

INTERAZIONI TRA I BATTERI E L'AMBIENTE



Enzimi di restrizione

CRISPR-Cas

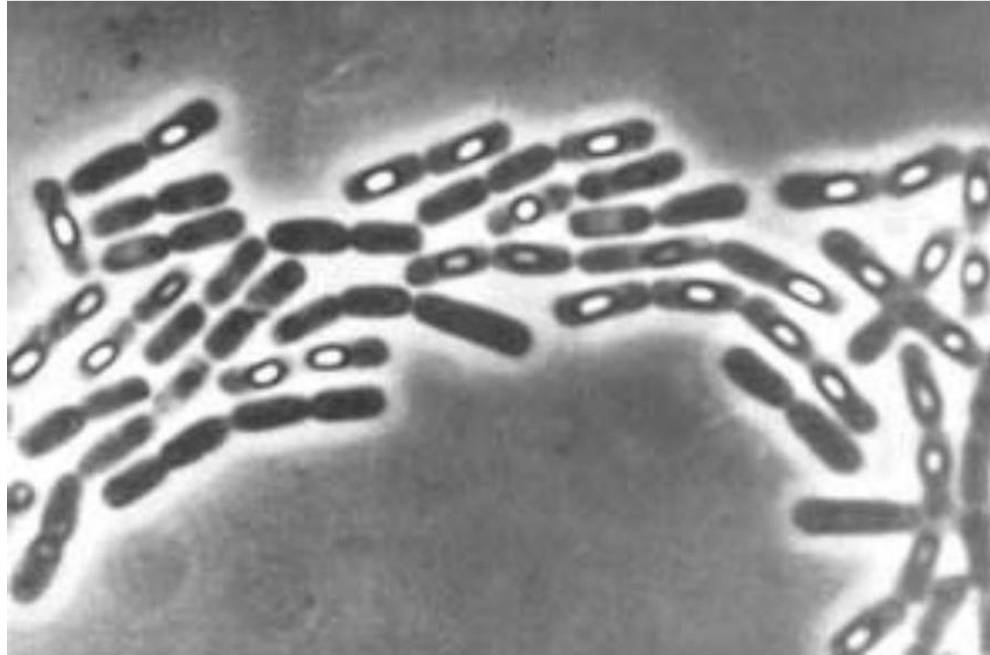
Microbioma

Quorum sensing e biofilm

La spora

LA SPORA BATTERICA

Batteri sporigeni



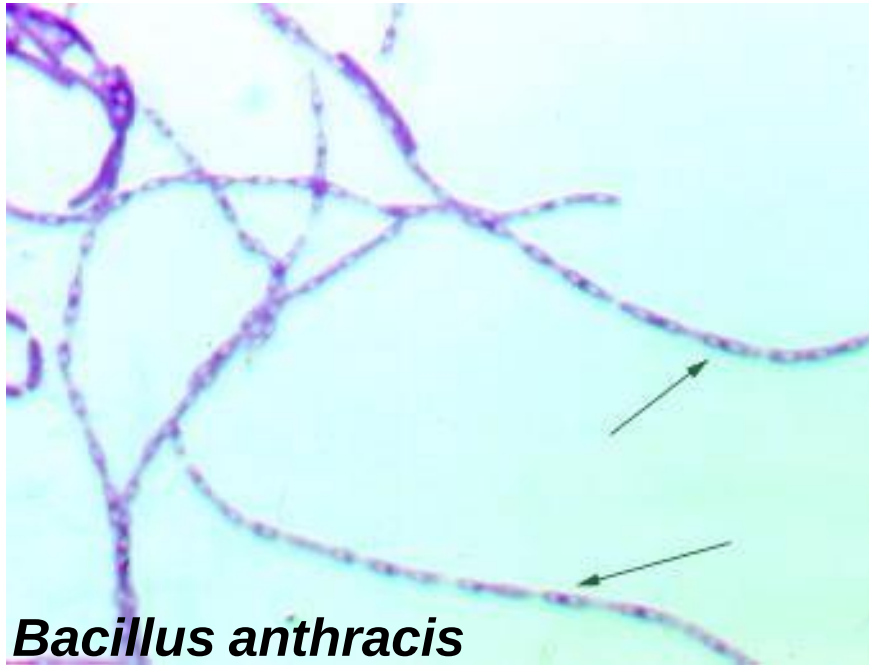
LA SPORA BATTERICA

Esempio di differenziamento nei procarioti

In seguito allo stimolo di particolari condizioni ambientali (condizioni che possono garantire una nutrizione subottimale), i **batteri sporigeni subiscono progressive modificazioni morfologiche** che culminano nella genesi della spora

Solo alcuni batteri sono sporigeni, appartenenti ai generi

- *Clostridium*
- *Streptomyces*
- *Bacillus*



Bacillus anthracis



Clostridium tetani

Bacillus anthracis: antraxe

Clostridium tetani: tetano

Clostridium botulinum: botulismo

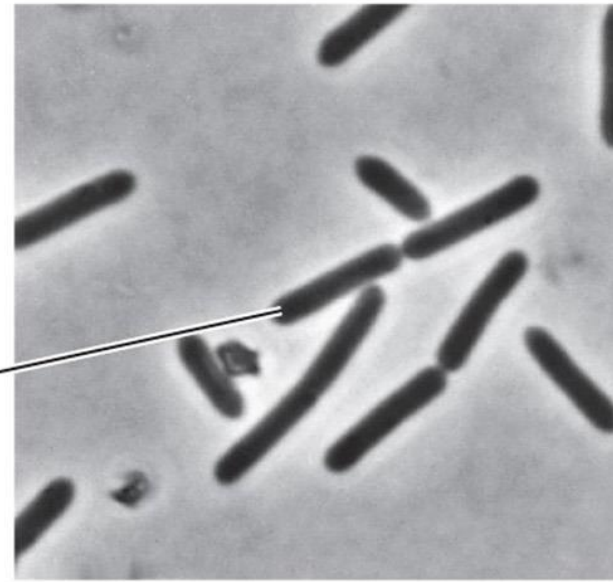
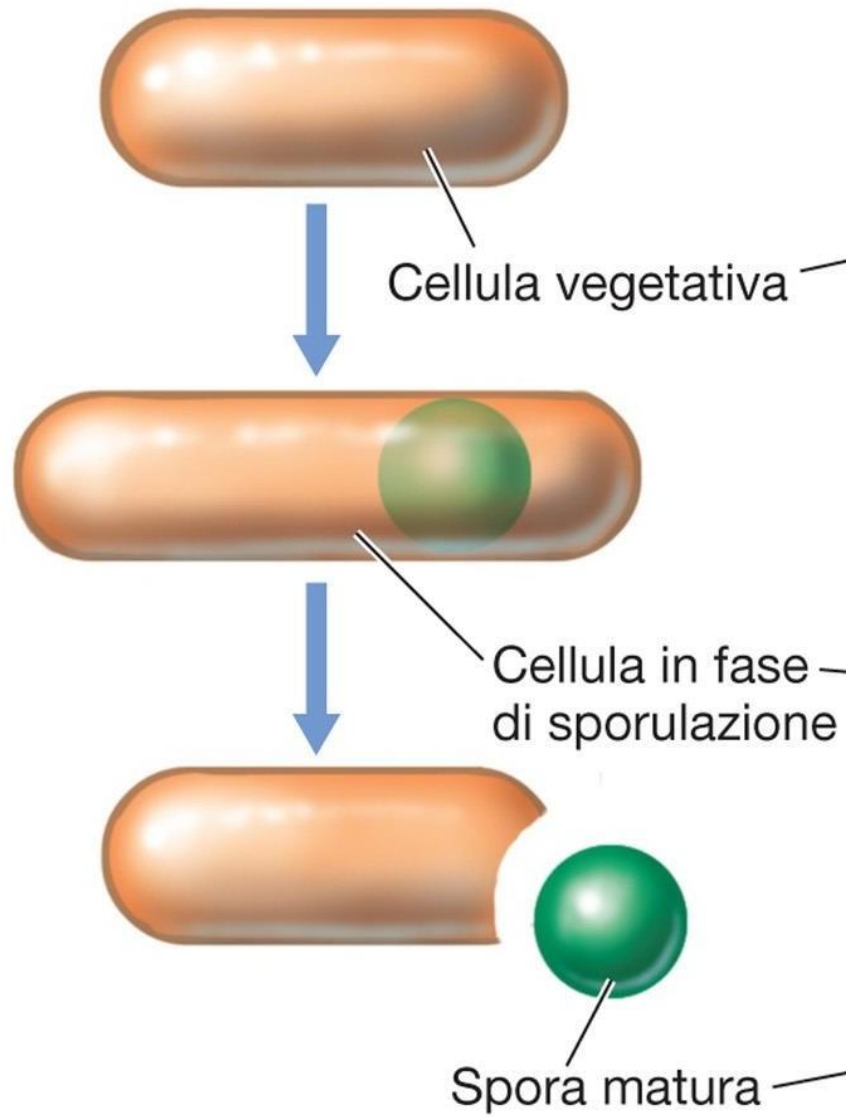
Clostridium perfringens: gangrena gassosa

Sporulazione

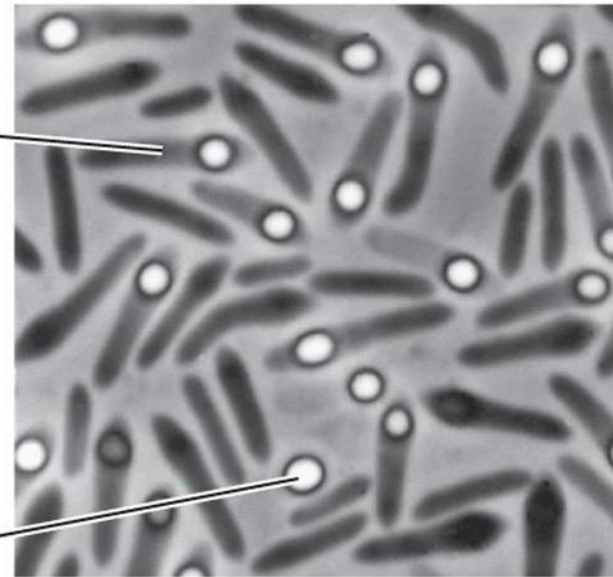
Con la sporulazione (o sporogenesi) **all'interno della cellula vegetativa si verifica la formazione della spora**, caratterizzata da proprietà diverse, sia di composizione sia di funzione

- **Cellula vegetativa → spora: processo richiede 6-8 ore**
- **Inizia in tarda fase logaritmica/inizio fase stazionaria**
- **Forma di resistenza indotta da particolari condizioni di pH, areazione, temperatura e carenza di C, N o P**

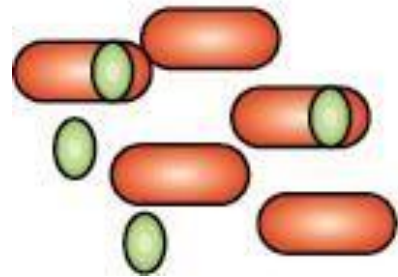
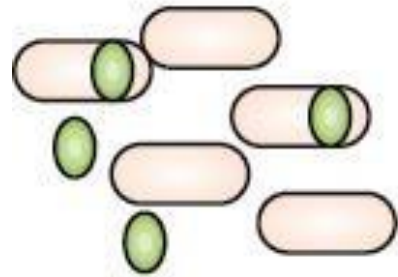
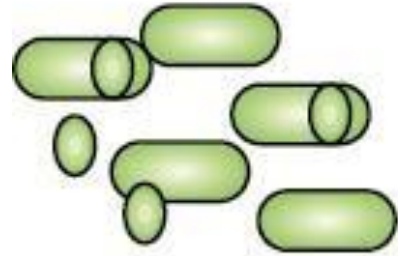
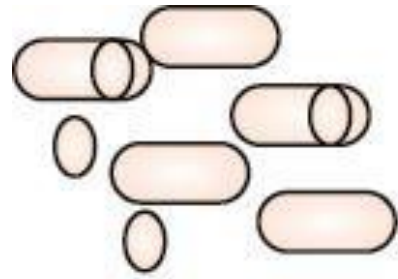
Sono le più resistenti fra tutte le strutture biologiche ad oggi conosciute



Hans Hippe



Hans Hippe



Batteri sporigeni



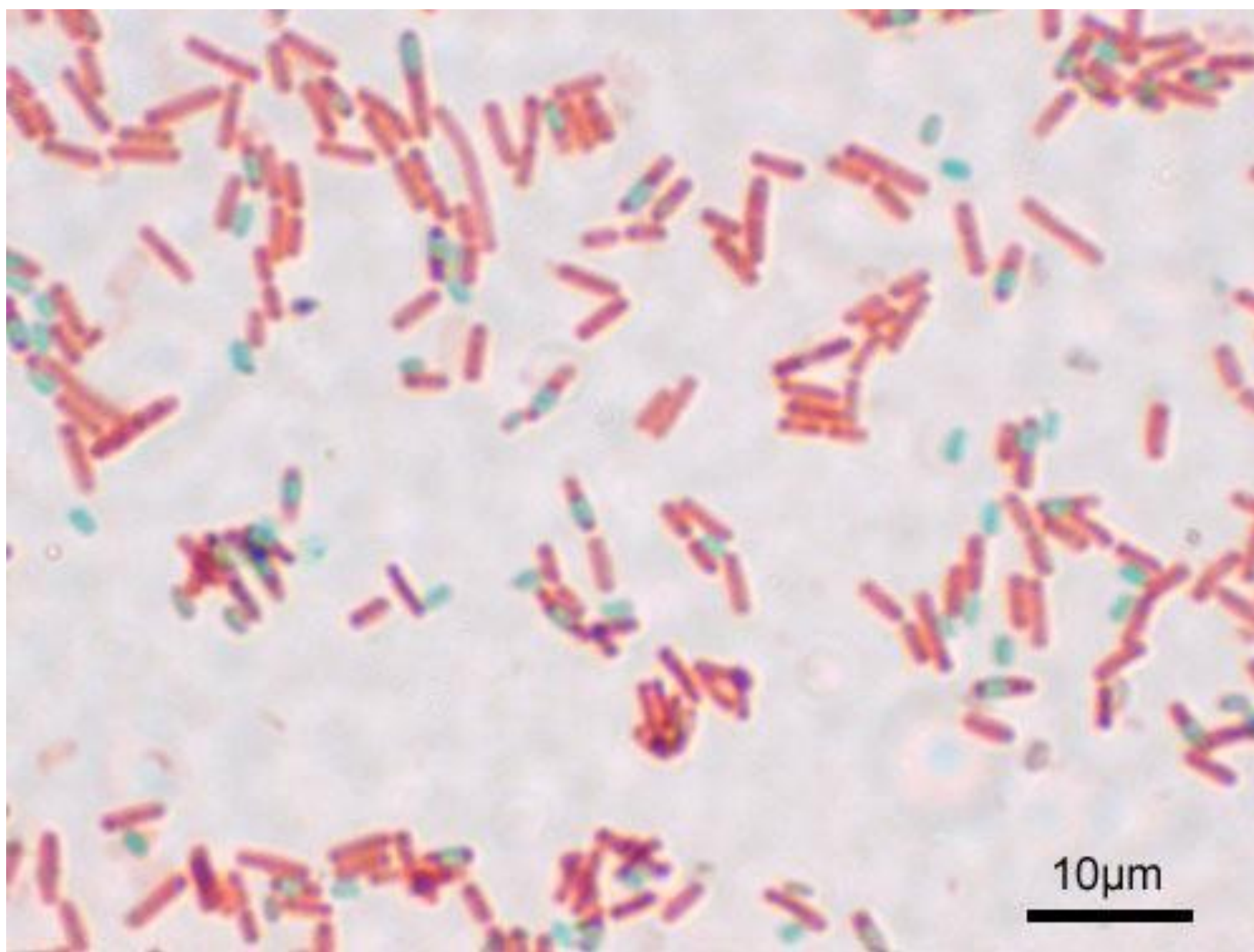
Colorazione a caldo con
verde malachite



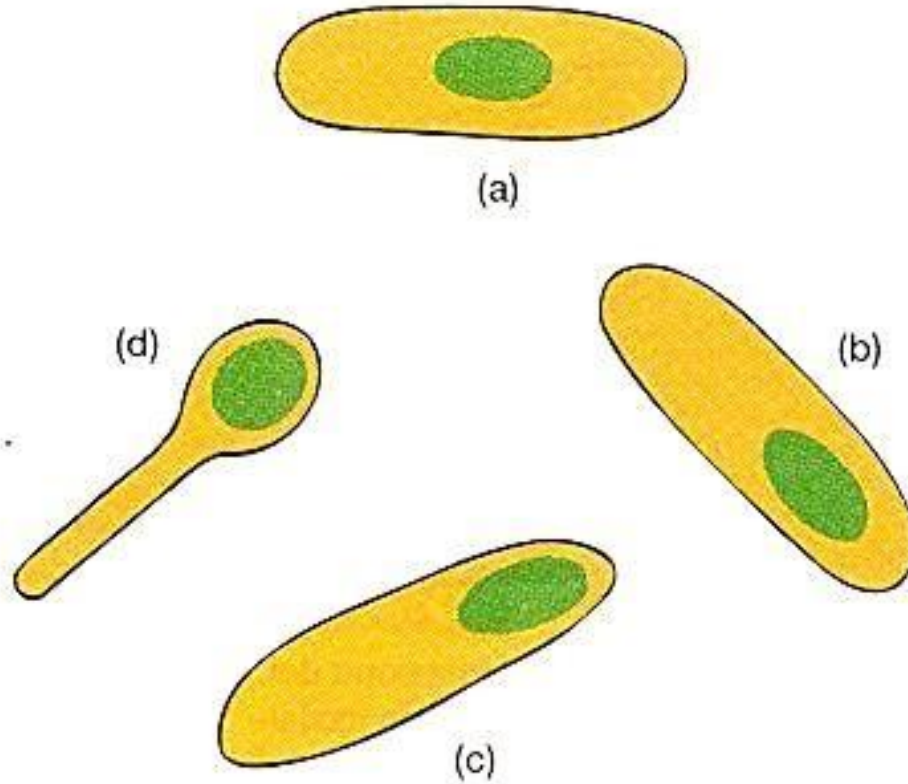
Lavaggio con acqua



Colorazione di contrasto
(**safranina**)

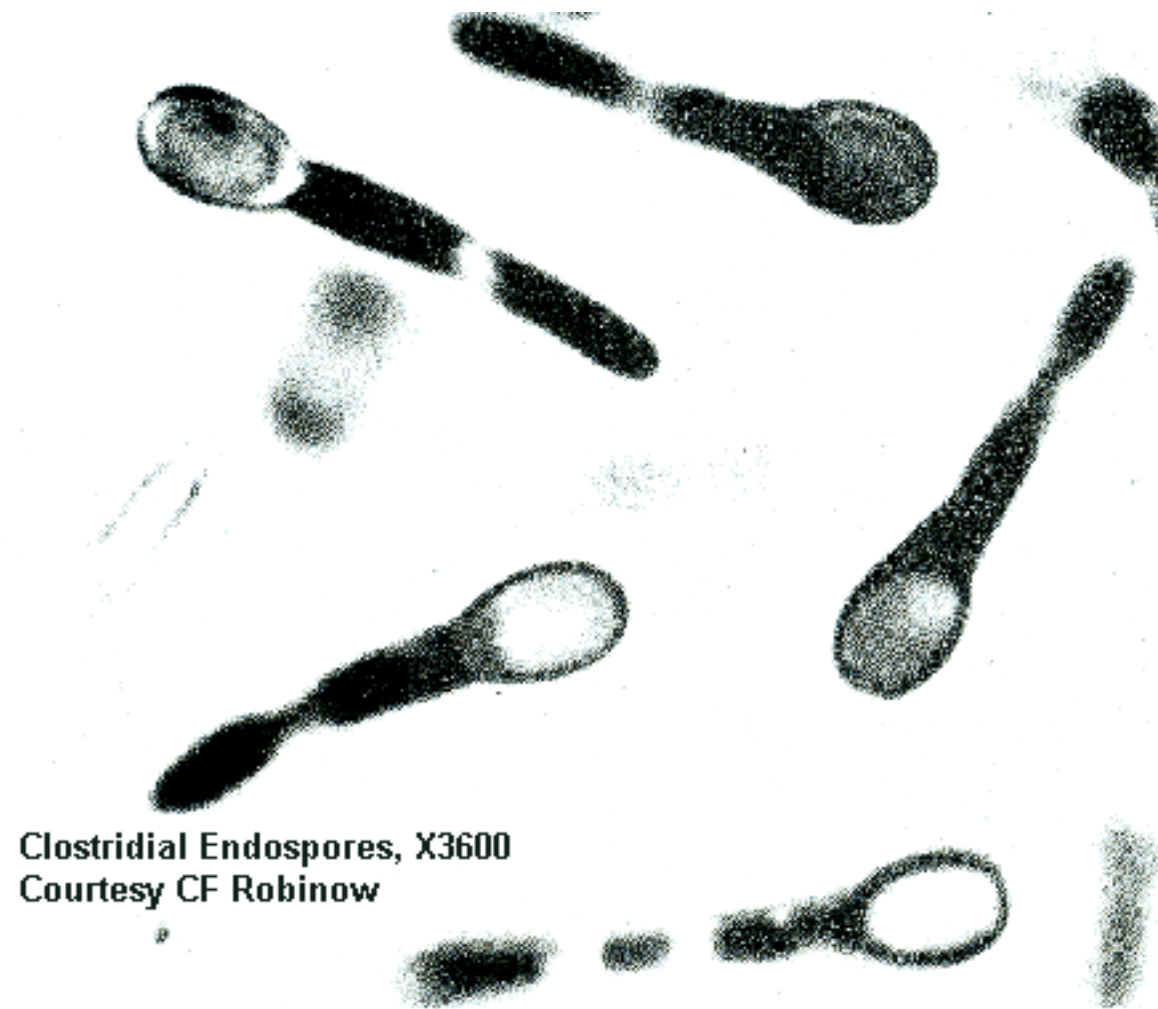


Esempi di disposizione dell'endospora



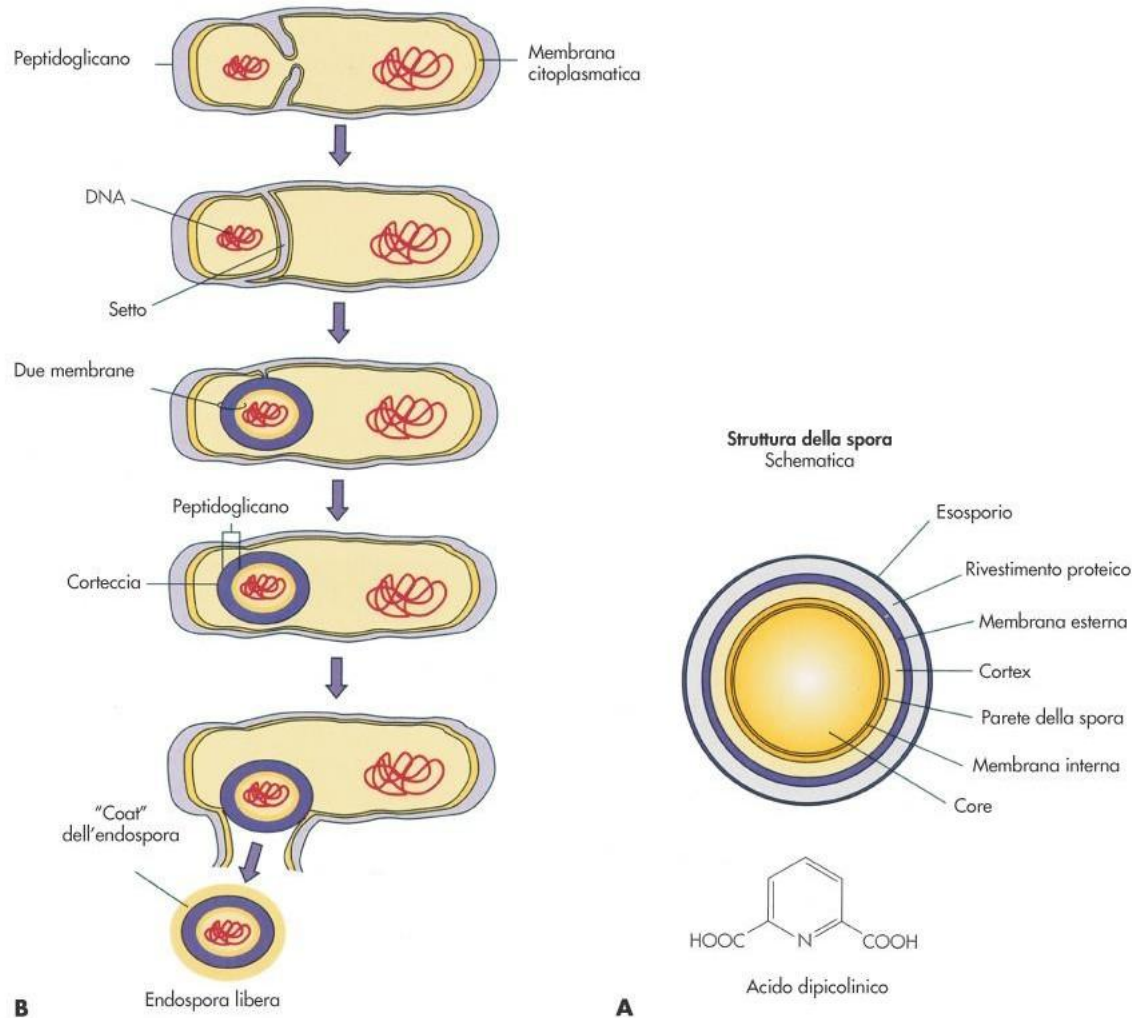
a) Spora centrale. b) Spora subterminale. c) Spora terminale. d) Spora terminale.

diametro della spora eccede
quello della cellula madre



Clostridial Endospores, X3600
Courtesy CF Robinow

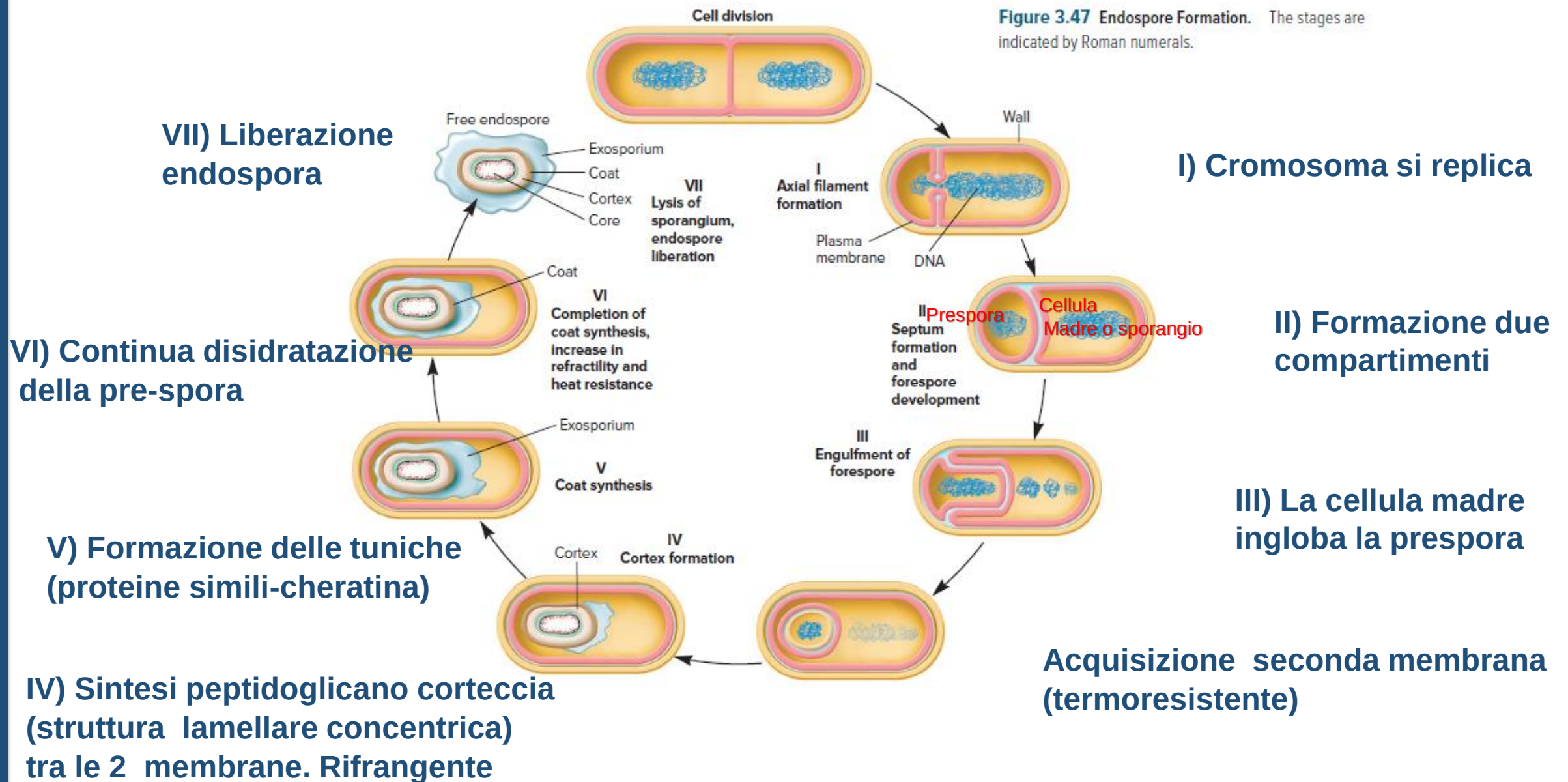
Composizione della spora



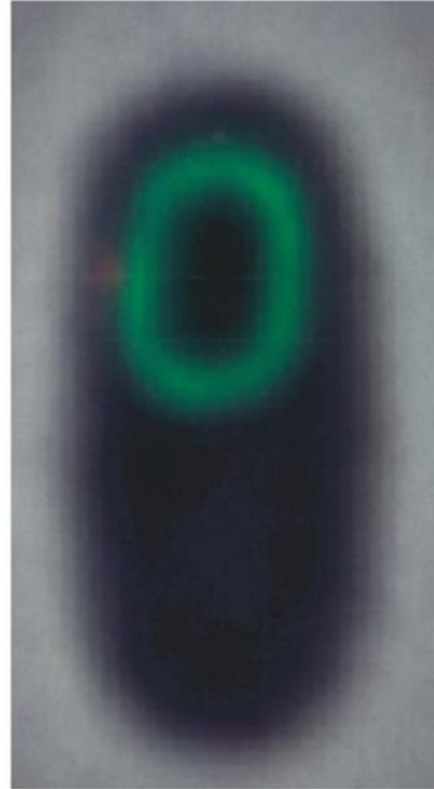
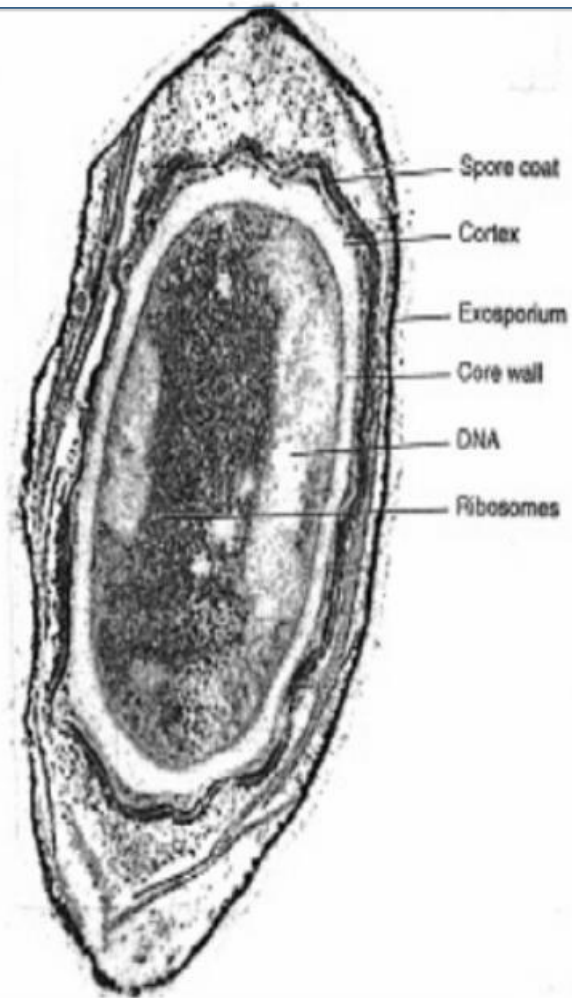
La spora contiene: una copia completa del cromosoma, concentrazioni minime di proteine essenziali e ribosomi, elevata concentrazione di calcio legato all'acido dipicolinico che è essenziale per la **termoresistenza** agendo sulla **stabilizzazione** delle proteine sporali.

FIGURA 3-13. Endospore. A, Struttura schematica della spora. B, Sporogenesi, processo di formazione dell'endospora.

Fasi della sporulazione



Struttura della spora



Kirsten Price

- **Exosporium:** think protein covering
- **Spore coat:** layers of protein
- **Cortex:** peptidoglycan
- **Core:** contains DNA, ribosomes, calcium dipicolinate
 - low water content: heat and chemical resistance
 - small acid-soluble spore proteins (SASPs) protect DNA

Core

DNA, ribosomi, tRNA ed enzimi, acido dipicolinico sotto forma di sale di calcio (fino al 15% peso totale) no mRNA. Il DNA è legato a proteine a basso peso molecolare (**SASP = Small Acid Soluble Proteins**) che lo rendono resistente ai raggi ultravioletti. Il tutto è racchiuso dalla membrana plasmatica e da residui di parete.

Cortex (corteccia)

doppio strato di peptidoglicano, dipicolinato di calcio ed acido diaminopimelico

Coats (tuniche)

proteine solforate molto stabili, **ricche di legami crociati**, che conferiscono resistenza a molti agenti fisici e chimici (proteine simili alla cheratina)

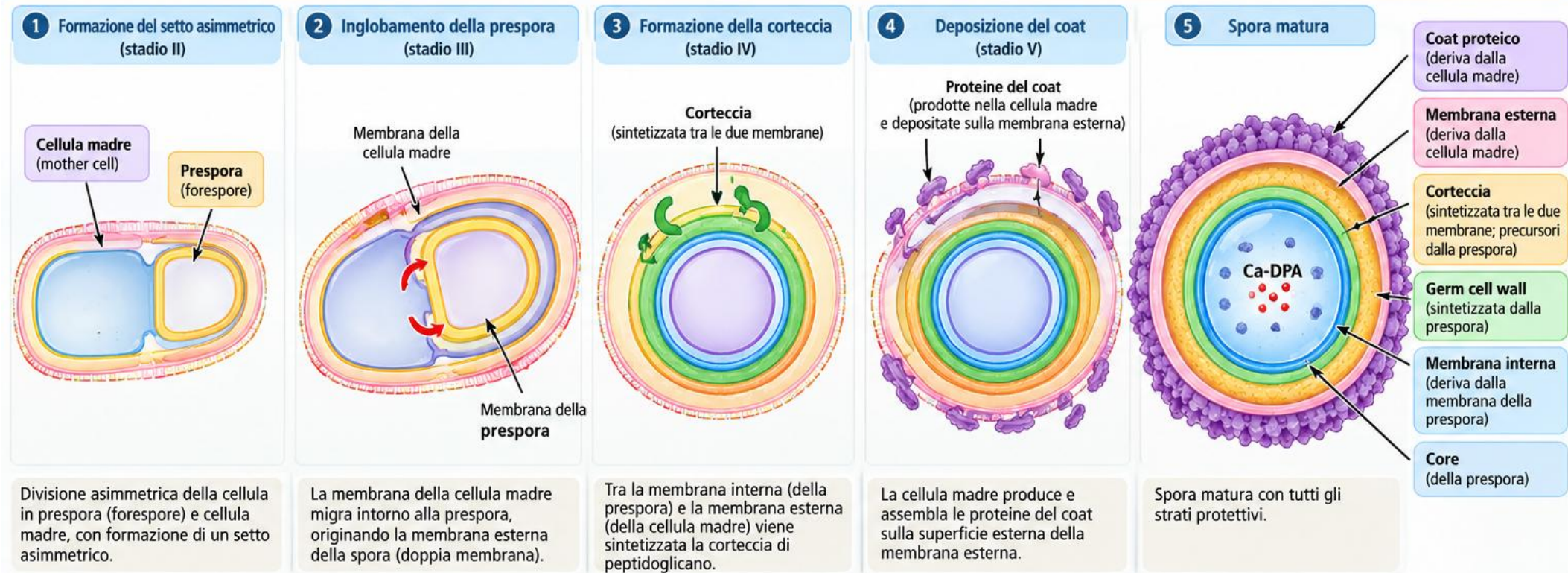
Esosporio

proteine-lipidi-polisaccaridi (fosfolipidi, acido teicoico, acido diaminopimelico, glucosammina) (non sempre presente)

**La Resistenza della spora al calore ed a agenti fisici
e chimici è dovuta a:**

- ❑ Estrema **disidratazione** del protoplasto, **assenza di sintesi proteica** e presenza della **corteccia** (polimero di peptidoglicano elettronegativo e fortemente idrofilo).
- ❑ **Mineralizzazione** del protoplasto (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+})
- ❑ Presenza di **dipicolinato di Ca** (si sostituisce all'acqua)
- ❑ Presenza di **tuniche e corteccia** → potente **barriera** all'ingresso di sostanze e agenti chimici
- ❑ Presenza nel citoplasma delle **proteine SASP** che interagendo con il DNA lo proteggono dai danni causati dai raggi UV.

Origine dei diversi strati protettivi nella spora di *Bacillus subtilis*



Strato della spora	Origine	Quando si forma	Principali componenti	Note
Coat proteico (rivestimento)	Cellula madre	Stadio V (dopo la formazione della corteccia)	Proteine del coat (es. CotE, CotB, CotC, CotO, CotA, ecc.), organizzate in più strati	Completamente derivato dalla cellula madre. Conferisce resistenza e permette il riconoscimento dei germinanti.
Membrana esterna	Cellula madre (membrana plasmatica)	Durante l'inglobamento (stadio III)	Doppio strato fosfolipidico con proteine specifiche (es. BclA associata alla superficie)	Deriva dalla membrana della cellula madre che migra intorno alla prespora.
Corteccia di peptidoglicano	Sintetizzata nella sede tra le due membrane (con precursori dalla prespora)	Stadio IV (dopo l'inglobamento)	Peptidoglicano modificato (basso contenuto di ponti peptidici, acido muramico lattilato)	Viene sintetizzata tra membrana interna ed esterna. I precursori (lipide II) sono prodotti nella prespora e trasportati nella sede di sintesi.
Germ cell wall	Prespora	Stadio IV-V	Peptidoglicano "normale" (simile a quello vegetativo)	Si forma all'interno della corteccia. Non viene degradata durante la germinazione e diventa la parete della cellula vegetativa.
Membrana interna	Prespora (membrana plasmatica)	È la membrana della prespora (stadio II) e rimane interna	Doppio strato fosfolipidico con proteine di germinazione (GerA, GerB, GerK), trasportatori	Diventa la membrana plasmatica della cellula vegetativa dopo la germinazione.
Core	Prespora	Presente sin dalle prime fasi	DNA, ribosomi, Ca-DPA, SASP, enzimi in forma inattiva, basso contenuto di acqua	Rimane all'interno della membrana interna. Si reidrata durante la germinazione.

Sporulazione di *Bacillus subtilis*: controllo dell'attivazione di Spo0A

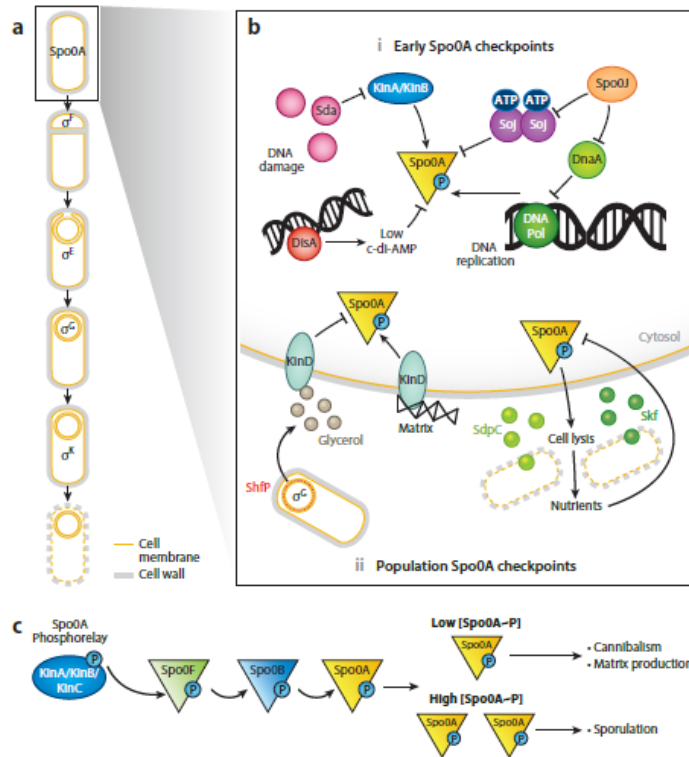


Figure 1

Several checkpoint mechanisms regulate the activation of the master regulator of sporulation entry, Spo0A. (a) The steps of sporulation: Compartment-specific σ factors driving gene expression are indicated at the stage when they become active during the sporulation program. Membranes are depicted in orange; the cell wall is depicted in gray. The progenitor cell asymmetrically divides and produces two progeny cells, a larger mother cell and a smaller forespore. Then, the polar septum curves as the mother cell completely engulfs the forespore. Finally, the mother cell releases the now mature, dormant spore into the environment via programmed lysis. (b, i) Early sporulation checkpoints that regulate the activation of the phosphorylation of Spo0A (yellow, with phosphate shown in light blue circles) at an individual cell level are mediated by Sda (pink), DisA (red), Soj (purple, with bound ATP indicated in dark blue), and SpoJ (orange). (ii) Early checkpoints are shown that regulate Spo0A at a population level and require extracellular signals (glycerol, gray) synthesized by ShfP (red) in a different cell or by released nutrients that result from the lysis of neighboring cells and that are mediated by secreted cannibalism toxin SdpC (light green) or Skf (green) that act through KlnD (teal). (c) The phosphorelay system regulating Spo0A activation. The kinases KinA/KinB/KinC (blue) phosphorylate Spo0F (light green), which then transfers the phosphate group (light blue circle) to Spo0B (light blue) before the final transfer of the phosphate group to Spo0A (yellow). The activated pathways at both low and high levels of active Spo0A (Spo0A~P) are indicated. Abbreviations: c-di-AMP, cyclic diadenylate; DNA pol, DNA polymerase.

1 Checkpoint intracellulari

Danno al DNA (Sda, DisA), replicazione del DNA (DnaA) e stato energetico modulano l'attivazione di Spo0A.

2 Checkpoint della popolazione

Segnali extracellulari, matrice, nutrienti e interazioni tra cellule influenzano l'ingresso nella sporulazione.

3 Fosforelay

Le chinasi sensoriali trasferiscono fosfato a Spo0F $\rightarrow$ Spo0B $\rightarrow$ Spo0A, generando Spo0A~P.

4 Risposta dipendente da Spo0A~P

Livelli bassi: adattamento, matrice e cannibalismo. Livelli elevati: avvio del programma di sporulazione.

Dalla percezione dei segnali alla formazione della spora

1. Segnali e checkpoint

Nutrienti, danno al DNA, replicazione e segnali intercellulari

2. Attivazione del fosforelay

KinA/KinB/KinC $\rightarrow$ Spo0F~P $\rightarrow$ Spo0B~P $\rightarrow$ Spo0A~P

3. Soglia di Spo0A~P

Concentrazioni basse: programmi alternativi; alte: sporulazione

4. Sviluppo della prespora

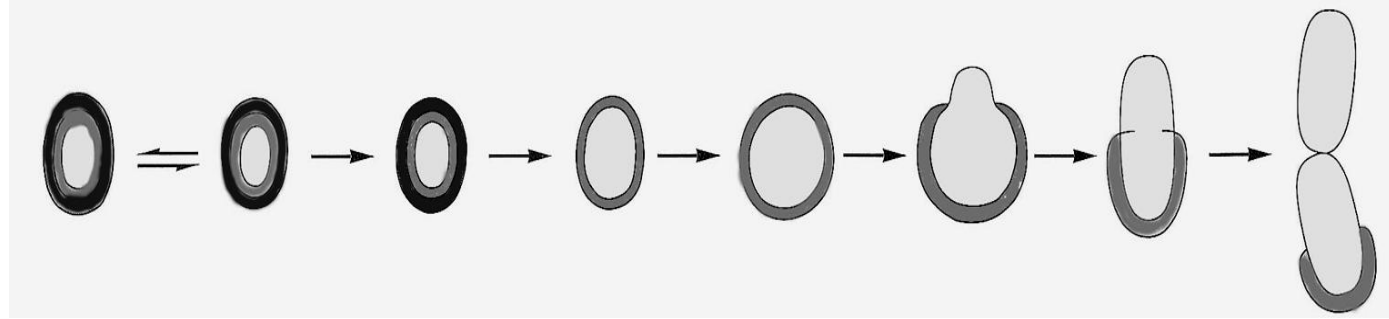
Setto asimmetrico $\rightarrow$ inglobamento $\rightarrow$ corteccia e rivestimenti

5. Maturazione e rilascio

Spora resistente e dormiente, liberata dalla cellula madre

GERMINAZIONE DELL'ENDOSPORA

Si verifica spontaneamente quando le condizioni ambientali ritornano favorevoli (acqua, calore, sostanze nutritive)

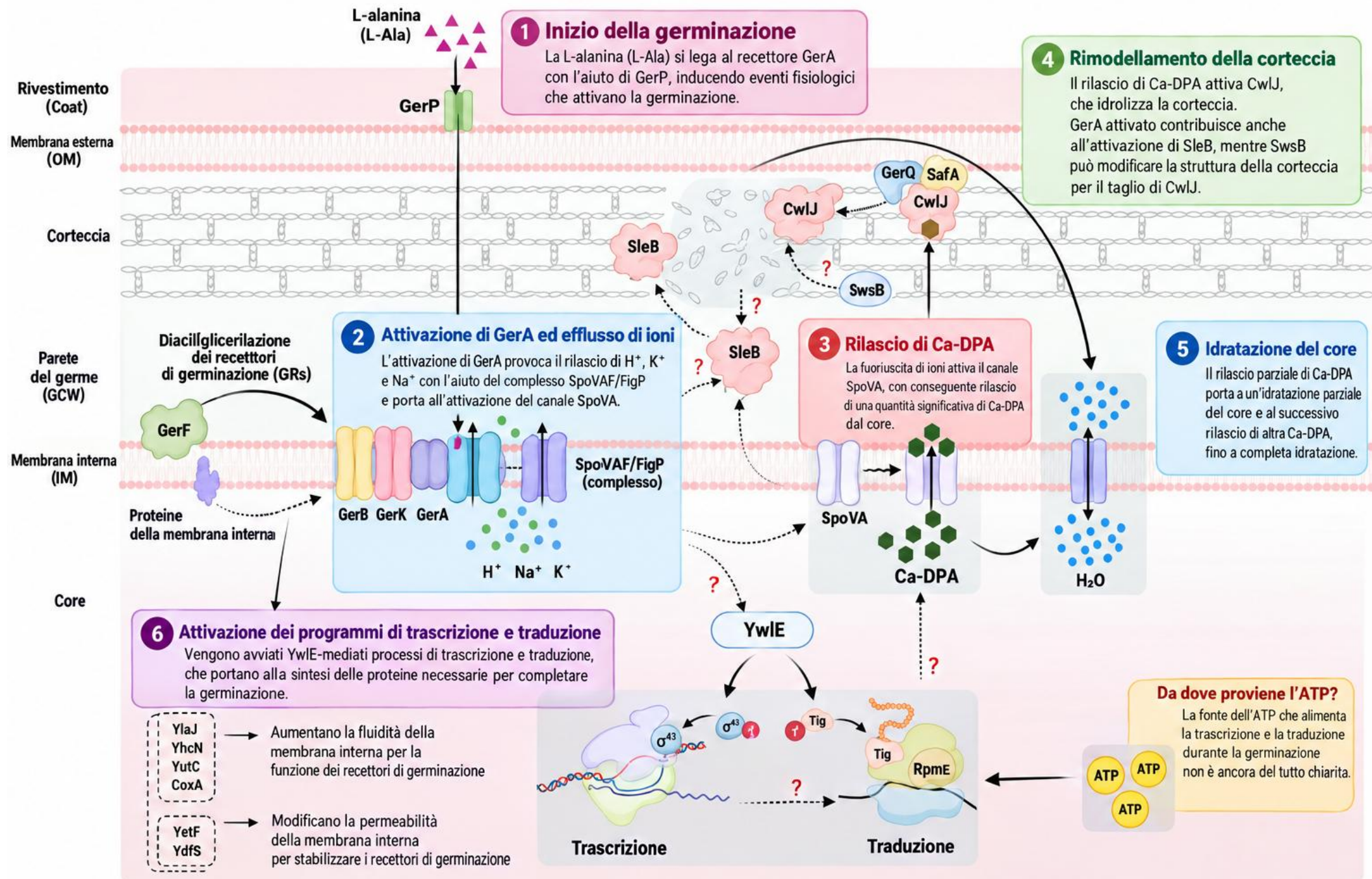


Attivazione (reversibile) = si ha sperimentalmente mediante esposizione al calore (60°-80°C per qualche minuto) e corrisponde, *in vivo*, all'invecchiamento naturale della spora → **danneggiamento e permeabilizzazione degli involucri esterni** → **scambi metabolici con l'ambiente**.

Germinazione (irreversibile) = reazioni degradative, idrolisi della corteccia, eliminazione dell'ac. dipicolinico e del Ca^{2+} , inizio dell'idratazione, ricomparsa della termosensibilità → perdita rifrangenza, perdita resistenza

Esocrescita = completamento idratazione, inizia il metabolismo respiratorio e l'attività biosintetica. mRNA → proteine → DNA.

Durata della germinazione 1-2 ore



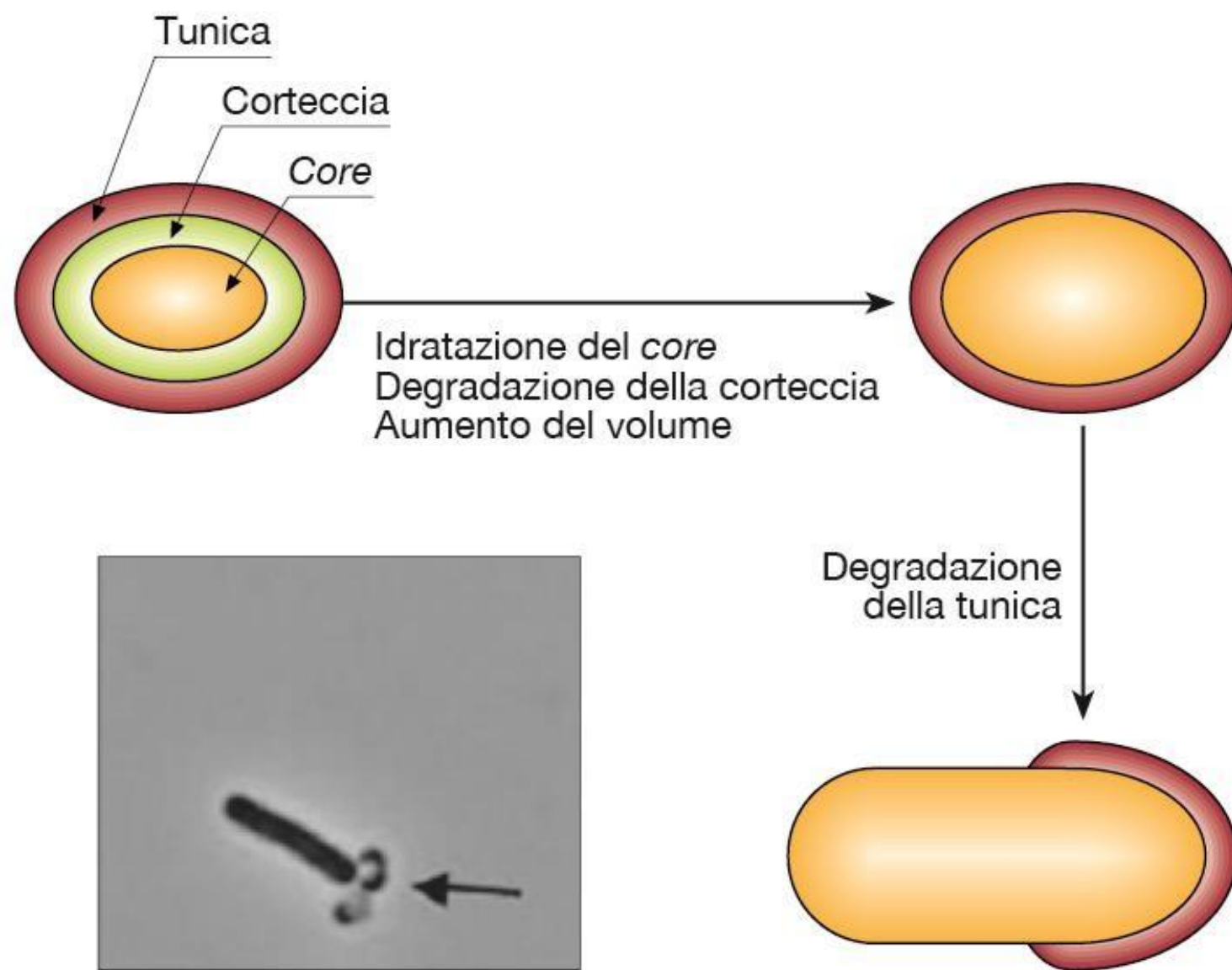


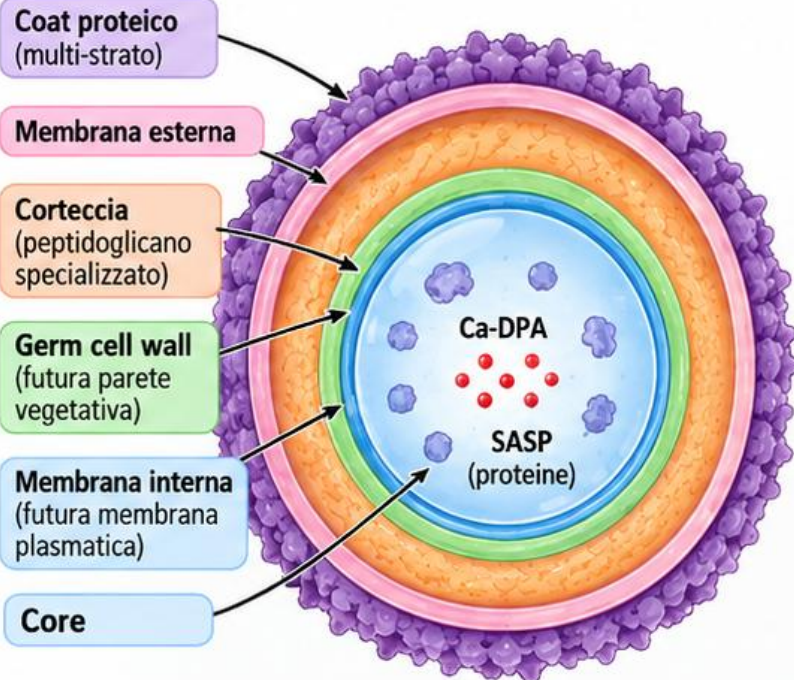
Figura 2.86 SCHEMA DELLE FASI DI GERMINAZIONE DELL'ENDOSPORA.

Destino dei rivestimenti durante la sporulazione

Struttura	Durante la sporulazione	Durante la germinazione e l'outgrowth
Coat	Viene assemblato dalla cellula madre in strati proteici concentrici.	Rimane inizialmente come involucro protettivo, poi viene aperto, rotto o abbandonato durante l'emergenza cellulare.
Membrana esterna	Deriva dall'inglobamento della prespora.	Il suo destino è meno chiaro; può perdere integrità durante la maturazione e non costituisce normalmente la membrana della cellula vegetativa.
Corteccia	Si forma tra le due membrane ed è costituita da peptidoglicano specializzato.	Viene idrolizzata dagli enzimi CwlJ e SleB, permettendo la completa reidratazione ed espansione del core.
Germ cell wall	Si forma internamente alla corteccia.	Non viene distrutta come la corteccia: contribuisce alla parete della nuova cellula vegetativa.
Membrana interna	Diventa una barriera scarsamente permeabile intorno al core disidratato.	Si espande con la reidratazione e diventa la membrana plasmatica della cellula vegetativa.
Core	Si disidrata e accumula Ca-DPA e proteine SASP.	Rilascia Ca-DPA, si reidrata e riprende progressivamente le attività metaboliche.

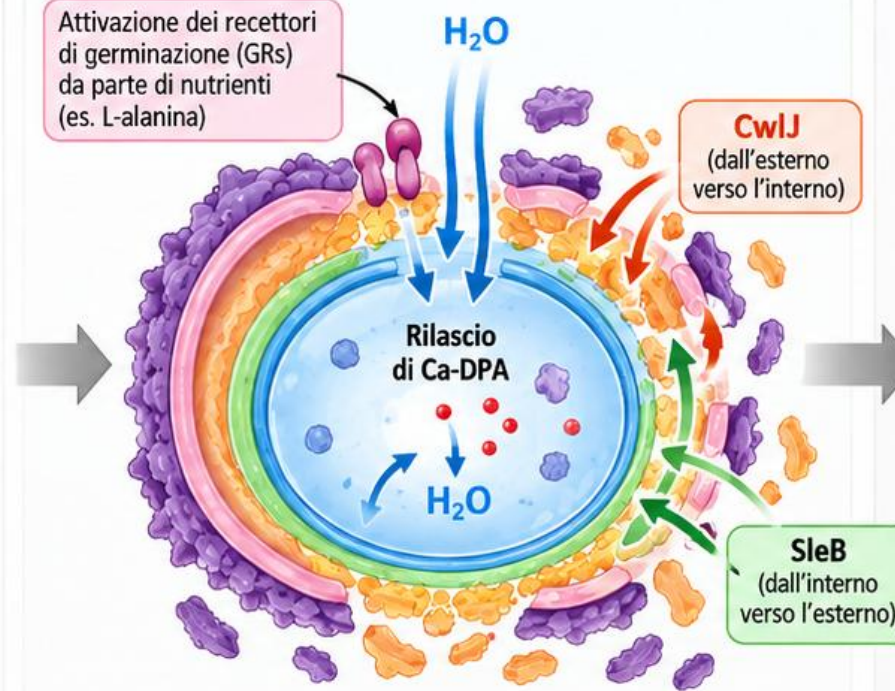
Destino degli involucri durante la germinazione di *Bacillus subtilis*

1 SPORA DORMIENTE



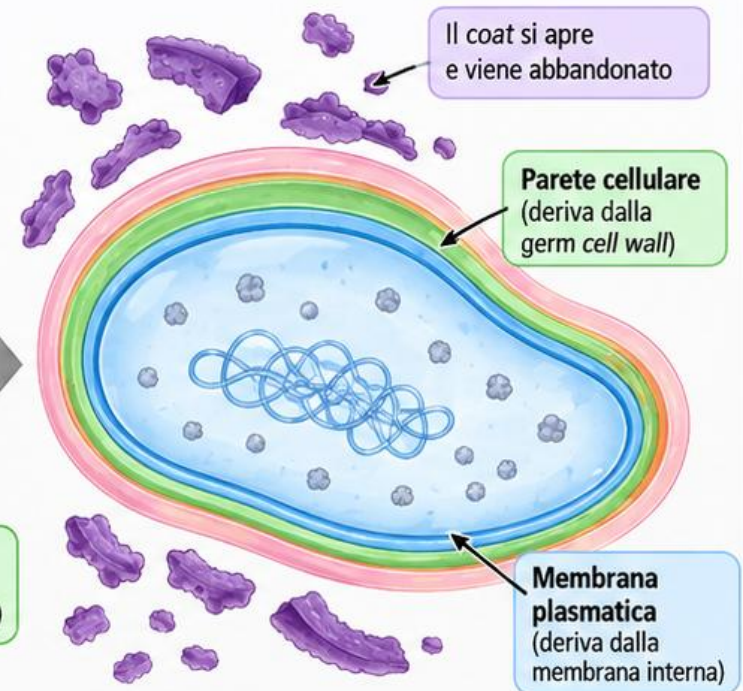
Core disidratato, ricco di Ca-DPA e SASP, metabolicamente quiescente e altamente resistente.

2 GERMINAZIONE



Idrolisi della corteccia da parte di CwlJ e SleB, rilascio di Ca-DPA e ingresso di acqua. Il core si reidrata e riprende il metabolismo.

3 OUTGROWTH / CELLULA VEGETATIVA



Completamento dell'idratazione, espansione del core, riattivazione della crescita e divisione cellulare. Gli strati esterni vengono rimossi o restano come detriti.

Destino dei singoli involucri

Coat proteico



Si apre e viene abbandonato durante l'outgrowth.

Membrana esterna



Destino non del tutto chiarito; può perdere integrità durante la germinazione.

Corteccia



Idrolizzata dagli enzimi CwlJ (esterno → interno) e SleB (interno → esterno).

Germ cell wall



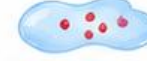
Conservata, contribuisce alla parete della cellula vegetativa.

Membrana interna



Conservata, diventa la membrana plasmatica della cellula vegetativa.

Core



Rilascia Ca-DPA, si reidrata e riprende le attività metaboliche.

Note importanti

- La germinazione precede l'outgrowth.
- Durante la germinazione viene idrolizzata la corteccia, non tutti gli involucri vengono eliminati.
- La germ cell wall e la membrana interna rimangono e formano la parete e la membrana plasmatica della cellula vegetativa.
- Schema non in scala.

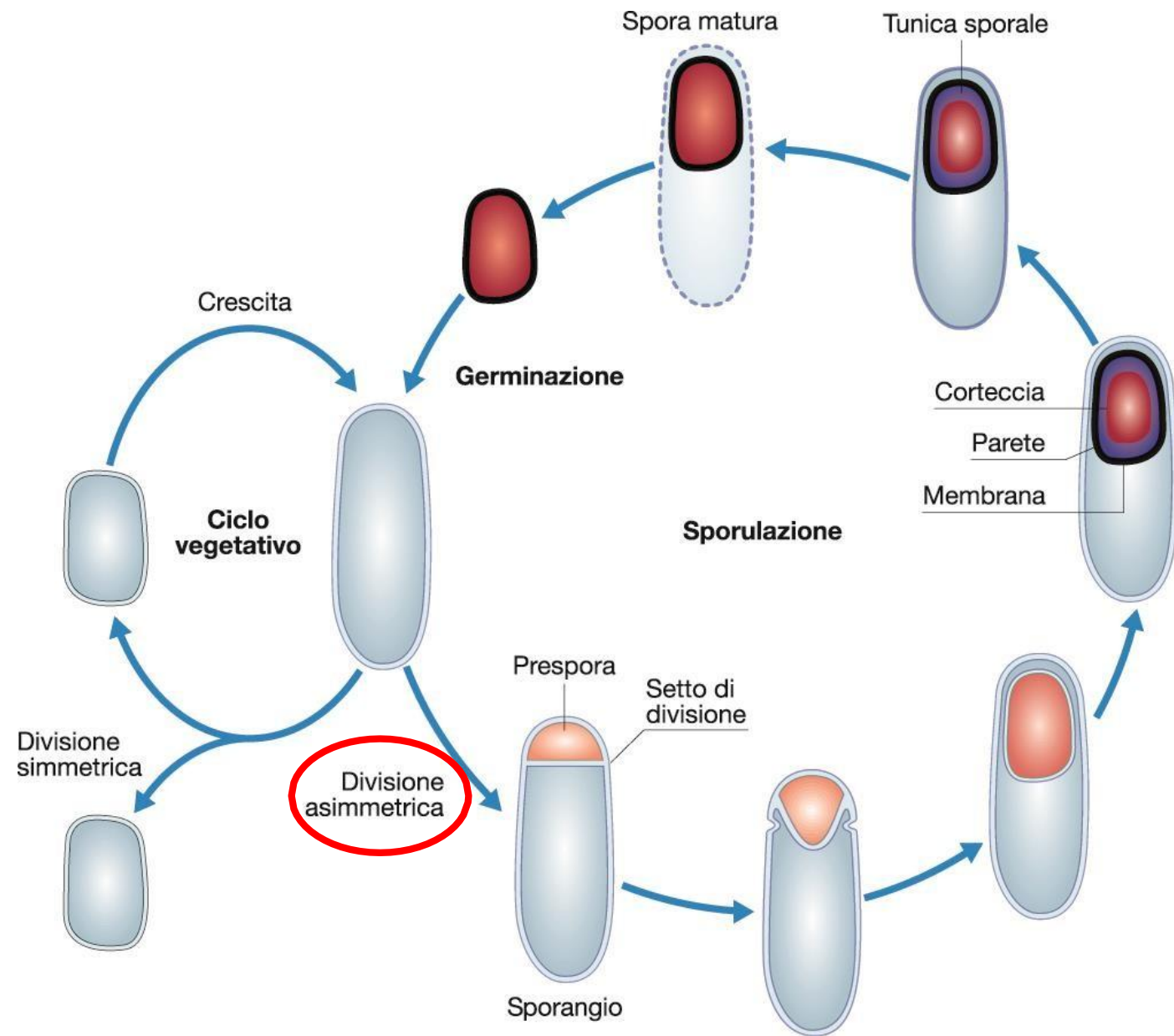
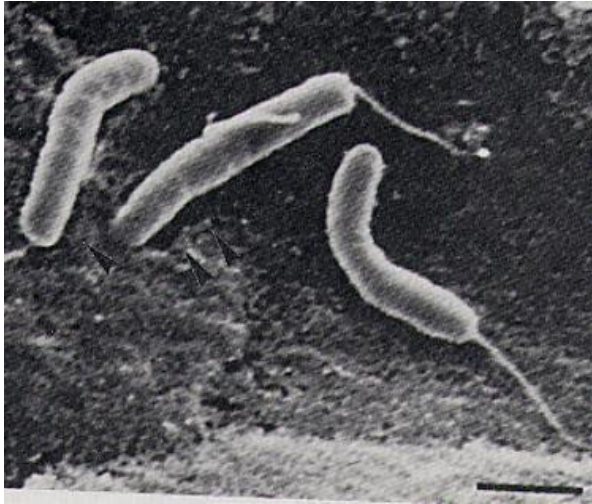
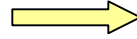


Figura 2.83 CICLO VITALE DEI BATTERI APPARTENENTI AI GENERI *BACILLUS* E *CLOSTRIDIUM*.



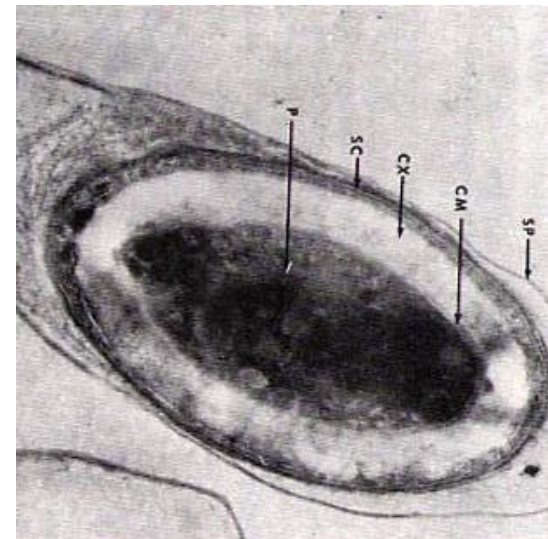
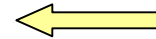
Forma vegetativa



Sporangio



Germinazione della spora



Spora libera

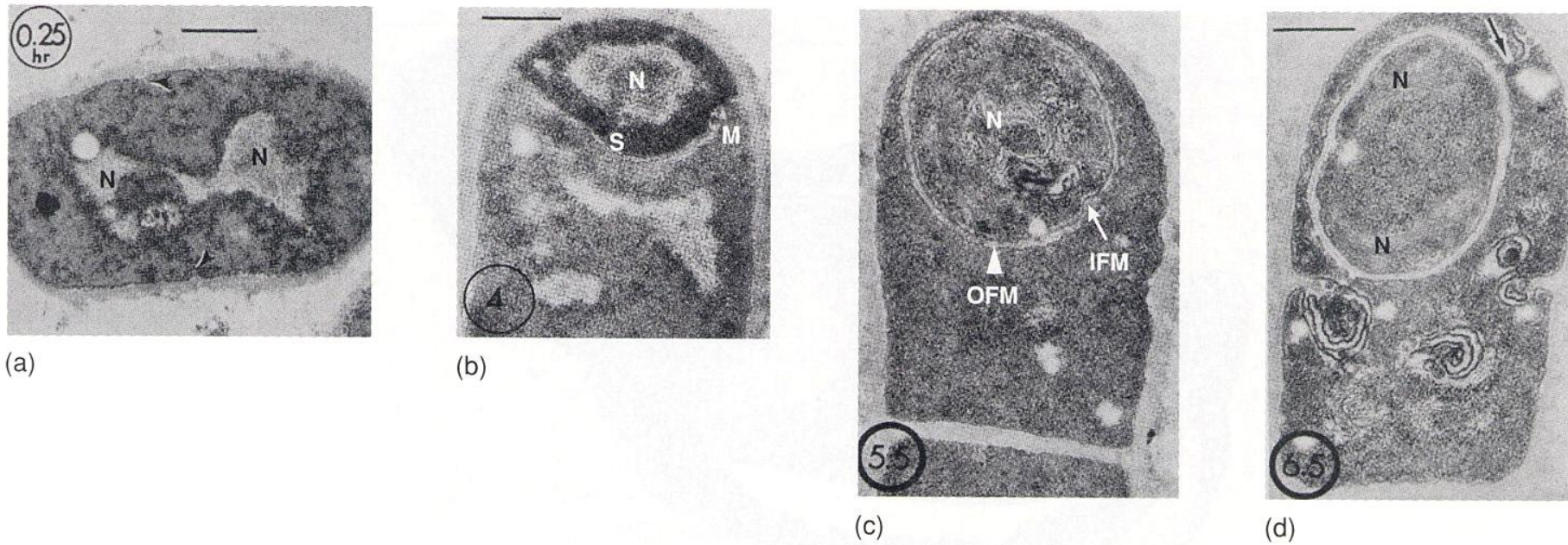
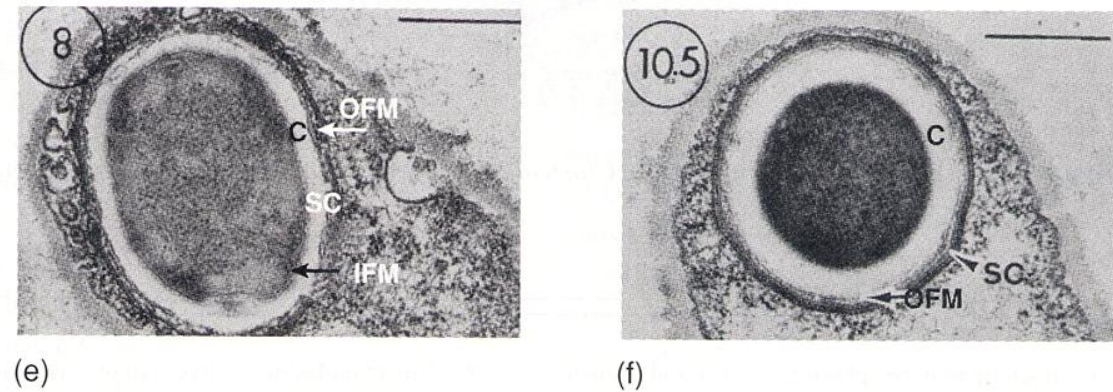


Figure 3.46 Stages of Sporulation in *Bacillus megaterium*. The circled numbers refer to the hours from the end of the logarithmic phase of growth. (a) 0.25 h: a typical vegetative cell. (b) 4 h: stage II cell, septation. (c) 5.5 h: stage III cell, engulfment. (d) 6.5 h: stage IV cell, cortex formation. (e) 8 h: stage V cell, coat formation. (f) 10.5 h: stage VI cell, mature spore in sporangium. C, cortex; IFM and OFM, inner and outer forespore membranes; M, mesosome; N, nucleoid; S, septum; SC, spore coats. Bars = 0.5 μ m.



Sporogenesi

In quali processi e aspetti della vita hanno un impatto le spore batteriche?

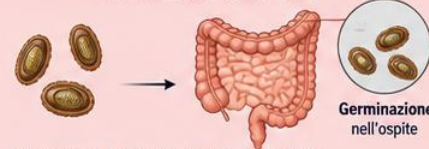
Le endospore permettono ai batteri di sopravvivere a condizioni estreme e influenzano salute, ambiente, industria, agricoltura ed evoluzione, con importanti ricadute ecologiche, economiche e cliniche.

SOPRAVVIVENZA E CICLO DI VITA DEL BATTERIO



- Permettono la sopravvivenza a stress (calore, disidratazione, radiazioni, agenti chimici, assenza di nutrienti).
- Consentono la disseminazione nel tempo e nello spazio.
- Rappresentano una strategia evolutiva per la persistenza della specie.

PATOLOGIE INFETTIVE



- Infezioni da *Clostridioides* (es. *C. difficile*) associate a malattia, recidive e diffusione nosocomiale.
- Le spore resistono alla disinfezione ambientale e ai trattamenti, facilitando la trasmissione.
- La germinazione nell'ospite è spesso attivata da segnali specifici (es. acidi biliari, nutrienti).

SICUREZZA ALIMENTARE



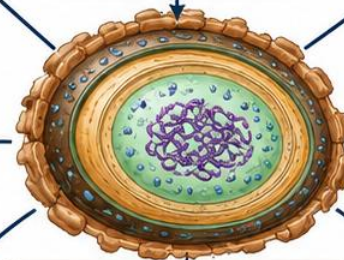
- Le spore di *Bacillus* e *Clostridium* sopravvivono a trattamenti termici e di conservazione.
- Possono germinare negli alimenti causando alterazioni (spoilage) o tossinfezioni (es. *C. botulinum*).
- Rappresentano una sfida per la sicurezza e la shelf-life degli alimenti.

AMBIENTE E CICLI GEOBIOCHIMICI



- Diffuse e persistenti in suolo, sedimenti, acque dolci e marine.
- Contribuiscono al riciclo di nutrienti (es. carbonio, azoto, zolfo).
- Permettono la colonizzazione di ambienti estremi (deserti, profondità marine, permafrost).
- Possono rimanere vitali per decenni o secoli in sedimenti antichi.

ENDOSPORA BATTERICA (es. *Bacillus*, *Clostridioides*)

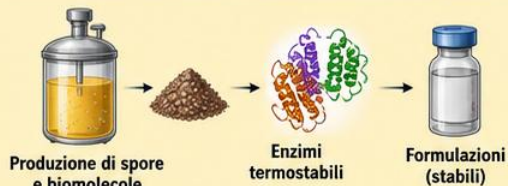


AGRICOLTURA E PROTEZIONE DELLE PIANTE



- Spore di *Bacillus* usate come agenti di biocontrollo (es. *Bacillus thuringiensis*) contro insetti fitofagi.
- Produzione di metaboliti utili (antibiotici, enzimi).
- Promuovono la crescita delle piante e la resilienza agli stress ambientali.

BIOTECNOLOGIE E APPLICAZIONI INDUSTRIALI



- Produzione di enzimi industriali (es. amilasi, proteasi) stabili al calore.
- Uso di spore come piattaforme per vaccini orali e delivery di antigeni.
- Cellule sporogene impiegate in bioremediation.
- Stabilità e lunga conservazione delle formulazioni a base di spore.

EVOLUZIONE E DISPERSIONE



- Le spore favoriscono la dispersione a lunga distanza (vento, acqua, animali, attività umane).
- Contribuiscono alla distribuzione globale e alla diversità genetica dei batteri sporigeni.
- Rappresentano un vantaggio selettivo in ambienti variabili e imprevedibili.

RESISTENZA E CONTROLLO



- Altamente resistenti a calore, radiazioni, disidratazione, solventi e disinfettanti.
- Difficili da eliminare in ambito clinico, alimentare e industriale.
- Richiedono strategie specifiche di inattivazione (es. combinazioni di calore, agenti chimici, germinazione seguita da uccisione).

MESSAGGIO CHIAVE

Le spore batteriche non sono solo una forma di sopravvivenza, ma hanno un impatto trasversale su salute umana, sicurezza alimentare, ambiente, agricoltura, biotecnologie ed evoluzione, influenzando processi naturali e attività umane a molteplici livelli.

Una differenza fondamentale tra tetano e botulismo

Nel tetano, le spore contaminano generalmente una ferita. Se trovano condizioni anaerobiche favorevoli, germinano e le cellule vegetative producono tetanospasmina. La tossina raggiunge il sistema nervoso, dove impedisce il rilascio dei neurotrasmettitori inibitori, soprattutto GABA e glicina.

Nel **botulismo alimentare**, le spore possono contaminare un alimento e successivamente germinare durante la conservazione, permettendo la produzione della tossina botulinica. **Quando l'alimento viene consumato, è generalmente la tossina già presente nell'alimento a causare l'intossicazione.**

Esistono però anche forme di botulismo, come quello infantile e quello da ferita, in cui le spore germinano nell'organismo e la tossina viene prodotta in vivo.

Tab. 4.3 Differenze tra endospore e cellule vegetative

Caratteristica	Cellula vegetativa	Endospora
Struttura	Tipica cellula Gram-positiva; poche cellule Gram-negative	Spessa corteccia Rivestimento Esosporio
Aspetto microscopico	Non rifrangente	Rifrangente
Contenuto di calcio	Basso	Alto
Acido dipicolinico	Assente	Presente
Attività enzimatica	Elevata	Ridotta o assente
Metabolismo (assunzione di O ₂)	Elevato	Ridotto o assente
Sintesi di macromolecole	Presente	Assente
mRNA	Presente	Ridotto o assente
Resistenza al calore	Ridotta	Elevata
Resistenza alle radiazioni	Ridotta	Elevata
Resistenza agli agenti chimici (per esempio H ₂ O ₂) e agli acidi	Ridotta	Elevata
Colorazione	Possibile	Solo con metodi specifici
Azione del lisozima	Sensibile	Resistente
Contenuto di acqua	Elevato, 80-90%	Ridotto, 10-25% nel core
Piccole proteine acide solubili (prodotte dai geni <i>ssp</i>)	Assente	Presente
pH citoplasmatico	Intorno a pH 7	Intorno a pH 5,5- 6,0 (nel core)