



## DIFFERENZIAMENTO

*Prof.ssa Vivian Tullio*



# DIFFERENZIAMENTO



è il progressivo sviluppo di un essere vivente attraverso le varie fasi che ne caratterizzano il ciclo vitale.

Due cellule si intendono differentiate quando hanno **uguale genotipo** ma **differente fenotipo**

*(hanno uguale patrimonio genetico ma sono in grado di sintetizzare proteine differenti e assolvono differenti funzioni)*

Tale definizione è valida per tutti gli organismi viventi.

Noi ci sviluppiamo da uno zigote con un corredo genetico, durante lo sviluppo ci si differenzia in organi completamente diversi come struttura e funzione pur partendo da un solo corredo genetico. Anche i batteri con 1 solo cromosoma possono differenziare



# DIFFERENZIAMENTO

## NEI PROCARIOTI

### Differenziamento reale

Quando i cambiamenti messi in atto **fanno parte del ciclo vitale** (sono cioè normali e ripetitivi); derivano dall'attuazione di un programma genetico ben preciso

### Differenziamento temporaneo

Quando un batterio si trova a contatto con particolari sostanze che lo inducono a sintetizzare composti che in genere non produce.

# DIFFERENZIAMENTO

## NEI PROCARIOTI

### DIFFERENZIAMENTO REALE



Divisione cellulare e crescita



Sporulazione



Pleiomorfismo in alcune sue forme (*Proteus spp.*)





# DIVISIONE CELLULARE

## Fissione Binaria

Considerata un tipo di differenziamento (di tipo reale).

Nelle diverse fasi del ciclo vitale di un batterio (tempo intercorrente fra una divisione e l'altra) →

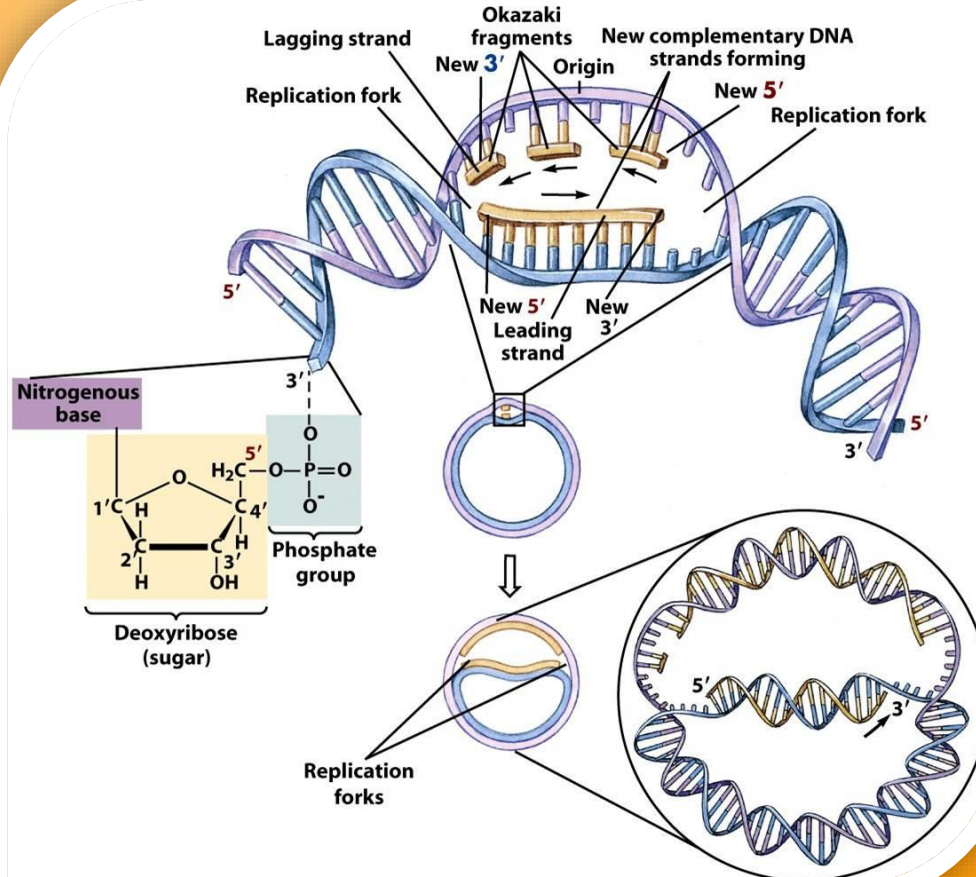
→ vengono prodotte proteine che risultano caratteristiche di una certa fase e che sono assenti in stadi diversi

Il tempo di generazione è variabile e dipende dalla specie e dal terreno nutrizionale. La divisione cellulare è preceduta dalla duplicazione del cromosoma



# DIVISIONE CELLULARE

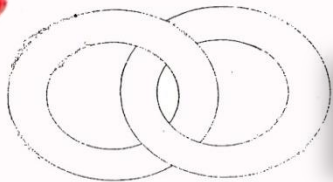
Prima tappa divisione cellulare è la  
Duplicazione del DNA (Sistema teta)





# DUPLICAZIONE CROMOSOMA

?



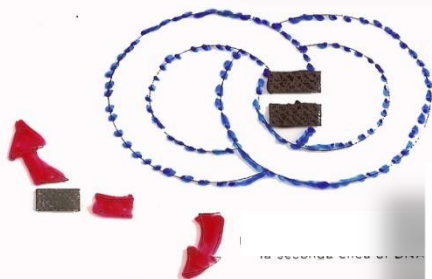
2 molecole di DNA intrecciate  
dopo replicazione



Girasi (Topoisomerasi II)



La girasi catalizza la rottura delle catene  
e si lega alle due estremità



La girasi forma un varco attraverso  
cui il DNA può passare





# DUPLICAZIONE CROMOSOMA

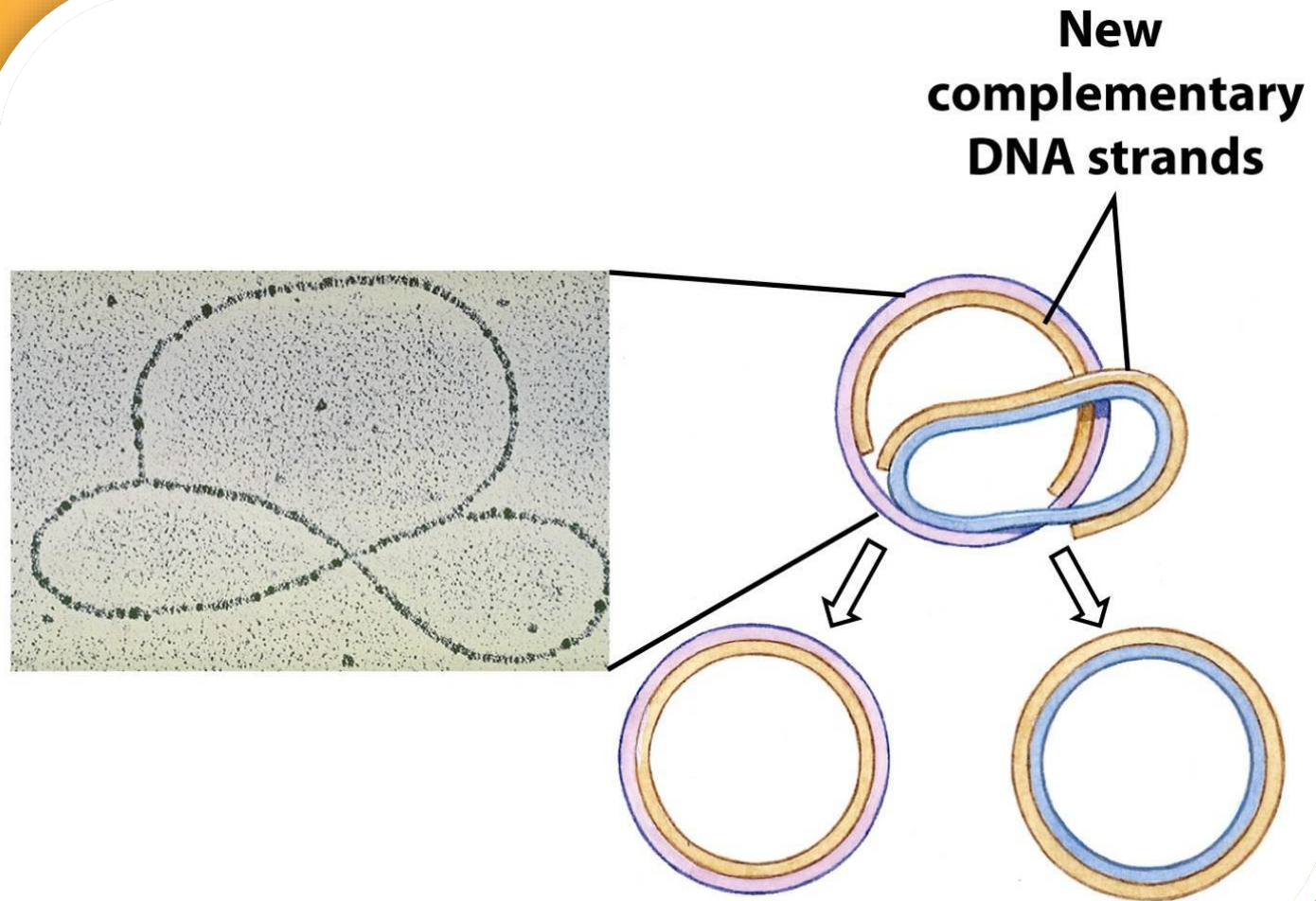


Figure 7-4b Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons

# TAPPE DELLA DIVISIONE CELLULARE



## Duplicazione del cromosoma

⇒ inizia in un punto preciso (sito di origine) e prosegue, lungo tutto il cromosoma, fino a tornare al punto di partenza.

In *Escherichia coli* dura 40 minuti a 37°C.

## Separazione dei cromosomi ⇒.

## Contemporaneamente :

- ingrandimento graduale del citoplasma;
- crescita della membrana citoplasmatica;
- biosintesi di nuova parete (cell-wall).

# TAPPE DELLA DIVISIONE CELLULARE



## Migrazione dei due cromosomi

in posizioni opposte

- **Gram-positivi**: formazione di un setto (CROSS-WALL: due mesosomi opposti, in posizione equatoriale, tendono a congiungersi);
- **Gram-negativi**: invaginazione per strozzatura delle membrane esterne.



# TAPPE DELLA DIVISIONE CELLULARE

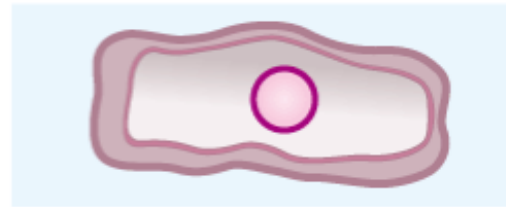
Allungamento  
della cellula madre



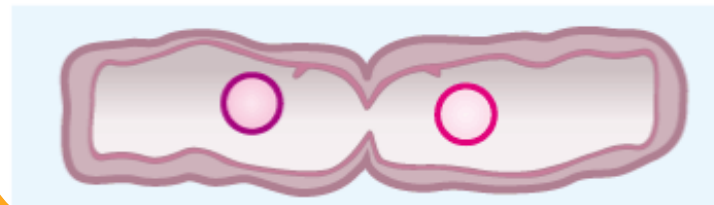
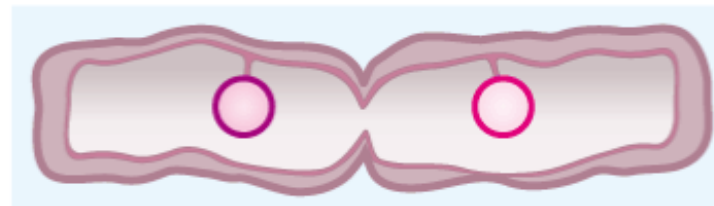
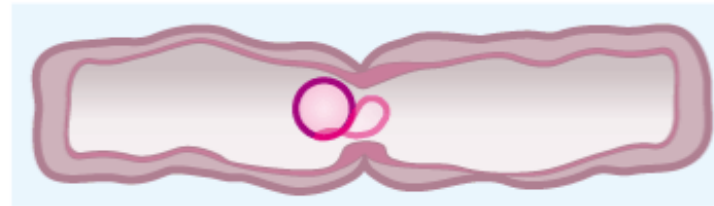
Formazione del  
CROSS WALL



Formazione delle  
due cellule figlie



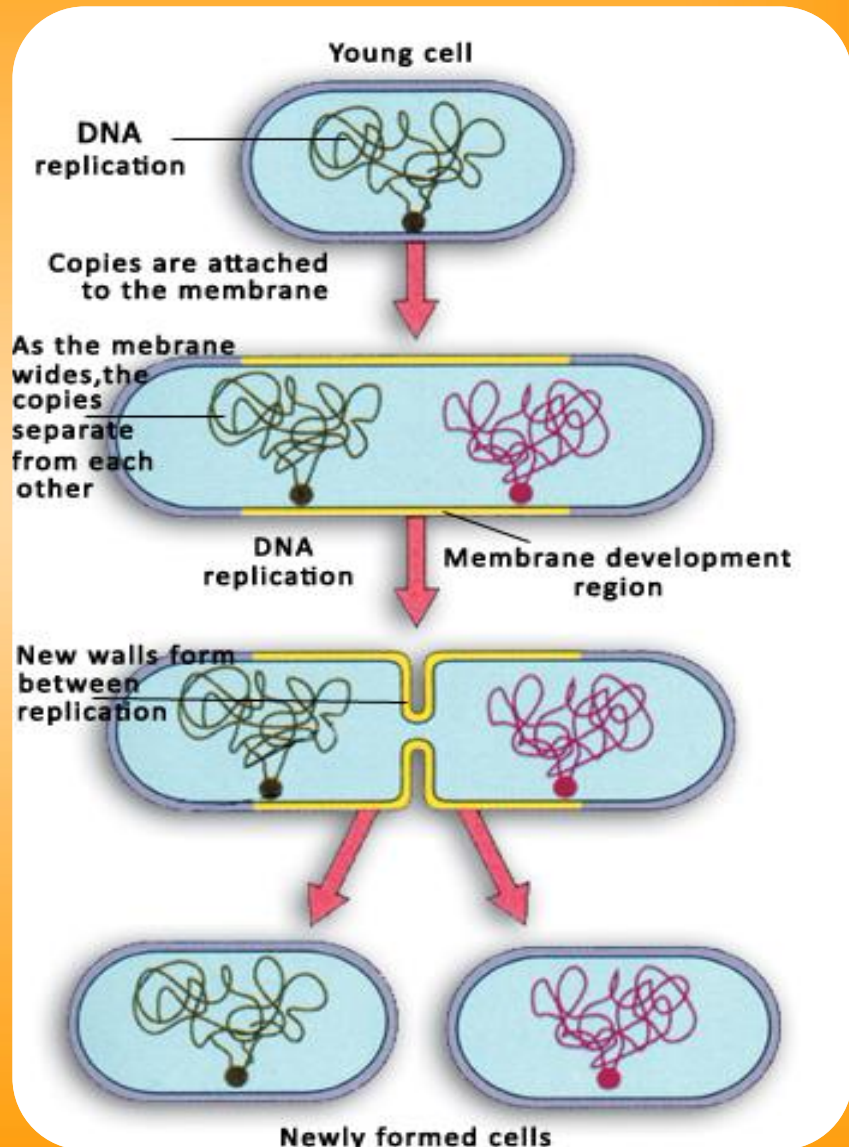
- Parete
- Membrana cellulare
- Cromosoma 1
- Cromosoma 2



# DIVISIONE CELLULARE GRAM POSITIVI

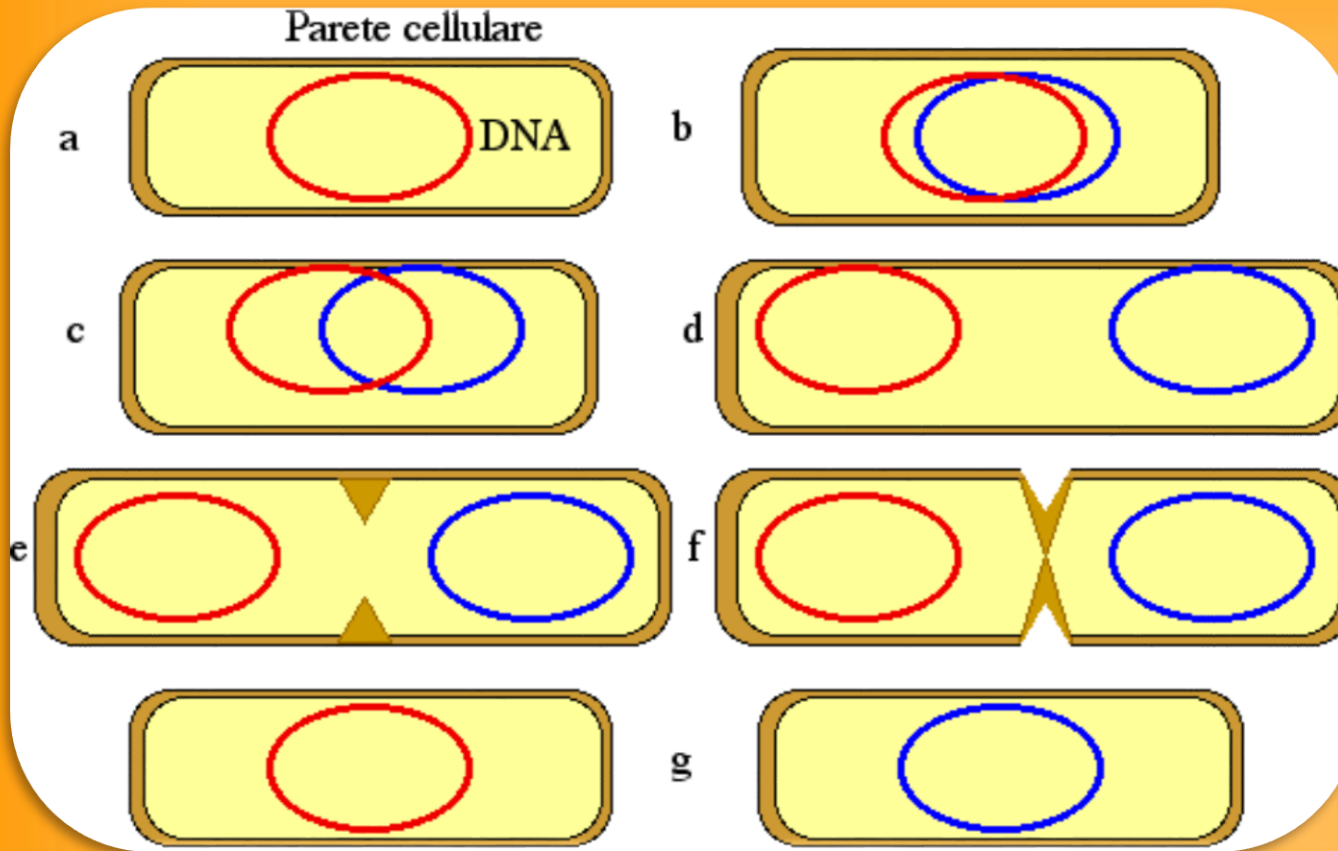
G<sup>+</sup> → setto

Le 2 cellule figlie  
possiedono alla fine  
metà parete vecchia  
e metà parete nuova





# DIVISIONE CELLULARE GRAM NEGATIVI



**G- →  
strozzatura**

**I 2 cromosomi  
si separano  
perché al  
centro la  
cellula si  
strozza.**

**Al centro si forma nuova parete e m.c. fino a quando le 2 cellule  
si staccano e solo dopo si completerà la formazione delle due  
cellule neoformate**

# TAPPE DELLA DIVISIONE CELLULARE

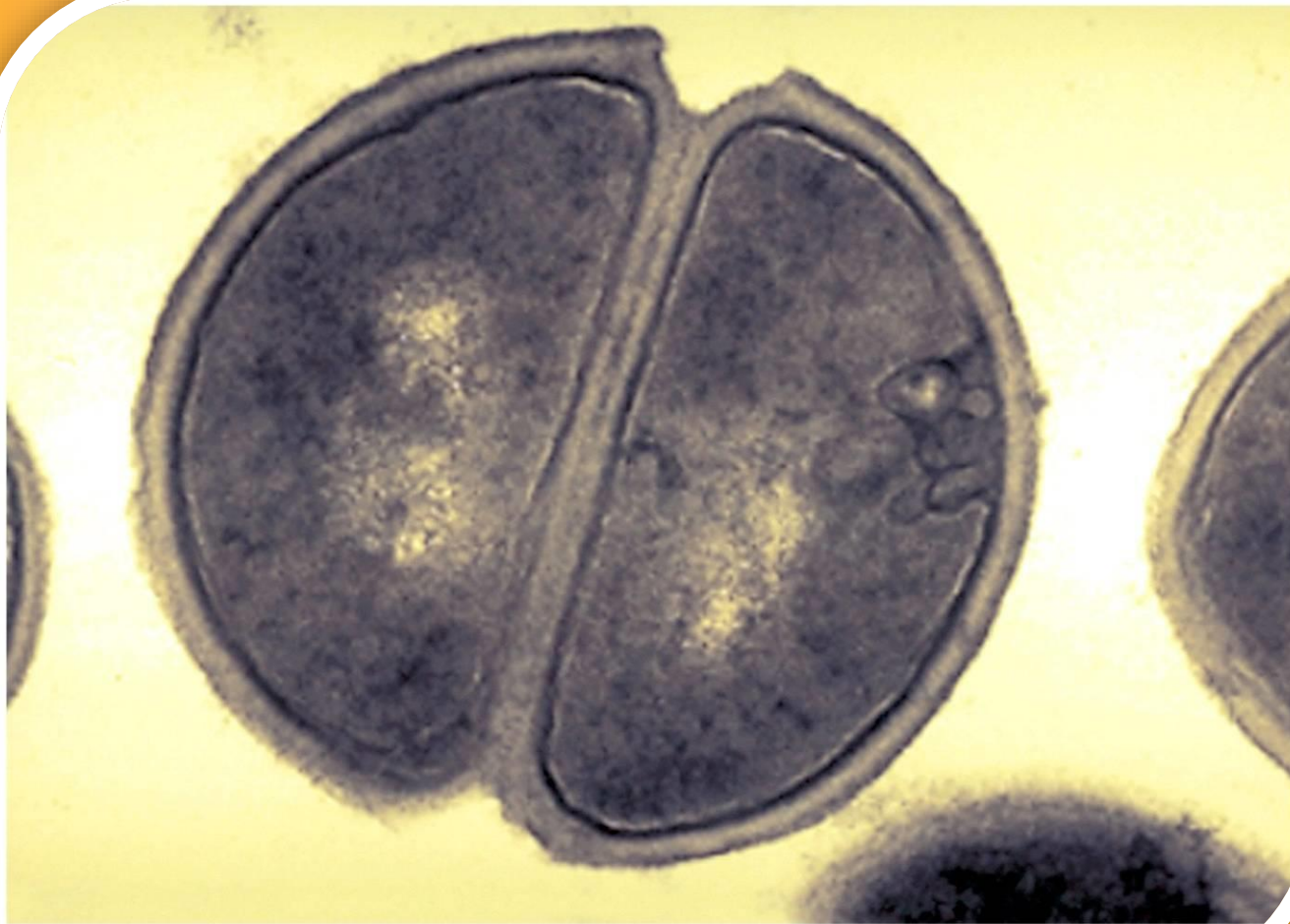


Figure 6-1b Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons

# TAPPE DELLA DIVISIONE CELLULARE

## Separazione delle due cellule neoformate

### Movimenti post-fissionali



**senza ordine** nello spazio (per "slittamento"):  
allontanamento tra 2 elementi cellulari senza  
particolare ordine (*Enterobacteriaceae*,  
*Staphylococcus* spp.)



**con ordine** nello spazio



**Rottura** = allineamento  
appaiati (diplococchi)  
tetradi/cubi  
catenelle (*Streptococcus* spp.)

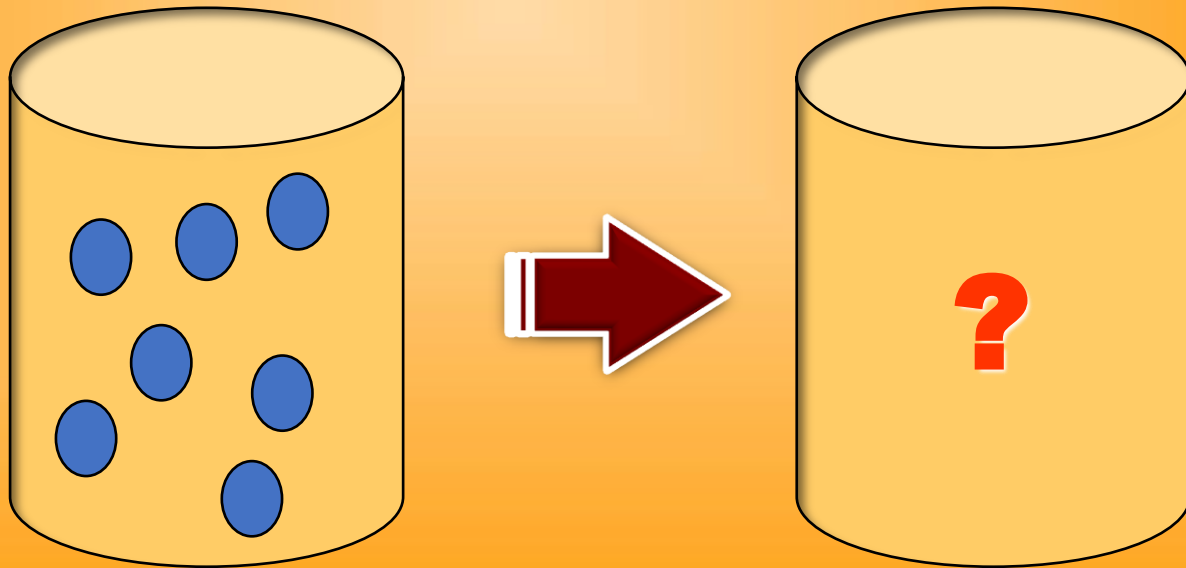
**Frusta** = spostamenti a semicerchio  
Corinebatteri e micobatteri  
formazioni a "palizzata"  
formazioni a "V"  
formazioni a "L"



# CRESCITA BATTERICA

Come possiamo vedere se i batteri stanno crescendo?

Immaginiamo di mettere dei batteri in una brodocoltura:  
che cosa succede?





# CURVA DI CRESCITA

Curva di crescita = differenziamento

La moltiplicazione cellulare può essere seguita con facilità misurando a tempi diversi la torbidità delle colture e, riportando graficamente i risultati ottenuti, si ottiene **una curva di crescita in fase liquida.**

# CRESCITA BATTERICA



Come misuro la torbidità?

Con l'impiego di nefelometri o spettrofotometri viene rappresentato l'andamento della crescita batterica in fase liquida.



Figure 6-12 Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons



Figure 6-11 Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons

**Terreno  
torbido  
SI  
crescita**

**Terreno  
limpido  
NO  
crescita**

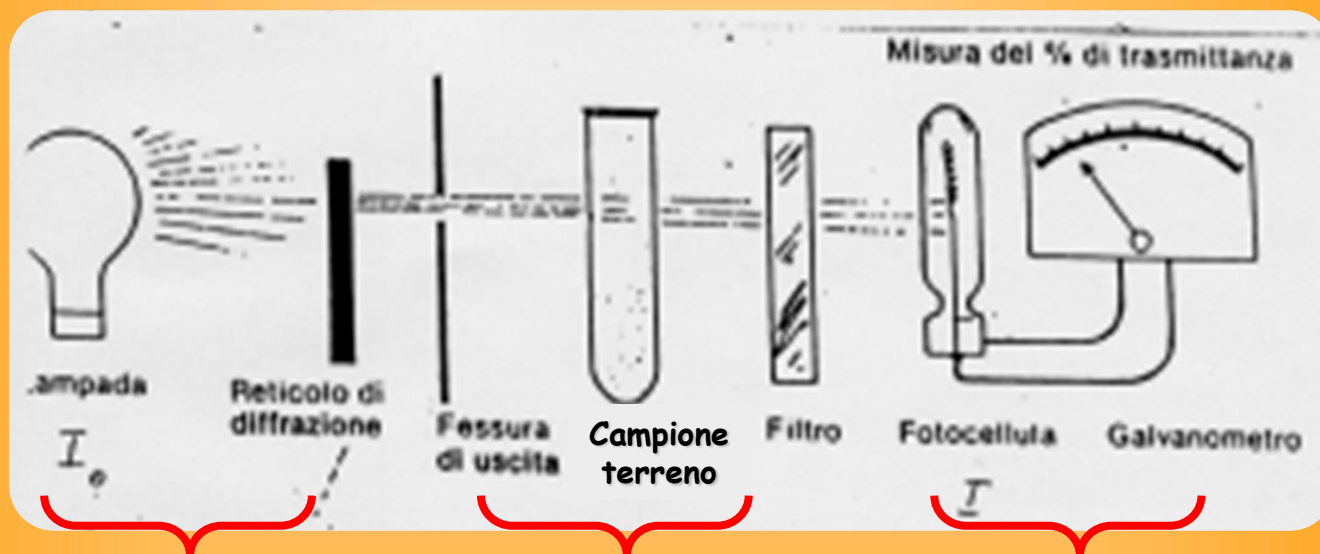




# CRESCITA BATTERICA

## NEFELOMETRO

Luce emessa = luce trasmessa



Luce emessa

Controllo

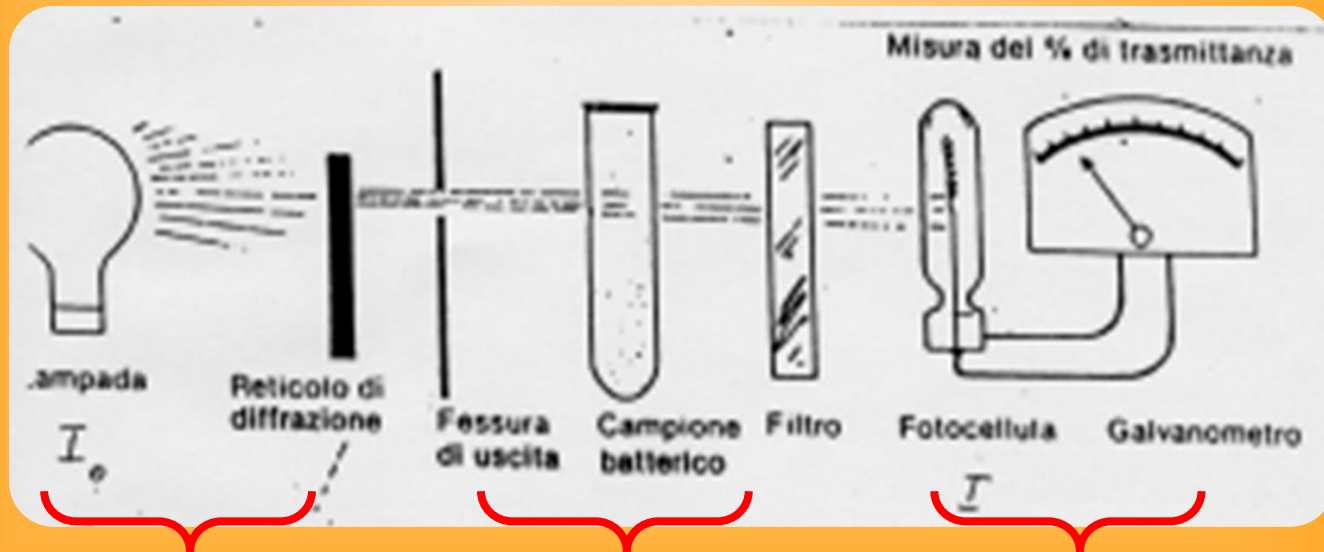
Luce trasmessa  
(o assorbita)

# CRESCITA BATTERICA

## NEFELOMETRO

Luce emessa > Luce trasmessa (perché deviata)

Per sapere quanto viene deviata rispetto al controllo si definisce un parametro chiamato O.D. (densità ottica)



Luce emessa

Brodocoltura  
con batteri

Luce trasmessa  
(o assorbita)



## CRESCITA BATTERICA

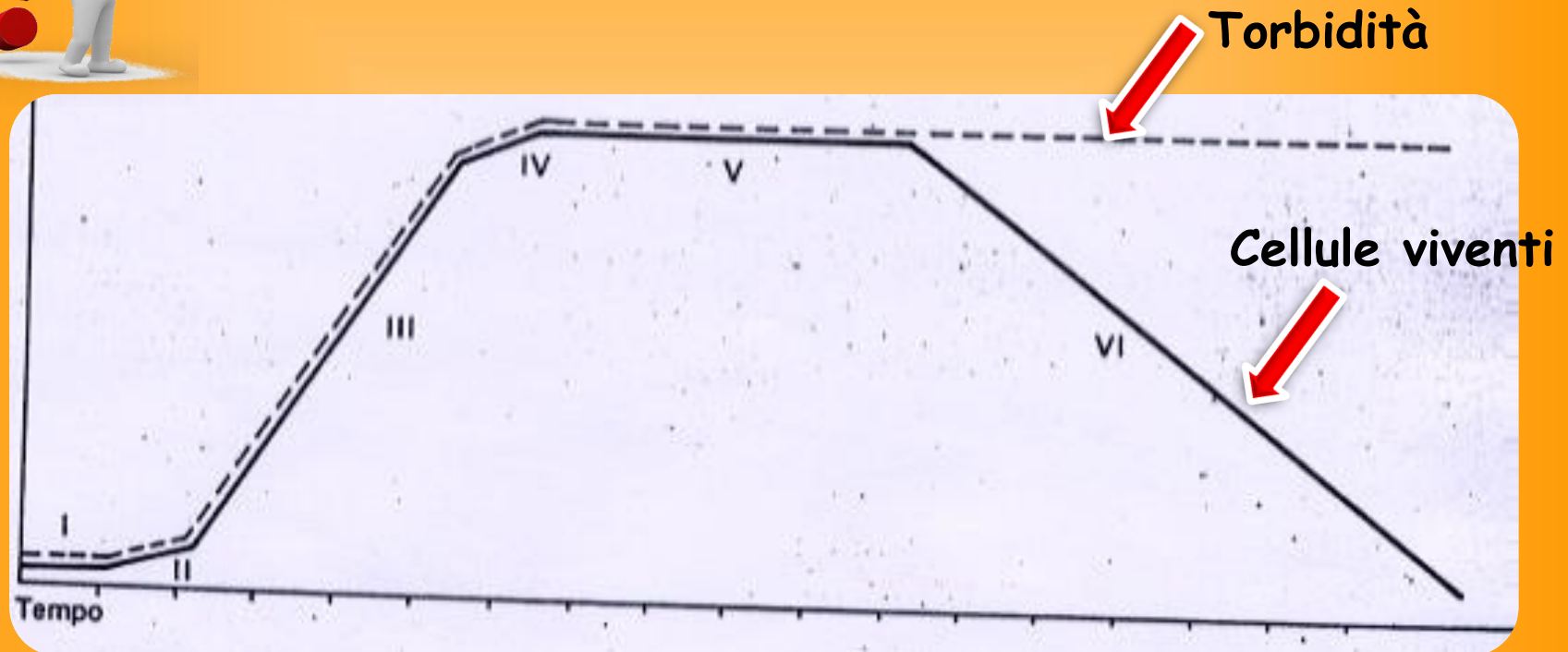
Gli apparecchi misurano l'aumento della torbidità tramite **assorbanza o trasmittanza** (l'uno è l'inverso dell'altro). La luce che attraversa la provetta di controllo non viene deviata, mentre la luce che attraversa la provetta contenente batteri viene deviata creando un indice di lettura O.D (**densità ottica**).

CON LO SPETTROFOTOMETRO NON LEGGO LA FASE DI MORTE  
(ECCEZIONE: *Streptococcus pneumoniae* = AUTOLISINA)

# CURVA DI CRESCITA



**Torbidità = cell vive + cell morte (massa)**



- 1:** fase di latenza "lag"
- 2:** fase di accelerazione
- 3:** fase logaritmica
- 4:** fase di decelerazione
- 5:** fase stazionaria o di "plateau"
- 6:** fase di declino o morte



# CURVA DI CRESCITA

1

## Fase di latenza (fase lag)

Il numero delle cellule viventi rimane stazionario. I batteri non si dividono, ma subiscono un incremento di volume → adattamento al nuovo ambiente.

2

## Fase di accelerazione della crescita

La moltiplicazione si avvera a ritmo piuttosto blando.



# CURVA DI CRESCITA

3

## Fase logaritmica (o esponenziale)

**Incremento rapido** della moltiplicazione cellulare.

Detta logaritmica in quanto in essa si raggiunge una relazione lineare tra il tempo e il logaritmo del numero delle cellule: per ogni unità di tempo il numero di batteri aumenta di 10 volte.

**È condizionata dalle condizioni ambientali**

# CURVA DI CRESCITA

4

## Fase di decelerazione

La moltiplicazione si attua ad un **ritmo nuovamente blando**, in quanto solo poche cellule hanno ancora la potenzialità riproduttiva.

Diminuzione dei nutrienti e conseguente aumento dei cataboliti della cellula batterica!



# CURVA DI CRESCITA

5

## Fase stazionaria

il numero delle cellule viventi si mantiene costante → plateau

cellule vive = cellule morte

Con il metodo turbidimetrico la curva si attesta alla fase stazionaria. Il nefelometro non distingue tra vivi e morti ma vede solo la massa!!!

In realtà i batteri dopo la fase stazionaria iniziano a morire. I nutrienti scarseggiano, aumentano i cataboliti, quindi la curva di crescita....inizia a scendere



# CURVA DI CRESCITA

6

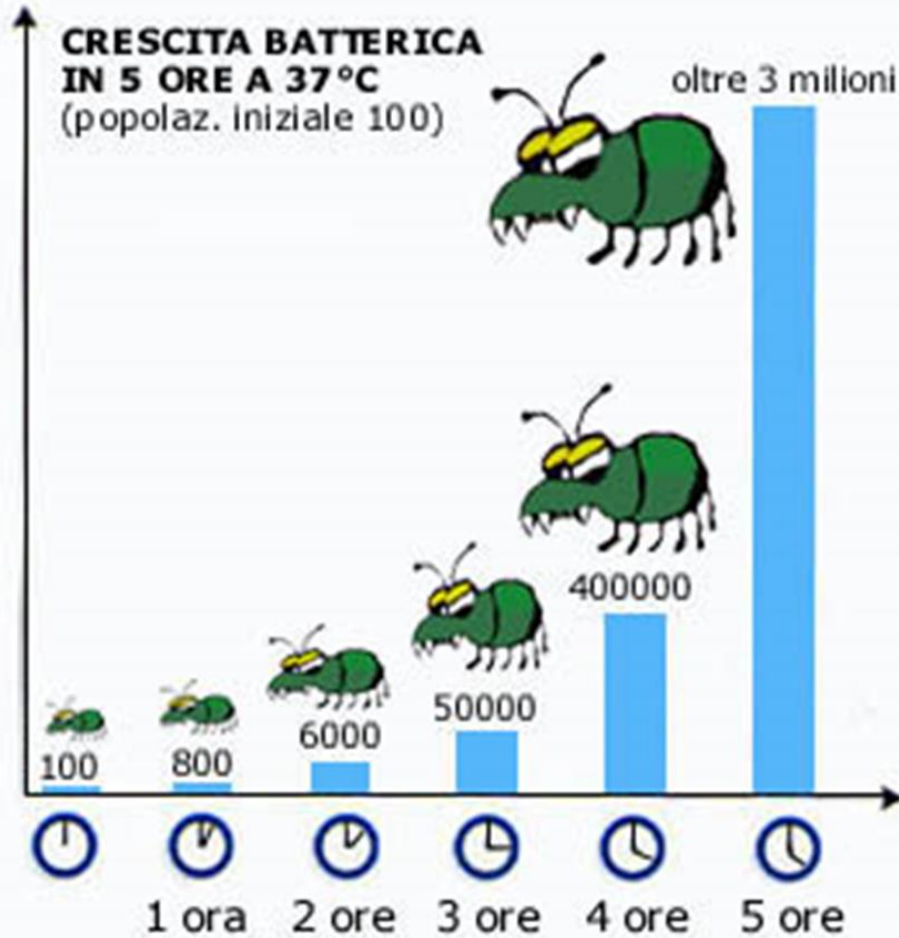
## Fase di declino (o morte)

i batteri vanno incontro a morte e quindi il numero delle cellule viventi a mano a mano si avvicinerà allo zero

(senza però raggiungerlo!).

Per sapere se i batteri sono vivi bisogna contare le UFC (unità formanti colonia) vedi più avanti

# CURVA DI CRESCITA

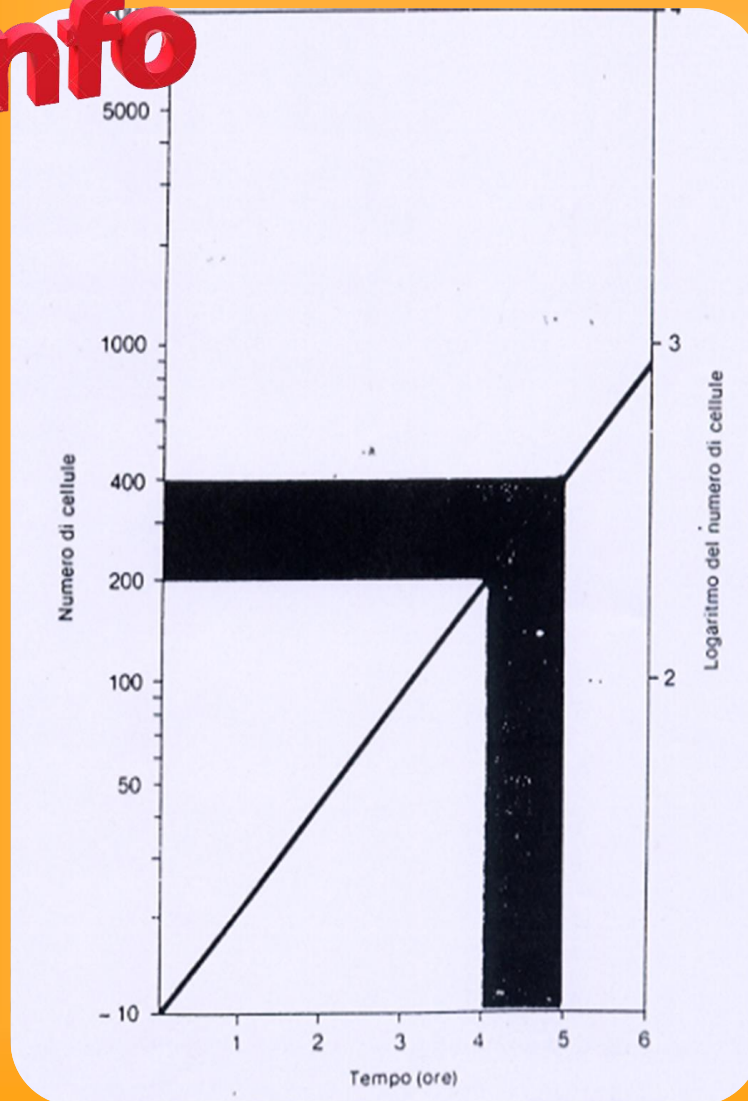






# CURVA DI CRESCITA

Retta in scala logaritmica



con la quale posso  
calcolare  
il tempo di duplicazione,  
caratteristico di ciascuna  
specie batterica  
Sull'asse delle y riporto il valore di  
densità ottica misurato al  
nefelometro. Osservo l'intervallo di  
tempo impiegato dalla  
popolazione per raddoppiare la  
massa (es. da 200 OD a 400 OD  
che corrisponde ad un T dupl di 1  
ora: da 4 a 5)

# CONTEGGIO DELLE COLONIE

U.F.C

unità formanti colonia

C.F.U

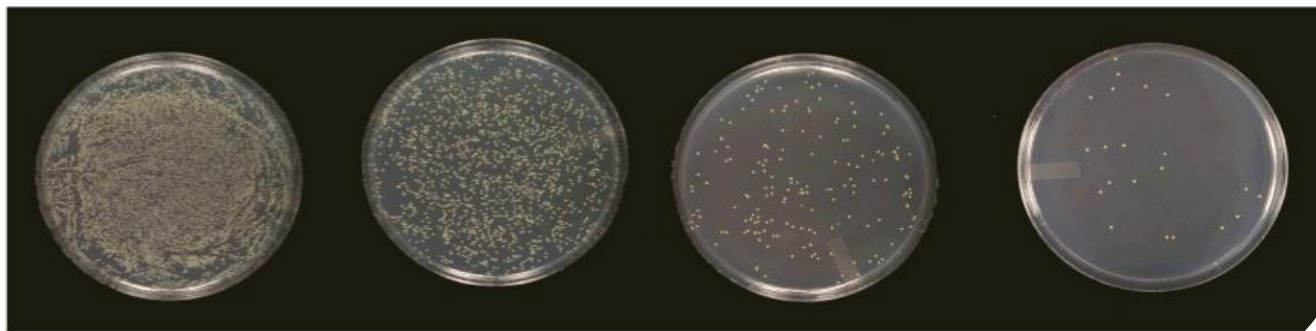
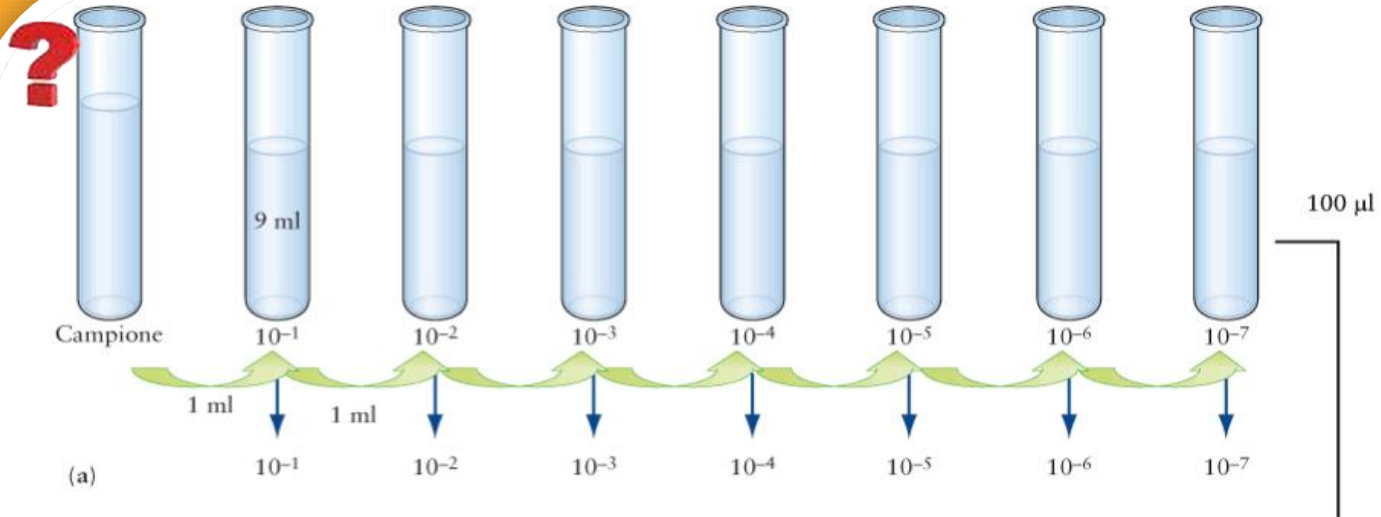
colony forming units



Consente di costruire la curva di crescita batterica e di determinare il numero dei microrganismi vivi presenti in una determinata coltura (acqua, campione biologico, alimenti, ecc.)

La tecnica più utilizzata è quella di contare le colonie che si sviluppano su terreni solidi

# CONTA DELLE U.F.C

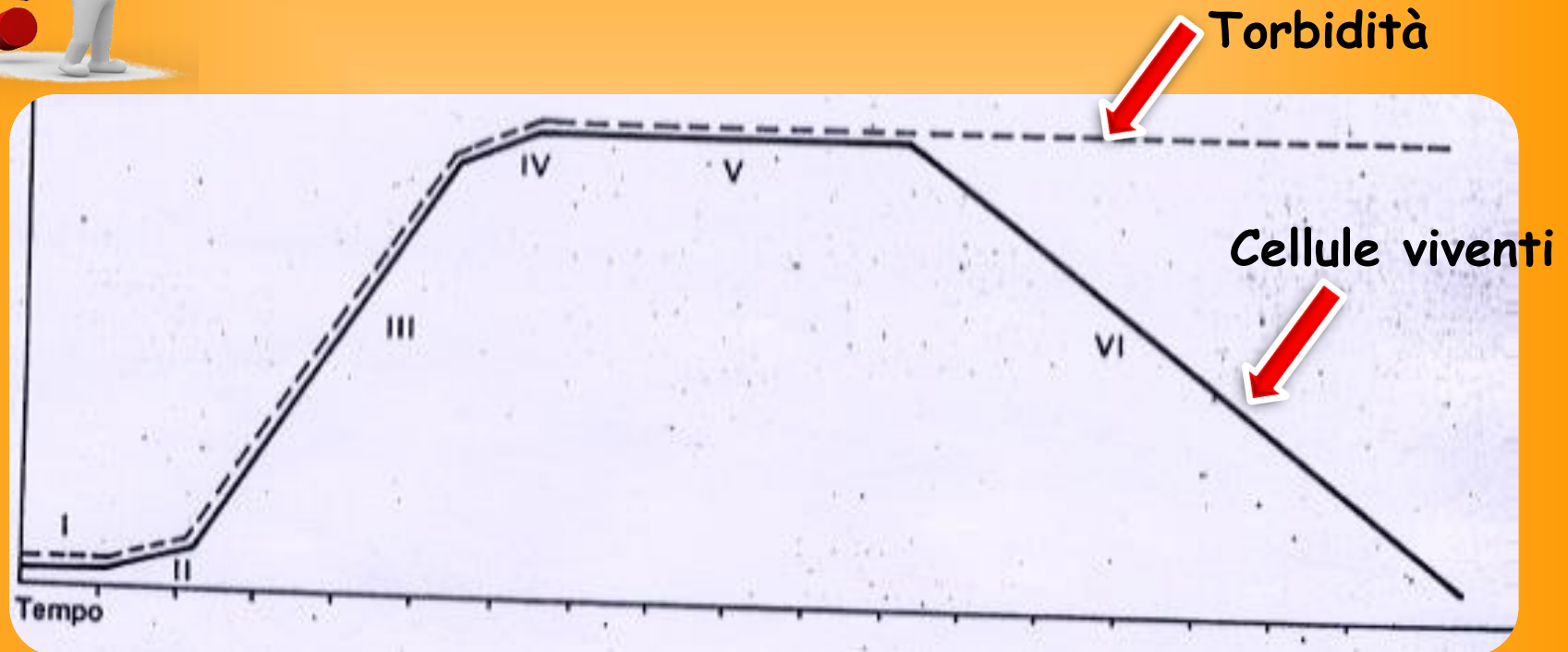


(b) 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup>

# CURVA DI CRESCITA



Torbidità = cell vive + cell morte (massa)

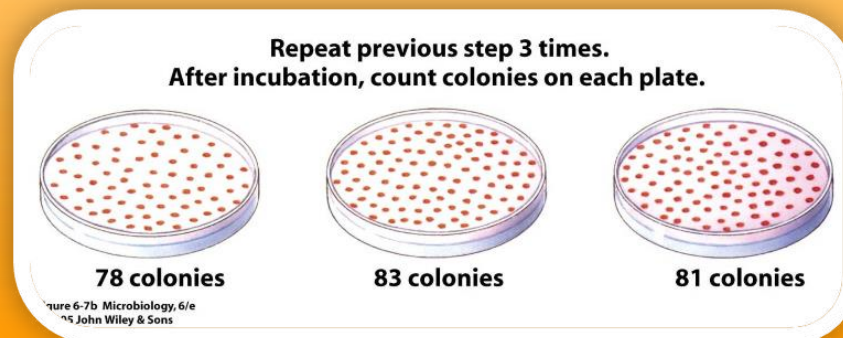


- 1: fase di latenza "lag"
- 2 fase di accelerazione
- 3: fase logaritmica
- 4 fase di decelerazione
- 5: fase stazionaria o di "plateau"
- 6: fase di declino o morte

# COSTRUIRE LA CURVA DI CRESCITA BATTERICA

## Metodica

Seminare una certa quantità di MCO ( $10^5$  ufc/ml) in una provetta con 50 ml di brodo colturale (Tempo<sub>0</sub>). Incubare in termostato a 37°C per 18-24 h. Al T<sub>0</sub> e ogni 60min prelevare dalla provetta 1ml e diluire il campione 1:10 (1 ml di campione + 9ml di acqua). Diluire molte volte se si suppone un numero elevato di batteri (quando si costruisce la curva di crescita, all'inizio i batteri saranno pochi, ma con il passare del tempo i MCO si moltiplicano e bisognerà diluire di più), questo perché in una capsula di Petri il numero ottimale di UFC che si riesce facilmente a contare è circa 200-300.





# COSTRUIRE LA CURVA DI CRESCITA BATTERICA

## Metodica

Dalle 3 ultime provette della serie di diluizioni si prelevano 0,1 ml e si spatola su una piastra di Petri con terreno adatto alla crescita del microrganismo in esame. Le piastre si mettono a incubare a 37°C per 18-24h. Allo scadere del tempo si conteranno le colonie cresciute.

Per sapere il n° di batteri esatto si dovrà tenere conto della diluizione fatta (abbiamo diluito 4 volte quindi al numero delle colonie contate bisogna aggiungere 4 zeri); es. piastra  $10^{-4}$  conto 21 colonie, quindi  $21 \times 10^4$  batteri. Devo aggiungere un altro zero perché quando ho seminato ho prelevato 0,1 ml e ho quindi diluito un'altra volta  $\rightarrow 2.100.000$ . Nel mio campione ho  $21 \times 10^5$  ufc/ml. Per ogni tempo opererò nello stesso modo fino alle 24h. I numeri ottenuti riportati su un grafico daranno la curva di crescita del MCO.

# CRESCITA BATTERICA

## CONTA DELLE UFC

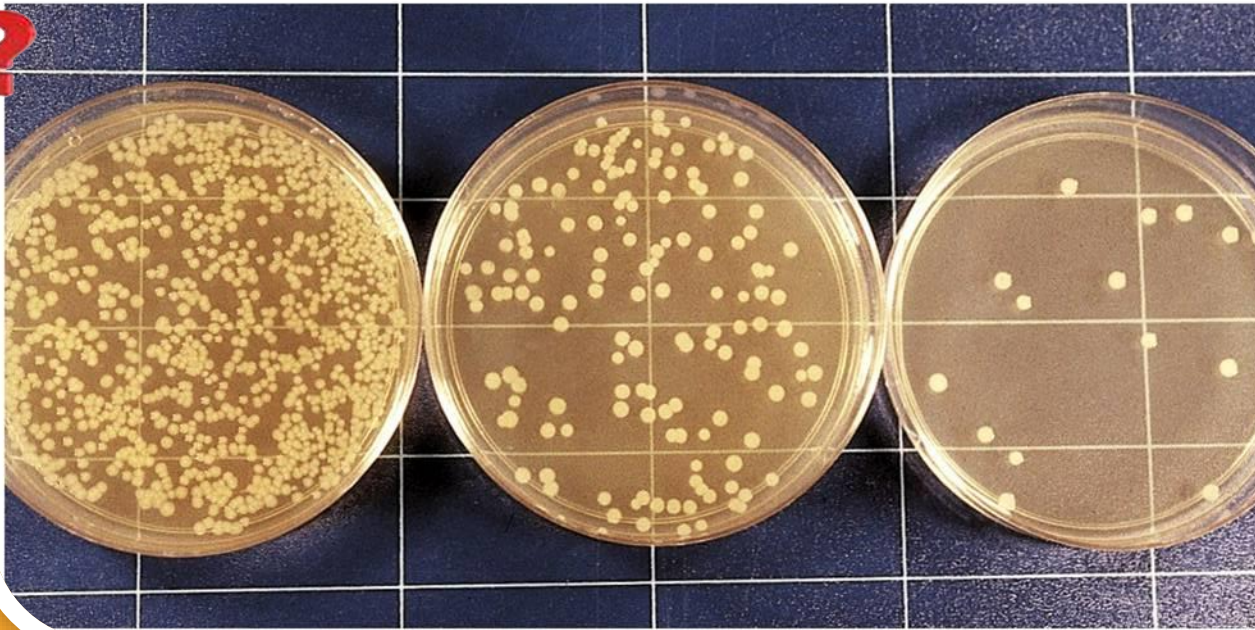


Figure 6-8c Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons



# CRESCITA BATTERICA

## CURVA DI CRESCITA DISCONTINUA (Diauxica = crescita a gradini)

Negli **ambienti naturali**, a differenza di quanto accade nelle colture preparate in laboratorio, i **microrganismi** possono venire a contatto con più di una fonte dello stesso fattore nutritivo: in questo caso essi **captano e metabolizzano il substrato che consente la crescita maggiore (la più veloce)**.



# CRESCITA BATTERICA



## CURVA DI CRESCITA DISCONTINUA (Diauxica = crescita a gradini)

Solo quando il substrato preferenziale è stato completamente esaurito, dopo un periodo di latenza più o meno breve, inizia ad essere utilizzato il secondo substrato.

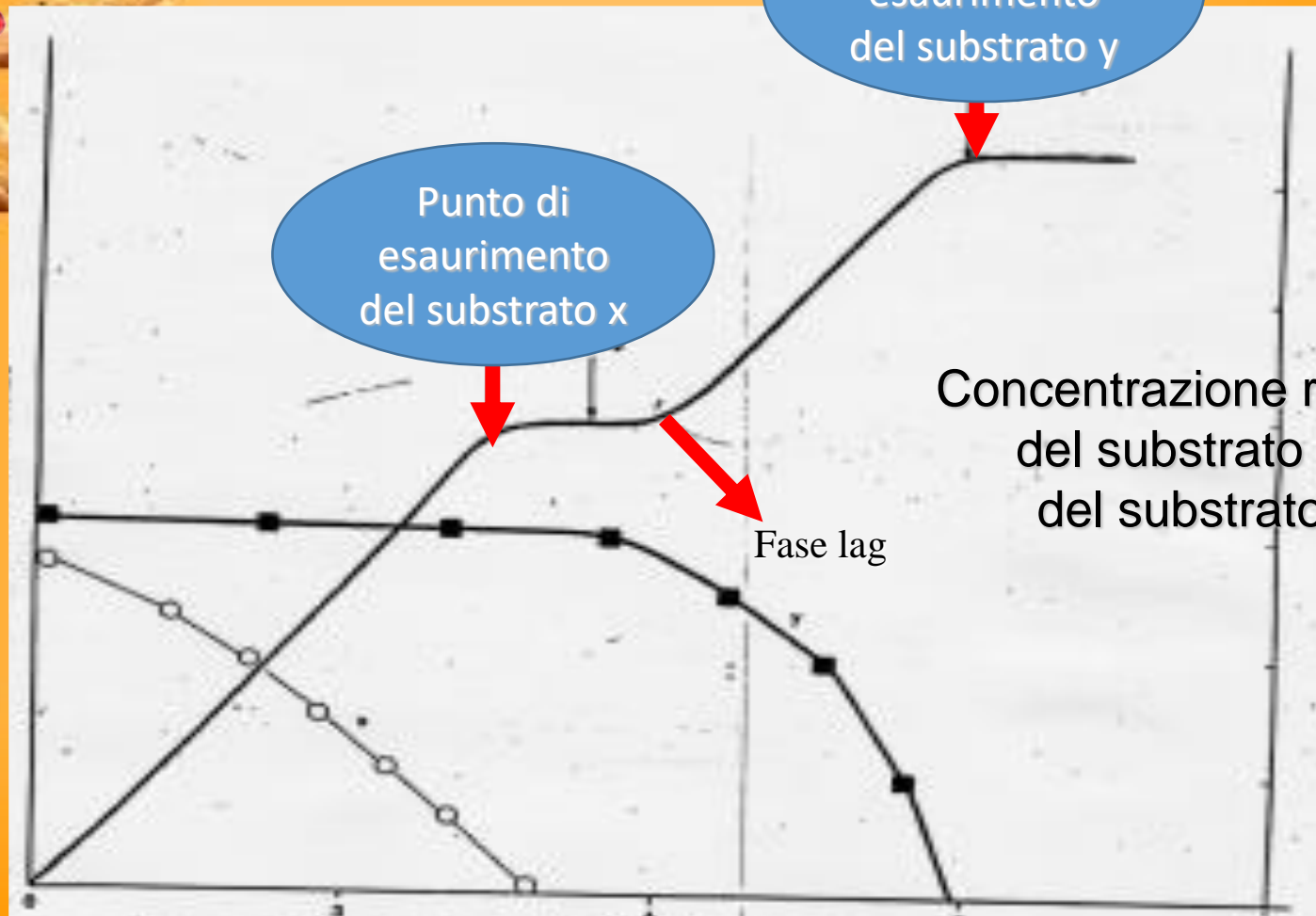
La curva di crescita in questi casi si presenta diversa da quella costruita sulla base delle indagini di laboratorio e si parla di **CURVA DIAUXICA**.

# CRESCITA BATTERICA

## CURVA DIAUXICA



Densità ottica della coltura





*Grazie*

*Per qualunque domanda o problema  
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: [vivian.tullio@unito.it](mailto:vivian.tullio@unito.it)