

NUTRIZIONE E TERRENI COLTURALI



a.a. 2022-2023



Materiale didattico
Riproduzione vietata senza espressa
autorizzazione del docente

Prof.ssa Annalisa Serio
Facoltà di Bioscienze
UNITE



I terreni culturali

“Insieme di sostanze nutritive che permettono la crescita *in vitro* di una o più specie microbiche”.

I microrganismi che crescono sulla superficie o all'interno di un terreno culturale sono denominati **culture**. La coltivazione dei batteri è possibile soltanto se si utilizzano terreni culturali adeguati.

La scelta del terreno dipende dai fabbisogni nutritivi della specie da coltivare e dagli obiettivi (es. isolamento, arricchimento, identificazione).

Composizione elementare della cellula microbica

Elemento	Peso secco	Elemento	Peso secco
Carbonio	50%	Potassio	1%
Ossigeno	20%	Sodio	1%
Azoto	14%	Calcio	0,5%
Idrogeno	8%	Magnesio	0,5%
Fosforo	3%	Cloro	0,5%
Zolfo	1%	Ferro	0,2%

Gli elementi essenziali:

Idrogeno

Ossigeno

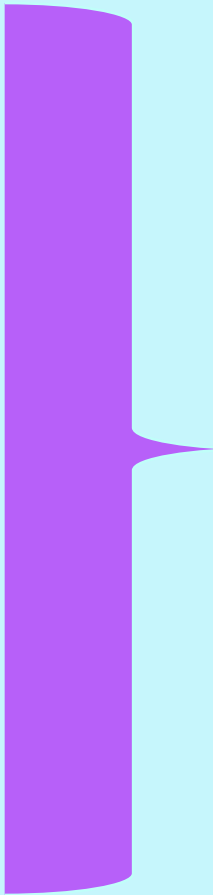
Carbonio

Azoto

Fosforo

Zolfo

Selenio



**Acqua = 80-90% della cellula
Proteine (55% del peso secco),
acidi nucleici (24%), lipidi,
polisaccaridi**

I fattori nutritivi

Carbonio:

dopo l'acqua, è il più importante componente della cellula batterica (1/2 del peso secco della cellula).

Chemoeterotrofi: ricavano carbonio da materiale organico

Chemoautotrofi e fotoautotrofi: ricavano carbonio da CO₂

Categorie nutrizionali

Fonte di energia

- **Luce** \Rightarrow **Fototrofi**
- **Sostanze chimiche organiche o inorganiche** \Rightarrow **Chemiotrofi**
(chemioorganotrofi o chemiolitotrofi)

Fonte di carbonio

- **Inorganico** \Rightarrow **Autotrofi**
- **Organico** \Rightarrow **Eterotrofi**

Classificazione dei microrganismi in funzione delle fonti di carbonio e di energia: i gruppi nutrizionali

Fonte di C: autotrofi (CO₂), eterotrofi (C organico)

Fonte di energia: fototrofi (luce solare), chemiotrofi (ossidazione di composti chimici)

Tipo	Fonte di energia	Fonte di carbonio	Microrganismi
FOTOAUTOTROFI	Luce	CO ₂	Alghie verdi-blu Batteri fotosintetici
FOTOETEROTROFI	Luce	Composti organici	Batteri rossi non sulfurei, fotosintetici
CHEMIOAUTOTROFI*	Composti inorganici	CO ₂	Solfo-, ferro-, ammonio-batteri; numerosi tipi di batteri metano-produttori
CHEMIOETEROTROFI*	Composti organici	Composti organici	Protozoi, funghi, la maggior parte dei batteri (tutti i batteri di interesse medico)

* I chemioeterotrofi usano di solito gli stessi composti per ottenere sia carbonio sia energia.

* detti anche CHEMIOLITOTROFI AUTOTROFI poiché ricavano energia dall'ossidazione di composti inorganici (NH₄⁺, NO₂⁻, H₂S, ecc.)

I fattori nutritivi

Azoto, zolfo e fosforo:

Sintesi proteica: richiede grandi quantità di azoto, nonché zolfo.

Sintesi di acidi nucleici e di ATP: richiede azoto e fosforo.

Azoto = 13-14% peso secco della cellula.

Fosforo + Zolfo = 4% peso secco della cellula.

I fattori nutritivi

Fonti di azoto:

- ① **Gruppo amminico** (catabolismo delle proteine)
- ② **Ione ammonio NH_4^+** (materiali organici cellulari)
- ③ **Nitrati** (liberano in soluzione lo ione nitrato NO_3^-)
- ④ **Azoto gassoso N_2** (es. cianobatteri: fissazione dell' azoto)

I fattori nutritivi

Fonti di zolfo:

- ① **Aminoacidi solforati** (catabolismo delle proteine)
- ② **Ione solfato SO_4^{2-}** (materiali organici cellulari)
- ③ **Idrogeno solforato H_2S**

Fonti di fosforo:

- ① **Ione fosfato PO_4^{3-}** (materiali organici cellulari)

I fattori nutritivi

I batteri hanno inoltre bisogno di:

Potassio, magnesio, calcio e ferro (spesso cofattori di enzimi)

Elementi traccia (necessari in quantità minime): molibdeno, rame, cobalto e zinco (spesso cofattori di enzimi)

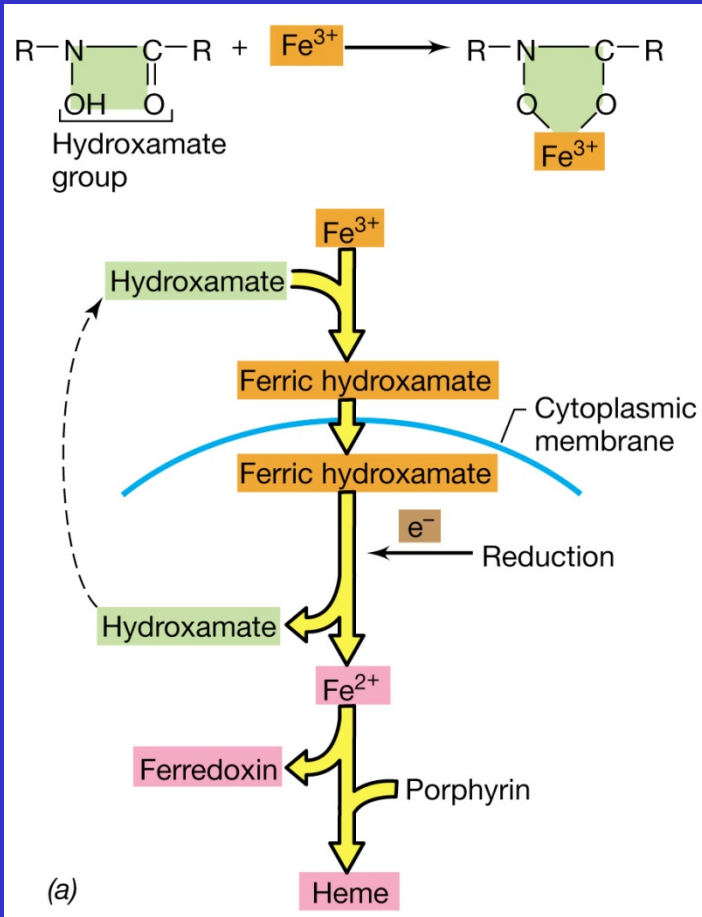
Funzioni fisiologiche generali dei macronutrienti (1)

- **Carbonio:** costituente dei materiali organici della cellula
- **Ossigeno:** costituente dell'acqua cellulare e del materiale organico della cellula; accettore di elettroni nella respirazione aerobia
- **Azoto:** costituente di proteine, acidi nucleici e coenzimi
- **Idrogeno:** costituente dell'acqua cellulare e del materiale organico della cellula
- **Fosforo:** costituente di acidi nucleici, fosfolipidi, coenzimi, ATP
- **Zolfo:** costituente di proteine (aminoacidi cisteina e metionina) e coenzimi (CoA e cocarbossilasi)

Funzioni fisiologiche generali dei macronutrienti (2)

- **Potassio:** uno dei principali cationi inorganici della cellula, cofattore per alcuni enzimi
- **Calcio:** importante catione cellulare; cofattore per alcuni enzimi (es. proteasi); stabilizza la parete cellulare.
- **Magnesio:** importante catione cellulare; cofattore inorganico per moltissime reazioni enzimatiche; funzioni nel legare gli enzimi ai substrati; costituente delle clorofille; stabilizza membrane e ribosomi.
- **Sodio:** regolazione pressione osmotica; attivazione alcuni enzimi e meccanismi di trasporto.
- **Ferro:** costituente dei citocromi e di altre proteine eme e non eme; cofattore per diversi enzimi

Il Fe si trova come Fe^{3+} in minerali insolubili



I siderofori legano Fe^{3+} e lo trasportano nella cellula.

Esistono numerosi tipi di siderofori nella cellula

Funzioni fisiologiche generali dei micronutrienti

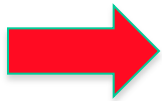
- **Cobalto:** costituente della vitamina B12 e dei coenzimi da essa derivati.
- **Rame, zinco, nichel, manganese, molibdeno, vanadio, selenio:** costituenti inorganici di particolari enzimi.

Micronutrienti: aggiunti in piccolissime quantità ai terreni di coltura. Normalmente presenti in tracce in alcuni componenti impiegati nei terreni (estratto di lievito, peptoni, ecc.)



Fattori di sviluppo o di crescita

- Aminoacidi (essenziali e stimolanti)
- Basi azotate (purine e pirimidine)
- Vitamine (es. B₁, B₆, B₁₂)



La formulazione dei terreni colturali si basa sulla composizione chimica della cellula!

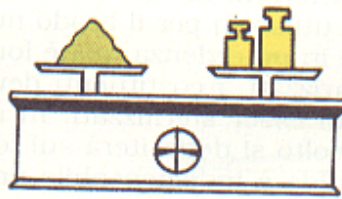
Gli ingredienti dei terreni colturali: **(macronutrienti e micronutrienti)**

- ① Fonti di azoto:** proteine, peptidi, aminoacidi, N inorganico;
- ② Sostanze energetiche (fonti di carbonio):** glucidi;
- ③ Metalli e minerali essenziali:** Ca, Mg, Fe, P, metalli in tracce, ecc.;
- ④ Tamponi:** fosfati, acetati, ecc.;
- ⑤ Indicatori (di variazione di pH):** rosso fenolo, porpora di bromocresolo, ecc.;
- ⑥ Agenti selettivi:** agenti antimicrobici, ecc.;
- ⑦ Gelificanti:** generalmente agar.

- Il fabbisogno in **zolfo** viene generalmente soddisfatto con l'aggiunta di solfati. Molti peptoni costituiscono una buona fonte di zolfo organico.
- Il fabbisogno in **fosforo** viene soddisfatto con l'aggiunta di fosfati di sodio o di potassio, che hanno un'importante funzione nel tamponare il pH del mezzo di coltura.
- Altri **macroelementi** (K, Ca, Mg) e **microelementi** (Mn, Zn...) possono essere aggiunti direttamente nelle concentrazioni necessarie come sali o indirettamente come impurezze in composti organici complessi (peptone, estratto di lievito, etc...).
- Fattori di crescita organici, come **vitamine e basi azotate**, possono essere aggiunti direttamente in terreni sintetici o sostituiti con estratti complessi, come estratto di lievito, nei terreni complessi.

Preparazione dei terreni culturali

- ① Preparazione della miscela (ricostituzione dei terreni disidratati)**
- ② Aggiustamento del pH**
- ③ Sterilizzazione in autoclave (121° C a 1 atm per 15-30 min)**
- ④ Eventuale aggiunta di ingredienti termolabili**



1
pesatura
ingredienti

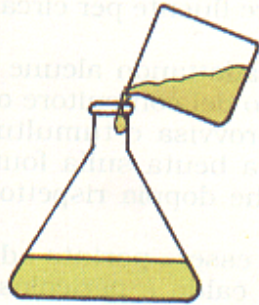
2
scioglimento
in H₂O dist.
a caldo



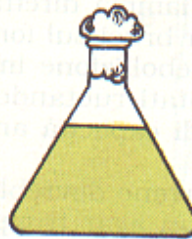
pH
≈ 50 °C



3
misurazione pH



4
travasato
in matraccio



5
chiusura
con cotone
idrofobo

6 1 atm



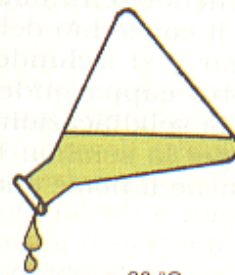
121 °C



20'

sterilizzazione in
autoclave

distribuzione
in piastre
o provette sterili



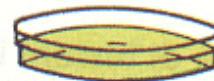
≈ 80 °C



7



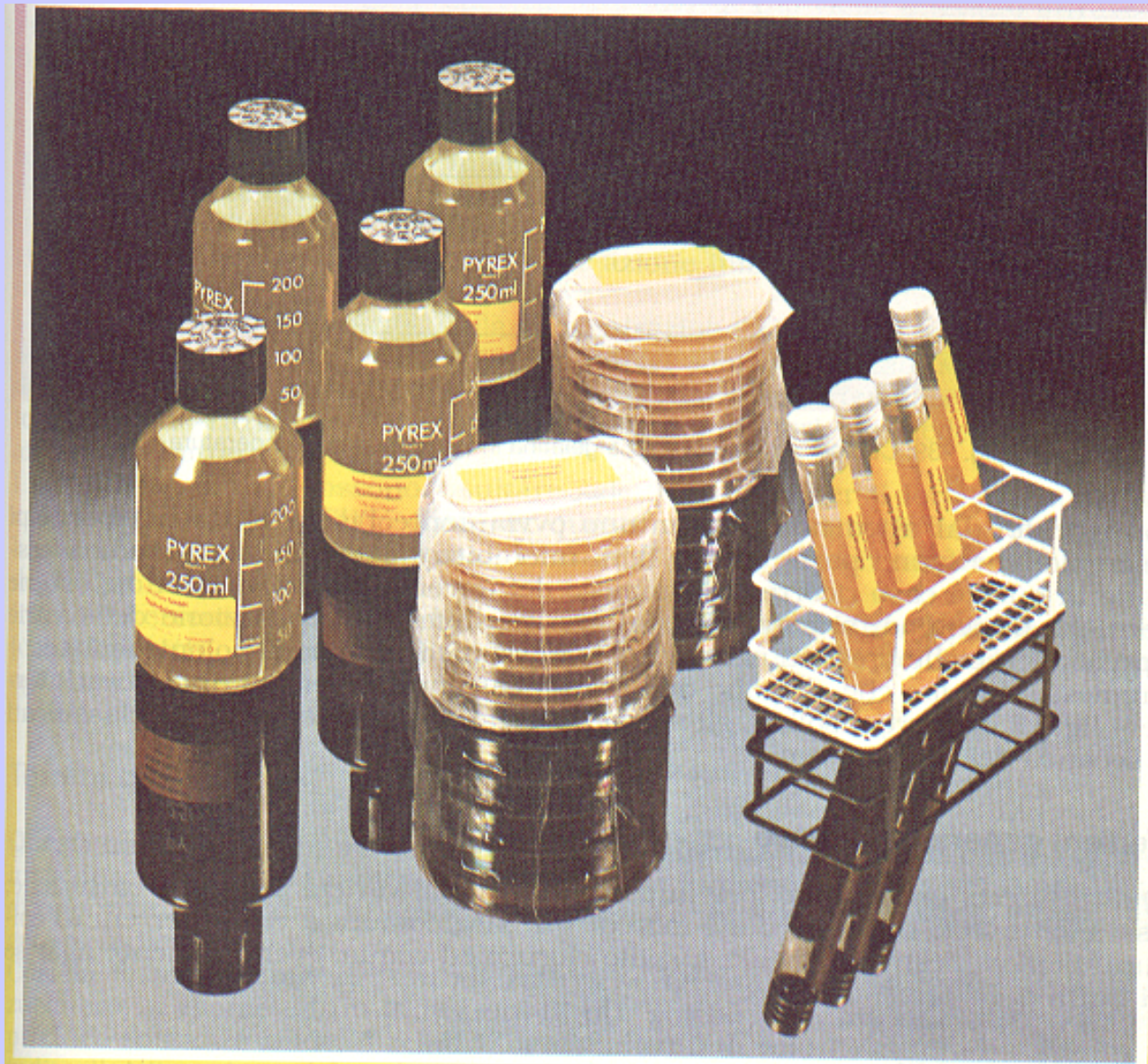
8



≈ + 4 °C

conservazione
in frigorifero





PROPRIETA' DELL' AGAR NUTRITIVO

- ① agente solidificante**
- ② inerte ed atossico per i batteri**
- ③ a conc. 1,5 – 2 % la superficie è sufficientemente umida per la crescita microbica ma abbastanza asciutta per mantenere le colonie separate**
- ④ solidifica a 38° C e fonde a 84° C**
- ⑤ la sua struttura (gel) ostacola il movimento dei batteri ma consente la diffusione delle sostanze nutritive**

CLASSIFICAZIONE TERRENO DI COLTURA:

- 1. Stato fisico:**
 - solido (1.5-2.0% agar)
 - liquido
 - semisolido (0.3-0.5% agar)

- 2. Composizione:**
 - empirico (chimicamente indefinito)
 - sintetico (chimicamente definito)
 - complesso (semisintetico)

3. Funzione:
- **isolamento** per isolare da campioni
 - **mantenimento** per mantenere colture pure
 - **arricchimento** favorisce la crescita di alcune specie esigenti
 - **selettivo** favorisce la crescita di alcune specie, inibendo altre, mediante incubazione con nutrienti (es. unica fonte di C) o mediante antimicrobiche
 - **differenziale** permette di distinguere le diverse specie microbiche mediante opportuni rivelatori di caratteristiche biochimiche (es. indicatori, coloranti, ecc)

in particolare **TERRENI CROMOGENICI!**

particolari
sostanze



Terreni empirici

Sono generalmente costituiti da miscele nutritive naturali, la cui composizione non è né costante né riproducibile.

Esempi: brodo nutritivo, estratto di carne, estratto di lievito.

Possono essere sufficientemente ricchi e completi da consentire la crescita di molte specie microbiche.

Sono stati i primi terreni colturali utilizzati in batteriologia.

Terreni sintetici

Sono costituiti da miscele di sostanze chimiche note, la cui composizione è costante e riproducibile.

Esempi: BG-11 per cianobatteri, Cary-Blair Medium (terreno di trasporto per anaerobi e Gram -).

Possono avere una composizione semplice (unica fonte di C) oppure numerosi ingredienti, a seconda delle esigenze nutritive dei microrganismi che devono essere coltivati.

Sono usati soprattutto per la coltivazione di autotrofi e nella ricerca (dove sono desiderabili condizioni sperimentali definite e riproducibili).

Esempi di terreni sintetici (o definiti)

BG11 Terreno per cianobatteri (fotoautotrofi)

- NaNO_3 (fonte di azoto) 1,5 (g/l)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,04 (“)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 (“)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,036 (“)
- Acido citrico 0,006 (“)
- Citrato ferrico di ammonio 0,006 (“)
- EDTA (sale Na_2Mg) 0,001 (“)
- Na_2CO_3 (fonte di carbonio) 0,02 (“)
- Soluzione con tracce di metallo 1 (ml/l)
- pH 7,4

Terreno per *Escherichia coli* (chemioorganotrofi)

- Glucosio (fonte di carbonio e energia) 1,0 (g/l)
- Na_2HPO_4 16,4 (“)
- KH_2PO_4 1,5 (“)
- $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (fonte di azoto) 2,0 (“)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 (“)
- CaCl_2 0,01 (“)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 (“)
- pH 6,8 - 7,0

Terreno per *Leuconostoc mesenteroides* (chemioeterotrofi)

Acqua	1 litro		
Glucosio (fonte di carbonio e energia)	25 g		
NH ₄ Cl (fonte di azoto)	3 g		
MINERALI			
KH ₂ PO ₄	600 mg	Fe SO ₄ 7 H ₂ O	10 mg
K ₂ HPO ₄	600 mg	MnSO ₄ 4H ₂ O	20 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg	NaCl	10 mg
ACIDI ORGANICI			
Sodio acetato	20 g		
AMINOACIDI			
DL- α -alanina	200 mg	L-lisina HCl	250 mg
L-arginina	242 mg	DL-metionina	100 mg
L-asparagina	400 mg	DL-fenilalanina	100 mg
L-acido aspartico	100 mg	L-prolina	100 mg
L-cisteina	50 mg	DL-serina	50 mg
L-acido glutammico	300 mg	DL-treonina	200 mg
Glicina	100 mg	DL-triptofano	40 mg
L-istidina HCl	62 mg	L-tirosina	100 mg
DL-isoleucina	250 mg	DL-valina	250 mg
DL-leucina	250 mg		
PURINE E PIRIMIDINE			
Adenina solfato H ₂ O	10 mg	Uracile	10 mg
Guanina HCl 2 H ₂ O	10 mg	Xantina HCl	10 mg
VITAMINE			
Tiamina HCl	0,5 mg	Riboflavina	0,5 mg
Piridossina HCl	1,0 mg	Acido nicotinico	1,0 mg
Piridossamina HCl	0,3 mg	Acido <i>p</i> -aminobenzoico	0,1 mg
Piridossale HCl	0,3 mg	Biotina	0,001 mg
Calcio pantotenato	0,5 mg	Acido folico	0,01 mg

Terreni semisintetici o complessi

Sono costituiti da terreni sintetici, addizionati con ingredienti la cui composizione chimica non è costante.

Differenti lotti di produzione possono presentare una composizione chimica leggermente diversa.

Esempi: brodo triptone soia (TSB), agar MacConkey.

Possono essere liquidi, agarizzati o (in particolari casi) solidificati con agenti diversi dall' agar (es. silicati).

Esempi di terreni complessi

Brodo nutritivo

- Estratto di carne (3 g/l) (fonte di carboidrati, proteine, sali, vitamine)
- Peptone (idrolizzato di carne, caseina, gelatina) (5 g/l) (fonte di azoto organico)
- NaCl (5 g/l)
- pH 7

TSB (Tryptic Soy Broth)

- Triptone (digerito pancreatico della caseina) (17 g/l)
- Peptone (digerito della farina di soia) (3 g/l)
- Glucosio (2,5 g/l)
- Cloruro di sodio (5 g/l)
- Fosfato dipotassico (2,5 g/l)
- pH 7

Esempio: Plate Count Agar Standard

Composizione (per 1000 ml terreno):

Estratto di lievito	2,5	g
Digerito pancreatico di caseina	5,0	g
Destrosio	1,0	g
Agar	15,0	g

Ingredienti dei terreni complessi

- ① **Peptoni:** idrolizzati proteici ottenuti mediante digestione proteolitica parziale da carne, caseina, soia, gelatina o da altra fonte proteica;
- ② **Estratto di carne:** estratto acquoso di carne bovina magra, ricco di aminoacidi, peptidi, nucleotidi, acidi organici, vitamine e minerali;
- ③ **Estratto di lievito:** estratto acquoso di lievito di birra, contenente numerose fonti di carbonio e di azoto e particolarmente ricco di vitamine del gruppo B.

Terreni semisintetici o complessi

La maggior parte dei batteri eterotrofi e dei miceti è ordinariamente coltivata su terreni complessi.

Tali terreni si usano inoltre quando le esigenze nutritive sono sconosciute oppure per batteri esigenti (“**fastidious**”), che possono anche richiedere terreni fortificati con sangue o siero (“**terreni arricchiti**”).

Terreni semisintetici o complessi

Esempi di terreni arricchiti (per batteri esigenti):

① **Agar sangue (BAP: sheep blood agar plate)**, composto da una base nutritiva (TSA) + 5% sangue ovino (in certi casi: equino, umano, di coniglio): molto usato in batteriologia clinica per la coltivazione di differenti microrganismi;

② **Agar cioccolato (CHOC)**, ottenuto modificando il terreno BAP, cioè riscaldando globuli rossi di ovino (in modo da liberare nutrienti) oppure aggiungendo particolari nutrienti: utilizzato per coltivare batteri particolarmente esigenti, come *Neisseria gonorrhoeae*.

L' agar sangue e la ricerca della emolisi

Molti batteri producono emolisine, sostanze in grado di danneggiare i globuli rossi dell' agar sangue (emolisi).

L' attività emolitica viene utilizzata per l' identificazione e la classificazione dei batteri. Le piastre devono essere esaminate attraverso luce trasmessa.

Il tipo di emolisi dipende anche dalla specie animale a cui appartengono i globuli rossi: es. *Gardnerella vaginalis* è beta-emolitica su globuli rossi umani e non emolitica su globuli rossi ovini.

L' agar sangue e la ricerca della emolisi

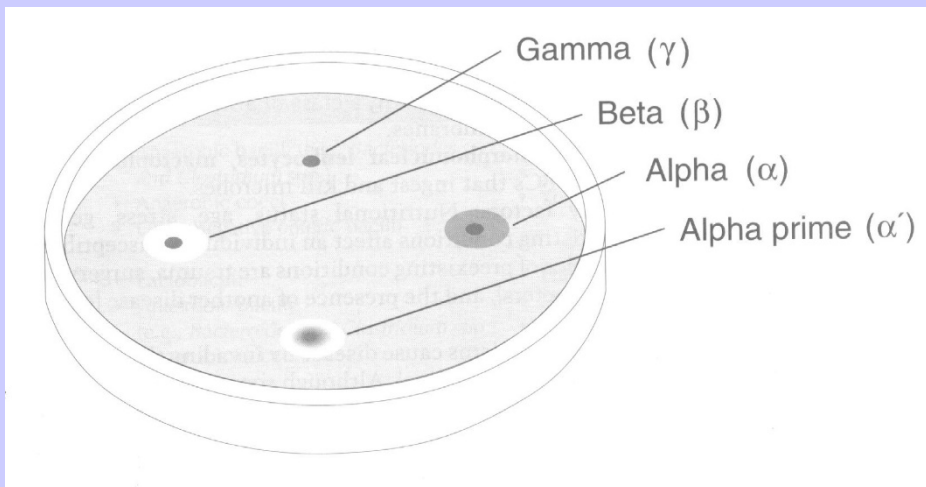
Comportamento dei batteri in relazione all' emolisi:

alfa-emolisi (emolisi incompleta): colonie circondate da un alone di decolorazione verdastria;

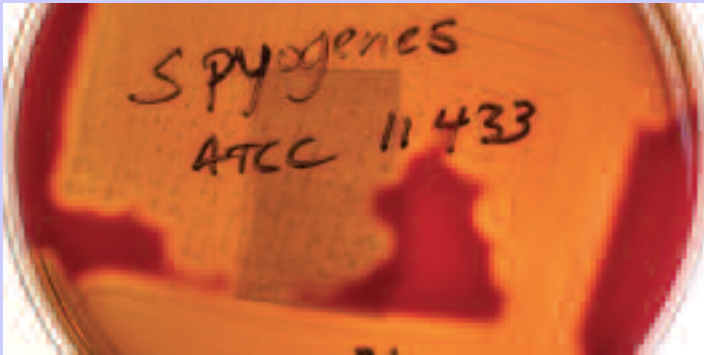
beta-emolisi (emolisi completa): colonie circondate da alone chiaro;

γ-emolisi: colonie non emolitiche;

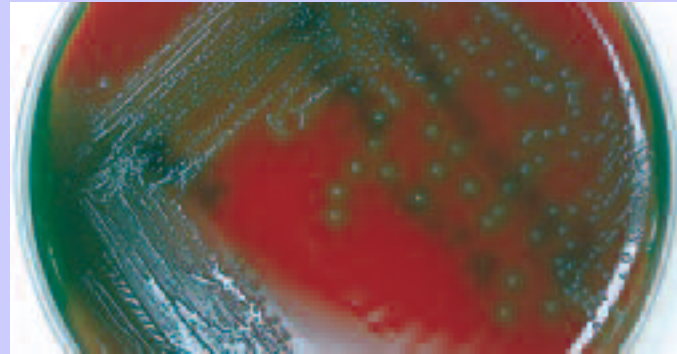
Alfa' (alfa primo)-emolisi (può essere confusa con la β-emolisi): zona di alfa-emolisi circondata da una beta-emolisi.



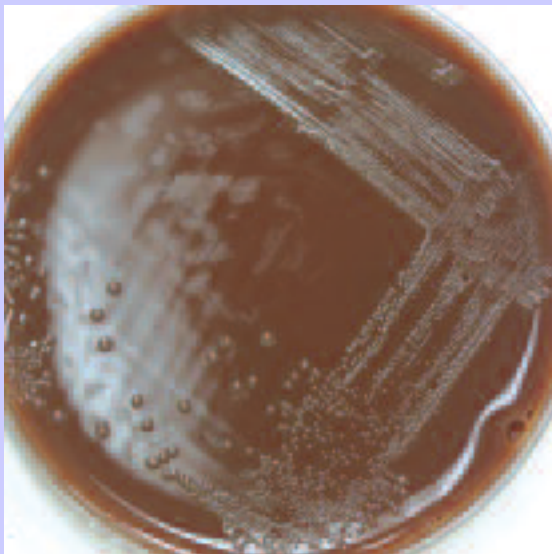
AGAR SANGUE



β - emolisi



α - emolisi



AGAR CHOC

Terreni di isolamento e mantenimento

T. isolamento: per isolare i microrganismi da campioni (es. prodotti alimentari, superfici, materiale patologico).

T. mantenimento: per conservare in laboratorio le colture pure.

Alcuni distinguono i t. di isolamento da quelli di mantenimento, perché normalmente le esigenze di un microrganismo sono maggiori al momento dell'isolamento piuttosto che nel mantenimento, quando si è già adattato al terreno culturale.

Terreni di isolamento e mantenimento

Esempi di t. isolamento: agar verde brillante (BGA: brilliant green agar), usato per l'isolamento di *Salmonella* da campioni alimentari (N.B.: è un terreno di isolamento ma anche selettivo).

Esempi di t. mantenimento: brodo triptone soia (TSB), agar triptone soia (TSA).

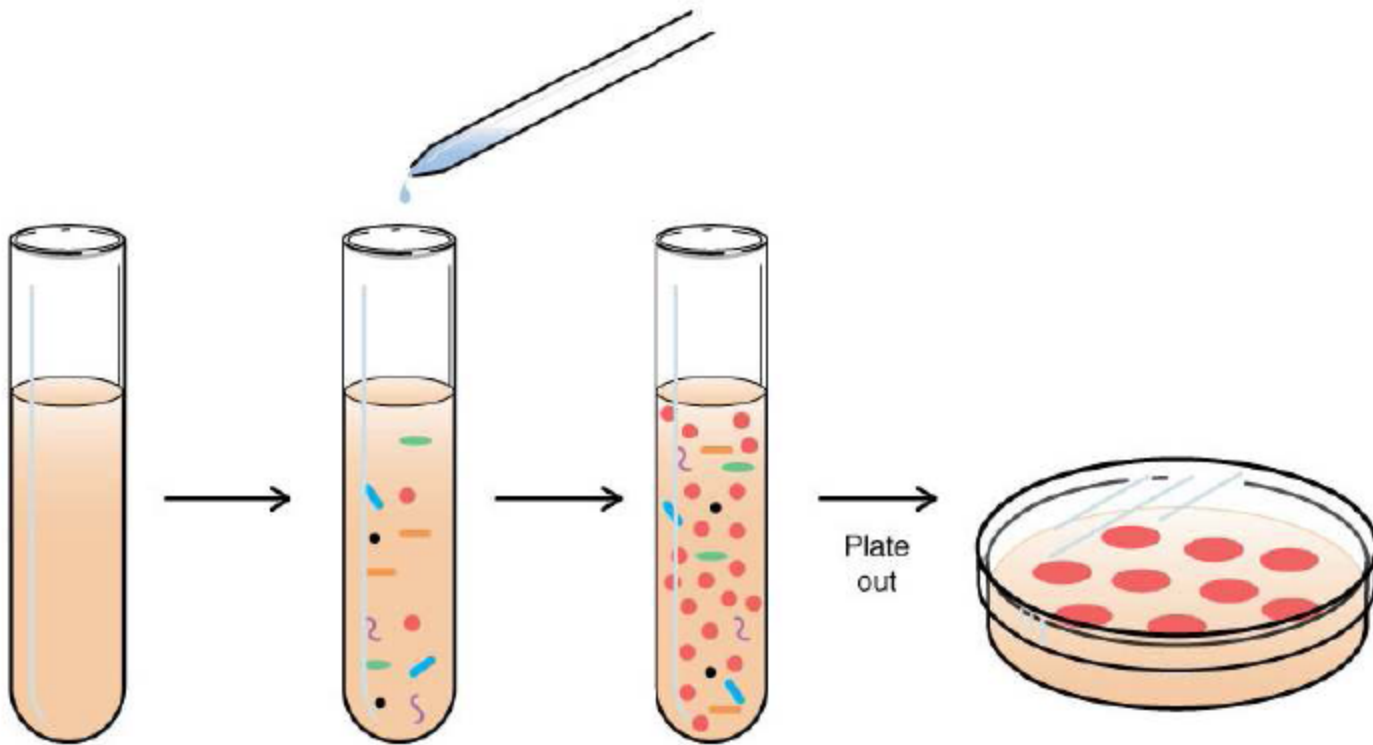
Terreni di arricchimento

Favoriscono la crescita di alcune specie microbiche e quindi “arricchiscono” la coltura con poche specie di microrganismi, inibendo gli altri.

Esempi: sono in genere terreni liquidi, es. brodo selenite, usato per isolare *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. da campioni di feci, che normalmente contengono cariche elevate di numerose specie microbiche.

Alcuni terreni si possono anche definire **elettivi** perché pur non contenendo inibitori, la loro composizione favorisce la crescita di determinati gruppi microbici (es. M17 è un terreno elettivo per gli streptococchi lattici; agar sangue favorisce lo sviluppo di molti microrganismi patogeni).

Terreni di **ARRICCHIMENTO**



Il terreno contiene nutrienti che favoriscono la crescita del microrganismo di interesse

Al terreno viene aggiunto un campione contenente un'ampia varietà di organismi, incluso l'organismo di interesse

Il microrganismo di interesse si moltiplica mentre la maggior parte degli altri organismi non trova le condizioni adatte

Un campione arricchito viene piastrato su un terreno solido appropriato. Prelevando una singola colonia del microrganismo di interesse si può ottenere una coltura pura

Terreni selettivi

Favoriscono la crescita di particolari specie microbiche ed inibiscono la crescita di altri microrganismi, di solito mediante sostanze antimicrobiche presenti nella composizione (es. sali biliari o coloranti).

Esempi: sono in genere terreni solidi. Ad esempio, sali biliari o fucsina basica o cristalvioletto inibiscono i Gram + (agar cristalvioletto per Gram - ; agar MacConkey per *Escherichia coli*).

Terreni selettivi

Altri esempi:

- ① **Mannitol salt agar (MSA):** l'alta % di NaCl consente la crescita soltanto agli stafilococchi (alotolleranti);
- ② **Terreno di Sabouraud:** l'alta % di zuccheri ed il pH acido (5,6) inibiscono la crescita dei batteri e consentono quella di lieviti e muffe;
- ③ **Agar PPLO:** contiene acetato di tallio e penicillina ed impedisce la crescita di quasi tutti i batteri, tranne i micoplasmi che sono privi di parete cellulare.

Agar nutritivo e Sabouraud Dextrose Agar a confronto

Table 16.1 Components of Nutrient Agar and Sabouraud Dextrose Agar

**Nutrient agar*
(bacteria)**

**Sabouraud dextrose
agar (funghi)**

Peptone	5 g
Beef extract	3 g

Peptone	10 g
Dextrose	40 g

Agar	15 g
------	------

Agar	15 g	SOLIDI
------	------	---------------

Distilled water 1,000 ml

Distilled water 1,000 ml

Final pH = 6.8

Final pH = 5.6

ISOLAMENTO

EMPIRICO

ISOLAMENTO

SELETTIVO

COMPLESSO

Source: *The Difco Manual*. Eleventh Edition. Difco Laboratories.

*Nutrient broth has the same formula, but does not contain agar.

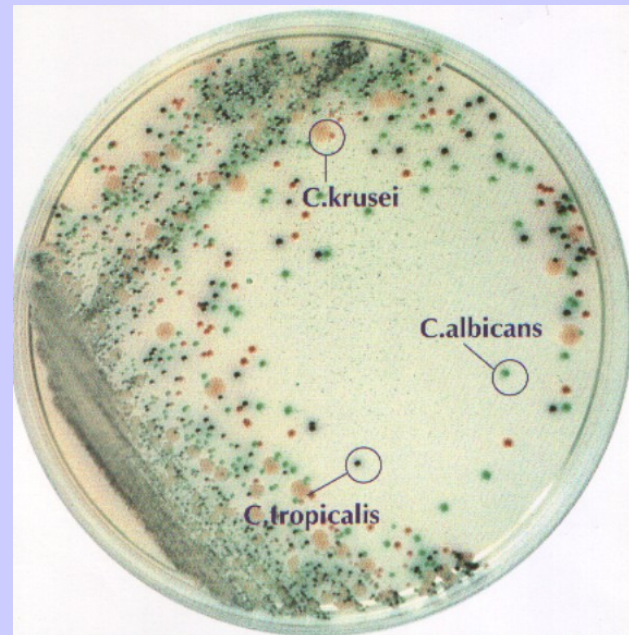
Terreni selettivi

L'azione selettiva può essere ottenuta mediante incubazione con particolari nutrienti (es. cellulosa come unica fonte di carbonio per selezionare i batteri che digeriscono la cellulosa).

N.B.: terreni come l'agar sangue e l'agar cioccolato non sono selettivi (non contengono sostanze antimicrobiche e consentono la crescita di molte specie microbiche).

Terreni differenziali

Consentono di distinguere le specie microbiche che possono crescere su questi terreni, di solito mediante indicatori colorati presenti nella composizione.



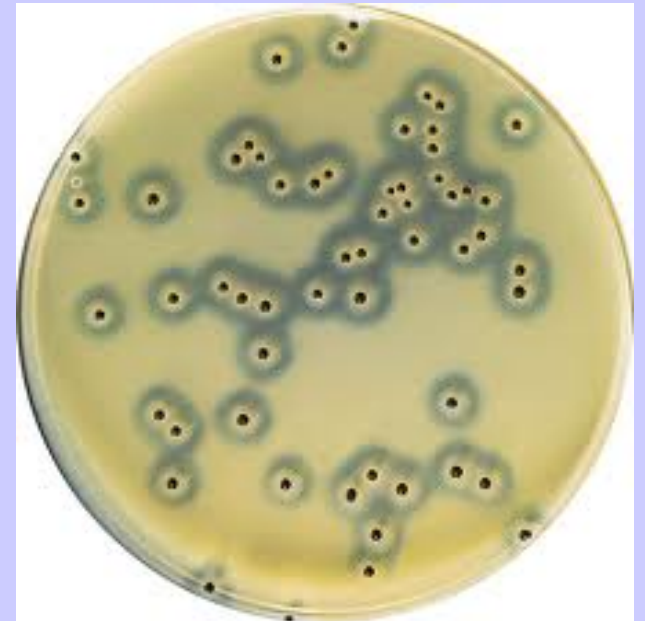
Terreni differenziali

Esempi:

- ① **Agar sangue:** permette di distinguere colonie emolitiche da colonie non emolitiche;
- ② **Terreno di Baird Parker (BPA), contenente tellurito di potassio e tuorlo d' uovo:** *Staphylococcus aureus* produce lecitinasi che chiarifica il terreno contenente tuorlo e cresce come colonia nerastra (tellurito) con alone chiaro.



Baird-Parker Agar



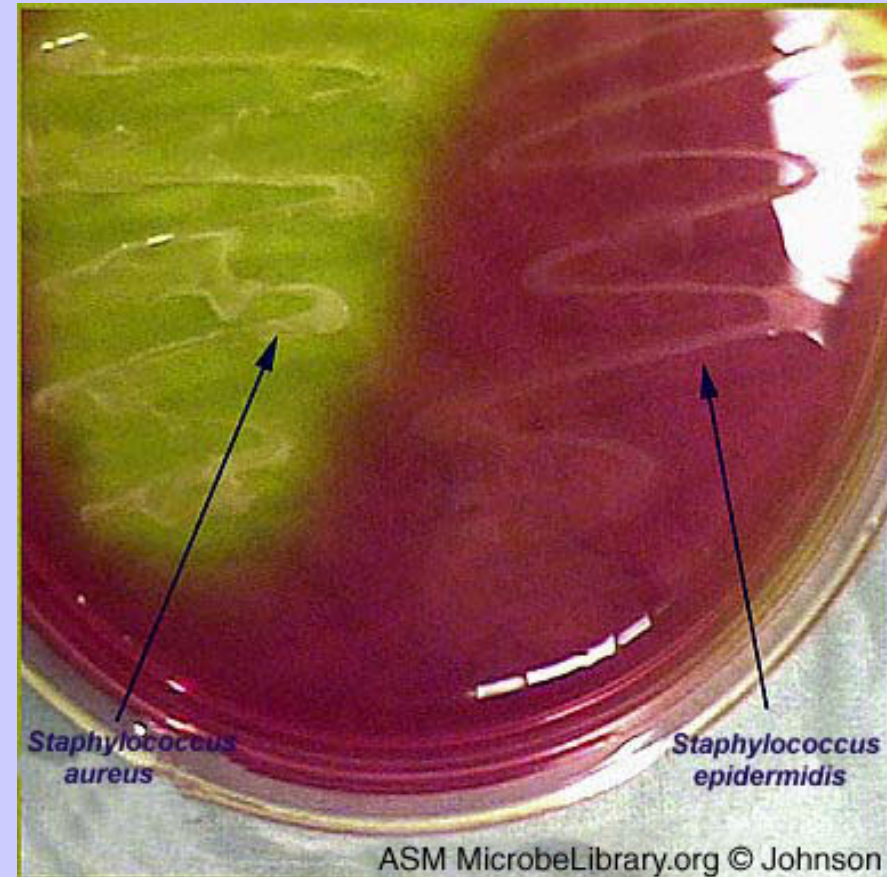
Mannitol Salt Agar

Altissima concentrazione di sale

Mannitolo come zucchero fermentescibile

Indicatore (pH)

***S. aureus* fermenta il mannitolo, quindi l'indicatore vira verso il giallo, dando un alone che circonda le colonie.**



Terreni differenziali

N.B.:

L' agar MacConkey è selettivo e differenziale, contenendo lattosio e rosso neutro che impartisce una colorazione rossa a $\text{pH} < 6,8$ (i **coliformi lattosio-fermentanti crescono come colonie rosa-rosse**. **N.B.:** *Salmonella* spp. non fermenta il lattosio!).

Esempi di terreni selettivi e differenziali

Agar MacConkey

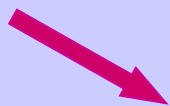
- Peptone 20 (g/l)
- Lattosio (agente selettivo) 10 (“)
- Sali biliari (agente selettivo) 1,5 (“)
- Cloruro di sodio 5,0 (“)
- Rosso neutro (agente differenziale) 0,03 (“)
- Cristal violetto (agente selettivo) 0,001 (“)
- Agar 13,5 (“)

I coloranti sono impiegati da decenni nei mezzi di coltura per valutare variazioni di acidità legate alle attività metaboliche microbiche.

Introduzione di sostanze **cromogeniche e **fluorogeniche**:**

MISURA RAPIDA dell'attività enzimatica in esame

MISURA SPECIFICA perché evidenziano attività enzimatica specifica di una specie o un gruppo microbico



identificazione presuntiva

QUINDI...

I terreni cromogenici possono essere considerati metodi rapidi! (sviluppati soprattutto per microrganismi patogeni)

Substrati cromogenici:

in ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani & Agosti)

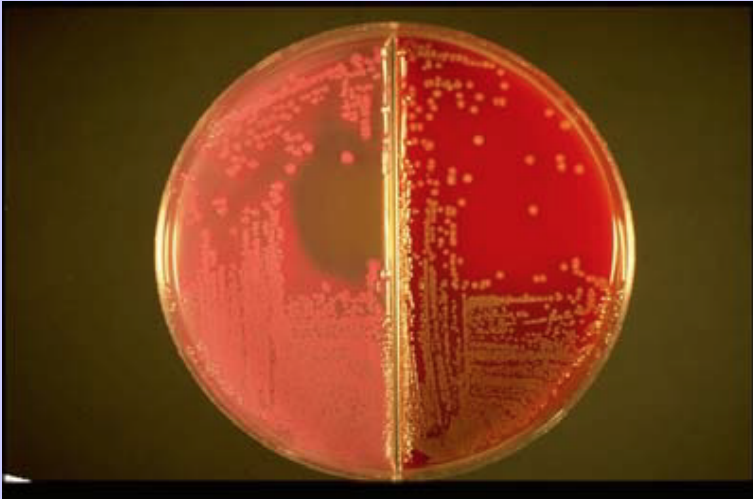
X-glucoside come substrato per enzima β -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria* e ad alcuni enterococchi e *Bacillus* .

Substrati fluorogenici:

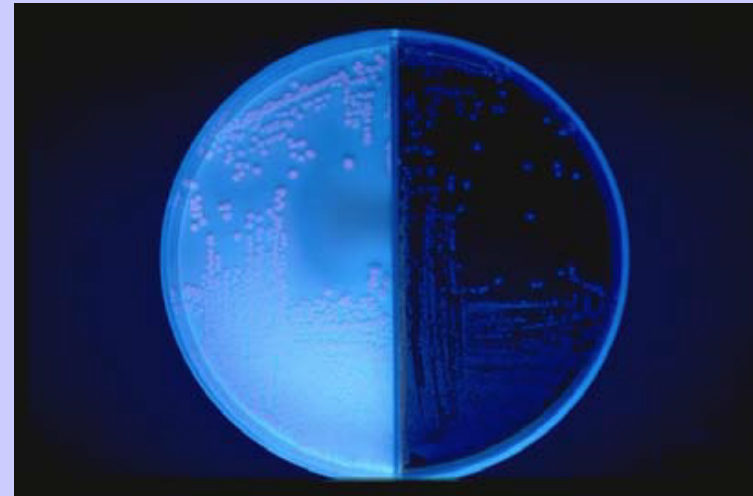
MUG (4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide) come substrato per enzima β -glucuronidasi (GUD), tipico di *E. coli* .
Supplemento per il VRBA, terreno per l'isolamento ed il conteggio di coliformi.

MAC CONKEY AGAR MUG

Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione degli enterobatteri e la determinazione di *Escherichia coli*.



**Mac Conkey Agar MUG
(sulla sinistra) alla luce
normale: colonie di *E.coli***



**Mac Conkey Agar MUG
(sulla sinistra) alla lampada
di Wood: colonie di *E.coli*,
fluorescenti**

ATTREZZATURA UTILE IN LABORATORIO



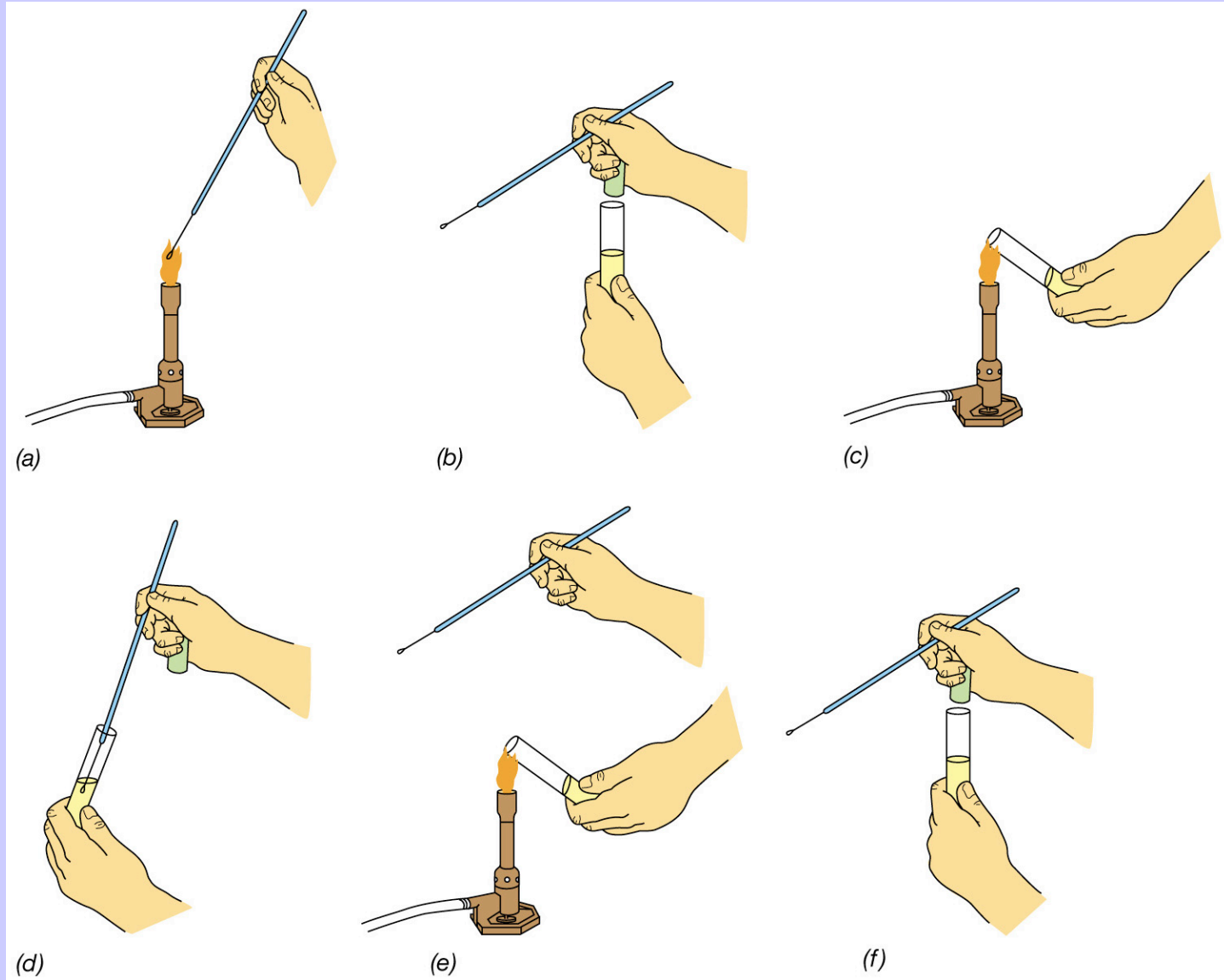


VORTEX

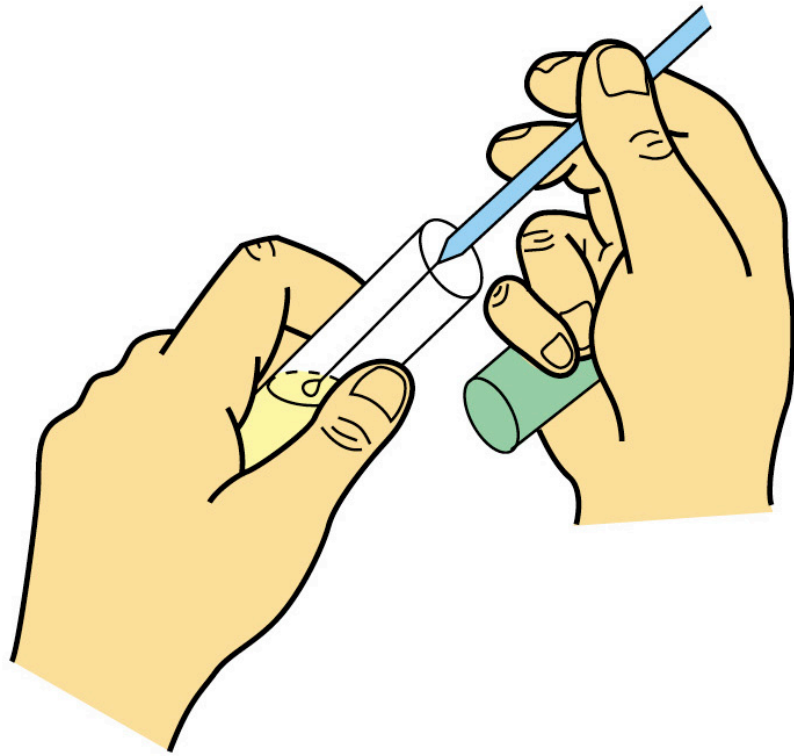


STOMACHER

Trasferimento aseptico di una coltura (“trapianto”)



Striscio in piastra e isolamento in **coltura pura** (popolazione di cellule che deriva da una singola cellula)

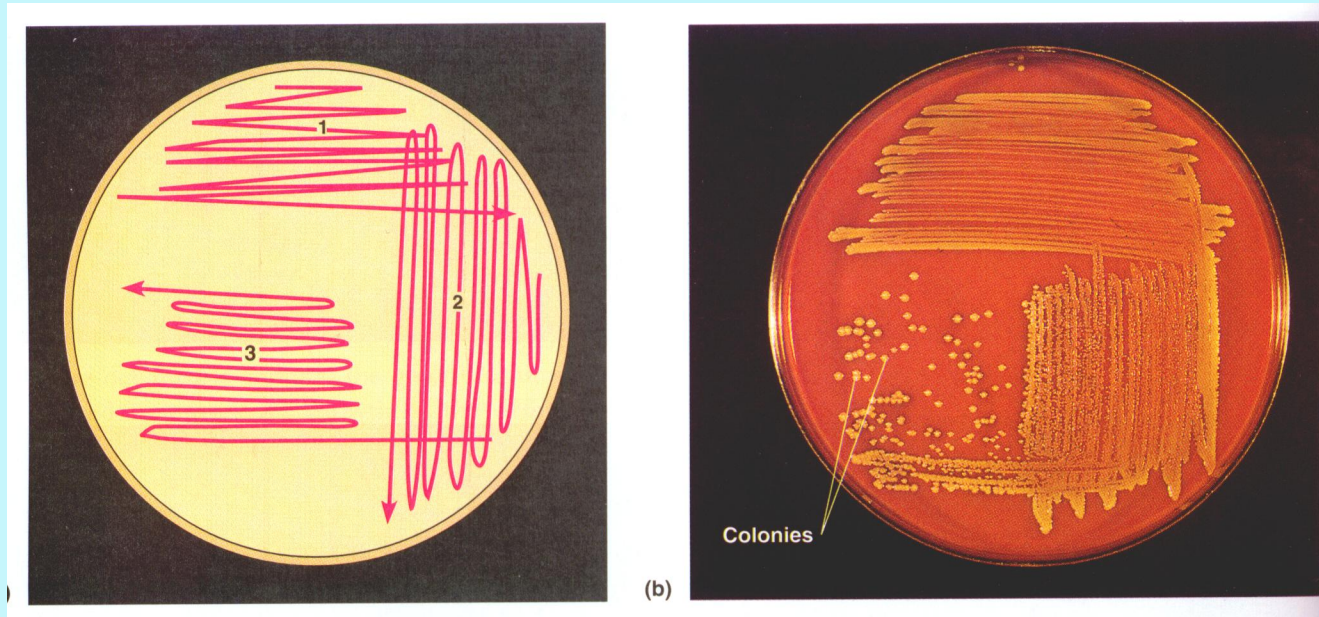


(a)



(b)

LE TECNICHE DI SEMINA: STRISCIO



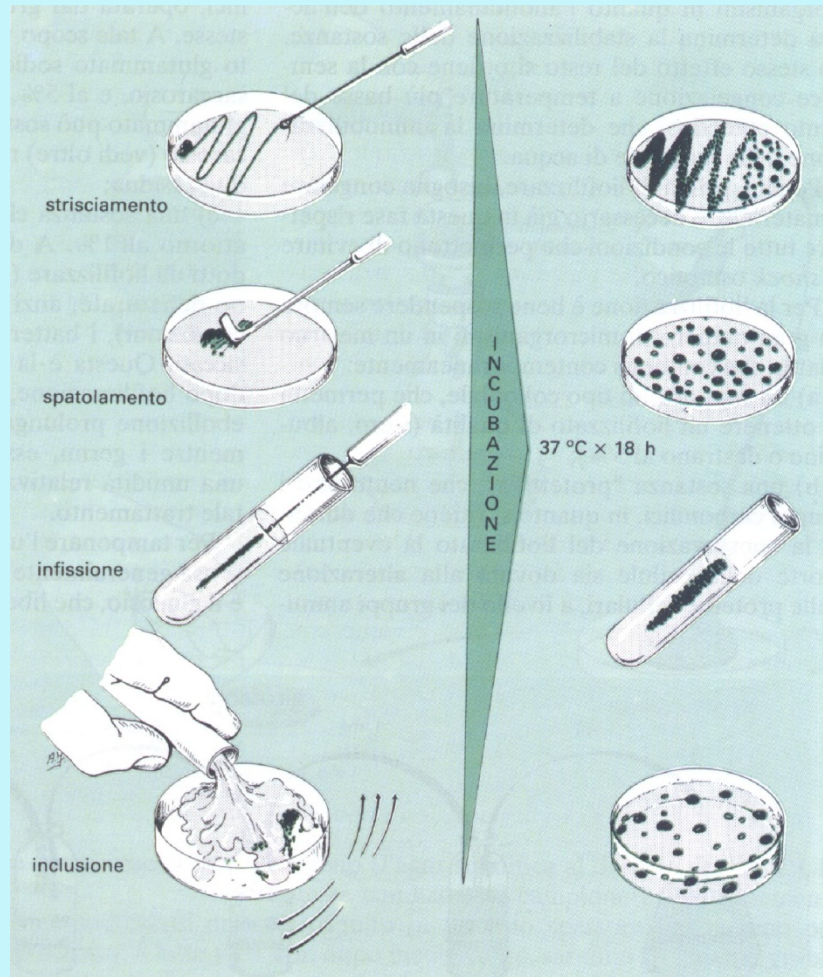
E' la tecnica più utilizzata per ottenere COLTURE PURE.
E' efficace se i batteri da isolare in purezza sono presenti in carica relativamente elevata, altrimenti è necessario aumentarne il numero attraverso un arricchimento selettivo.



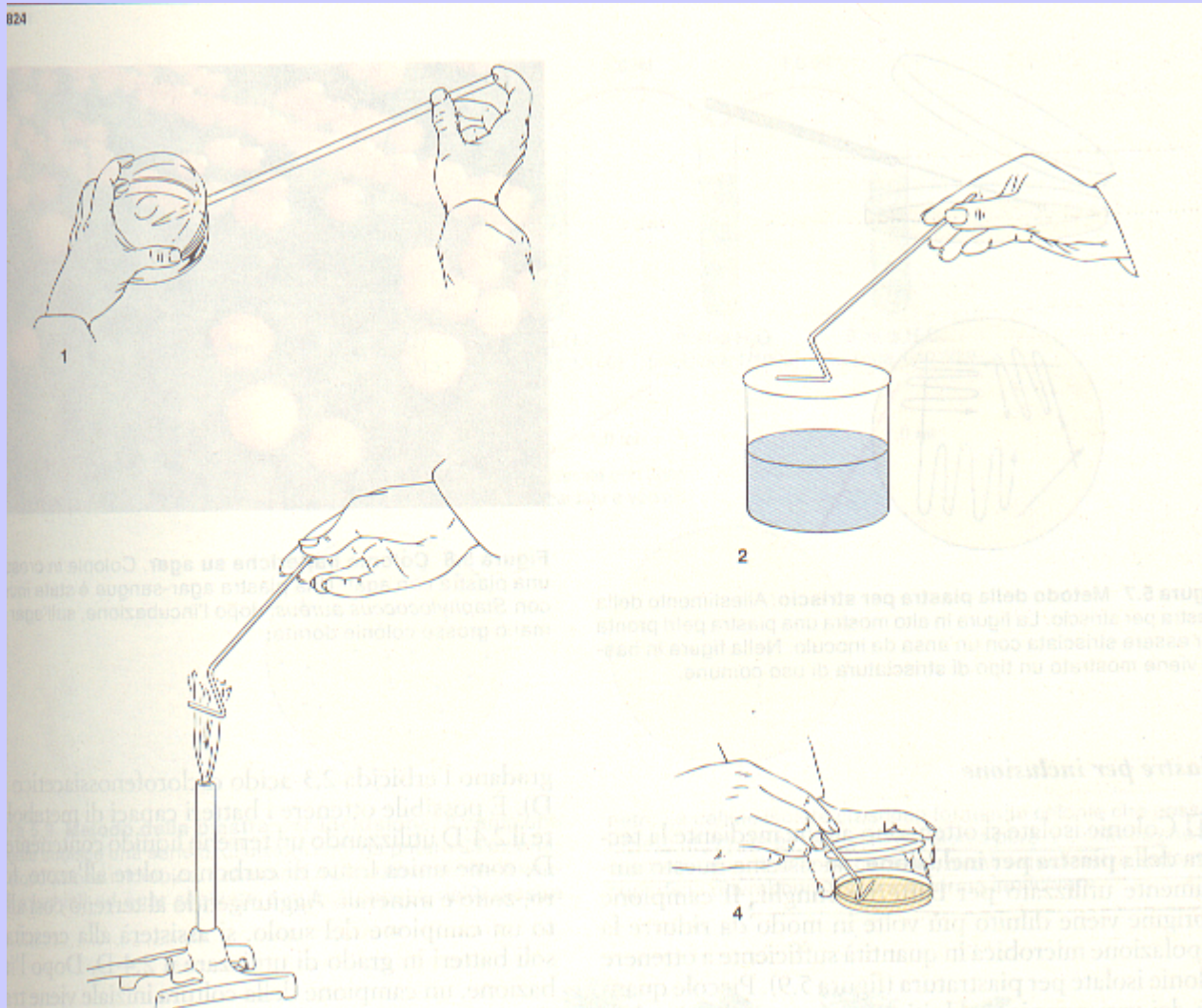
Oltre allo striscio, con opportune operazioni di diluizione effettuate sul campione, è possibile ottenere **colture pure utilizzando **altre tecniche di semina su terreno solido**:**

- **Spatolamento**
- **Inclusione (o “agar germi”)**
- **Infissione**

LE TECNICHE DI SEMINA



Metodo della piastra per spatolamento



LE COLONIE BATTERICHE
(CRESCITA SU TERRENI SOLIDI)

Le crescita dei batteri in un terreno solido: le colonie batteriche

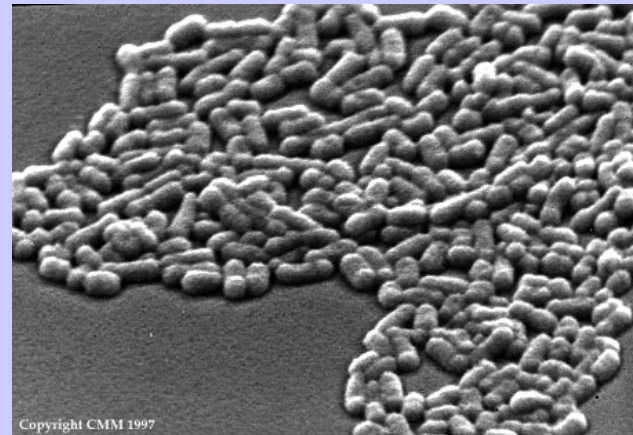
I batteri, seminati in un terreno solido agarizzato ed incubati in termostato, si riproducono formando ammassi rotondeggianti, eventualmente pigmentati, detti **colonie**.

Ogni colonia origina da una singola cellula batterica (in genere diventano visibili dopo almeno 18 ore di incubazione, quando si raggiunge una carica di almeno 10^6 cellule).

La morfologia delle colonie batteriche

Le caratteristiche delle colonie (dimensione, colore, forma, consistenza, odore, ecc.) sono un parametro fondamentale per l'identificazione e la classificazione dei batteri.

Crescita di *E. coli*



Morfologia delle colonie

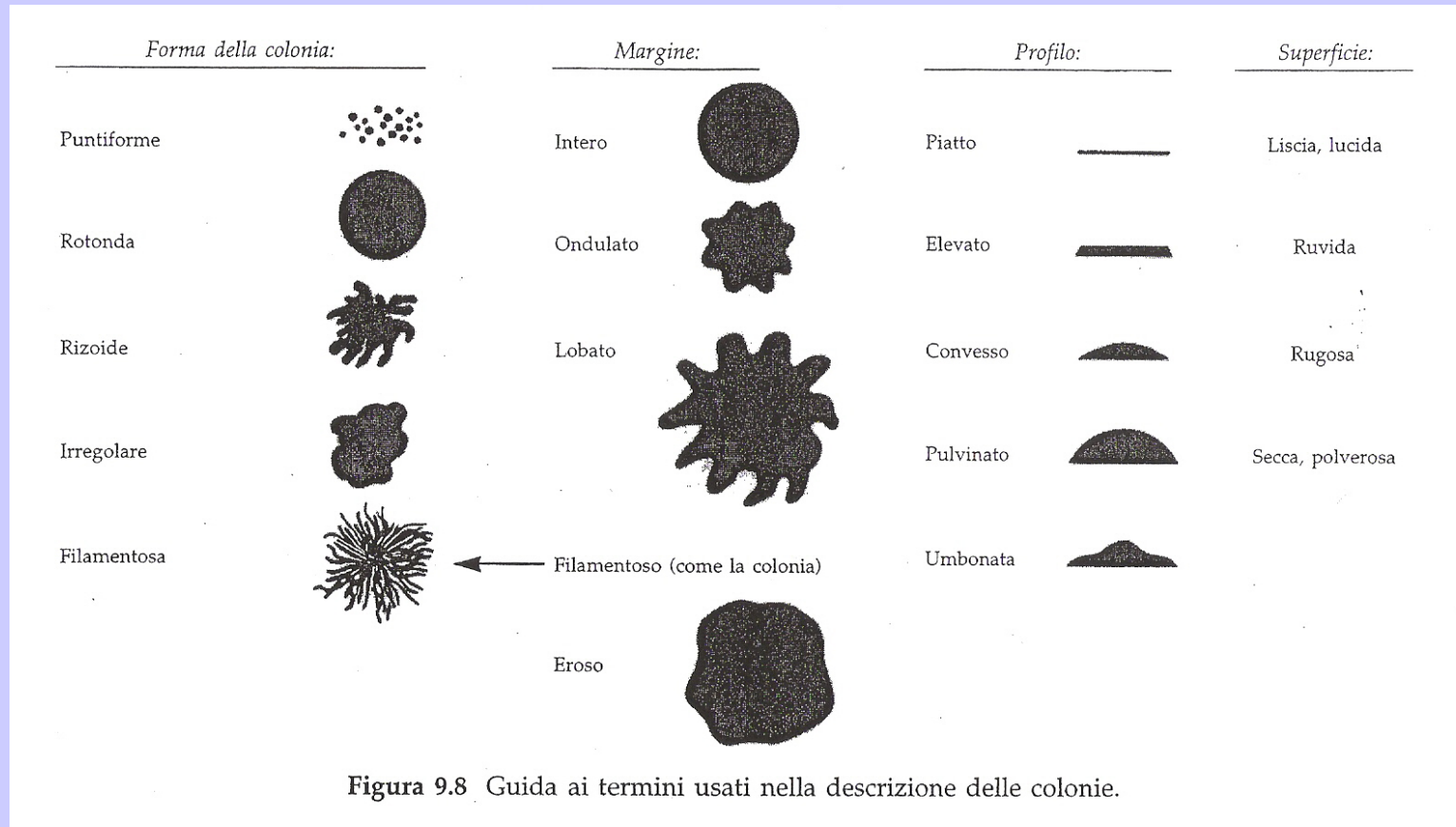
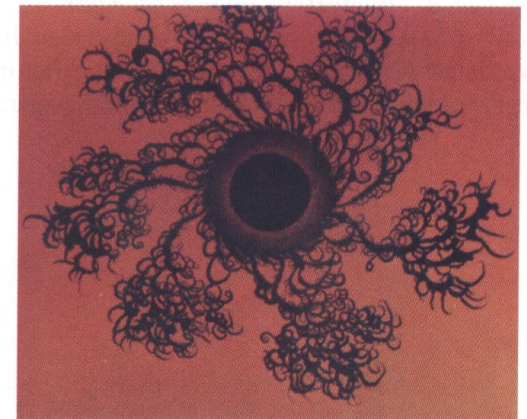
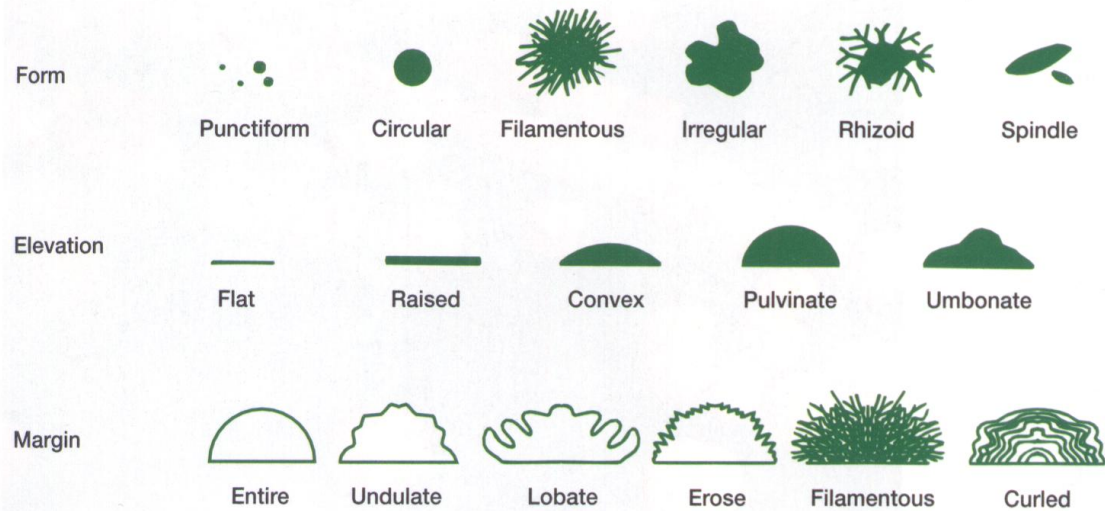


Figura 9.8 Guida ai termini usati nella descrizione delle colonie.

Morfologia delle colonie

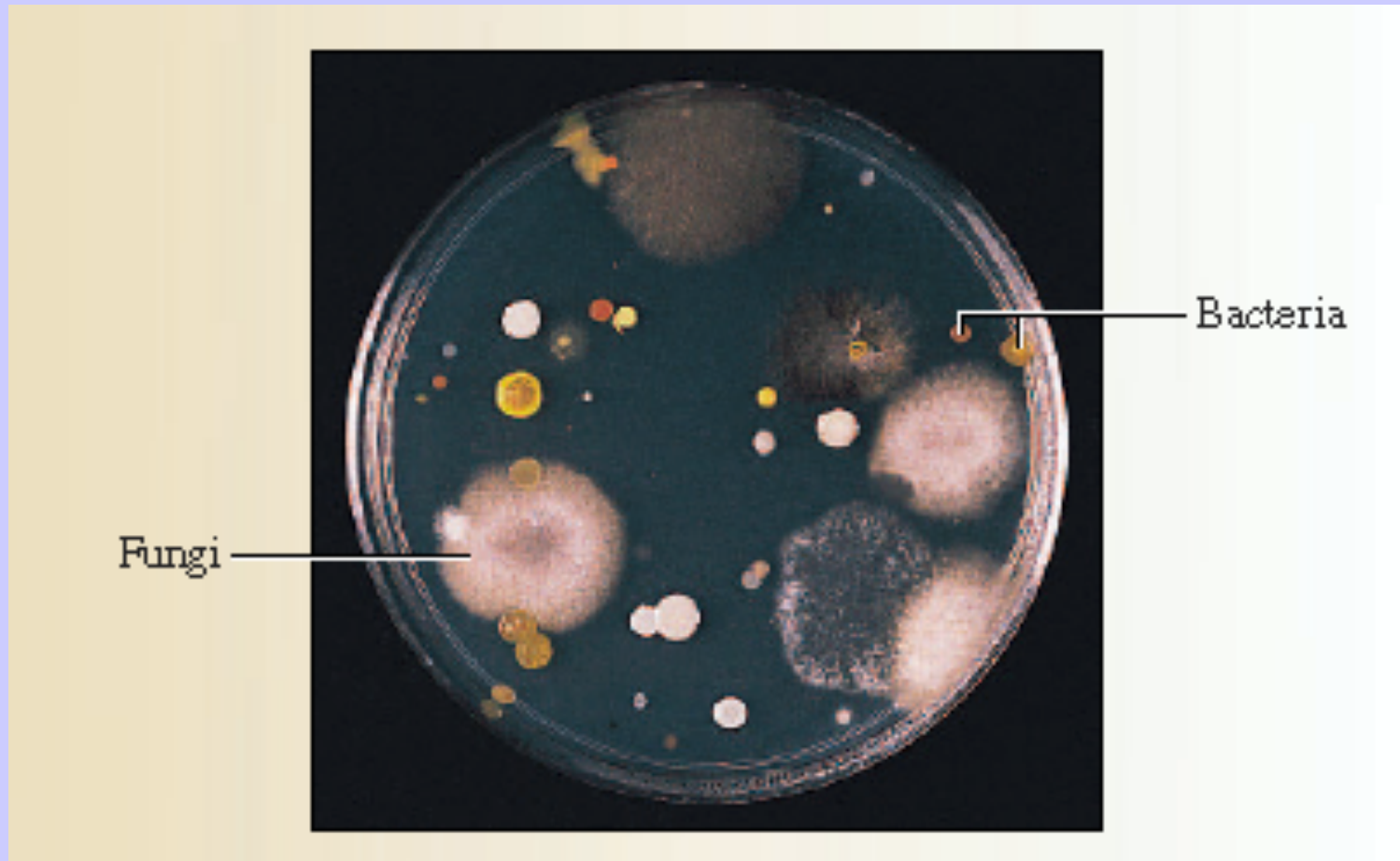


(a)

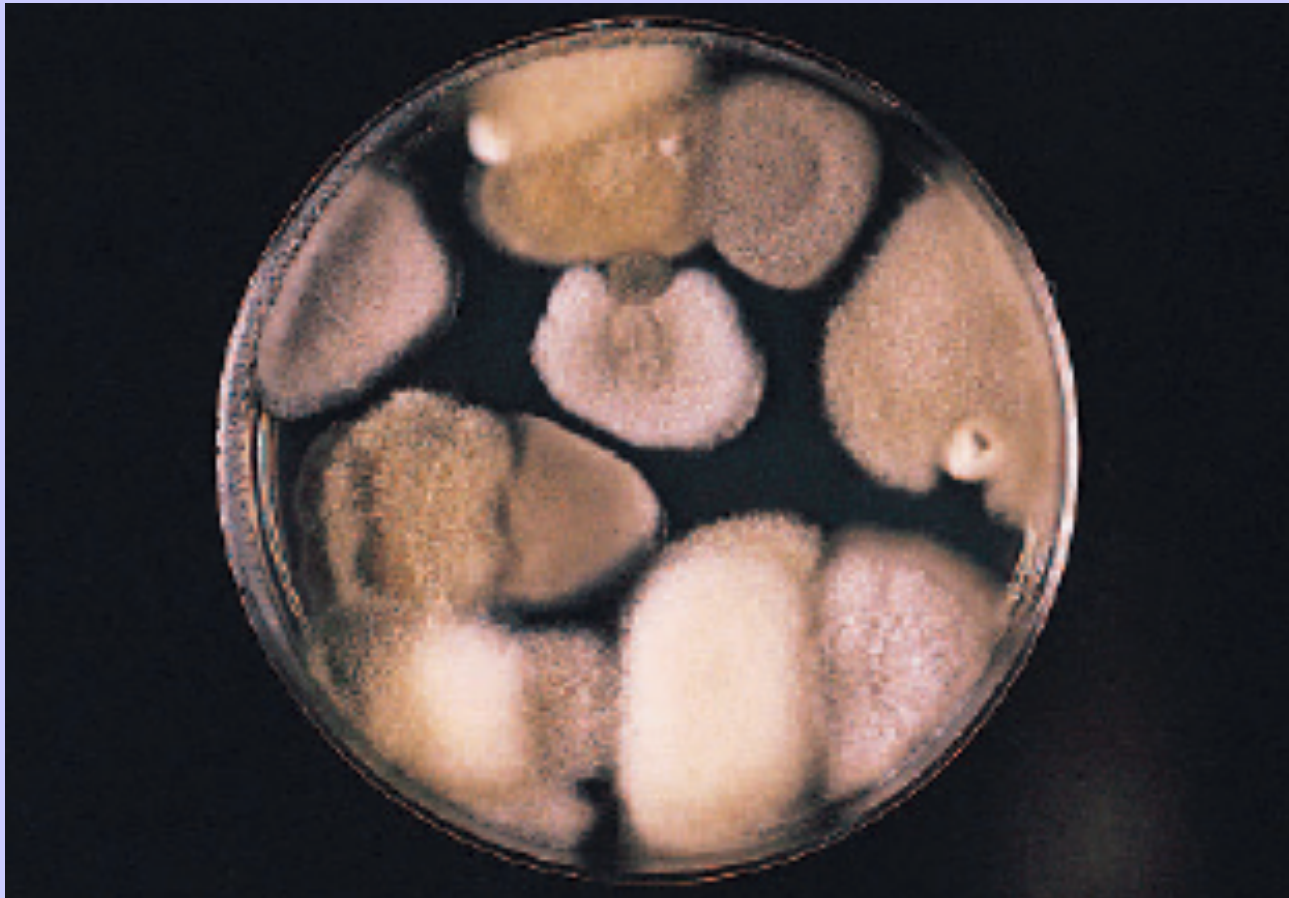
Figure 5.10 Bacterial Colony Morphology. (a) Variations in bacterial colony morphology seen with the naked eye. The general form of the colony and the shape of the edge or margin can be determined by looking down at the top of the colony. The nature of colony elevation is apparent when viewed from the side as the plate is held at eye level. (b) Colony morphology can vary dramatically with the medium on which the bacteria are growing. These beautiful snowflakelike colonies were formed by *Bacillus subtilis* growing on nutrient-poor agar. The bacteria apparently behave cooperatively when confronted with poor growth conditions, and often the result is an intricate structure that resembles the fractal patterns seen in nonliving systems.

(b)

BATTERI E MICETI ISOLATI DA UN CAMPIONE DI ARIA

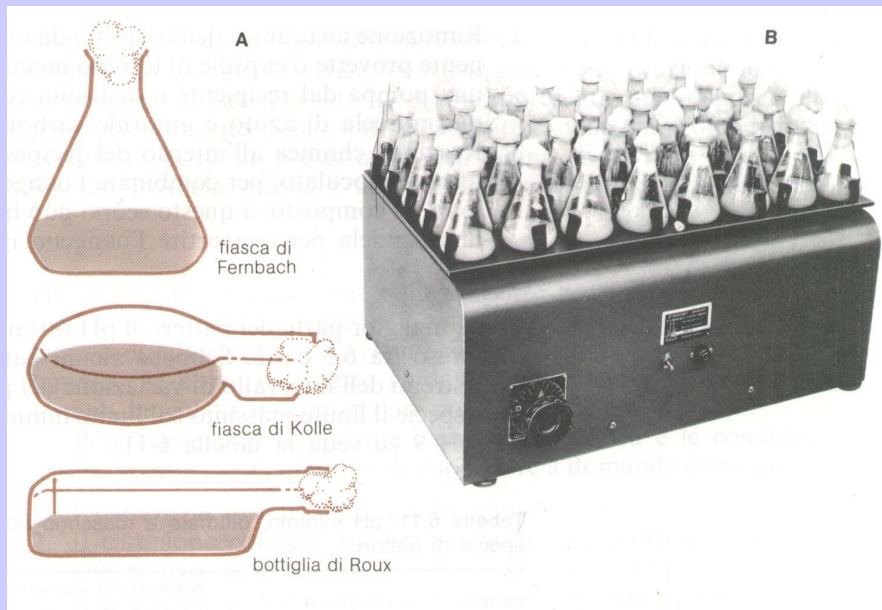


**MICETI ISOLATI
DA UN CAMPIONE DI ARIA**



**METODI PER LA
COLTIVAZIONE IN ATMOSFERA
RICCA DI OSSIGENO**

LE TECNICHE PER AUMENTARE L' AERAZIONE DURANTE L' INCUBAZIONE



A. Recipienti di coltura che incrementano la superficie di terreno esposta:

1. Fiasca di Fernbach; 2. Fiasca di Kolle; 3. Bottiglia di Roux.

B. Agitatore a piano oscillante.

COLTIVAZIONE IN ANAEROBIOSI

TERRENI E METODI PER L' ANAEROBIOSI

La coltivazione degli anaerobi pone particolari problemi (l' O₂ è tossico per questi batteri).

LE SOLUZIONI:

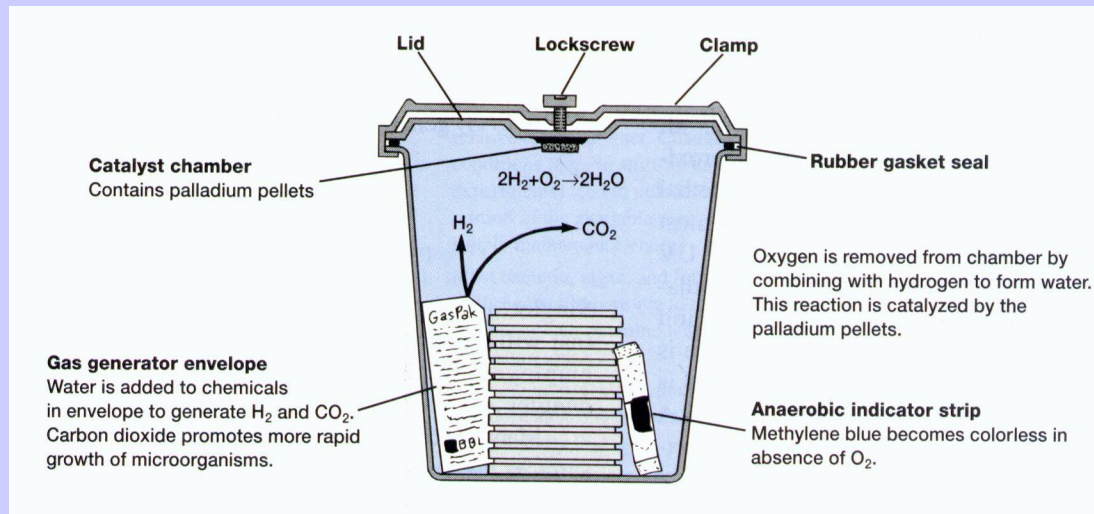
① **TERRENI RIDUCENTI:** contengono ingredienti (es. tioglicolato di sodio o cisteina) che sequestrano l'ossigeno ("*gas scavengers*"). Provette con tappo a tenuta.

TERRENI E METODI PER L'ANAEROBIOSI

② GIARA DA ANAEROBIOSI
(per piastre Petri): contiene le
Petri, una confezione con una
miscela di bicarbonato di sodio
e boruro di sodio, un indicatore
(blu di metilene → diventa
incolore se l' O_2 è rimosso) e
pochi ml di acqua. Giara
sigillata (sotto il coperchio, un
catalizzatore al platino).



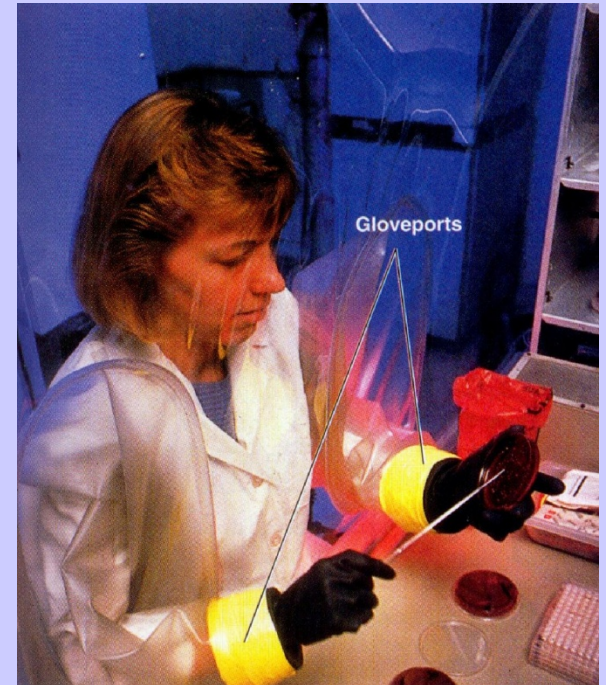
TERRENI E METODI PER L'ANAEROBIOSI



Il bicarbonato di sodio ed il boruro di sodio reagiscono con H_2O producendo CO_2 e H_2 . H_2 reagisce con O_2 (catalizzatore al palladio) producendo H_2O . O_2 scompare e si accumula CO_2 (l'indicatore diventa incolore).

TERRENI E METODI PER L'ANAEROBIOSI

③ **CAMERE PER ANAEROBIOSI**
(per manualità in ambiente privo di ossigeno): camere trasparenti dotate di filtro e riempite con gas inerte. Le manualità sono eseguite tramite guanti inseriti nella parete della camera.



TERRENI E METODI PER L'ANAEROBIOSI

④ INCUBATORI A CO₂ (per incubazione a livello di CO₂ predefinito, es. per i **batteri capnofili**, che crescono meglio in presenza di livelli contenuti di CO₂, es. 3-10%): è possibile coltivare batteri che richiedono % di CO₂ maggiori o minori di quella atmosferica, attraverso una regolazione elettronica della composizione dell'atmosfera interna.

TERRENI E METODI PER L'ANAEROBIOSI

Metodi per i **batteri microaerofili** e **capnofili** (che crescono meglio rispettivamente in presenza di livelli di O_2 e di CO_2 relativamente ridotti, es. 3-10%):

⑤ **GIARE CON CANDELA** (la candela si spegne quando O_2 è notevolmente consumato; N.B.: il livello di O_2 è comunque sufficiente per gli aerobi);

⑥ **KIT CON GENERATORI DI GAS** (per 1 o 2 Petri), contenenti una confezione di generatore di gas da rompere o inumidire.

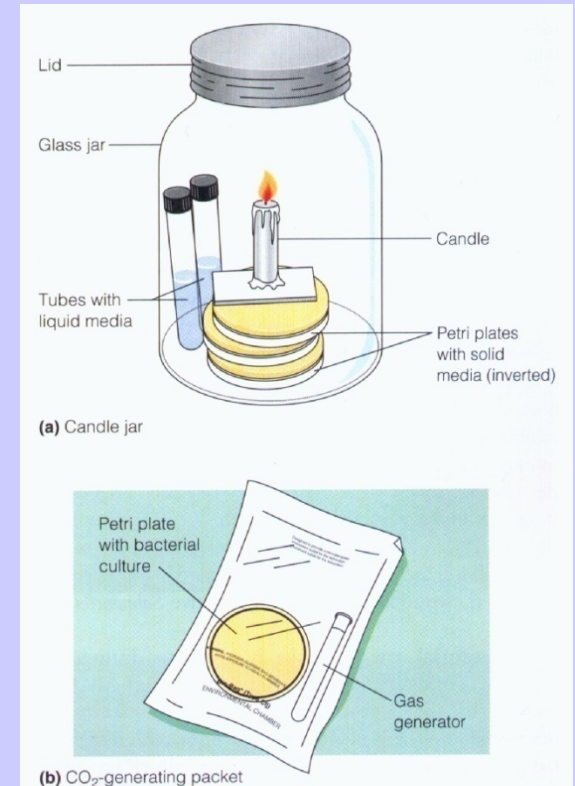


Figure 6.7 Equipment for producing CO_2 -rich environments. (a) Plates and tubes inoculated with, for example, *Neisseria meningitidis* are placed in a jar with a lighted candle, and the jar is sealed. This will provide a CO_2 atmosphere of approximately 3%. (b) The packet consists of a bag containing a Petri plate and a CO_2 gas generator. The gas generator is crushed to mix the chemicals it contains and start the reaction that produces CO_2 . This gas reduces the oxygen concentration in the bag to about 5% and provides a CO_2 concentration of about

MICROORGANISMI CHE NON CRESCONO SU TERRENI COLTURALI

Mycobacterium leprae (lebbra): coltivato su armadilli (temperatura corporea più bassa rispetto ai mammiferi domestici).

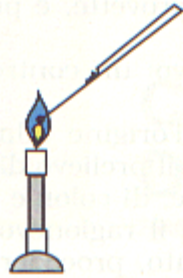
Batteri intracellulari obbligati (es. *Chlamydia* spp. e rickettsie), come i **virus**, si coltivano su colture cellulari.

**METODI PER LA
CONSERVAZIONE DELLE
COLTURE BATTERICHE**

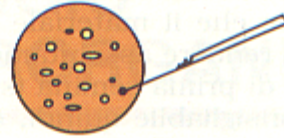
METODI PER LA CONSERVAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE:

- ① **CONSERVAZIONE REFRIGERATA IN “BECCO DI CLARINO”:** trapianto in terreno solido di mantenimento, usando provette con agar inclinato (maggiore superficie); le colture sono conservate in frigorifero e trapiantate in nuovo terreno ogni 2-4 mesi.

N.B.: possono manifestarsi mutazioni (es. il ceppo può perdere alcune proprietà fisiologiche, come la capacità di produrre un enzima).



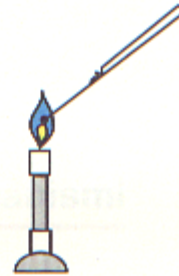
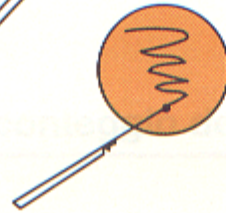
1 - sterilizzare l'ansa



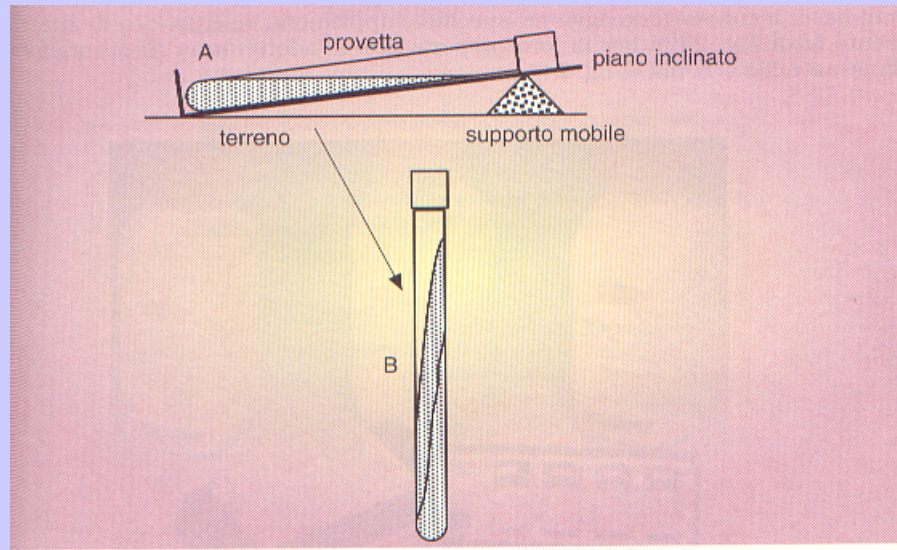
2 - prelevare una colonia isolata



3 - seminare in provetta o in piastra



4 - sterilizzare l'ansa




METODI PER LA CONSERVAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE:

- ② **CONGELAMENTO RAPIDO** da -50° C a -95° C, previa sospensione in apposito diluente (crioprotettivo);
- ③ **LIOFILIZZAZIONE**: sospensione in crioprotettivo adeguato e congelamento rapido da -54° C a -72° C, successiva applicazione del vuoto (sublimazione di H_2O) e termosaldatura del contenitore.

Mestruai per la liofilizzazione delle colture batteriche:

INGREDIENTI:

- ①SUPPORTO:** sostanza colloidale, es. siero o albumine;
- ②SOSTANZA CON AZIONE PROTETTIVA:** es. glutammato monosodico (1% se è presente saccarosio, 5% se è assente) tampona anche l'umidità residua, in sostituzione  saccarosio;
- ③SOSTANZA CHE RIDUCA L'UMIDITA' RESIDUA ALL' 1%:** es. saccarosio 10% (N.B.: i batteri muoiono se viene eliminata completamente l'umidità).

Il latte magro può essere considerato un mestruo completo.

Collezioni di colture

- Il deposito presso una Collezione di colture è una prassi abbastanza comune nei riguardi di ceppi di microrganismi interessanti ai fini industriali e scientifici.
- Ogni coltura depositata deve essere corredata di esaurienti dati riguardanti: habitat e isolamento, posizione tassonomica, caratteristiche morfologiche, colturali, biochimiche e, possibilmente, sierologiche e genetiche.
- Alcune Istituzioni ufficiali dotate di collezioni di colture:
 - **ATCC** (American Type Culture Collection - USA)
 - **DSMZ** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - Germany)
 - **CBS** (Centrallbureau voor Schimmelcultures - Germany)
 - **LMG** (Laboratorium voor Microbiologie, Gent - Belgium)
 - **JCM** (Japan Collection of Microorganisms - Japan)