

## La scissione binaria

Come tutte le cellule anche quelle batteriche crescono e si duplicano. Il meccanismo di replicazione più noto tra i batteri è quello della **scissione binaria**. Si parte da una **cellula madre** che dividendosi (da qui il termine “scissione”) darà origine a **due cellule figlie** (ecco perché “binaria”). Al termine del ciclo vitale di ogni cellula batterica si ottengono, dunque, due nuove cellule figlie che avranno ereditato il materiale genetico e tutti gli altri componenti dalla madre.

Per capire meglio come avviene focalizziamo l’attenzione sulla figura 1.

Prima di dividersi, la cellula madre cresce in termini di dimensioni e di numero dei suoi componenti. Il **DNA**, localizzato su un singolo cromosoma circolare, inizia a replicarsi a partire dal punto chiamato “**origine di replicazione**” che risulta praticamente attaccato allo strato interno della membrana cellulare.

La replicazione si muove in entrambe le direzioni fino a quando l’intero cromosoma non è stato interamente duplicato (in fig. 1 è raffigurato con il doppio cerchio verde all’interno della cellula madre in crescita). La cellula madre così ingrandita tende a restringersi verso il centro fino a formare due cellule figlie.

## Il divisoma

Ogni cellula figlia riceve una copia del DNA della madre e una divisione del citoplasma (processo noto come citochinesi). A dirigere il tutto è una **proteina** chiamata **FtsZ** le cui tante subunità si legano tra loro a formare una catena di lunghi filamenti. Questi si assemblano, grazie all’azione della proteina FtsA, su una struttura ad anello a forma di Z (da qui il nome) che risulta ancorata alla membrana citoplasmatica (Fig. 2). Il complesso proteico così formato prende il nome di **divisoma** e ha il compito di produrre uno strato di peptidoglicano proprio al centro della cellula madre dividendola in due parti. Il divisoma, infatti, mette a disposizione lo strato di peptidoglicano necessario alla formazione della parete di entrambe le cellule figlie. Tale strato prende il nome di **setto** e rappresenta il punto in cui la cellula madre si scinde in due cellule figlie.

A questo punto sappiamo che una cellula batterica madre si duplica tramite scissione binaria originando due cellule figlie. Questo è, dunque, il risultato di una singola generazione.

Quanto tempo impiega ogni cellula madre per duplicarsi? Scopriamolo nel prossimo paragrafo.

## Il tempo di generazione

**Definizione:** nei procarioti, il tempo di generazione è il tempo necessario alla popolazione per raddoppiare di numero attraverso un ciclo di scissione binaria.

In termini più semplici, il tempo che una cellula madre impiega per dividersi in due cellule figlie è chiamato tempo di generazione. Ecco perché viene definito anche tempo di raddoppiamento. In condizioni ottimali di crescita, una cellula di *Escherichia coli* (il batterio standard più usato nei laboratori sperimentali) impiega circa 20 minuti per dividersi in due cellule figlie. Questo esempio serve solo per semplificare il concetto perché, in realtà, la microbiologia studia i tempi di generazione di un'intera popolazione e non di una singola cellula.

Inoltre, è bene precisare che il tempo di generazione dei batteri varia a seconda della specie e/o delle condizioni in cui le cellule si trovano. Le stesse cellule di *Escherichia coli* che in condizioni normali impiegano 20 minuti per duplicarsi, in condizioni non ottimali impiegheranno molto più tempo.

## Come si calcola il numero di cellule in una popolazione batterica?

A partire da una cellula madre, che dopo ogni tempo di generazione si divide in due cellule figlie, possiamo ottenere 8 cellule figlie dopo 3 tempi di generazione. Nel caso di un basso numero di tempi di generazione il calcolo è molto semplice. Tuttavia sappiamo che i batteri impiegano pochissimo tempo per duplicarsi quindi calcolare il numero di cellule dopo ore e ore di crescita diventa complicato. La matematica ci viene in aiuto con una semplicissima formula considerando che il numero delle cellule aumenta in maniera esponenziale:

$$N_n = N_0 2^n$$

- $N_n$  il numero di cellule ad ogni tempo  $n$
- il numero di cellule al tempo iniziale è sempre 1 ( $N_0$ )
- $n$  è il numero delle generazioni;

Ancora un esempio per chiarirci meglio le idee.

Se una cellula batterica si divide ogni 30 minuti e vogliamo sapere quante cellule si generano dopo 24 ore, quindi dopo 48 divisioni, possiamo fare il seguente calcolo:

$$N_n = 1 \text{ (cellula batterica iniziale)} \times 2^{48} = 281.474.976.710.656 \text{ cellule}$$

Il numero totale di cellule figlie ottenute dopo 24 ore a partire da una cellula madre che si divide ogni 30 minuti è pari a 281.474.976.710.656.

A questo punto sorge spontaneo chiedersi: ma le cellule batteriche si dividono all'infinito? E ancora, esiste un modo per contare un numero così alto di cellule? Le risposte nei prossimi paragrafi.

### La curva di crescita

La cellula batterica continua a dividersi fino a quando dispone dei nutrienti necessari e le sostanze tossiche prodotte dal catabolismo non raggiungono livelli di accumulo tali da comprometterne la sopravvivenza. La cinetica della divisione cellulare viene descritta dalla curva di crescita che si ottiene coltivando le cellule in un terreno liquido e misurandone la concentrazione nel tempo. Infatti, la curva di crescita misura la variazione della quantità di batteri in un intervallo di tempo. La sua rappresentazione grafica è semilogaritmica ed è divisa in 4 fasi distinte e sequenziali (Fig. 3). Il logaritmo fa riferimento alla concentrazione cellulare espressa come CFU/mL (CFU sta per unità formanti colonie) in funzione del tempo.

La curva si compone di quattro fasi:

1. latenza
2. esponenziale
3. stazionaria
4. morte

### La fase di latenza o fase lag

Inizialmente, ogni coltura batterica contiene un piccolo numero di cellule che sono quelle che vengono aggiunte al terreno di coltura fresco e che nel loro insieme prendono il nome di inoculo.

Questa fase iniziale della curva è chiamata **fase di latenza**, o fase lag (numero 1, fig. 3), e descrive il momento in cui le cellule si adattano al mezzo in cui dovranno crescere. In questa fase, il numero delle cellule non cambia ma aumentano in termini di dimensioni e sono metabolicamente attive. Infatti, si verifica la sintesi di enzimi e di nuovi componenti strutturali. Questa fase ha una durata che varia a seconda della specie, delle condizioni cellulari, del numero di cellule usate per l'inoculo e in alcuni casi può essere assente. Se le condizioni di crescita sono particolarmente favorevoli, infatti, le cellule non hanno bisogno di adattarsi al mezzo di coltura e iniziano a dividersi immediatamente.

### La fase esponenziale o fase log

È la fase in cui le cellule si dividono tramite scissione binaria aumentando di numero in maniera esponenziale (da qui il nome). Il tempo di generazione impiegato dalle cellule in questa fase è determinato dalla genetica della specie batterica ed è chiamato tasso di crescita intrinseco. Questo valore rimane costante ed è supportato da un'uniforme attività metabolica. Grazie a questi aspetti, la fase esponenziale della crescita batterica trova numerose applicazioni in campo industriale e nei laboratori di ricerca. Questa è anche la fase in cui i batteri mostrano una maggiore sensibilità all'azione dei disinfettanti e degli antibiotici (numero 2, fig. 3).

### La fase stazionaria

È la fase in cui le cellule raggiungono il limite massimo di crescita (*plateau*) determinato dal graduale esaurimento dei nutrienti e accumulo dei prodotti di scarto (numero 3, fig. 3). Infatti, man mano che le cellule crescono, tendono a consumare i nutrienti del terreno e a rilasciare i cataboliti prodotti dal loro metabolismo. Nel complesso, questi fattori rallentano il tasso di divisione cellulare fino a bloccare la crescita dell'intera popolazione. La fase è definita **stazionaria** perché il numero delle cellule che si creano è uguale a quello delle cellule che muoiono quindi la popolazione batterica permane ad un livello "stagnante".

Durante la fase stazionaria, le cellule sono meno suscettibili agli antibiotici perché il metabolismo cellulare rallenta e di conseguenza anche la sintesi proteica, quella del peptidoglicano e di tutti gli altri processi su cui gli antibiotici generalmente agiscono.

### La fase di declino o di morte

Quando il terreno di coltura diventa privo di nutrienti e accumula rifiuti tossici non consente alle cellule di sopravvivere e iniziano a morire (numero 4, fig. 3). Poco a poco, le cellule morte superano quelle in divisione riducendo quelle vive e la fase prende il nome di fase di declino o di morte.

Alcune cellule possono andare incontro a lisi e rilasciare nutrienti utili per quelle poche cellule sopravvissute fornendo loro la possibilità di generare endospore. Poche cellule, definite "persistenti", mantengono un tasso metabolico molto basso e sono particolarmente coinvolte nelle infezioni croniche.

### Crescita in continuo

Esiste un metodo per "mantenere" le cellule nella fase esponenziale che, come accennato, trova impiego in diversi campi industriali. Lo strumento che permette ai

nutrienti di non esaurirsi e agli scarti di non accumularsi si chiama **chemostato**. Al suo interno, la coltura batterica viene mantenuta in continua crescita proprio grazie al sistema che permette, simultaneamente, di aggiungere i nutrienti necessari e di eliminare le sostanze tossiche prodotte. Al fine di mantenere una crescita ottimale, la coltura batterica viene rimossa alla stessa velocità con cui si aggiungono i nutrienti.

### **Quali sono le tecniche per determinare il numero di una popolazione batterica?**

Sapere quante cellule sono presenti in una popolazione batterica è di estrema importanza sia in campo clinico per stimare la gravità di un'infezione sia in altri settori come, ad esempio, quello alimentare per valutare la qualità di un prodotto. A tal proposito, la microbiologia ha sviluppato diverse tecniche per "contare" le cellule presenti in una popolazione batterica e possono essere suddivise in due approcci:

#### **1) Conta diretta cellulare**

- Conteggio in camera contaglobuli
- Contatori elettronici
- Membrane filtranti

#### **2) Conta vitale cellulare**

- Metodo della semina su terreno agarizzato
- Membrane filtranti

#### **Conta diretta cellulare**

##### ***Conteggio in camera contaglobuli***

Implica il trasferimento di un volume noto di coltura batterica sul vetrino di Petroff-Hausser (simile a un emocitometro usato per contare i globuli rossi) e suddiviso in diversi quadrati. Il vetrino viene osservato al microscopio ottico e si contano le cellule presenti in ogni quadrato per poi fare una media aritmetica dei valori ottenuti. Questo metodo è molto semplice e veloce ma ha una scarsa sensibilità e non fornisce informazioni sulla vitalità cellulare.

Per ovviare, è possibile sfruttare le tecniche di colorazione a fluorescenza che distinguono le cellule vitali (fluorescenza verde) da quelle morte (fluorescenza rossa).

Spieghiamo brevemente come funziona considerando la figura 4:

- il colorante primario, che emette fluorescenza verde, può penetrare la membrana citoplasmatica intatta colorando sia le cellule vive che quelle morte;
- il colorante secondario, che emette fluorescenza rossa, colora solo le cellule con la membrana danneggiata;

Quindi, le cellule “rosse” sono morte e sottraendole al numero totale delle cellule colorate è possibile calcolare la vitalità cellulare dell'intera popolazione.

### ***Contatori elettronici***

Un'altra tecnica largamente utilizzata è quella basata sull'uso di contatori elettronici che determinano e contano i cambiamenti della resistenza elettrica in una soluzione salina. La coltura batterica viene fatta passare attraverso le piccole aperture di un tubo di vetro dove subisce l'azione della corrente elettrica. Il passaggio delle cellule batteriche cambia la resistenza misurata tra due elettrodi e un sensore registra questa variazione. Ogni variazione corrisponde al passaggio di una cellula e non consente di distinguere le cellule vive da quelle morte.

### ***Membrane filtranti***

Si tratta di membrane di cellulosa che durante la filtrazione trattengono i batteri contenuti nel mezzo filtrato. I batteri restano intrappolati sulla superficie della membrana e sfruttano i nutrienti di cui le membrane si sono imbevute durante il passaggio del mezzo di coltura. Dopo un periodo di incubazione opportuno delle membrane, è possibile osservare lo sviluppo delle colonie batteriche e procedere con la loro conta. Questo metodo è utilizzato, in particolare, per filtrare le acque ambientali.

### **Conta vitale cellulare**

#### ***Conta cellulare su terreno solido (agarizzato)***

È il conteggio delle cellule vitali su una piastra contenente terreno solido, cioè terreno liquido a cui è stato aggiunto l'agar che ne consente la solidificazione a temperature al di sotto dei 30-40°C. Il principio su cui si basa è quello della replicazione delle cellule (vive) che danno origine a colonie dopo incubazione. Il numero delle colonie è espresso in CFU/mL perché più di una cellula può trovarsi nel punto in cui è comparsa la singola colonia. Infatti, non è detto che una singola colonia corrisponda a una singola cellula batterica.

## Procedimento

- *Piastramento in superficie*: il campione si distribuisce con un'ansa sterile sulla superficie della piastra che viene incubata per un tempo e ad una temperatura ottimali per il tipo di campione analizzato.
- *Piastramento per inclusione*: il campione viene depositato su una piastra sterile vuota a cui si aggiunge, successivamente, il terreno che a questo punto andrà ad includere il campione e si procede con l'incubazione.

Entrambi i metodi iniziano con diluizioni seriali (o decimali) del campione in modo da diluire il numero di batteri presenti al suo interno e semplificare i calcoli della conta. I microbiologi contano solo le piastre contenenti un numero di colonie compreso tra 30 e 300 CFU.

### Facciamo un esempio:

1 mL del campione iniziale viene diluito 100.000 volte attraverso 5 diluizioni decimali. Da ogni diluizione viene prelevato e piastrato 1 mL ottenendo piastre con un numero decrescente di colonie. Le piastre corrispondenti alle diluizioni 1:10, 1:100, 1:1000 contengono un numero superiore a 300 CFU e non possono essere considerate per la conta così come quella corrispondente alla diluizione 1:100.000 che contiene solo 2 colonie. La piastra da considerare è, invece, quella corrispondente alla diluizione 1:10.000 che riporta 50 colonie. Queste 50 colonie sono quelle presenti in 1 mL del campione diluito 10.000 volte. Come ricavare il numero di cellule presenti nel campione originale quindi non diluito?

Il numero di CFU per ml è pari a 50 (colonie contate)  $\times$  (10.000), (fattore di diluizione del campione originale) = 500.000. La stima dei batteri nella cultura è di 500 mila cellule/mL.

**Attenzione:** I nostri PDF a volte non contengono tutto il materiale presente nell'articolo originale o potrebbero non essere aggiornati.

**Articolo completo:** <https://www.biopills.net/articoli/ripassiamo-aiuto-studio/microbiologia/la-divisione-cellulare-e-la-curva-di-crescita-dei-procarioti/>