

Microbiologia

- Biologia degli organismi non visibili a occhio nudo:
- Protozoi, funghi, alghe, batteri, cianobatteri, virus
 - Nel 1866 viene proposto il regno dei protisti

Piante e Animali

- Pluricellulari con forte differenziazione delle cellule e dei tessuti

Protisti

- Pluricellulari, unicellulari o cenocitici; i pluricellulari sono a bassa o nulla differenziazione delle cellule e dei tessuti

Protisti:

Alghe

Protozoi

Funghi

Batteri

Studi al M.E. evidenziano differenze



Struttura complessa

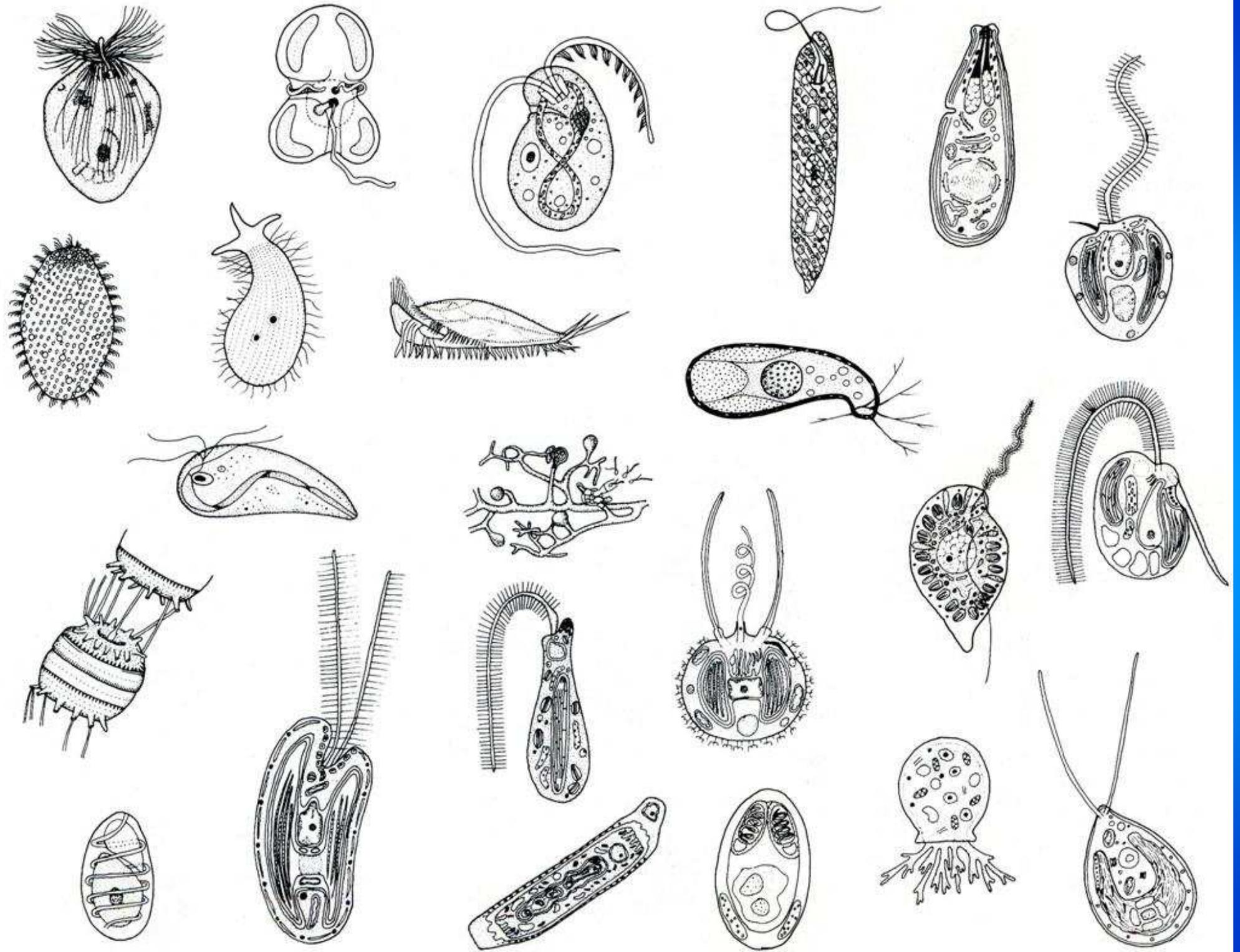
Eucariotica

Alghe, Protozoi, Funghi

Struttura semplice

Procariotica

Batteri



Eucarioti e Procarioti a confronto

A4

Caratteristiche cellulari	Eucarioti (vero nucleo)	Procarioti (nucleoide)
<i>Dimensione di una cellula (diametro)</i>	2-25 μm	0,3-2 μm
<i>Regione nucleare</i>		
Membrana nucleare	+	-
Nucleolo	+	-
Numero di cromosomi	>1	1
Presenza di istoni	+	-
Divisione nucleare per mitosi	+	-
<i>Strutture citoplasmatiche</i>		
<i>Flussi citoplasm. e movimenti ameboidi</i>	+	-
<i>Mitocondri</i>	+	-
<i>Reticolo endoplasmatico</i>	+	-
<i>Apparato di Golgi</i>	+	-
<i>Lisosomi, vacuoli, cloroplasti</i>	+	-
<i>Ribosomi</i>	80S	70S
<i>Mesosomi</i>	-	+
<i>Strutture di superficie</i>		
<i>Membrana citoplasmatica</i>	+	+
<i>Steroli nella membrana</i>	+	- (raram. +)
<i>Peptidoglicano nella parete cellulare</i>	-	+
<i>Flagelli, se presenti</i>	Con microtubuli	Composti di flagellina

Protisti (Eucarioti)

- Alghe
- Protozoi
- Funghi

Protisti (Procarioti)

- Eubatteri
- Archibatteri
- Cianobatteri (alghe blu-verdi)

Tra gli Eubatteri sono incluse:

- Chlamydiae
- Rickettsiae
- Sono più piccole (0,2-0,5mm) degli altri batteri
- Sono parassiti intracellulari obbligati

Misure in microscopia

mm
Millimetro: 10^{-3} m

mm
Micrometro: 10^{-6} m, 10^{-3} mm

nm
Nanometro: 10^{-9} m, 10^{-6} mm, 10^{-3}

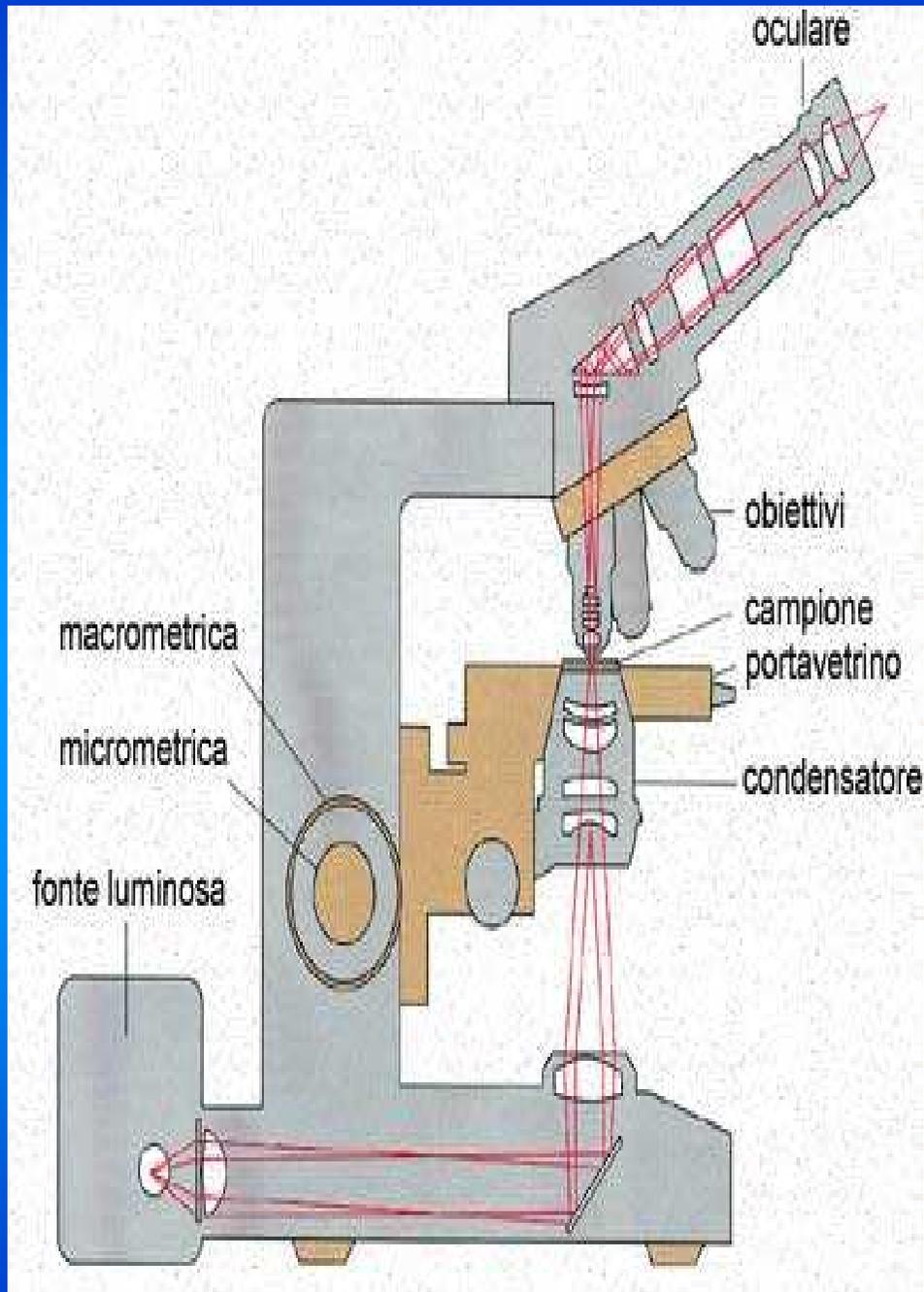
Å
Angstrom: 10^{-10} m, 10^{-7} mm, 10^{-4} mm, 10^{-1} nm

Potere di risoluzione

La più piccola distanza alla quale si possono avvicinare due punti perché diano ancora immagini distinte

Occhio umano = 0,1mm

Microscopio ottico = 0,2 μ m



Microscopia in campo chiaro (1)



colorazioni

Microscopia in campo oscuro (2)



la luce non entra direttamente
nell'obiettivo, ma solo se deviata dal
preparato

Immagine con contorni luminosi su fondo
scuro

Studi per la mobilità

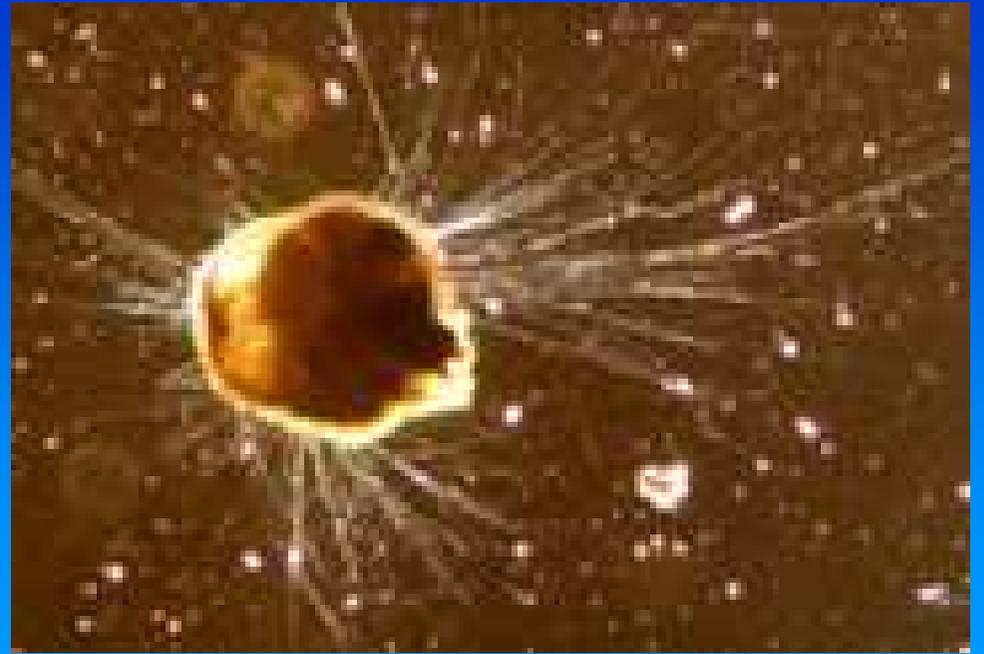
Microscopia a contrasto di fase (3)



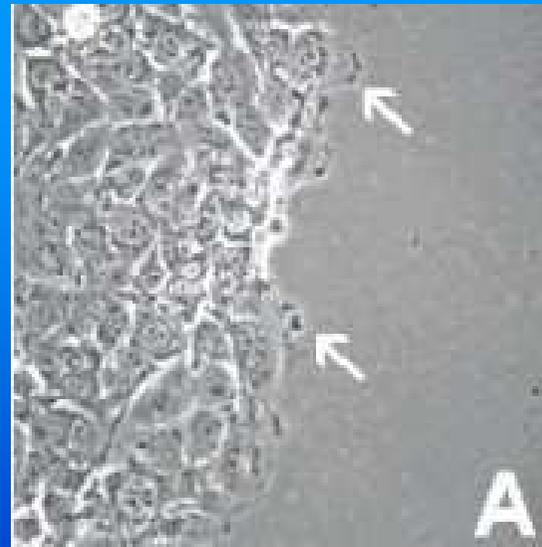
Diverse densità del preparato
Diverse velocità dei raggi luminosi
Diverse intensità luminose



(1)



(2)



(3)

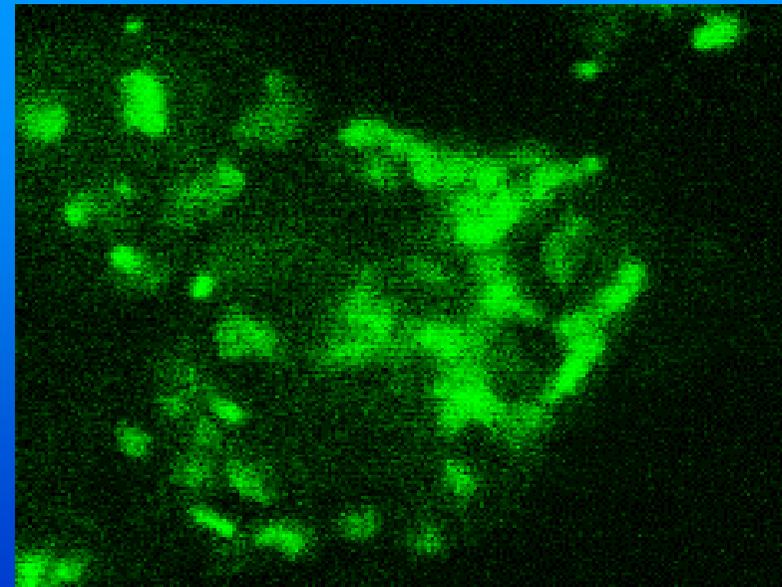
Microscopia a fluorescenza

Luce ultravioletta (L.O. $\frac{1}{2}$ luce bianca)

Aumenta il potere di risoluzione

Non è percepita dall'occhio umano

Impiego di fluorocromi



Microscopia Elettronica

Utilizza un fascio di elettroni al posto della luce

Si può raggiungere $1'000'000 \times$ (0,1nm)

La messa a fuoco avviene tramite elettromagneti

L'interno è sotto vuoto spinto per evitare interferenze sul fascio elettronico



M.E. a trasmissione

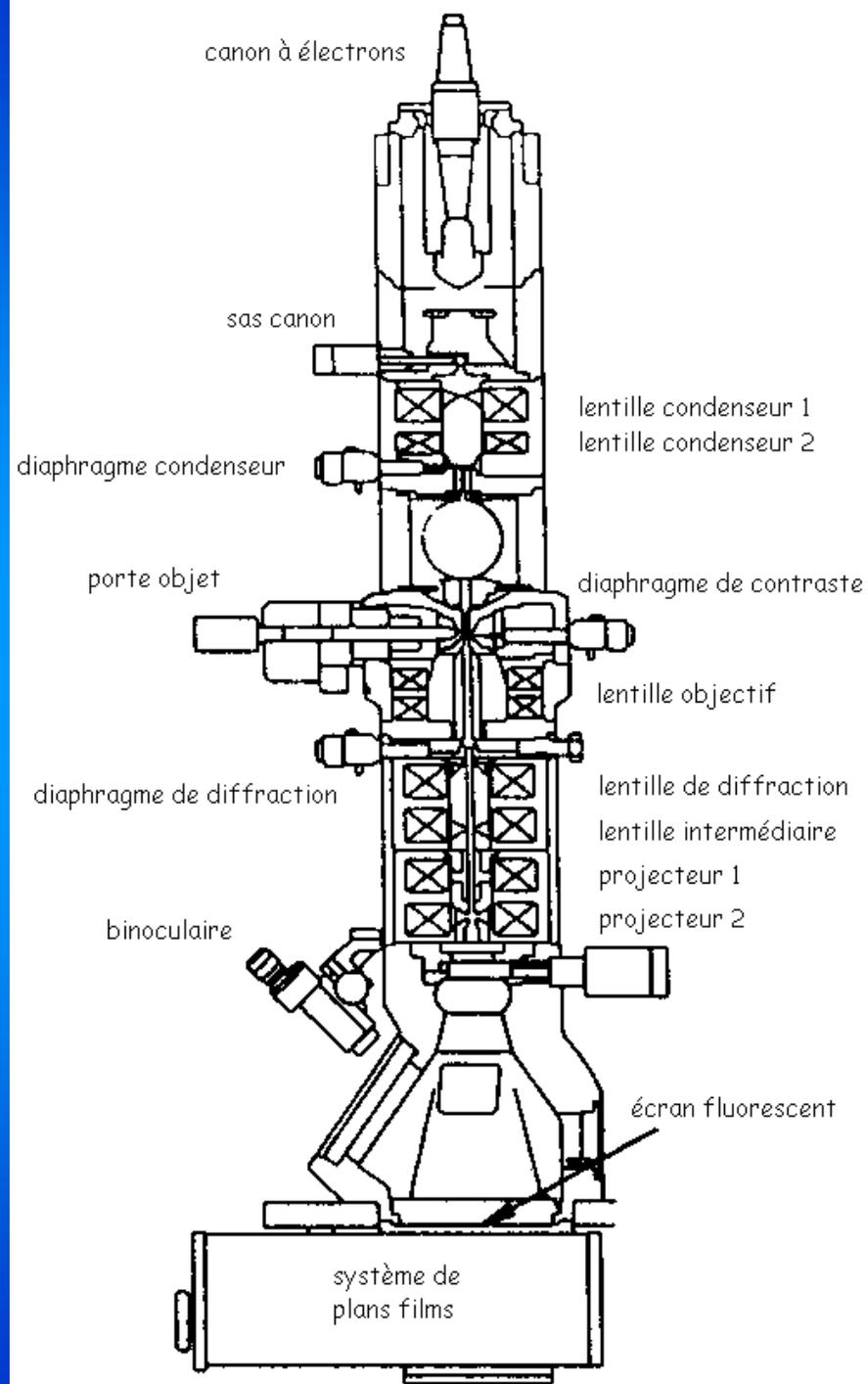
Colorazione positiva:

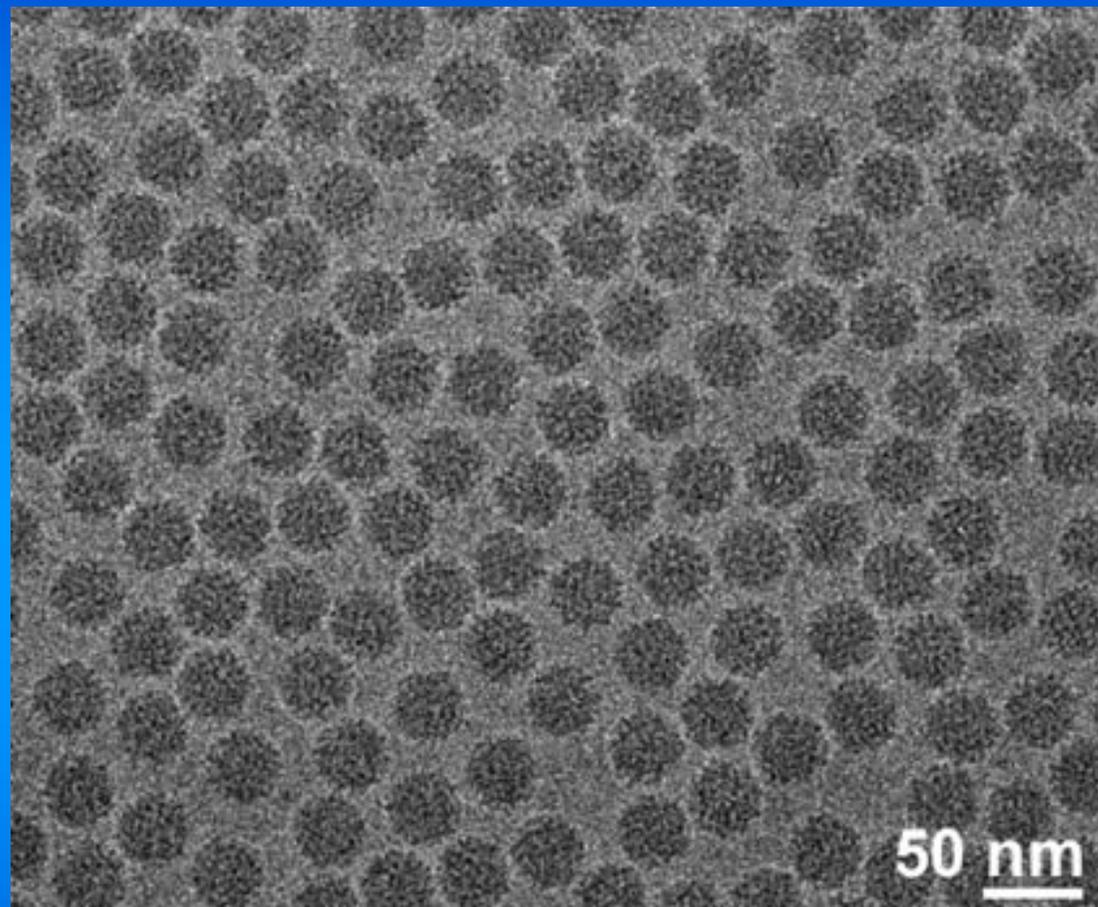
- sali di metalli pesanti (Pb, U, W) aumentano il contrasto del campione
- gli elettroni attraversano il campione

Colorazione negativa:

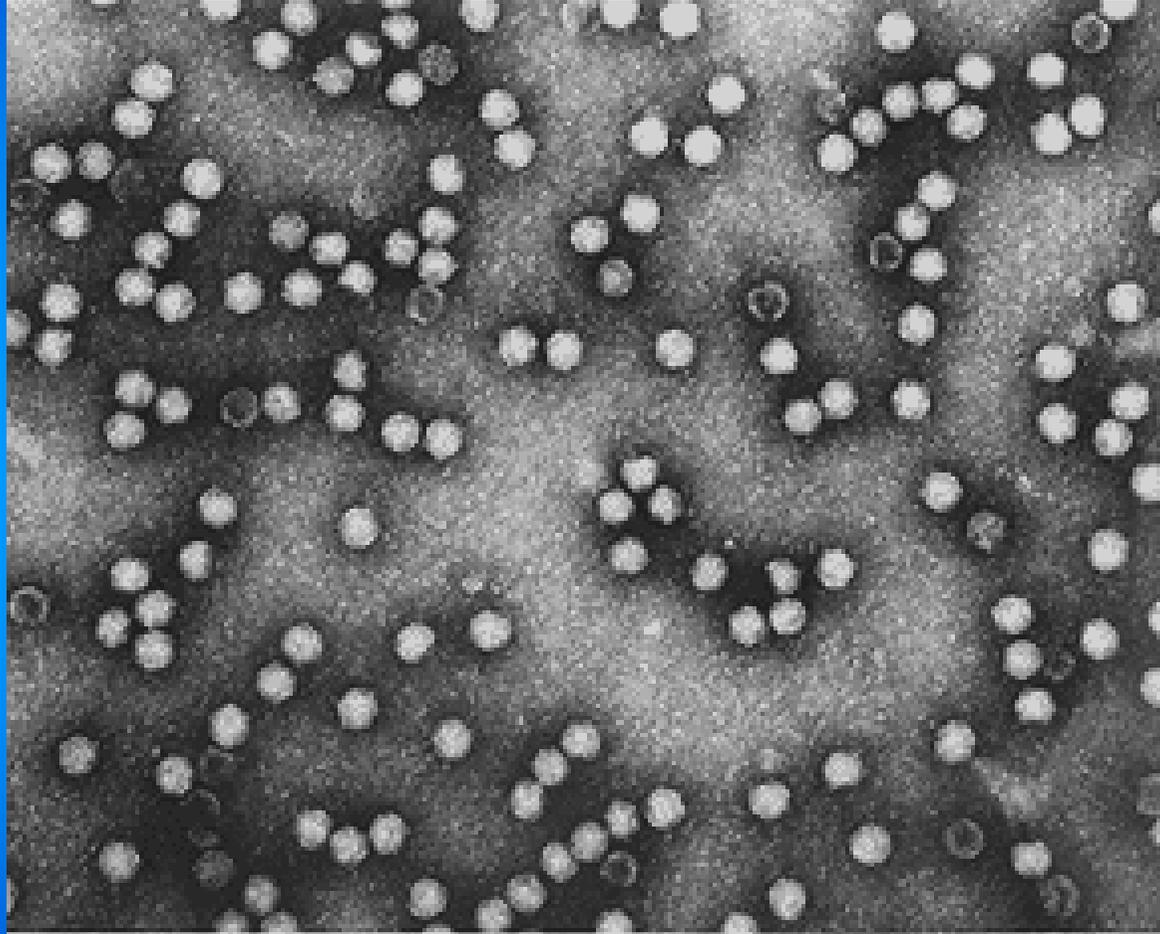
- Ac. fosfotungstico (PTA) e acetato di uranile a pH acido non si legano al campione, ma scuriscono le zone circostanti





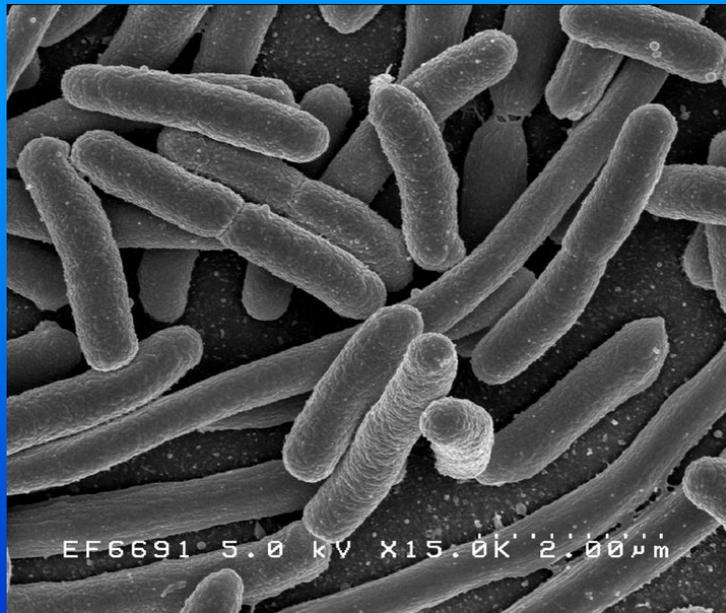


A 14

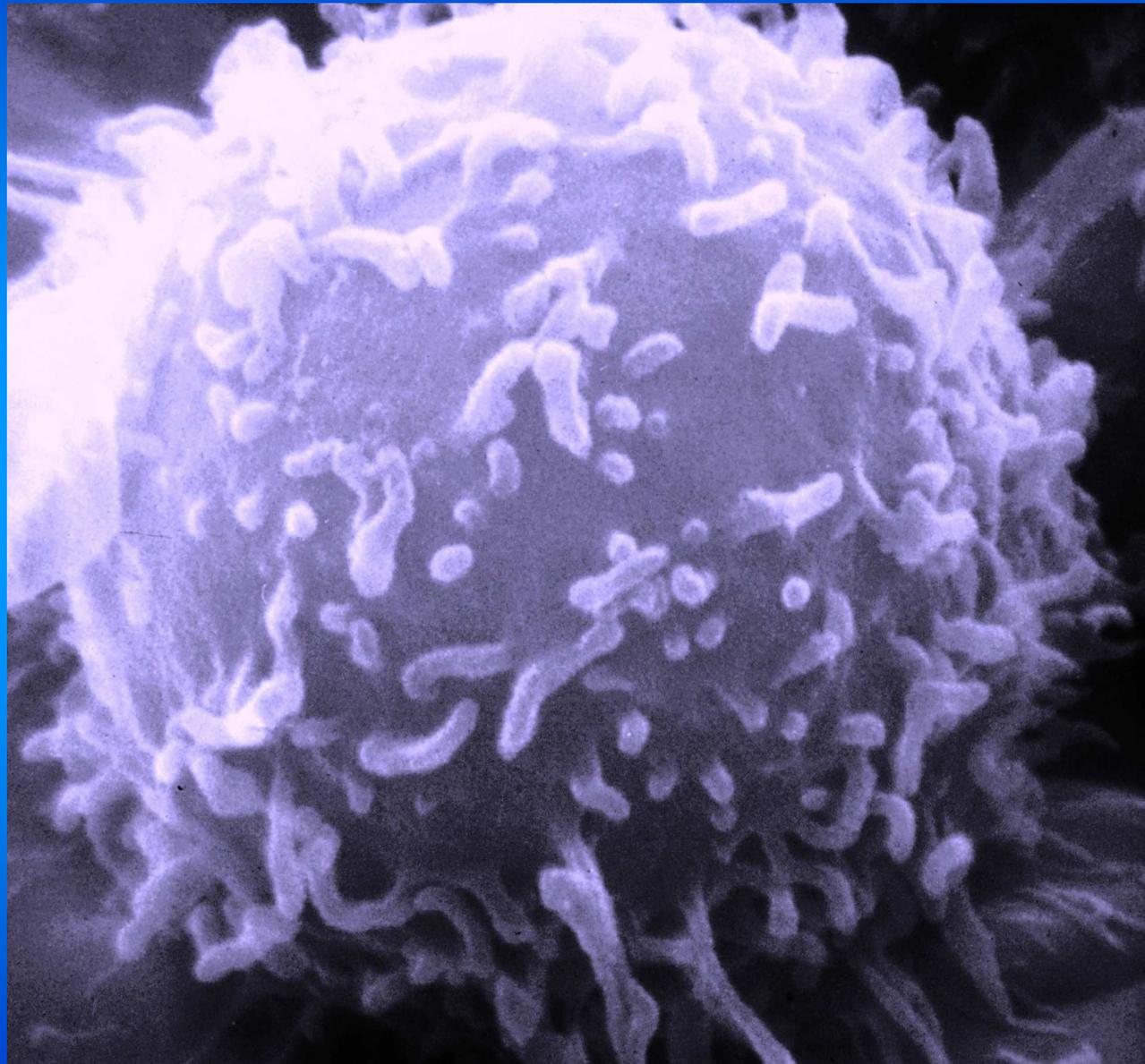


M.E. a scansione

- Visione tridimensionale
- Campione ricoperto da un metallo pesante (oro)
- Dal preparato vengono emessi elettroni secondari (riflessi) che vengono raccolti su un monitor)



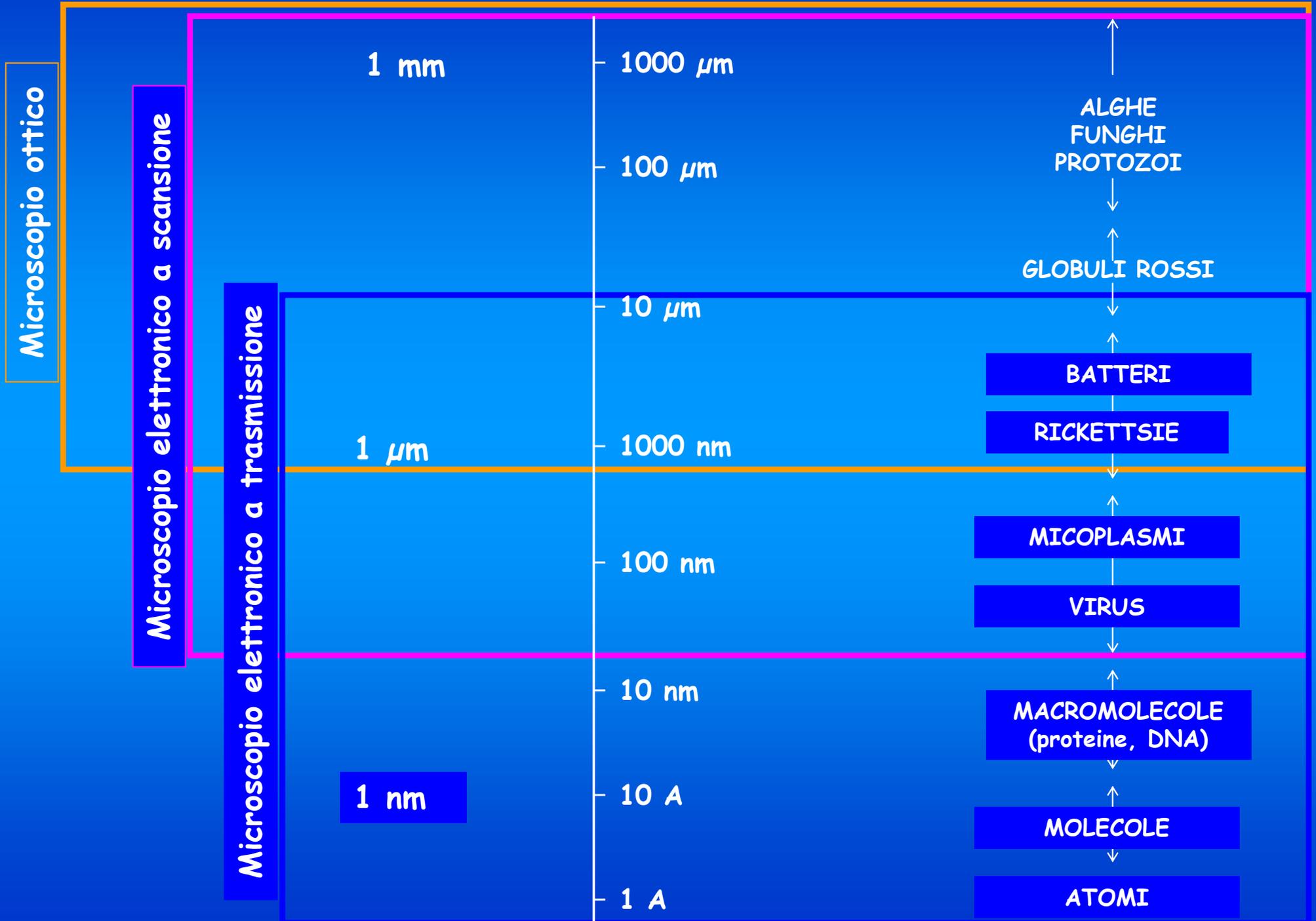
E. coli: foto microscopio a scansione



Limiti di visibilità

Dimensioni

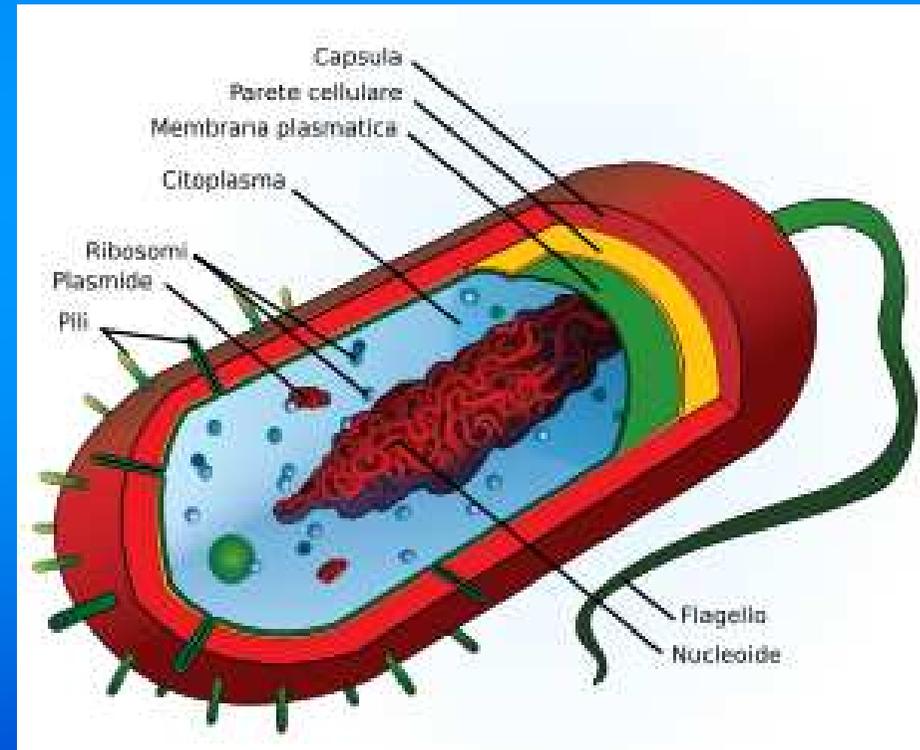
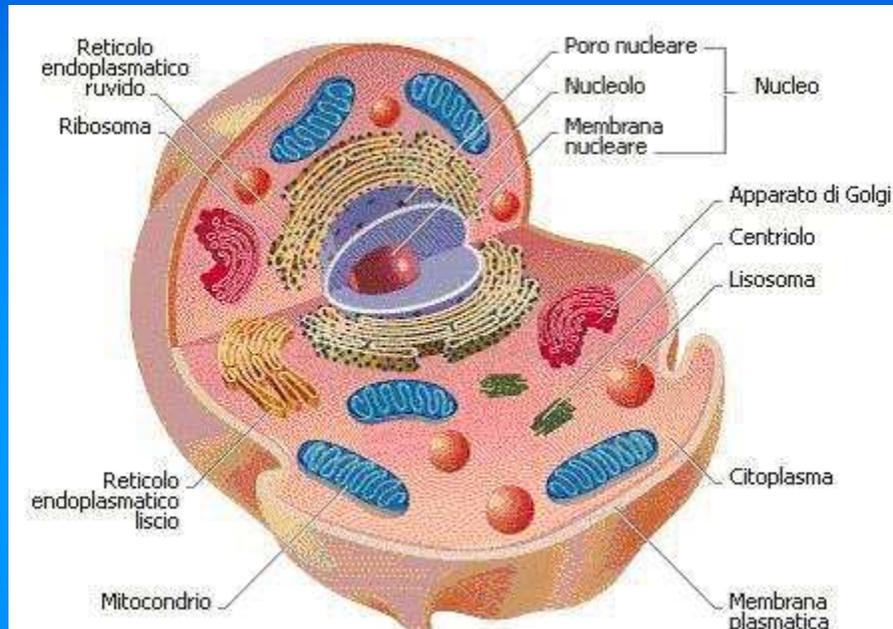
A 17 Tipo di campione



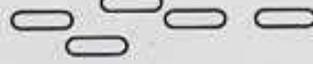
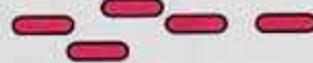
Tipo di microscopio	Massimo ingrandimento	Utilizzazione	Vantaggi	Svantaggi
Ottico in campo illuminato	1000X	Osservazione preparati colorati. Conta microbica.	Facile uso, poco costoso, permette di distinguere I microrganismi dopo colorazione differenziale	No contrasto, no visibili virus e batteri molto piccoli. La maggior parte strutture colorata x essere visibile. Artefatti a seguito colorazioni
Ottico in campo oscuro	1000X	Osservaz. Microrg. Vivi, non colorati e con strutture morfologiche difficilmente visibili in campo illuminato	Osservazione organismi viventi, no colorazione dunque no artefatti	Non è possibile valutare preparati colorati. Particolari subcellulari no facilmente individuabili
Ottico in contrasto di fase	1000X	Osservaz. Microrg. Vivi, non colorati e di strutture intracellulari	Strutture intracellulari visibili ed evidenziazione dettagli	No valutazione preparati colorati

Tipo di microscopio	Massimo ingrandimento	Utilizzazione	Vantaggi	Svantaggi
Ottico a fluorescenza	1000X	Usato in procedure diagnostiche, impiegando reagenti fluorescenti, per identificare microorganismi e svelare reazioni immunologiche	Rapida identificazione agenti infettivi	Osservazione solo di preparati naturalmente fluorescenti o marcati con sostanze fluorescenti
Elettronico a trasmissione (TEM)	1.000.000X	Osservaz. Ultrastruttura microorganismi, virus compresi. Diagnosi malattie virali. Osservazione macromolecole	Osservazione microrganismi e strutture invisibili al microscopio ottico	Costoso. Osservaz. Microrganismi uccisi, fissati, disidratati e "colorati". Problema ARTEFATTI! Preparati 50-20nm spessore
Elettronico a scansione (SEM)	300.000X	Conservaz. Dettagliata struttura superficiale microorganismi. Immagini tridimensionali	Visione tridimensionale realistica. Permette agevolmente variare ingrandimento campione da 1 a 40.000X	Costoso. Consente osservare solo strutture superficie. Ingrandimento massimo inferiore a TEM

Struttura della cellula Procariotica



La cellula procariotica è più semplice di quella eucariotica **CON L'ECCEZIONE** delle strutture **DI RIVESTIMENTO CELLULARE**

	Gram Positive <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram Negative <i>Escherichia coli</i>
Step 1 Crystal Violet		
Step 2 Gram's Iodine		
Step 3 Decolorizer (Alcohol or Acetone)		
Step 4 Safranin Red		

A

Bacterial Morphology Shapes

 Coccus	 Bacillus	 Coccobacillus	 Fusiform bacillus
 Vibrio	 Spirillum	 Spirochete	

B

Nucleo

- La membrana nucleare è assente (Nucleoide)
- Può essere considerato un unico cromosoma
- La cellula batterica è aploide
- Il nucleoide è addossato ad una invaginazione della membrana

Mesosoma

Citoplasma

-Assenza di mitocondri

Contiene:

- plasmidi
- ribosomi
- materiali di riserva sotto forma di granuli

C

P inorganico

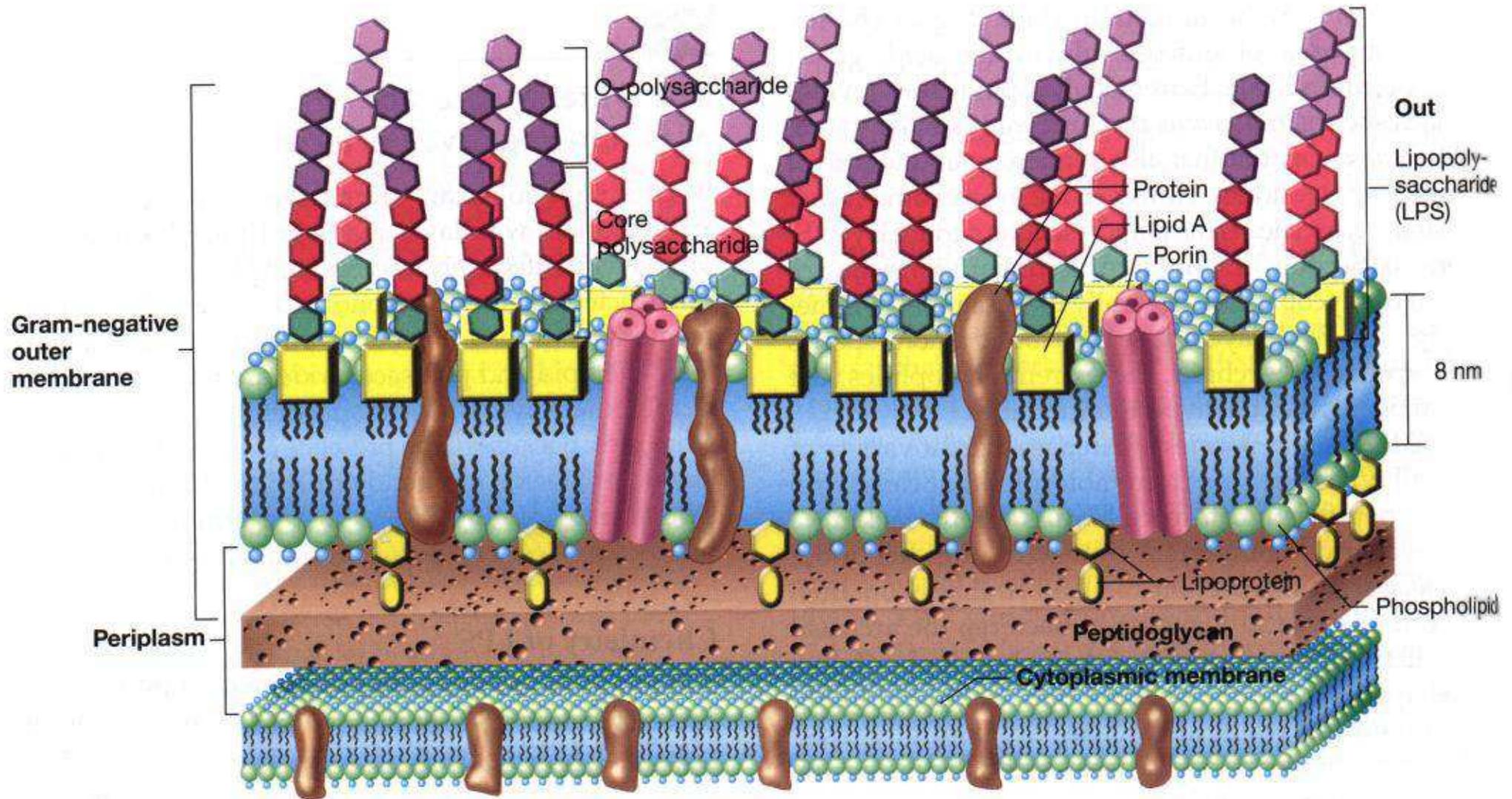
Lipidi

Membrana citoplasmatica

- È una tipica "unità di membrana"

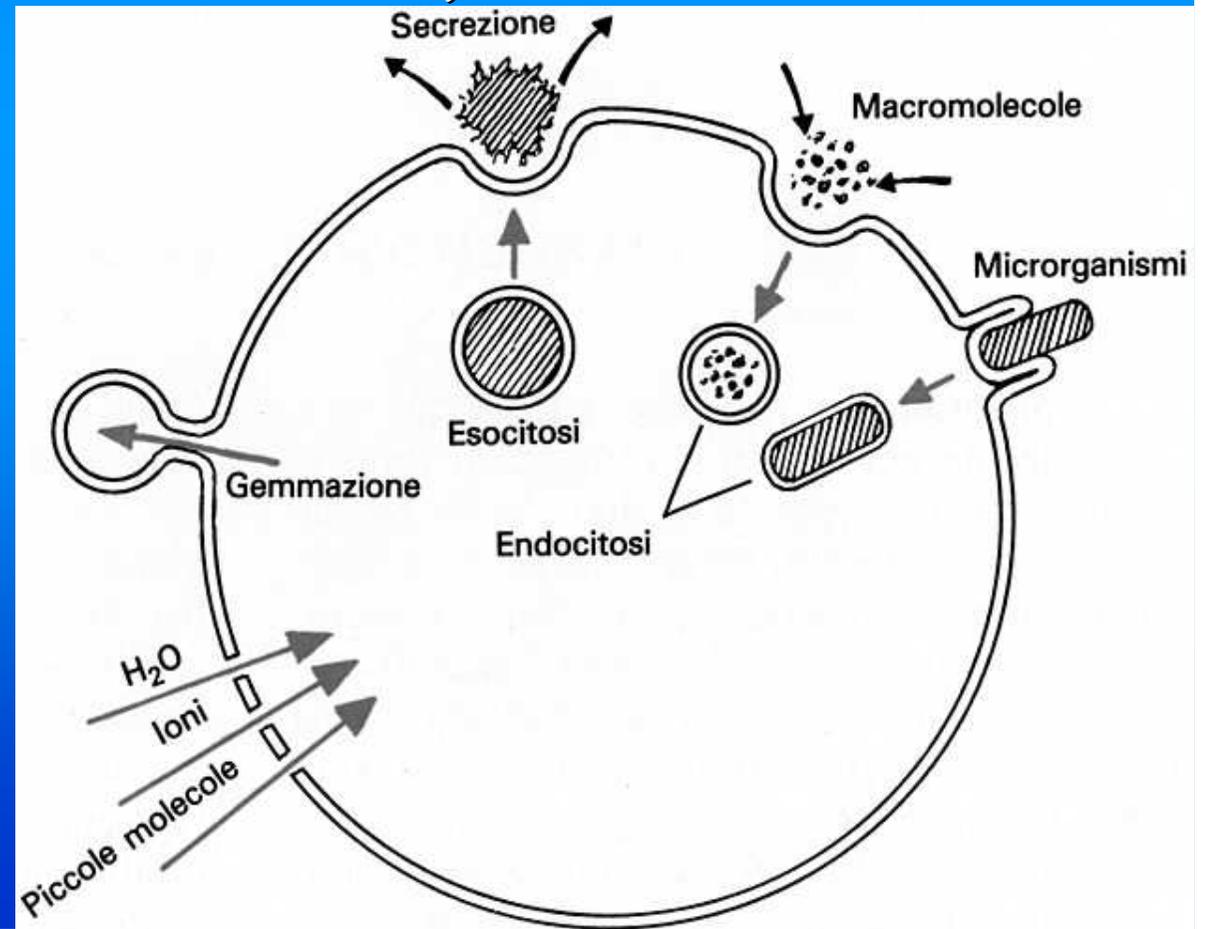
Fosfolipidi + Proteine

- Mesosomi: invaginazioni della membrana cellulare



Funzioni della membrana citoplasmatica

- 1) Permeabilità selettiva (trasporto dei soluti)
- 2) Trasporto di elettroni (fosforilazione ossidativa)
- 3) Escrezione enzimi idrolitici
- 4) Funzioni biosintetiche
- 5) Sistemi di chemiotassi



1) Permeabilità e trasporto

- Funzione di barriera per alcune sostanze
- Facilita la diffusione di altre sostanze mediante permeasi
- La diffusione di sostanze può avvenire

Senza consumo di
energia (osmosi)

Con consumo di energia

2) Trasporto elettroni e fosforilazione ossidativa

La membrana cellulare ha funzione analoga a quella dei mitocondri

Presenza di citocromi ed enzimi della catena respiratoria

3) Escrezione enzimi idrolitici

La degradazione di sostanze polimeriche avviene fuori la struttura batterica (G^+) o nello spazio periplasmatico (G^-)

4) Funzioni biosintetiche

- Assemblaggio subunità della parete batterica

- Enzimi per sintesi di fosfolipidi

- Ruolo nella replicazione batterica

5) Sistema chemiotattico

- Specifici chemiorecettori di attrazione

