Flagelli

Sono appendici disposte sulla parte esterna dell'involucro. Nei batteri di forma bastoncellare i flagelli possono presentarsi in quattro disposizioni: un singolo flagello a un polo della cellula (batteri monotrichi), un ciuffo di flagelli a uno o entrambi i poli della cellula (batteri lofotrichi), un flagello a entrambi i poli (batteri anfitrichi), numerosi flagelli sull'intera superficie esterna (batteri peritrichi).

Il filamento è formato da subunità di una proteina detta flagellina. Il flagello è inserito sul corpo batterico sino a livello della membrana. Il corpo basale consiste in una o due copie di anelli che possono ruotare come un asse in una boccia. Il flagello possiede un moto rotatorio nei due sensi orari, l'energia è fornita dalla forza motrice protonica. Tale forza è generata dagli ioni che rientrano nella cellula (attraverso la parete e generano ATP) a causa di un gradiente ionico che si forma durante i processi energetici cellulari (vedi oltre). Il flagello consente alla cellula di muoversi nelle varie direzioni. Il movimento è casuale con rapide inversioni di direzione, ma la presenza di sostanze nutrienti (attraenti) determina una riduzione del numero delle inversioni quando la cellula si muove verso il composto. Il movimento verso molecole che attraggono la cellula batterica si chiama chemiotassi positiva, la situazione inversa si ha in presenza di sostanze nocive per i batteri (repellenti) in tal caso si ha allontanamento del microorganismo (chemiotassi negativa).

Pili o Fimbrie

Le fimbrie sono appendici diverse dai flagelli, sono costituite da una proteina che gioca un ruolo fondamentale nel processo di adesione dei batteri ad altre cellule (patogenicità). Esistono diversi tipi di fimbrie ma alcune specie batteriche ne possono essere prive. Queste strutture sono adesine che mediano l'interazione con molecole presenti nella controparte cellulare o con materiali inerti. I pili sono strutture di tipo tubolare in grado di creare un ponte citoplasmatico tra due cellule batteriche e facilitare, nel processo di coniugazione, il trasferimento di DNA da un donatore a un ricevente; rappresentano uno dei tanti sistemi di secrezione dei gram-negativi. I pili e, talvolta, le fimbrie sono codificati da plasmidi (vedi oltre) che veicolano insieme a questi caratteri anche l'informazione genetica per la resistenza agli antibiotici.

Strato S

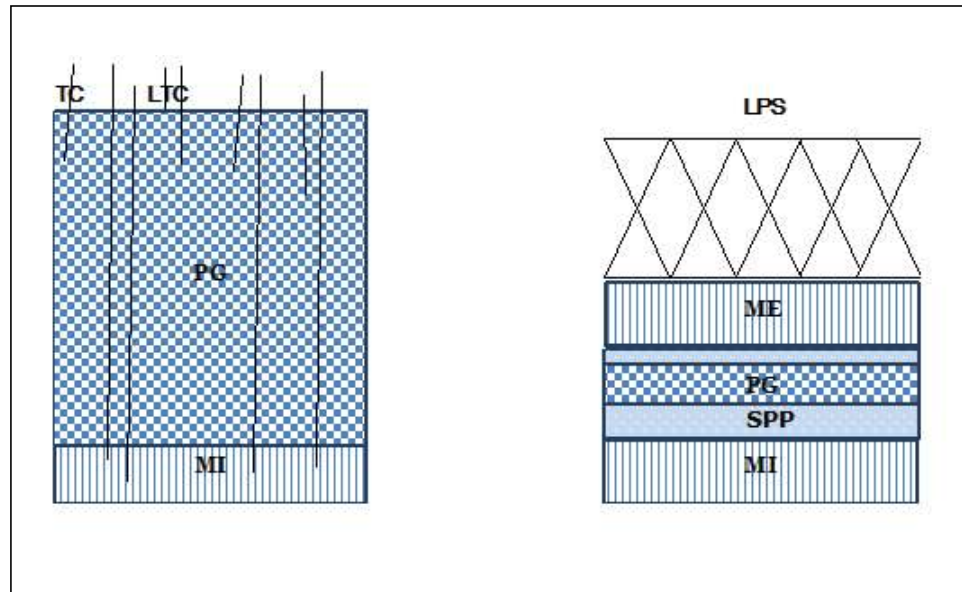
È una struttura (cristallina) di sub-unità glicoproteiche piuttosto gommosa con distribuzione regolare e di spessore variabile, con proprietà auto-assemblanti. Il ruolo non è noto, ma appare svolgere una funzione di resistenza verso i batteriofagi o i predatori come il *Bdellovibrio bacteriovorus* o da filtro per certi composti.

La parete (cell-wall)

È lo strato compreso tra la membrana citoplasmatica e la capsula quando presente (Figura 1.2).

■ Figura 1.2

Differenze strutturali dell'involucro dei gram-positivi e dei gram-negativi. MI, membrana interna o citoplasmatica; PG, peptidoglicano; TC, acido teicoico; LTC, acido lipoteicoico; SPP, spazio periplasmico; ME, membrana esterna; LPS, lipopolisaccaride. La MI contiene delle proteine funzionali, la ME contiene le porine. Vedi testo.



Nei Gram-positivi la parete è composta da uno spesso strato di peptidoglicano che contiene lunghe catene di acidi teicoici (polimeri di alcoli polivalenti, in genere glicerolo o ribitolo, legati da gruppi fosfato e associati a zuccheri e a D-alanina); quando gli acidi teicoici originano dalla membrana citoplasmatica vengono detti lipoteicoici. Queste molecole sono chelanti il calcio e il magnesio e possono giocare un ruolo di primo piano nell'adesività dei gram-positivi a diverse superfici come lo smalto dei denti.

La parete dei gram-negativi è costituita da un sottile strato di peptidoglicano e dalla membrana esterna. Quest'ultima struttura contiene fosfolipidi, proteine (tra cui la lipoproteina di Braun che serve da ancoraggio al peptidoglicano) e, nel foglietto esterno, un glicolipide complesso, il lipopolisaccaride (LPS).

Come già detto, i batteri sono classificati come gram-positivi o gram-negativi sulla base della loro proprietà di trattenere il cristalvioletto dopo trattamento con alcool. Se l'alcool non decolora le cellule, i batteri (gram positivi) mantengono il colore violetto; in caso contrario, i batteri (gram negativi), dopo trattamento con fucsina, assumono il colore rosa o rosso.

Questa differenza risiede nella struttura della parete e, in particolare, nel maggiore spessore del peptidoglicano nei gram-positivi rispetto ai gram-negativi. Nei primi, lo spesso strato di peptidoglicano, disidratato dall'azione dell'alcol, si oppone all'uscita del complesso cristalvioletto e iodio, mentre nei secondi il peptidoglicano, presente in uno strato sottile, non impedisce la rimozione del colorante e le cellule vengono completamente decolorate. Come già detto, la parete fornisce ai batteri protezione osmotica (5-20 atm nei cocci gram-positivi) e gioca un ruolo fondamentale nella divisione.

Il peptidoglicano è un complesso polimero strutturato in tre parti: lo scheletro composto da una parte glicanica costituita da lunghissime catene di N-acetil-glucosammina e acido N-acetil muramico, un gruppo tetrapeptide legato all'acido N-acetil-muramico e un gruppo peptide che si lega al peptide della parte glicanica adiacente (cross-bridge) (legame crociato) (vedi Figura 1.4).

Lo scheletro è lo stesso per varie specie batteriche, il tetrapeptide e il legame crociato possono variare.

GRAM-POSITIVI

La parete dei gram-positivi, come già accennato, contiene oltre al peptidoglicano quantità notevoli di acidi teicoici; vi sono inoltre acidi teicuronici, polisaccaridi e proteine (Figura 1.2). Gli acidi teicuronici sono polimeri simili agli acidi teicoici che presentano acido N-acetilmansuronico al posto dell'acido fosforico. Sono sintetizzati in alternativa agli acidi teicoici quando il fosfato è limitato.

Tra i polisaccaridi sono compresi polimeri di mannosio, arabinosio, galattosio, ramnosio e glucosammina e altri acido zuccheri.

GRAM-NEGATIVI

Lo strato sottile di peptidoglicano dei gram - negativi è circondato dalla membrana esterna. Si tratta di un doppio strato lipidico costituito non solo da fosfolipidi e proteine (tra cui le OMP, outer membrane proteins) come la membrana citoplasmatica, ma anche da lipopolissaccaride (LPS) nel foglietto esterno. La membrana esterna impedisce la perdita di proteine dello spazio periplasmico e protegge i batteri dai prodotti tossici (es. sali biliari, antibiotici) e dagli enzimi idrolitici dell'ambiente. La presenza di pori, formati da trimeri di particolari proteine dette porine, consente l'ingresso nella cellula di molecole idrofile a basso peso molecolare. Alcuni di questi canali sono aspecifici, cioè consentono il passaggio a qualunque piccolo composto, altri sono specifici nel senso che permettono il transito di un solo tipo di sostanza (es. LamB responsabile dell'ingresso del maltoso). Sistemi multiproteici spesso costituiti da proteine della membrana esterna, del periplasma e della membrana citoplasmatica, sono specificamente dedicati al trasporto di molecole di grandi dimensioni dall'esterno all'interno della cellula e viceversa. Altre proteine presenti nella membrana esterna sono le lipoproteine che, tra l'altro, conferiscono stabilità alla struttura. La più abbondante è la lipoproteina di Braun che ancora la membrana esterna al peptidoglicano. Alcune OMP possono fungere da recettori per alcuni batteriofagi (virus batterici).

L'LPS è formato da un complesso lipide, chiamato lipide A, al quale è attaccato un polisaccaride distinto in una porzione centrale, core, e in una serie di unità ripetute laterali. Il lipide A è formato da unità disaccaridiche di glucosammina fosforilata alle quali sono legati acidi grassi a catena lunga (acido β -idrossimiristico, sempre presente, altri possono variare). Il core dell'LPS è costante in tutte le specie gram-negative ed è formato da unità tri-, tetra- o pentasaccaridiche; infine, la terza componente è formata da unità polisaccaridiche ripetute che vanno a formare l'antigene O, diverso tra ceppi non solo dello stesso genere ma anche della stessa specie. L'LPS è carico negativamente, tutte le catene sono unite tra loro in modo non covalente da ioni bivalenti fornendo alla molecola stabilità e conferendo alla membrana impermeabilità alle molecole idrofobiche. Può essere rimosso con agenti chelanti o con antibiotici come le polimixine e, solo marginalmente, dagli aminoglicosidi. L'LPS viene liberato nell'ambiente soprattutto a seguito della lisi cellulare ed è estremamente tossico per gli animali, rappresenta infatti la componente endotossica dei gram - negativi. Il termine endotossina si riferisce, in particolare, al lipide A. Data la grande variabilità dell'LPS, la risposta immunitaria verso questa struttura non può essere definitiva. È sintetizzato nella membrana citoplasmatica ed è necessario per il funzionamento di molte proteine della membrana esterna (Figura 1.3).