



## DIFFERENZIAMENTO

*Prof.ssa Vivian Tussio*



# DIFFERENZIAMENTO



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

Due cellule si intendono **differenziate** quando hanno **uguale genotipo** ma **differenti fenotipi**

**(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) →

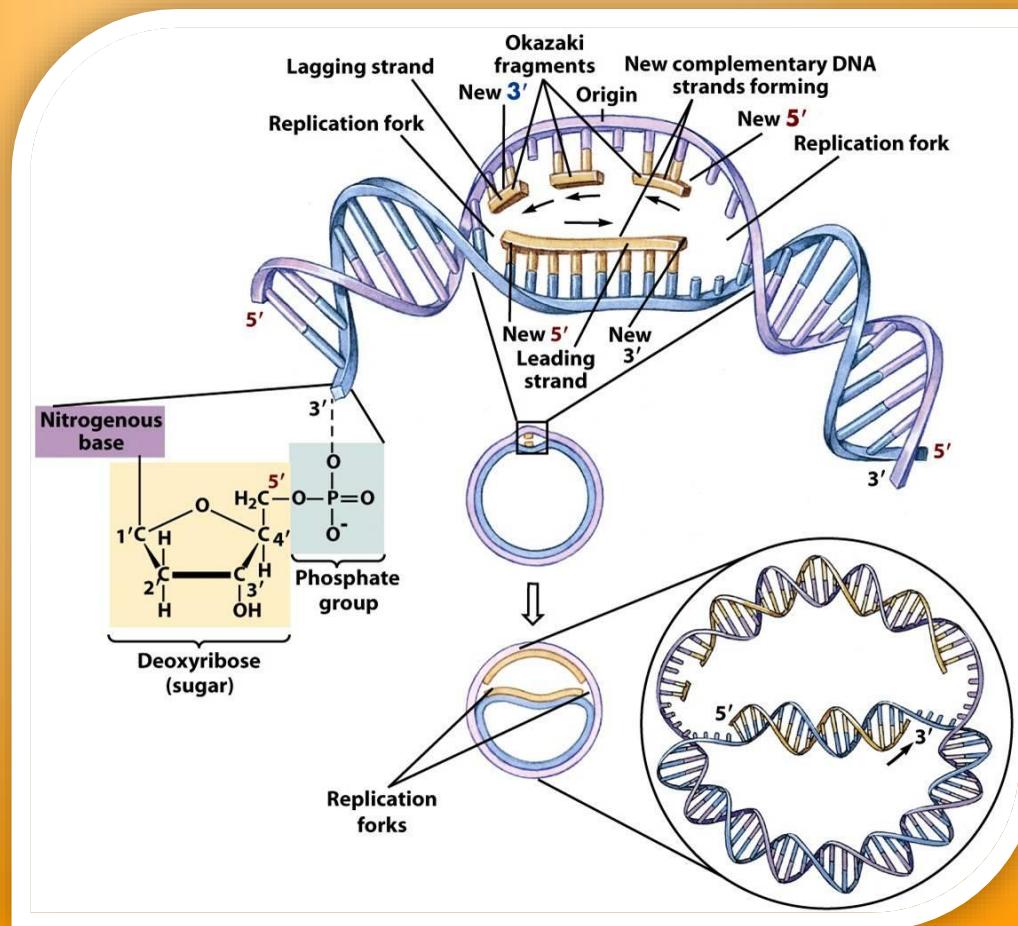
→ vengono prodotte proteine che risultano caratteristiche di una certa fase e che sono assenti in stadi diversi

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



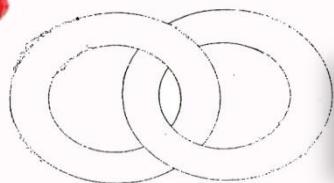
**Prima tappa divisione cellulare è la  
Duplicazione del DNA (Sistema teta)**



# DUPLICAZIONE CROMOSOMA



?



2 molecole di DNA intrecciate  
dopo replicazione



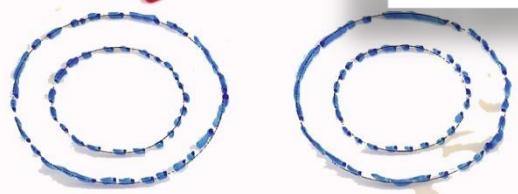
Girasi (Topoisomerasi II)



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

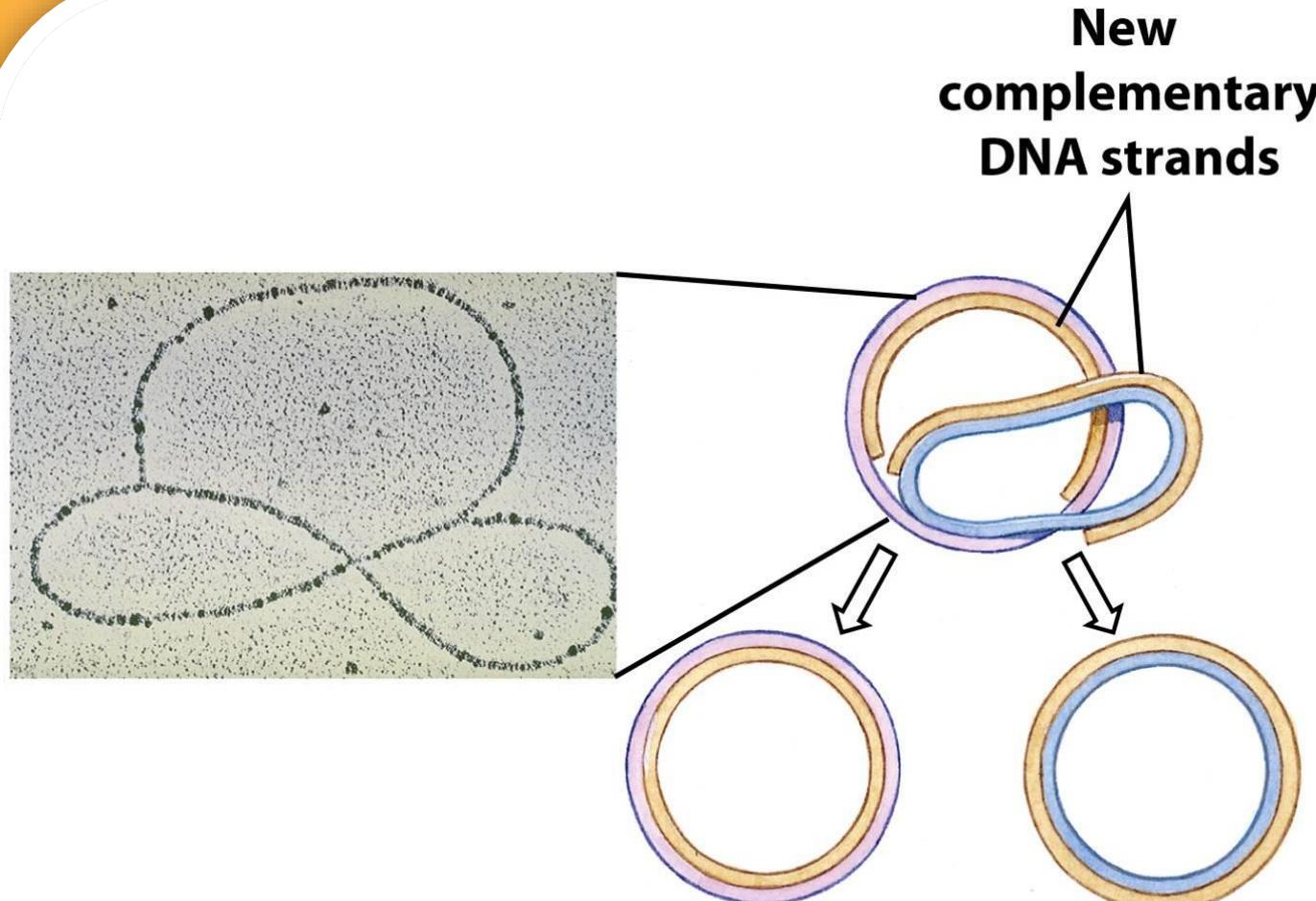


Figure 7-4b Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons

# 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

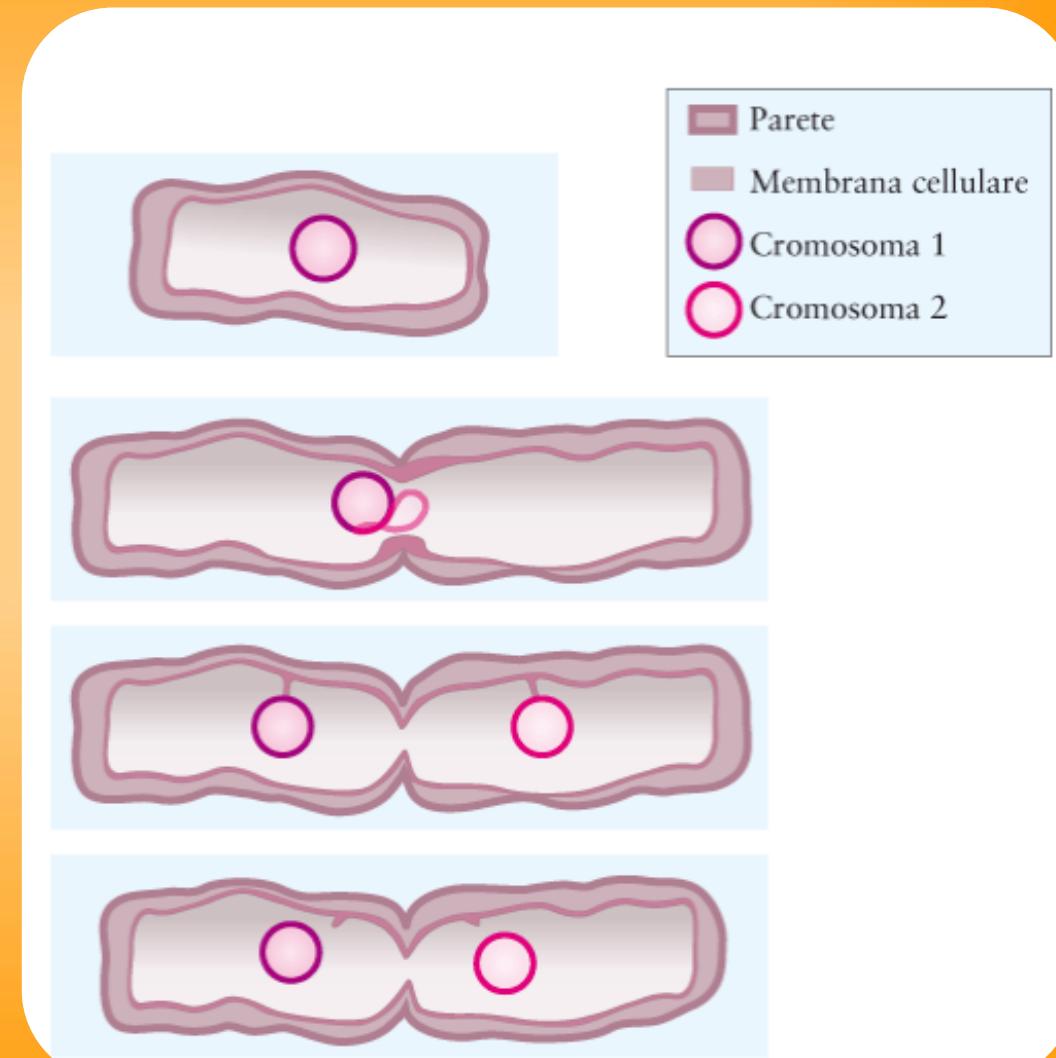
Allungamento  
della cellula madre



Formazione del  
CROSS WALL



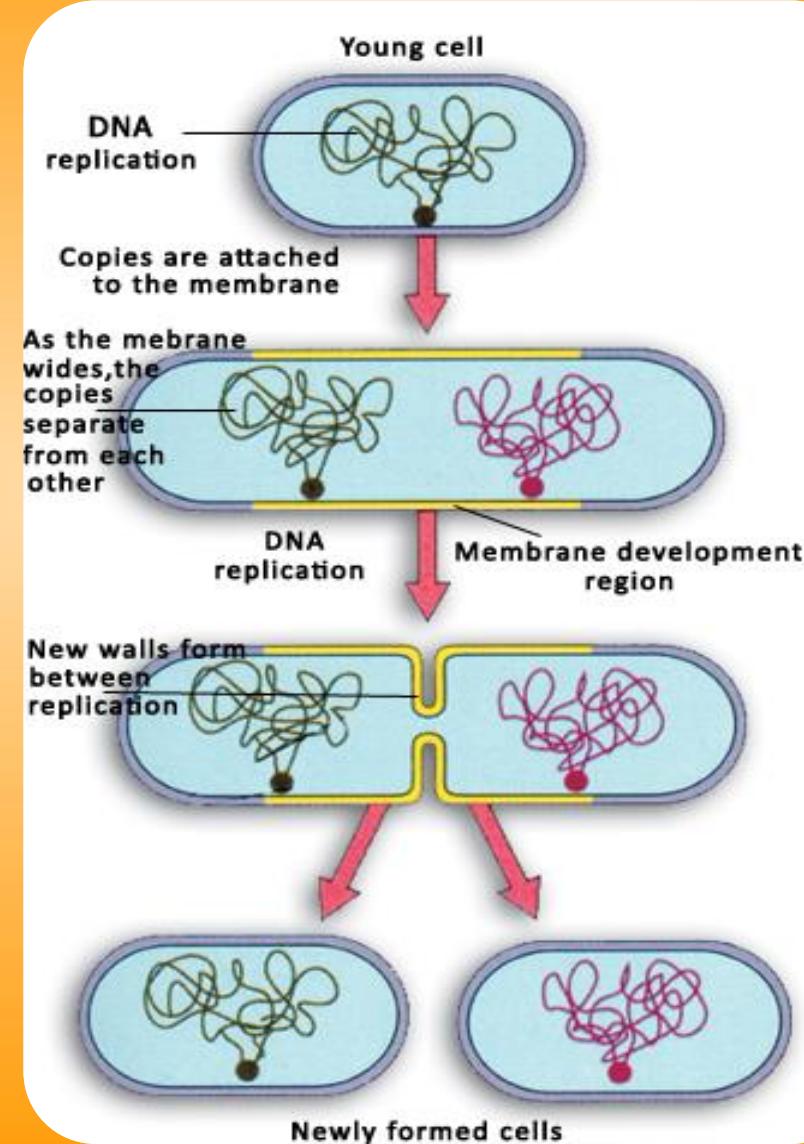
Formazione delle  
due cellule figlie



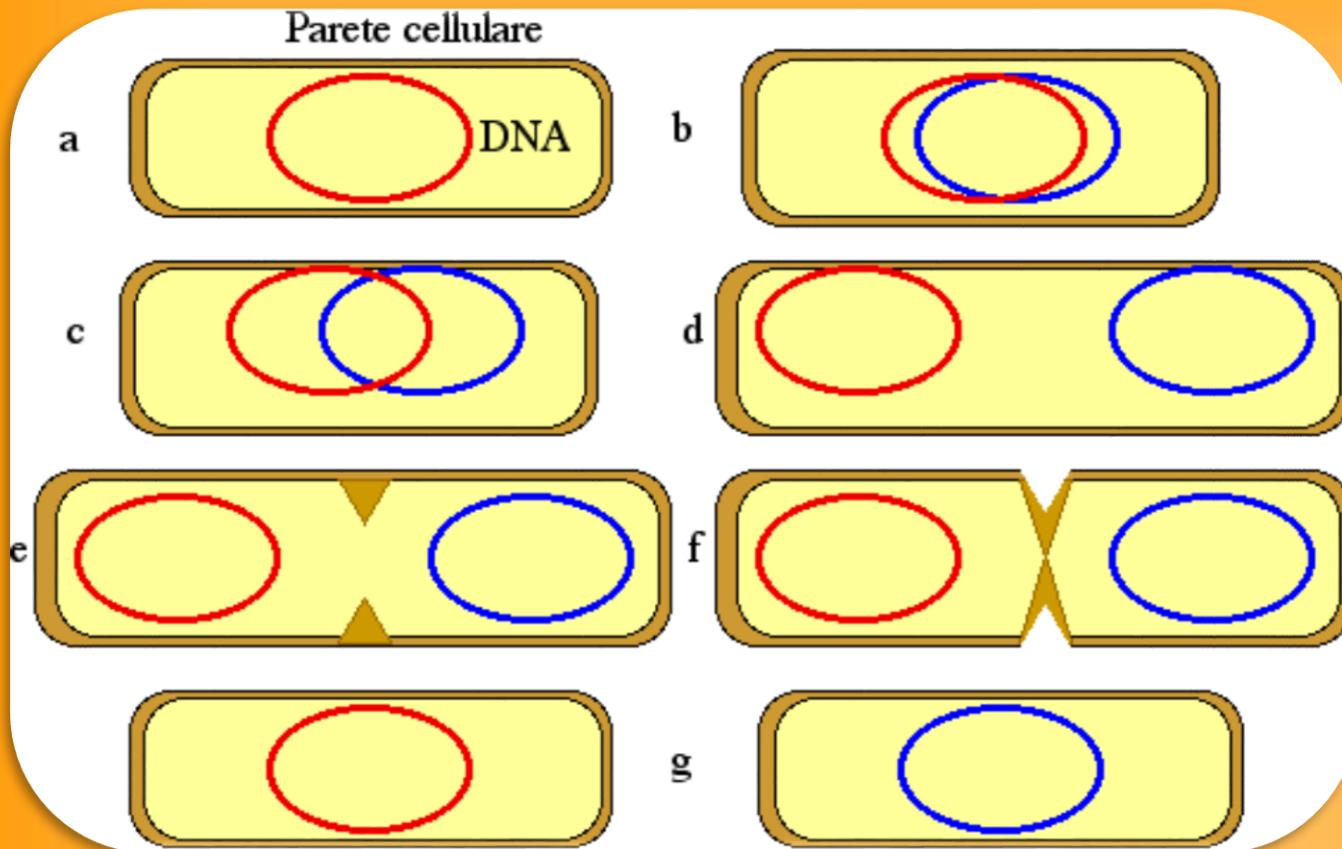
# DIVISIONE CELLULARE GRAM POSITIVI

**G+ → 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

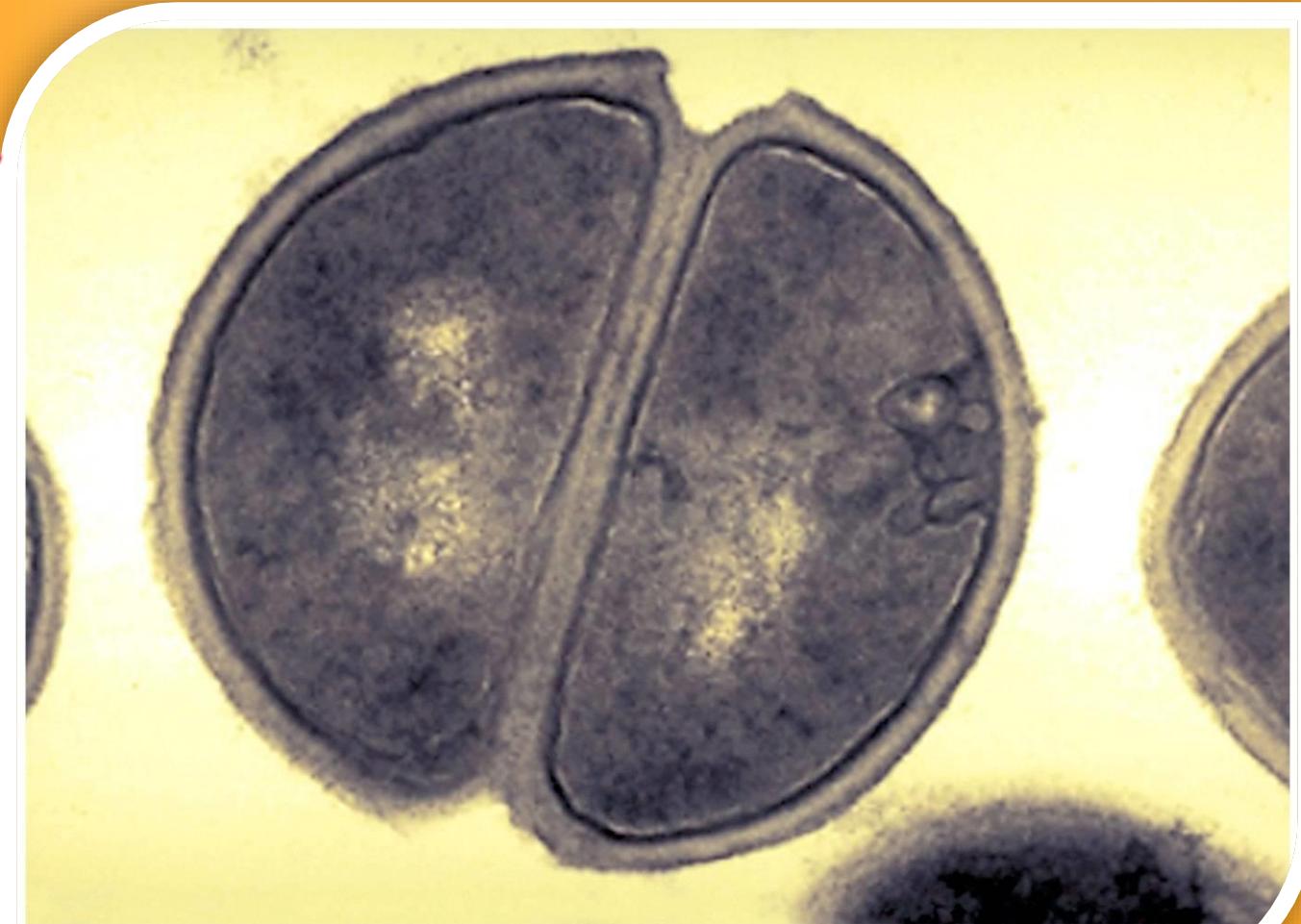


Figure 6-1b Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons

# 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.)

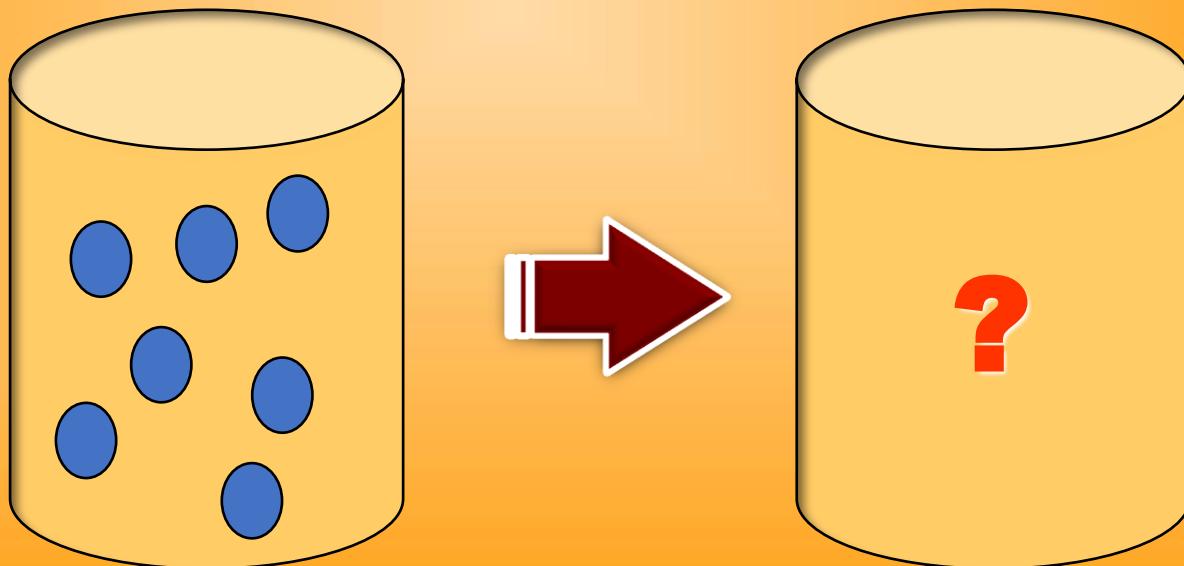
**Frusta** = spostamenti a semicerchio  
Corinebatteri e micobatteri  
formazioni a "palizzata"  
formazioni a "V"  
formazioni a "L"



## 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  
turbido  
**SI**  
crescita

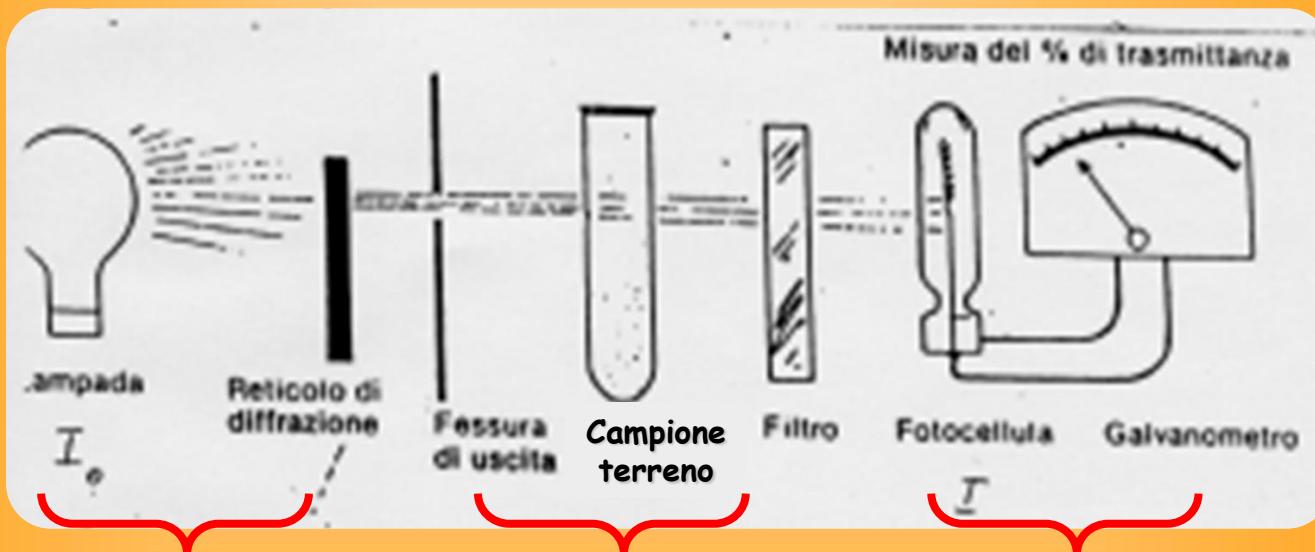
Terreno  
limpido  
**NO**  
crescita



# CRESCITA BATTERICA

## NEFELOMETRO

Luce emessa = luce trasmessa



Luce emessa

Controllo

Luce trasmessa  
(o assorbita)

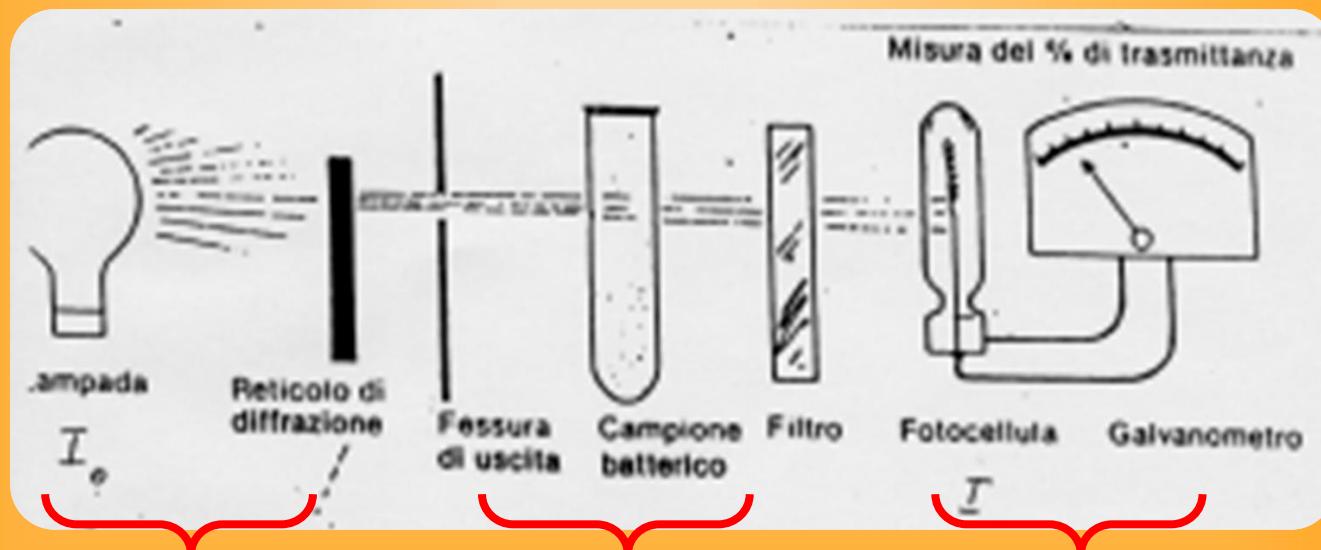
# CRESCITA BATTERICA



## NEFELOMETRO

Luce emessa > Luce trasmessa (perché deviata)

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



Luce emessa

Brodocoltura  
con batteri

Luce trasmessa  
(o assorbita)

## CRESCITA BATTERICA

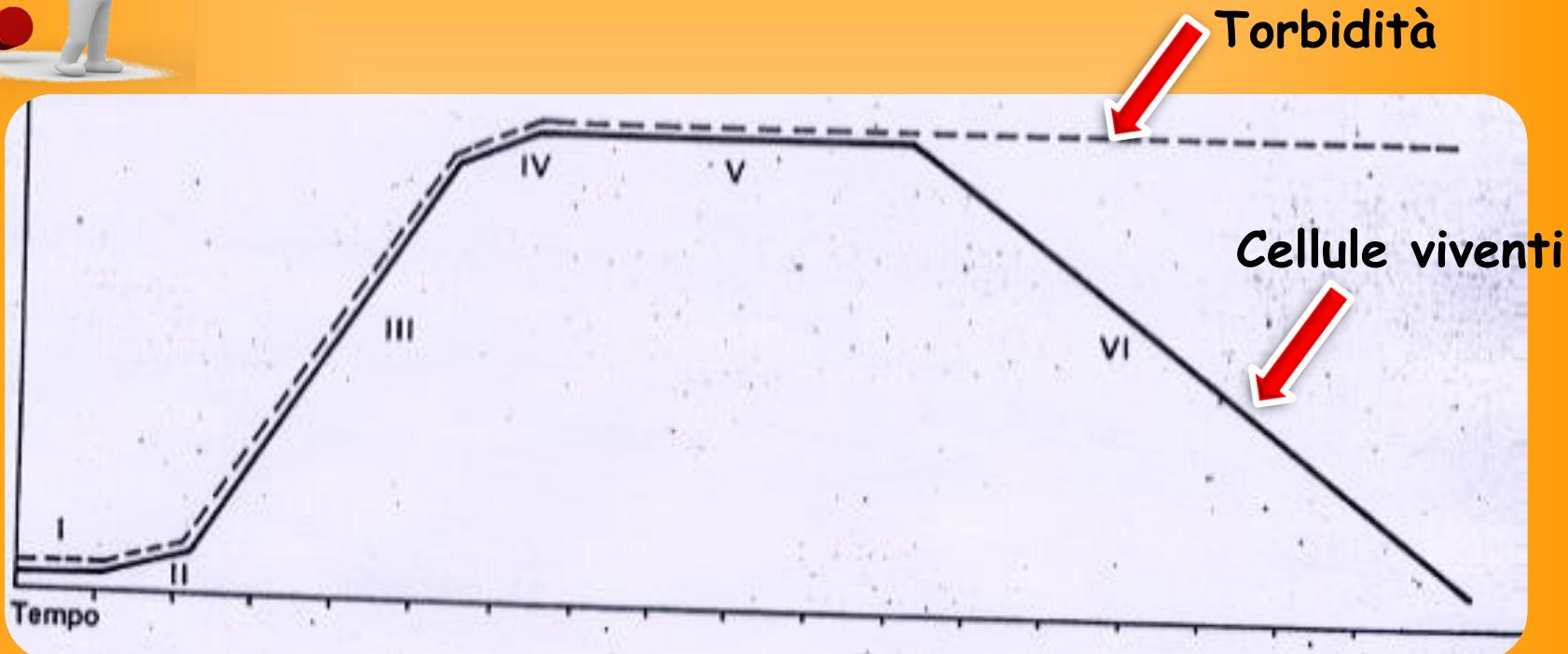
Gli apparecchi misurano l'aumento della torbidità tramite **assorbanza** o **trasmittanza** (l'uno è l'inverso dell'altro). La luce che attraversa la provetta di controllo non viene deviata, mentre la luce che attraversa la provetta contenente batteri viene deviata creando un indice di lettura O.D (**densità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

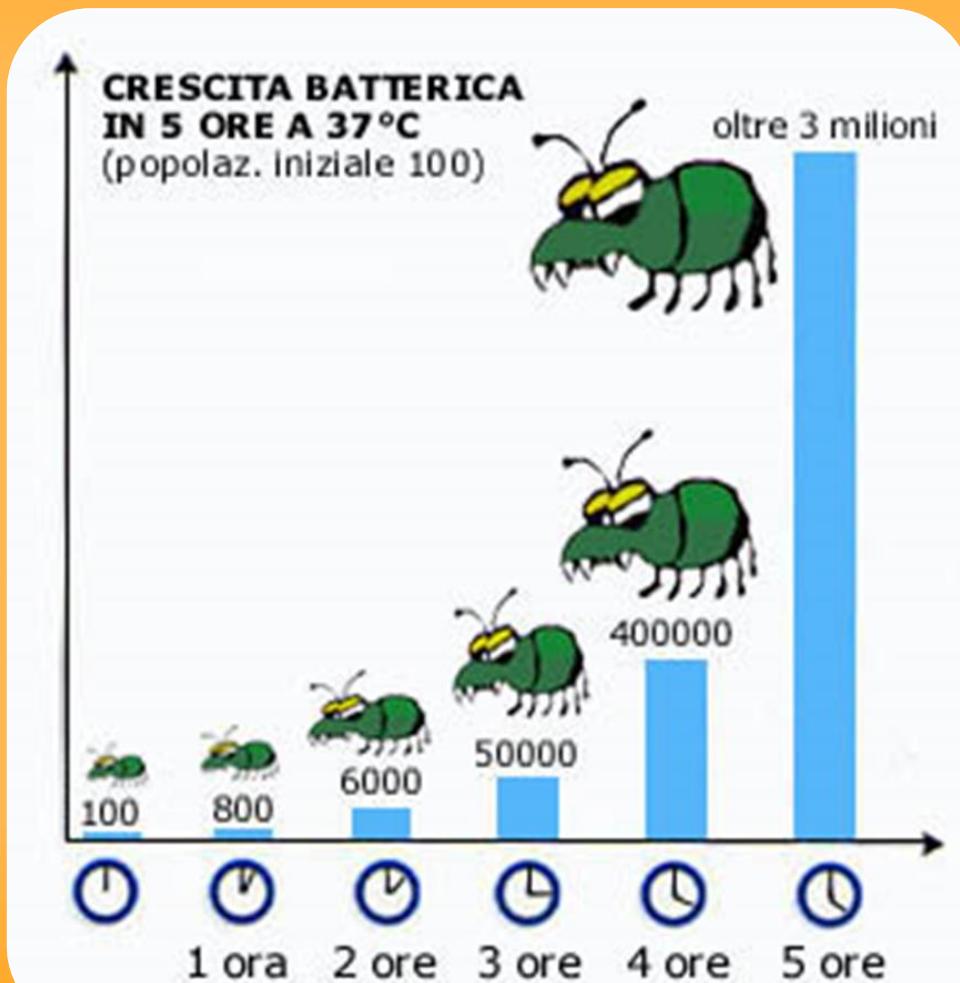
6

### 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!).

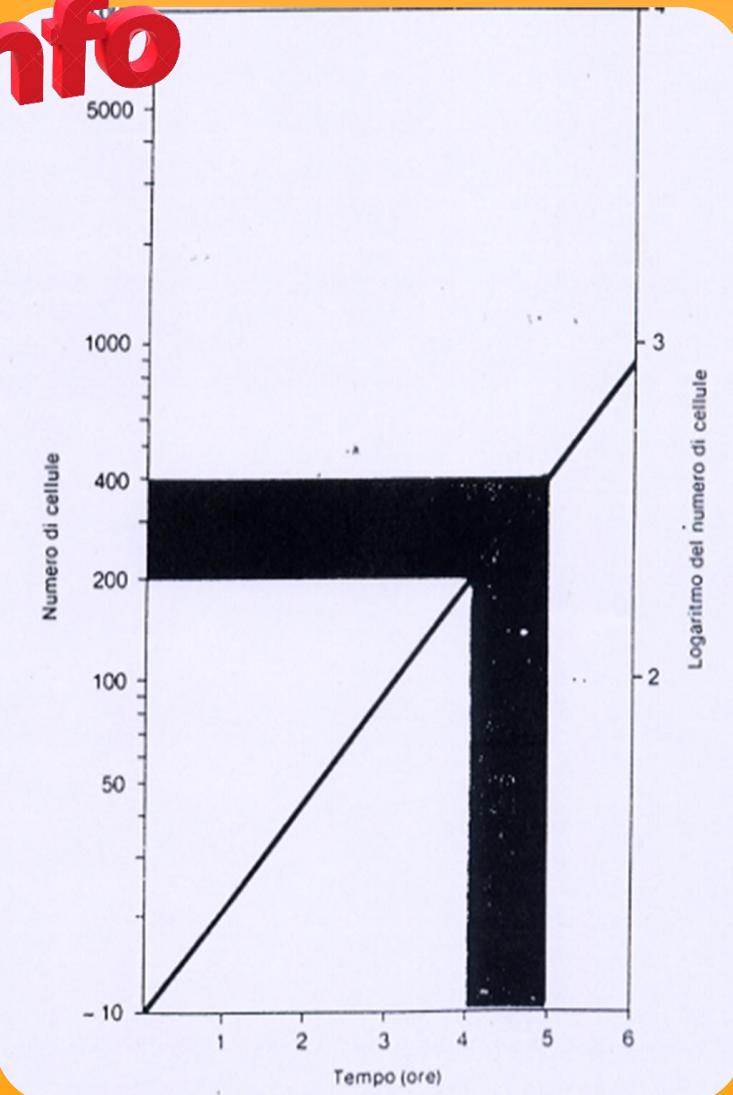
Per sapere se i batteri sono vivi bisogna contare le UFC (unità formanti colonia) vedi più avanti

# 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

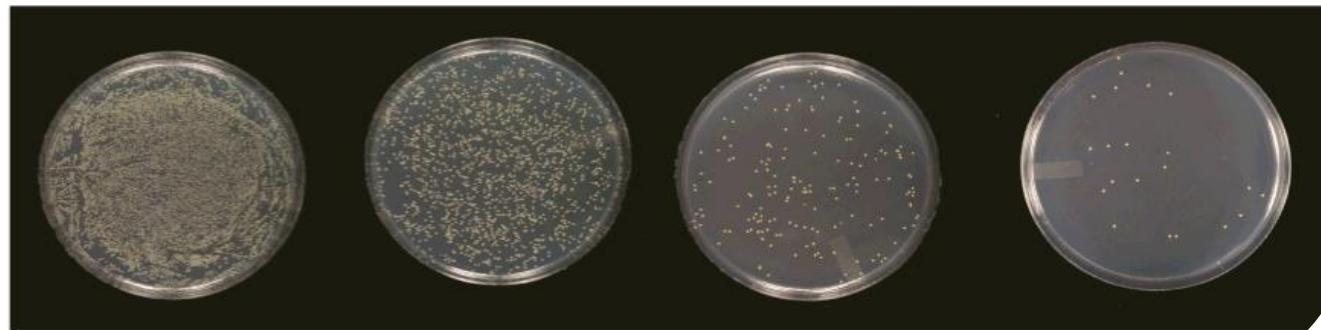
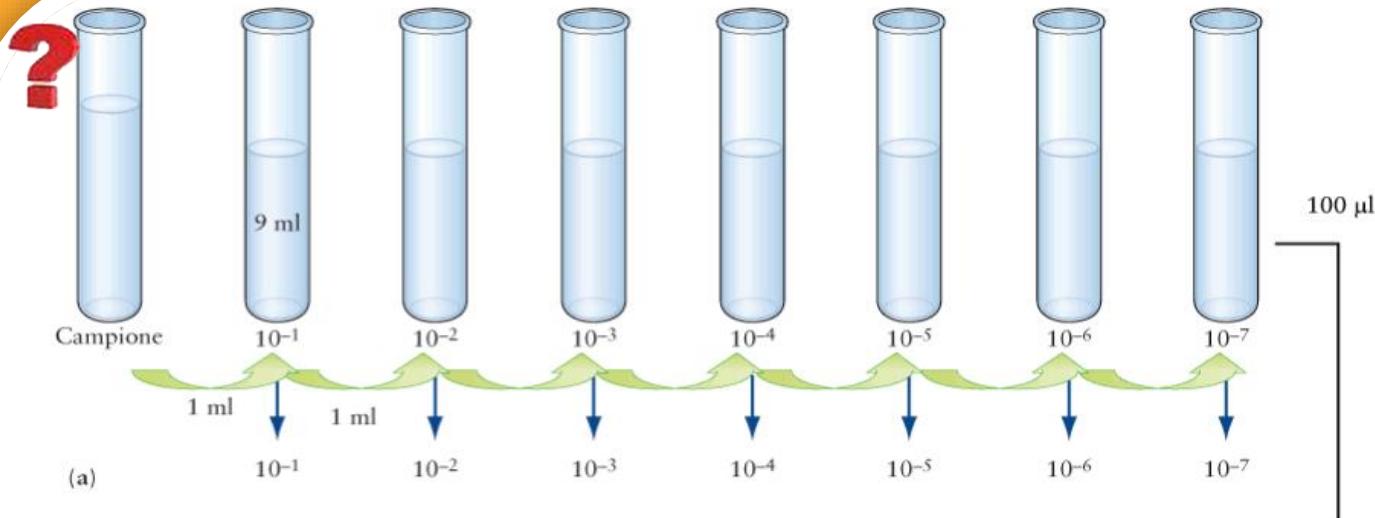
colony forming units



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

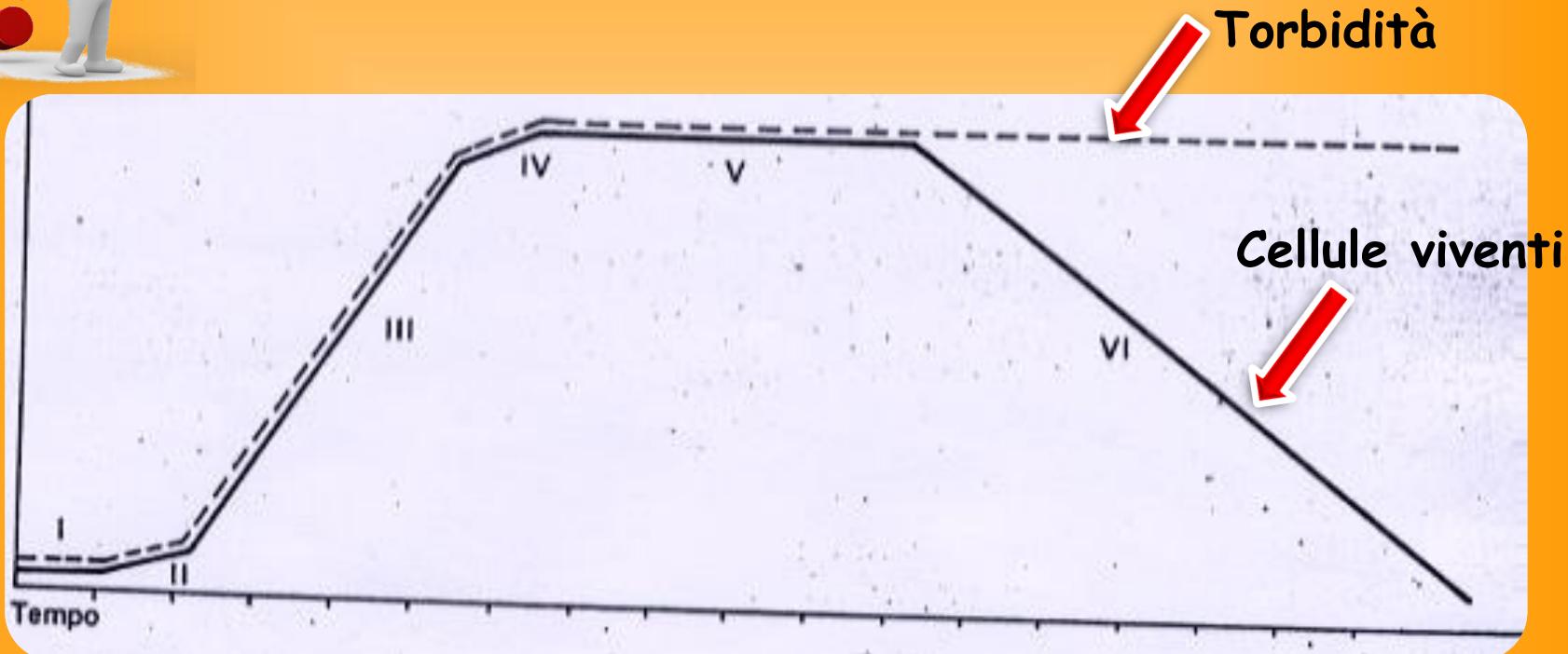
# CONTA DELLE U.F.C



# CURVA DI CRESCITA



Torbidità = cell vive + cell morte (massa)

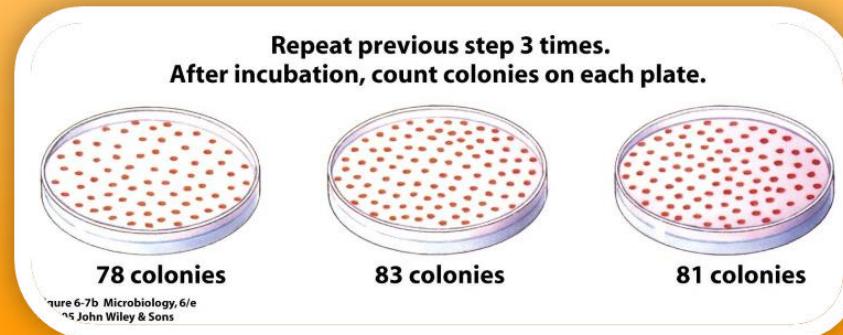


- 1: fase di latenza "lag" 2 fase di accelerazione
- 3: fase logaritmica 4 fase di decelerazione
- 5: fase stazionaria o di "plateau"
- 6: fase di declino o morte

# 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 culturale ( $T_0$ ). Incubare in termostato a  $37^\circ\text{C}$  per 18-24 h. Al  $T_0$  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

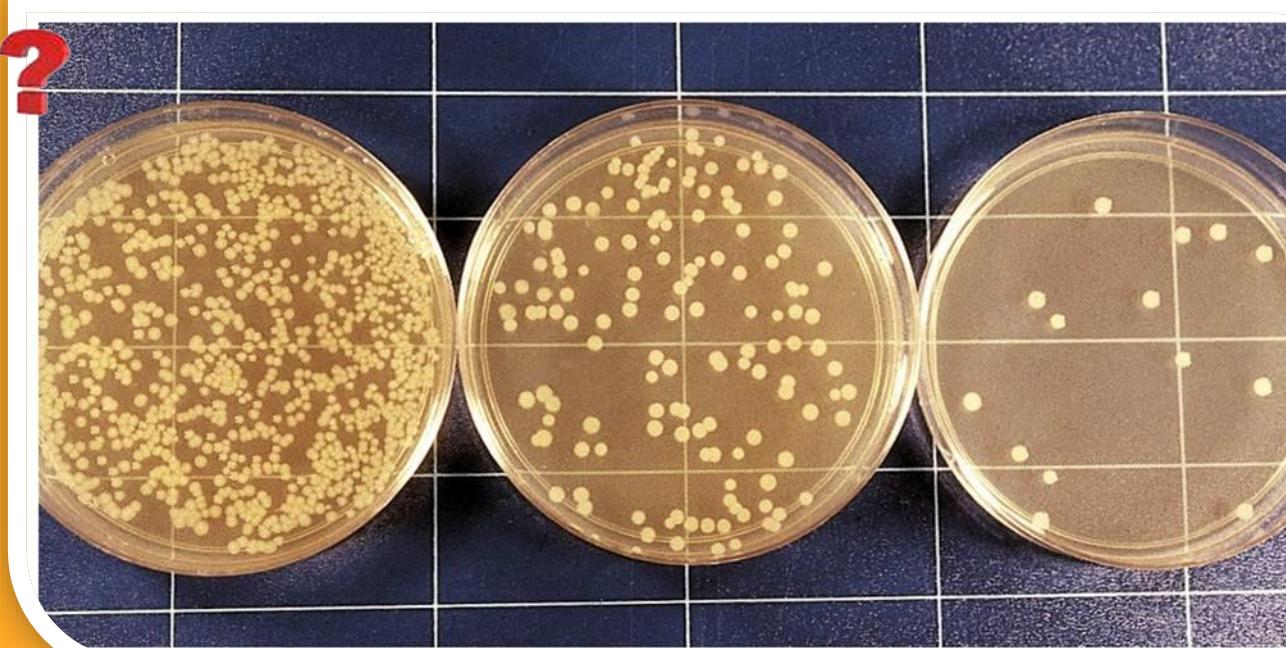


Figure 6-8c Microbiology, 6/e  
© 2005 John Wiley & Sons



## 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)**.



### 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.

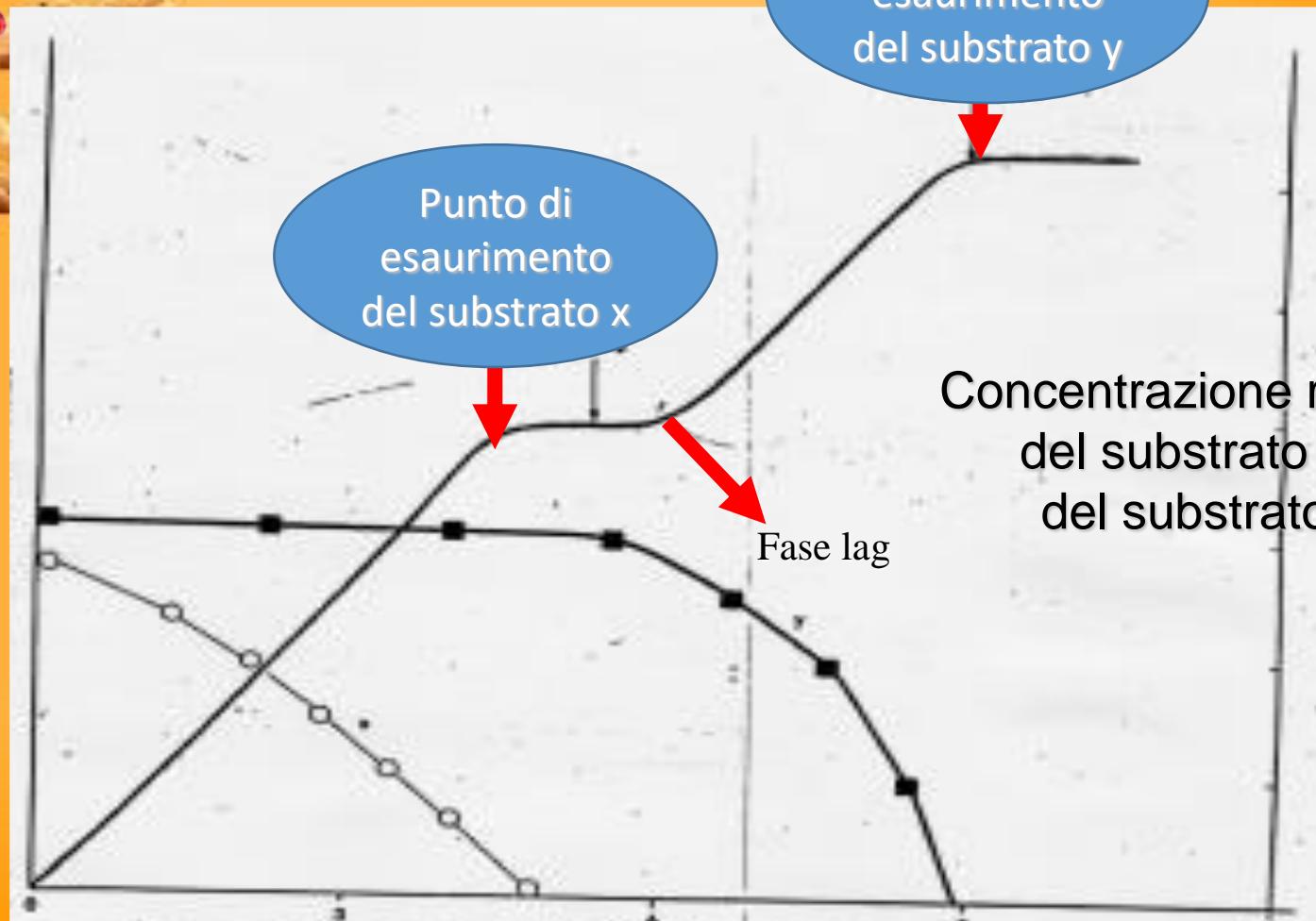
La *curva di crescita* in questi casi si presenta diversa da quella costruita sulla base delle indagini di laboratorio e si parla di **CURVA DIAUXICA**.

# CRESCITA BATTERICA

## CURVA DIAUXICA



Densità ottica della coltura



Punto di esaurimento del substrato y

Punto di esaurimento del substrato x

Concentrazione relativa del substrato x e del substrato y

Fase lag



*Per qualunque domanda o problema  
puoi contattarmi al*

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