

# CARATTERISTICHE DEI MICRORGANISMI

I microrganismi = organismi viventi di dimensioni piccolissime, solo qualche millesimo di millimetro

*organismi unicellulari di dimensioni estremamente piccole*

Osservati solo per mezzo di un microscopio

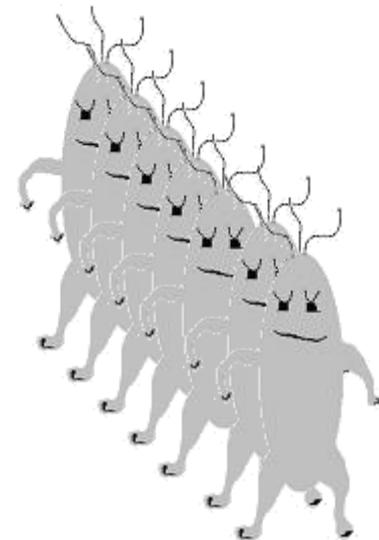
$\mu$  = micron o micrometro = 0.001 mm ( $10^{-6}$  m)

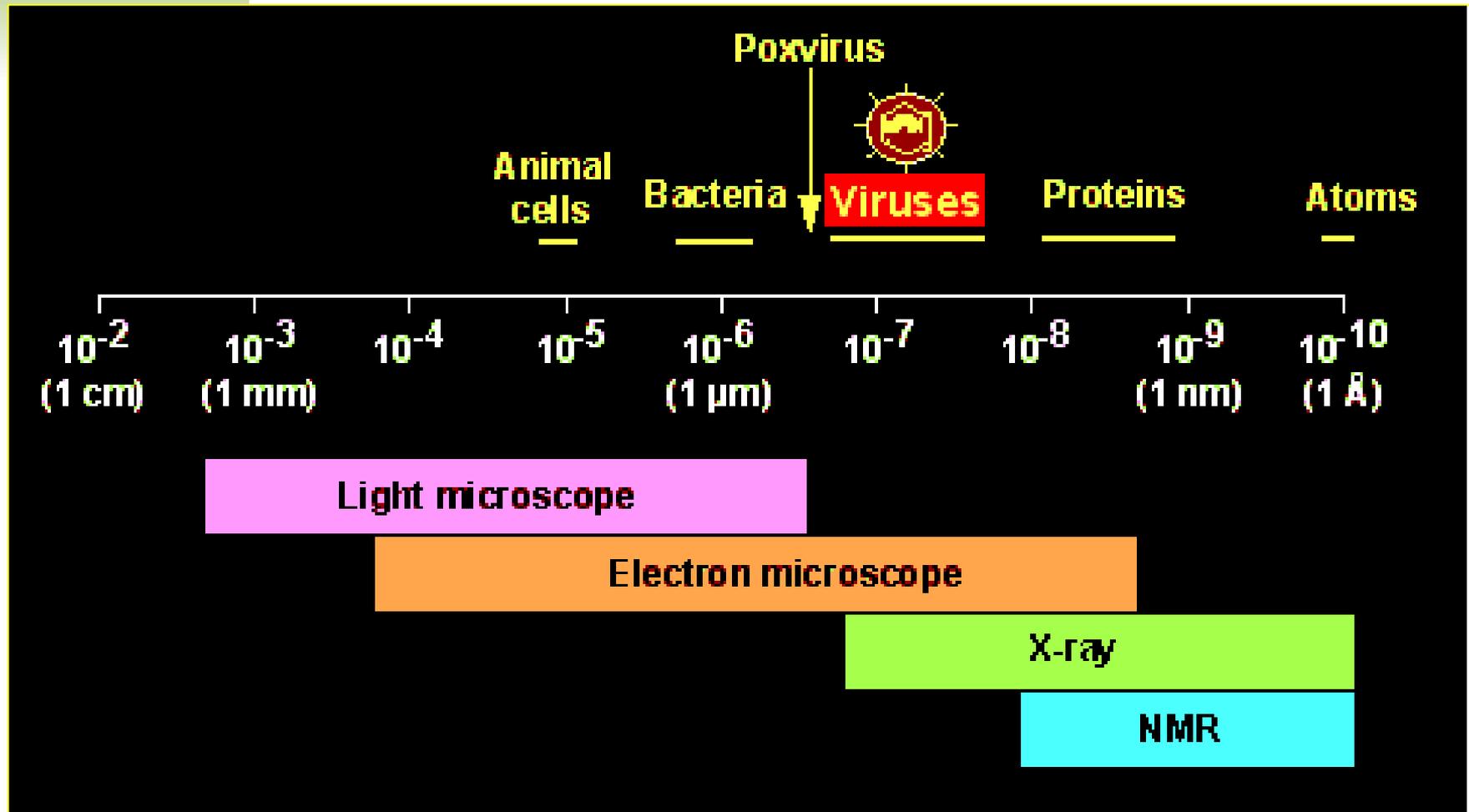
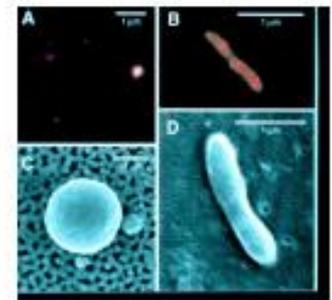
Ne occorrono 500.000 per fare un metro di lunghezza

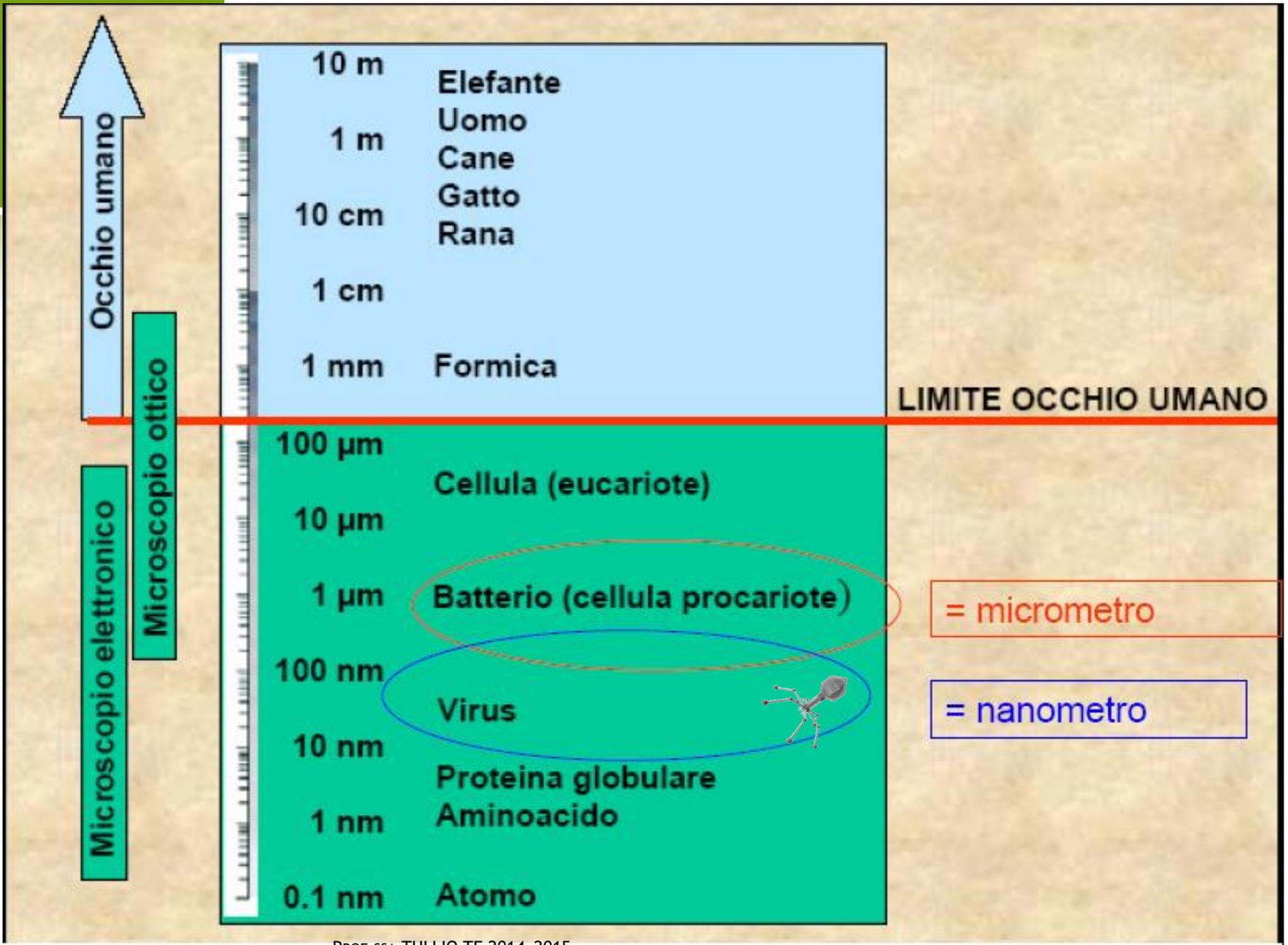


*invisibili a occhio nudo*

PROF.SSA TULLIO TE 2014\_2015



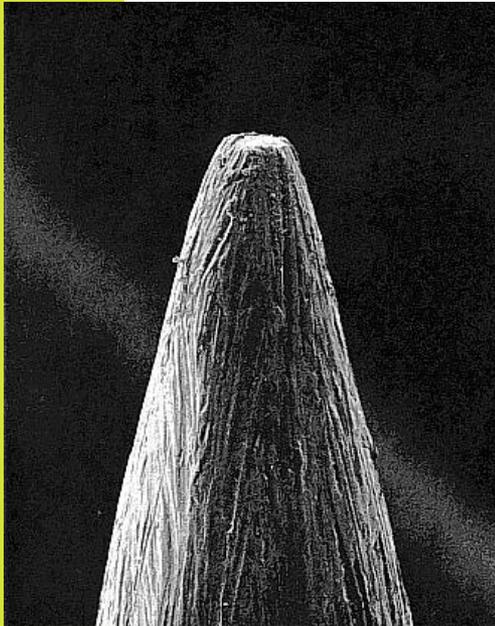




# MONDO DEI MICROBI

## Zoom sulla punta di uno spillo

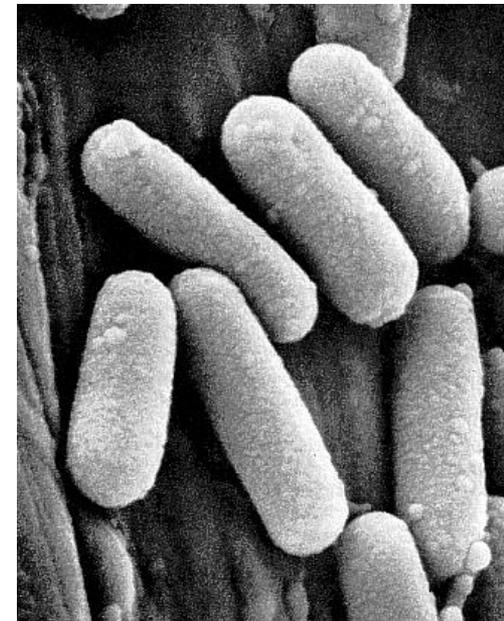
X 50

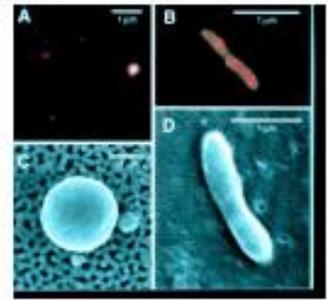


X 1250



X 30 000





## Micrometri...

- ➔ Se ingrandissimo un batterio fino a 5 cm



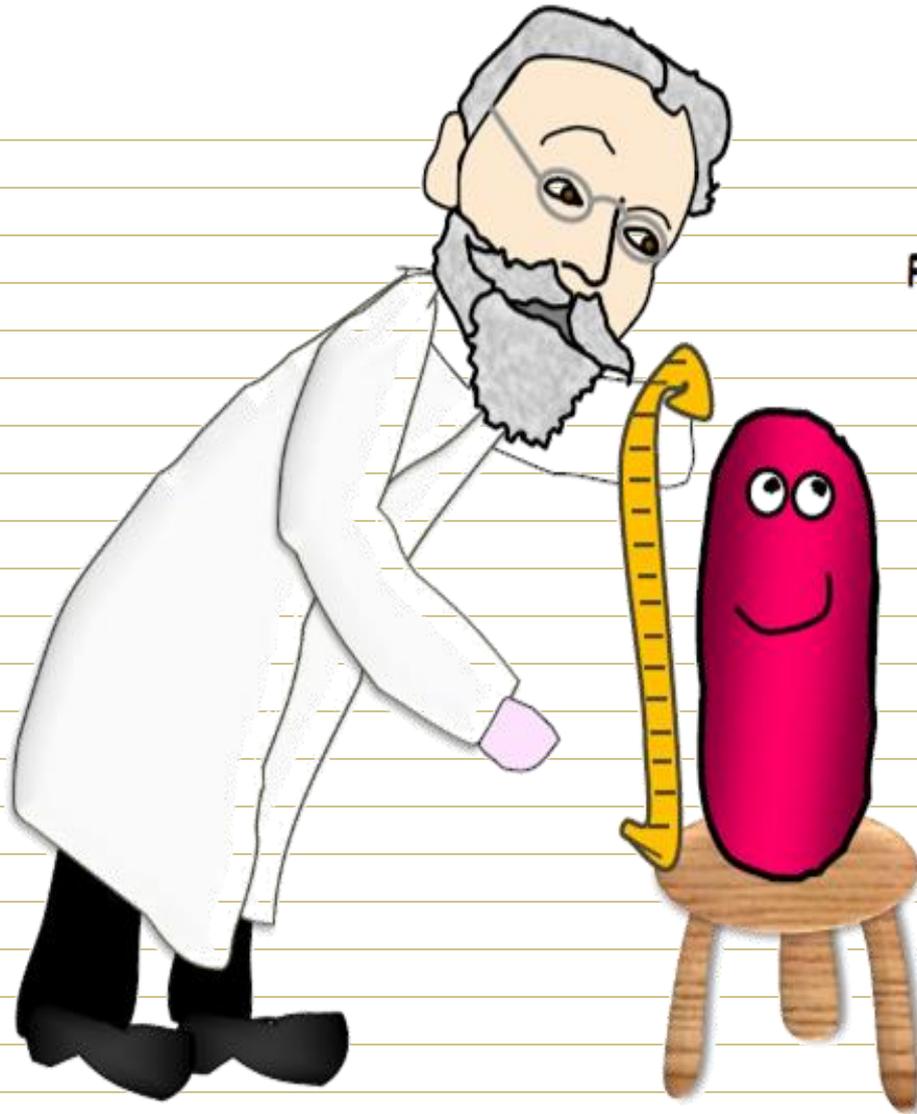
- ➔ un uomo in proporzione sarebbe alto 8500 metri





## *I microrganismi si trovano ovunque*

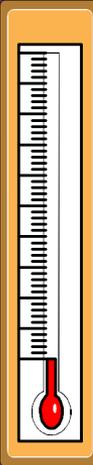
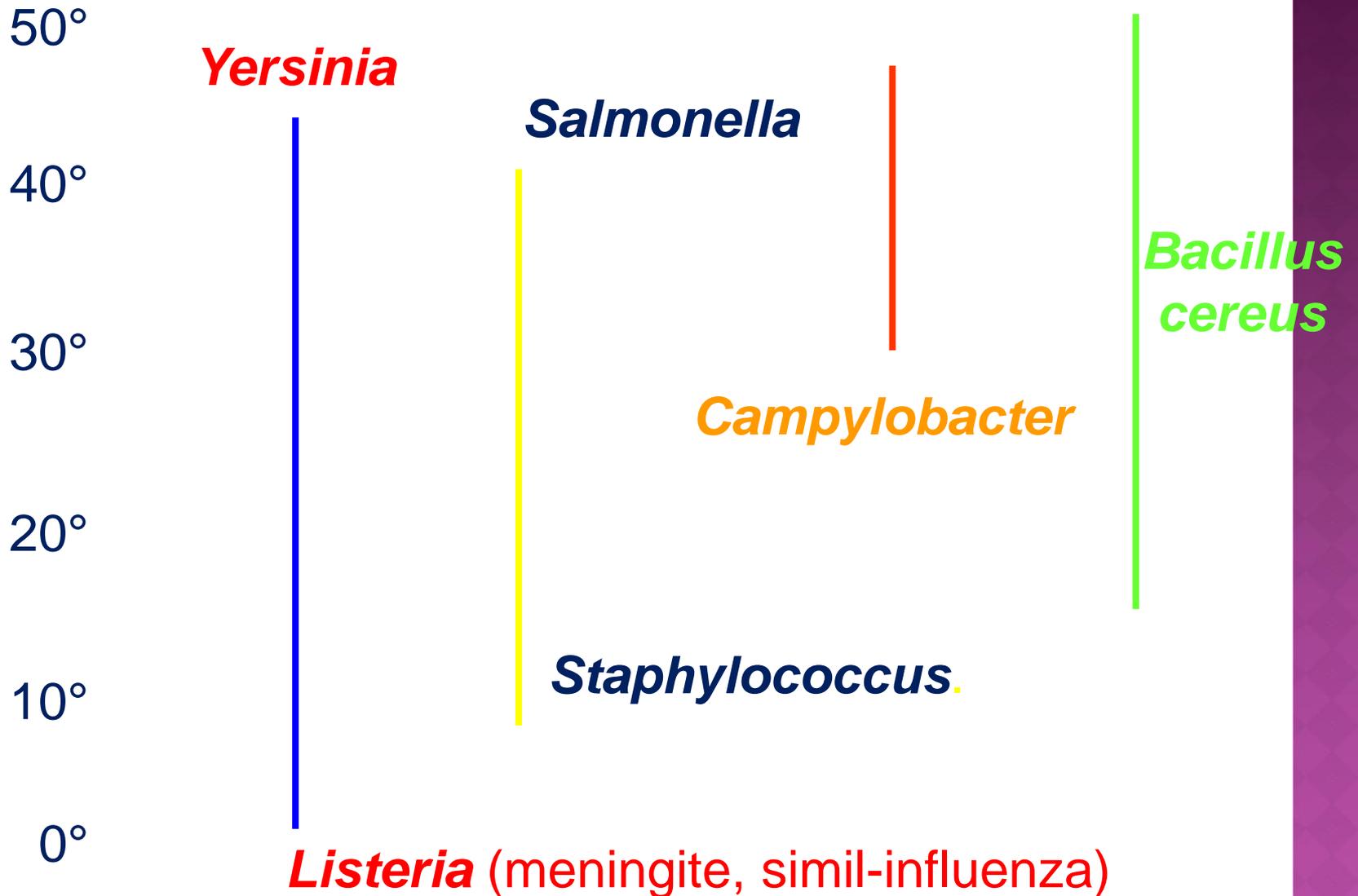
- ➡ **nell'aria**
- ➡ **nell'acqua**
- ➡ **negli alimenti**
- ➡ **nel suolo**
- ➡ **nell'uomo (intestino, naso, pelle)**
- ➡ **sulle superfici**



Per formulare un buon terreno di coltura bisogna conoscere le esigenze dei batteri

Energia, nutrienti, condizioni di incubazione ideali

# TEMPERATURE MINIME E MASSIME



## L'IMPORTANZA DELL'ACQUA



*I microrganismi necessitano di acqua per il loro metabolismo*

**La presenza di acqua non legata al terreno è molto importante. L'H<sub>2</sub>O influenza altri fattori che condizionano lo sviluppo batterico.**

# GLI EFFETTI OSMOTICI SULLA CRESCITA MICROBICA



- ◉  $H_2O$  è uno dei principali fattori che influenzano la crescita microbica
- ◉ La disponibilità di  $H_2O$  è anche in funzione delle [ soluti ] (sali, zuccheri) disciolti nel  $H_2O$ .
- ◉  $H_2O$  associata ai soluti non è più disponibile.
- ◉ La disponibilità di  $H_2O$  espressa come **attività dell'acqua** ( $a_w$  = rapporto tra pressione di vapore dell'aria in equilibrio con una sostanza/pressione di vapore dell'acqua pura)
- ◉ Di solito il citoplasma dei batteri ha una concentrazione di sali più elevata dell'ambiente est. Per osmosi l'acqua penetra all'interno della cellula = **equilibrio idrico positivo**
- ◉ La maggior parte dei microrganismi è incapace di vivere in ambienti in cui  $a_w$  è molto bassa (si disidratano o rimangono dormienti)
- ◉ Gli organismi **alotolleranti** sopportano una riduzione di  $a_w$  ma crescono meglio in assenza di soluti aggiunti
- ◉ Gli organismi **alofili** possono vivere in condizioni di elevata salinità (osmofili se vivono in presenza di elevata concentrazione di zuccheri)

# **ESIGENZE ENERGETICHE DEI BATTERI**

**Batteri AUTOTROFI**  
**Batteri ETEROTROFI**



## **Autotrofi**

**fotosintetici (en.solare in en. chimica)**

**chemiosintetici litotrofi (en.da ossidazione di composti inorganici)**

## **Eterotrofi**

**chemiosintetici organotrofi (en.da ossidazione di composti organici da semplici a complessi)**

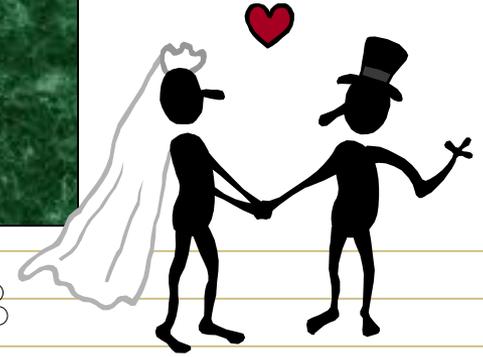
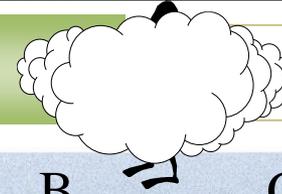
# ESIGENZE ENERGETICHE DEI BATTERI



<b>TIPO DI NUTRIZIONE</b>	<b>CAPACITA' DI SINTESI</b>	<b>FONTE DI ENERGIA</b>	<b>ORGANISMI CORRISPONDENTI</b>
<b>Autotrofia</b>	<b>Totale</b>	<b>Luce</b> <b>Legami chimici</b>	<b>Batteri fototrofi</b> <b>B.Chemio-litotrofi</b>
<b>Eterotrofia</b>	<b>Parziale</b>	<b>Legami chimici</b>	<b>Batteri e Funghi chemiorganotrofi</b>
<b>Paratrofia</b>	<b>Assente</b>	<b>Cellula ospite</b>	<b>Virus</b>

# FATTORI CHE INFLUENZANO LA SOPRAVVIVENZA E MOLTIPLICAZIONE DEI BATTERI

## Disponibilità di O<sub>2</sub>



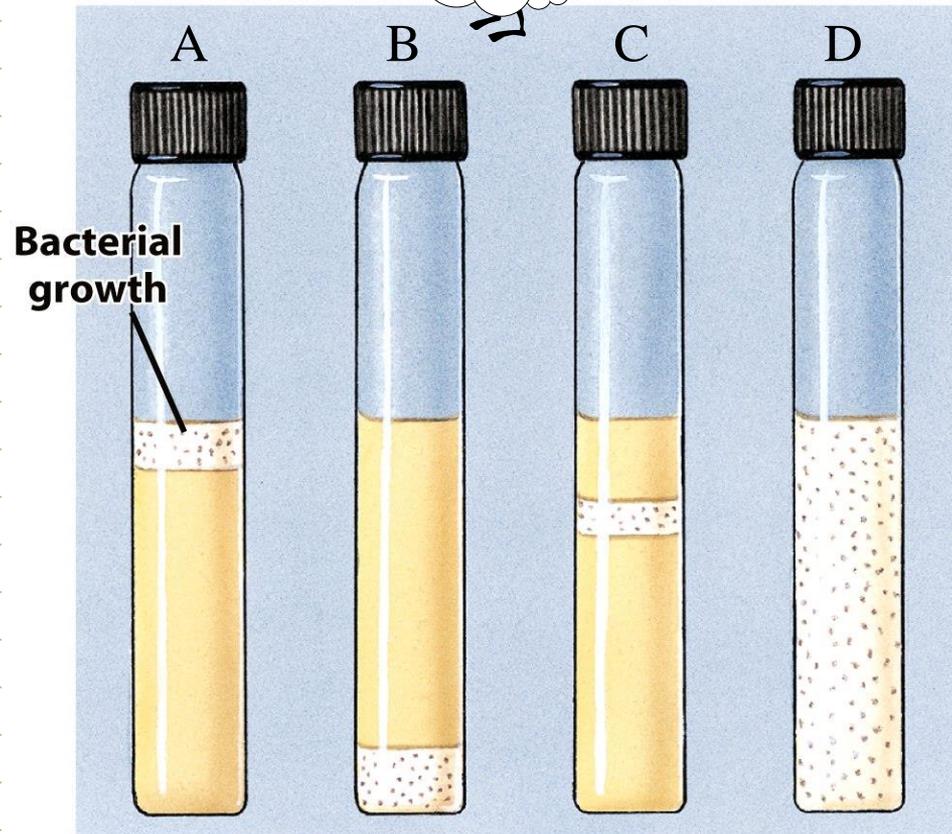
**A.** *Mycobacterium tuberculosis*

Cresce in agitazione - aria

**B.** Clostridi non crescono in presenza di ossigeno

**C.** Streptococchi crescono stentatamente in presenza di ossigeno. Optimum di crescita in aria con >10% di CO<sub>2</sub>

**D.** Aerobi-anaerobi facoltativi. Crescono sia in presenza che in assenza di aria. In assenza di ossigeno seguono la via fermentativa.  
Es. *Vibrio*, *Escherichia*



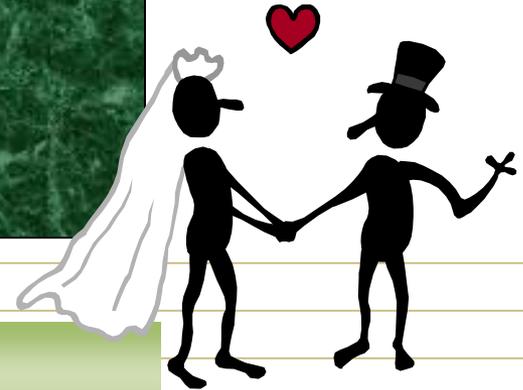
Obligate  
aerobe

Obligate  
anaerobe

Micro-  
aerophile

Facultative  
anaerobe

# FATTORI CHE INFLUENZANO LA SOPRAVVIVENZA E MOLTIPLICAZIONE DEI BATTERI



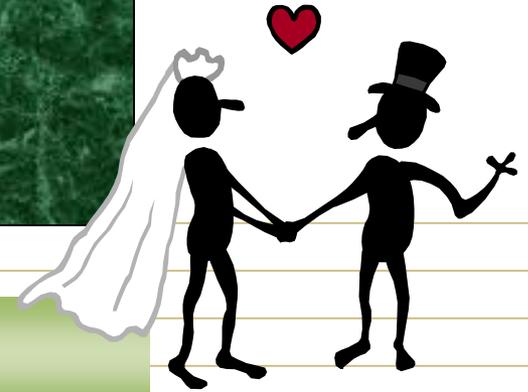
pH

pH 2-4 **ACIDOFILI** (es. Lattobacilli)

pH 5-8 **NEUTROFILI** (la maggior parte dei batteri  $\Rightarrow$  PATOGENI)

pH 8-11 **ALCALOFILI** (es. *Vibrio cholerae*)

# *FATTORI CHE INFLUENZANO LA SOPRAVVIVENZA E MOLTIPLICAZIONE DEI BATTERI*

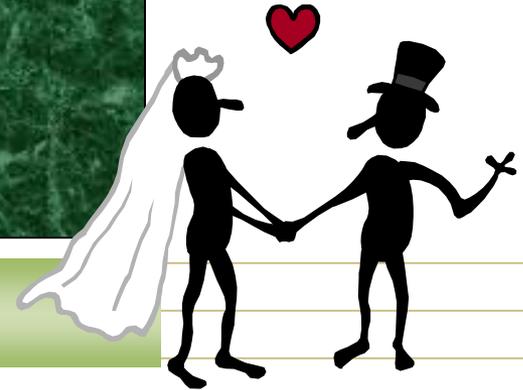


**Umidità**

**Presenza di H<sub>2</sub>O non legata al terreno è importante e influenza altri fattori che condizionano lo sviluppo batterico**

**La pressione osmotica dipende dalla concentrazione di sostanze disciolte nell'H<sub>2</sub>O**

# **FATTORI CHE INFLUENZANO LA SOPRAVVIVENZA E MOLTIPLICAZIONE DEI BATTERI**



## **Pressione osmotica**

**Se aumenta la P.O. nel terreno (aggiunta di 15-20% NaCl o 20-25% di zucchero) si impedisce l'assunzione di H<sub>2</sub>O da parte del batterio con arresto dello sviluppo (salazione)**

**OSMOFILFI crescono anche in condizioni ipertoniche (70-80% di zuccheri nel miele) → lieviti**

**ALOFILI → 30% concentrazioni saline (Mar Morto)  
Grampositivi (7-8% NaCl)**

# CLASSIFICAZIONE DEI BATTERI IN BASE ALLA TEMPERATURA



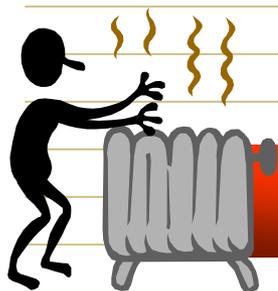
**PSICROFILI**

*ARTIDE-ANTARTIDE-CIBI*



**MESOFILI**

*PATOGENI - CIBI*



**TERMOFILI**

*PROTEINE CON PONTI S-S*

-20

-10

-7

0°C

10

15

20

30

37

40

50

60

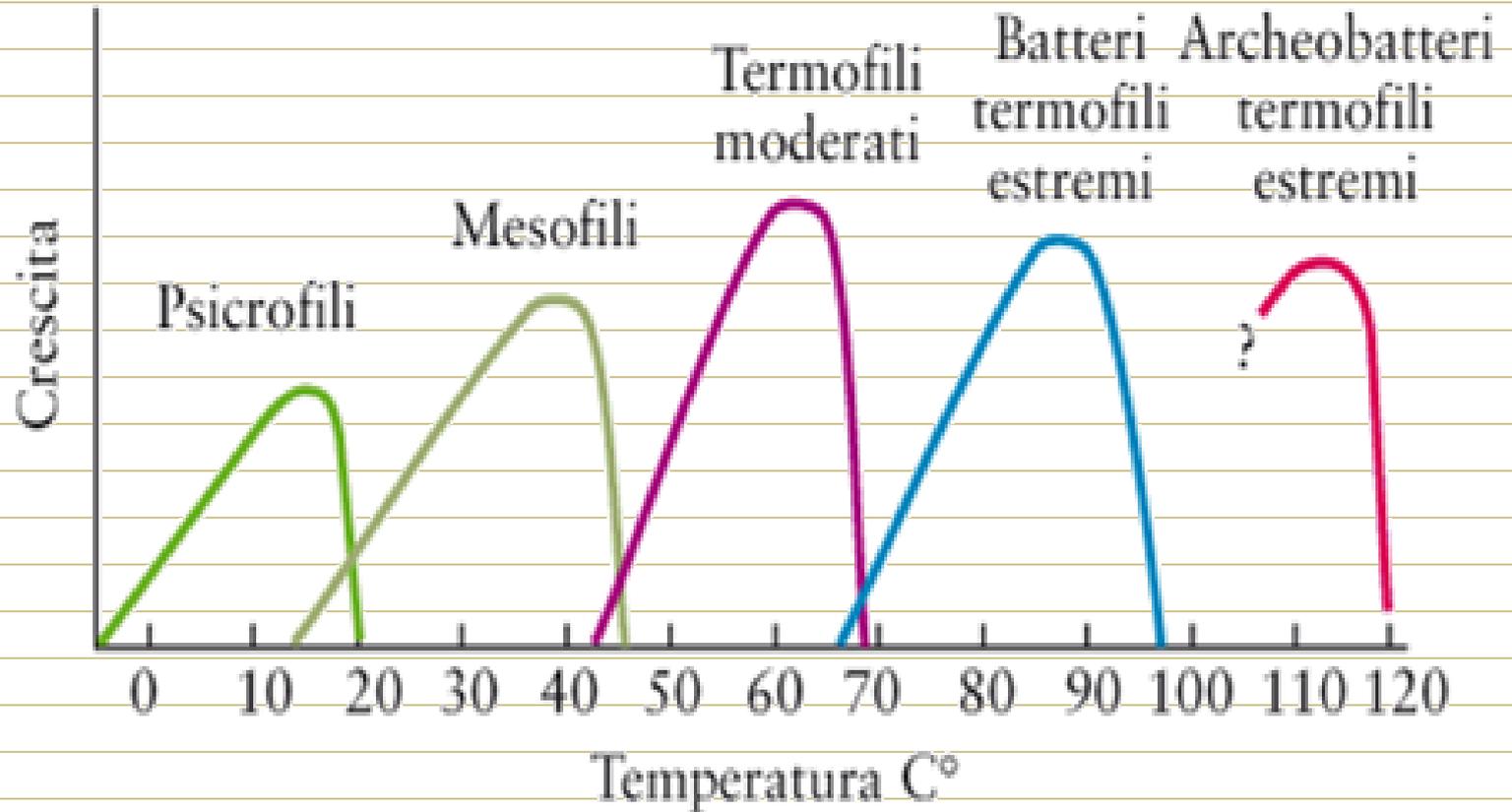
70

80

90

115

# *CLASSIFICAZIONE DEI BATTERI IN BASE ALLA TEMPERATURA*



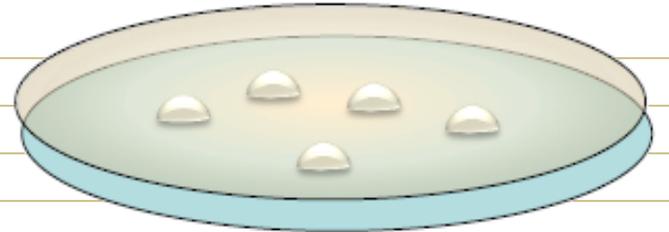
## UN TERRENO IDONEO DEVE:

Comprendere tutti i nutrienti necessari alle specie da coltivare

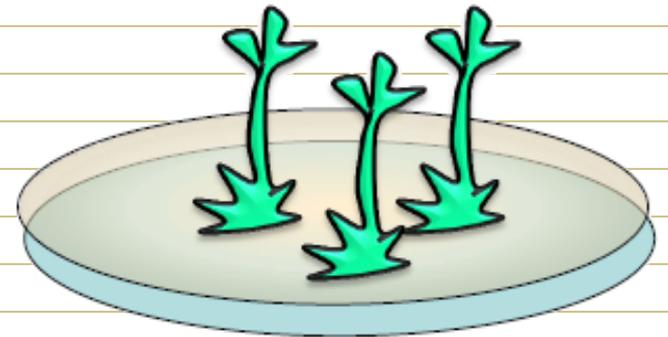
Avere un pH adatto

Un potenziale redox idoneo

Un giusto grado di umidità



Per far crescere i microrganismi che interessano



Essere sterile

Per non farne crescere altri

# TERRENO MINIMO

- **H<sub>2</sub>O**
- **GLUCOSIO (fonte di C)**
- **SOLFATO DI AMMONIO (fonte di N)**
- **SALI MINERALI**

# BATTERI PATOGENI

Richiedono terreni più complessi  
arricchiti di indispensabili

## *FATTORI DI CRESCITA ORGANICI*

- aminoacidi,
- basi azotate (purine e pirimidine)
- vitamine

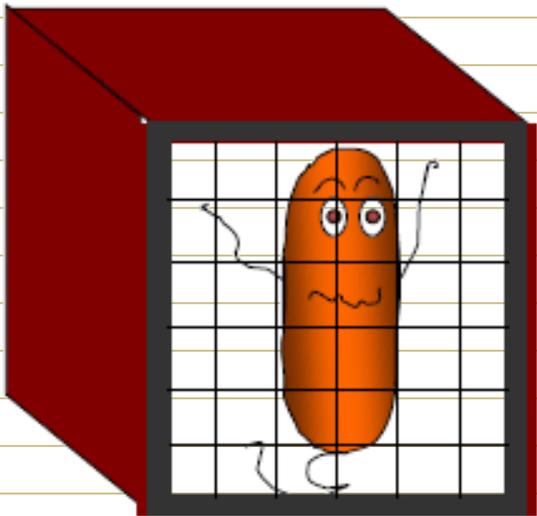
(per sintesi proteine, ac.nucleici,  
per catalizzare reazioni chimiche)

Questi batteri non riescono a  
sintetizzare queste sostanze:  
devono trovarle nel terreno  
colturale

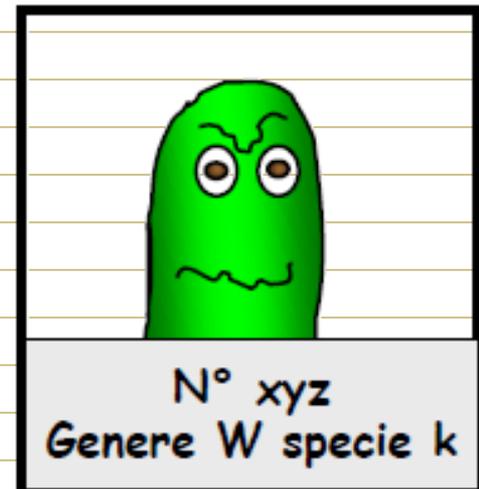


## IDENTIFICAZIONE PER CARATTERISTICHE COLTURALI

ISOLAMENTO



CARATTERIZZAZIONE



# TERRENI DI COLTURA

**Stato fisico**



**Liquidi  
(brodi)**

**Solidi  
(agar 1.5-2%)**

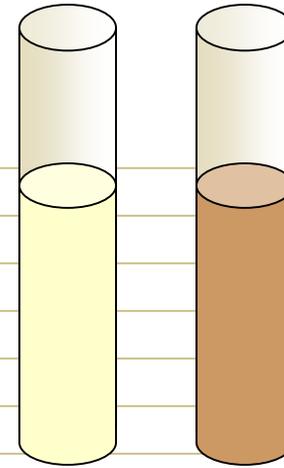
**AGAR = polisaccaride acido estratto da alghe**  
**liquido  $>50^{\circ}\text{C}$  - solido  $<50^{\circ}\text{C}$**

**Non tossico per i batteri**

**Reticolo 3D  diffusione libera delle sostanze**

## BRODI NUTRITIVI

**H<sub>2</sub>O, NaCl, estratto di carne, peptone** (derivato dalla digestione parziale di proteine animali)



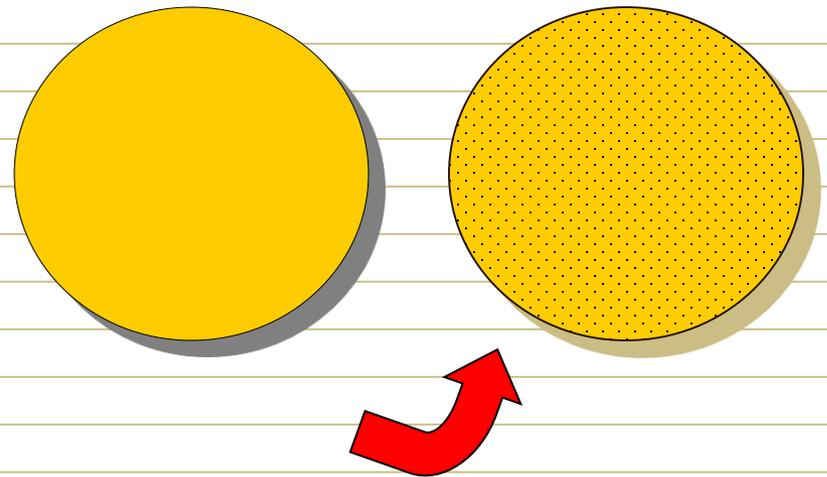
Crescita  
batterica  
massiva

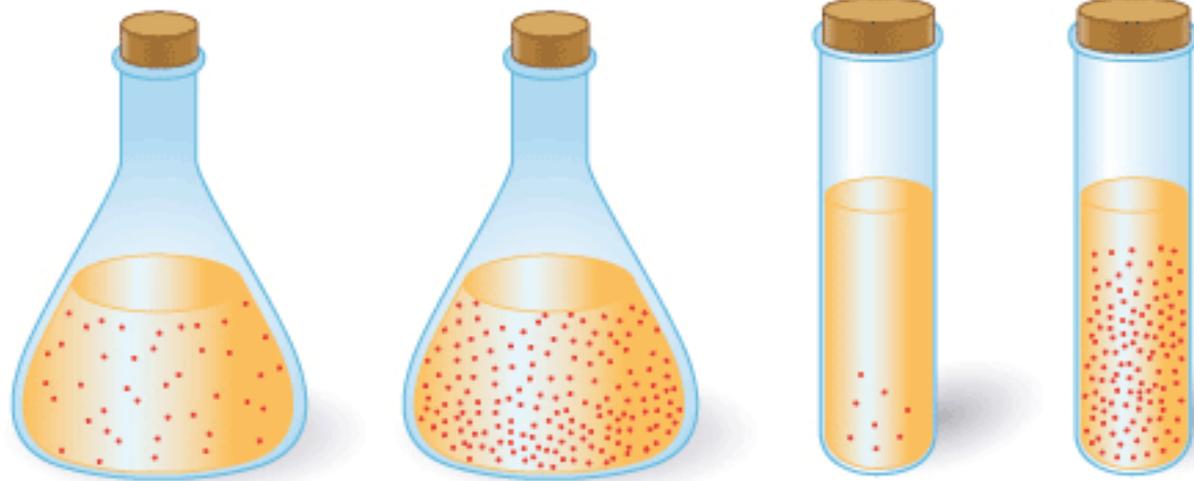
— +

## TERRENI SOLIDI in capsule Petri

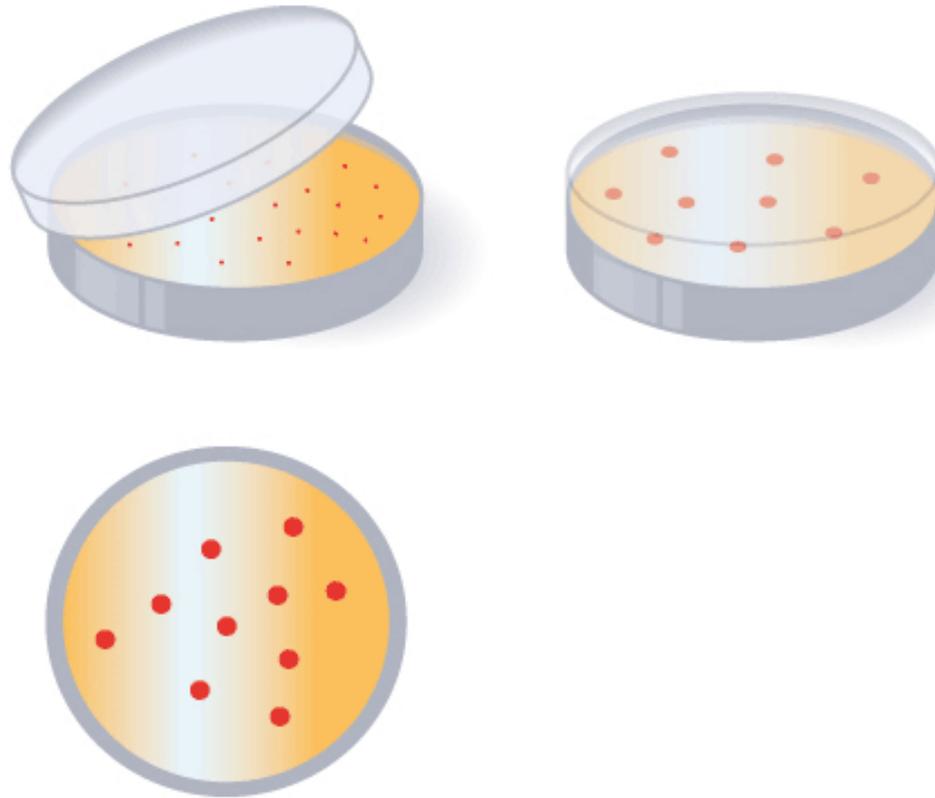
Crescita batterica si  
manifesta come

**COLONIE**





**Figura 17.1** Terreni di coltura liquidi.



**Figura 17.2** Terreni di coltura solidi.



Microrganismo in coltura pura.

# TERRENI NATURALI

LATTE - SANGUE - INFUSI VEGETALI - BRODI  
DI CARNE

## TERRENI SINTETICI a composizione esattamente definita

» **NORMALI**

» **RICCHI-ARRICCHITI**

» **SPECIALI**

• *TRASPORTO*

• *SELETTIVI*

• *DIFFERENZIALI*

**TERRENI NORMALI** permettono la crescita di molte specie microbiche

## **TERRENI RICCHI-ARRICCHITI**

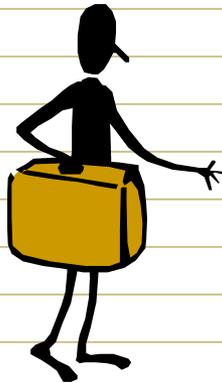
es. *agar sangue* (sangue defibrinato di cavallo/montone/bue al 5%)

**TERRENI SPECIALI** consentono di:

- *Trasportare e conservare* i batteri vivi
- *Isolare* una singola specie da 1 campione polim.
- *Identificare* un batterio tramite caratteri differenziali

# TERRENI SPECIALI

## TERRENI DI TRASPORTO



### • TERRENO DI STUART

» mantengono MCO vivi  $\Rightarrow$  soluzioni saline tamponate

» carica microbica inalterata per mancanza di C, N e fattori di crescita

## TERRENI SELETTIVI



» pressione selettiva per aggiunta di: **coloranti**, elevate [**NaCl**], valori di **pH** acidi o alcalini

↳ **Brodo selenite** per isolare **Salmonelle** e **Shigelle** da feci

↳ **Mac Conkey agar** con colorante **crystal-violetto** che inibisce la crescita di batteri **Gram positivi**

↳ **Mannitol Salt agar** con **7.5% NaCl** per **stafilococchi (alofili)**

↳ **Sabouraud dextrose agar** **pH 4.5-6** per **miceti**

## TERRENI DIFFERENZIALI

- **Mannitol Salt agar rosso fenolo**

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*



- **Mac Conkey agar**

- **lattosio fermentanti (rosse)**

- **lattosio non fermentanti (incolori)**

- **Agar sangue**

- **$\beta$ -emolisi (totale  $\Rightarrow$  area incolore)**

- **$\alpha$ -emolisi (parziale  $\rightarrow$  verde)**

- **$\gamma$ -emolisi (nessuna emolisi  $\rightarrow$  rosso vivo)**

*Staphylococcus aureus*



Mannitol Salt agar, colonie acidificanti (gialle).

*Staphylococcus epidermidis*



Mannitol Salt agar, colonie incolori.

*Escherichia coli, Klebsiella spp.*



MacConkey agar, colonie acidificanti (rosse).

*Proteus spp.*

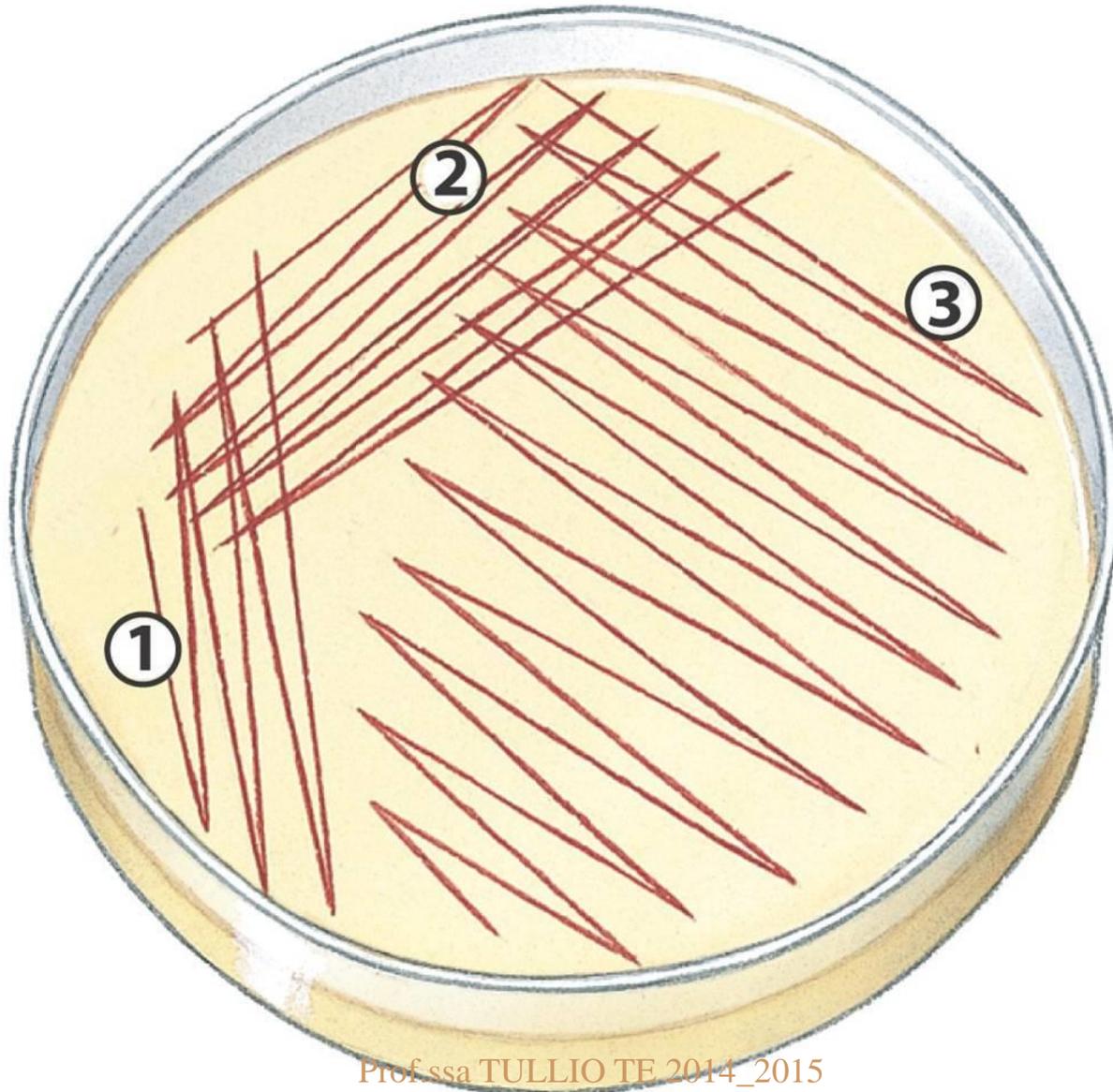


MacConkey agar, colonie incolori.

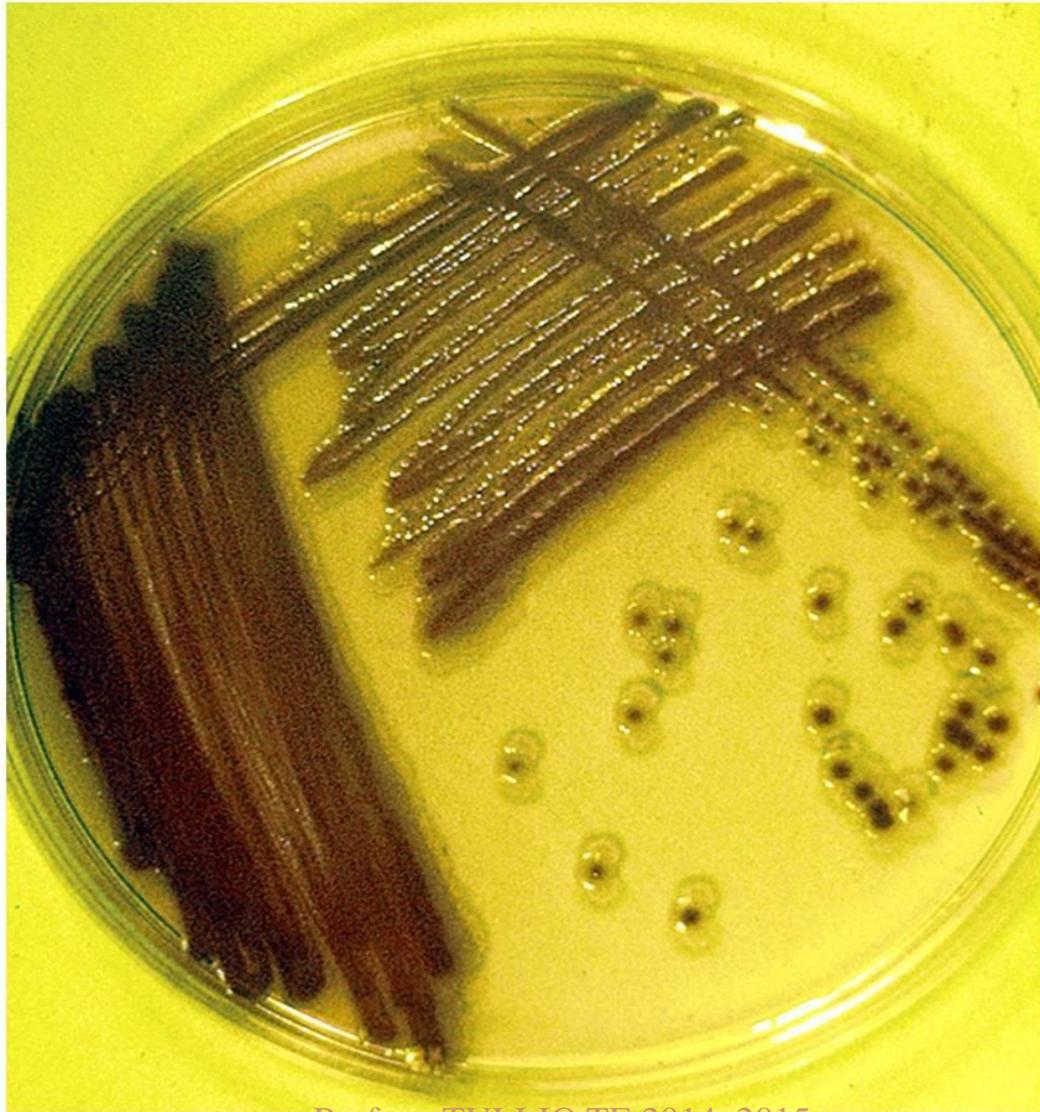


Columbia Blood agar base.

# TECNICHE DI SEMINA

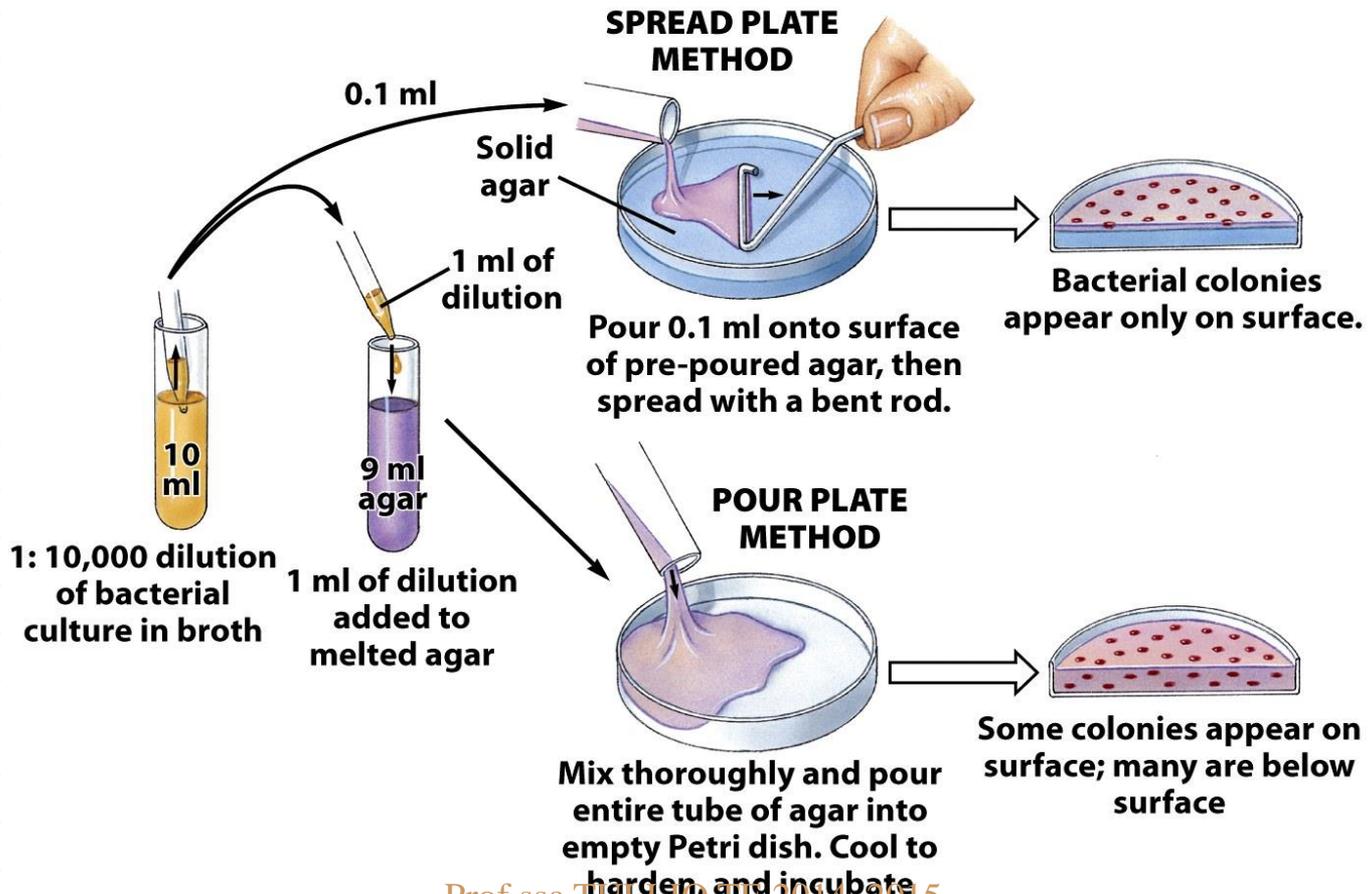


# *TECNICHE DI SEMINA*

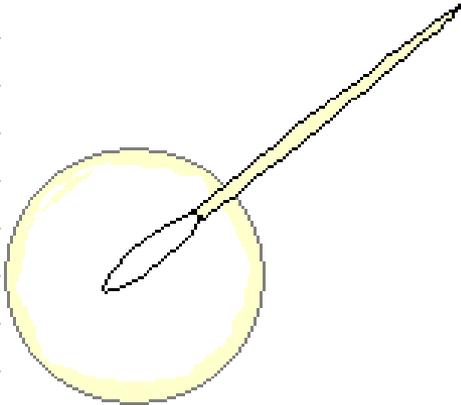


# Tecniche di semina

- Spatolamento e Agar germi



# TECNICHE DI SEMINA



La crescita si manifesta con formazione di una patina più o meno omogenea.



Si utilizza questa semina con un ago per inoculare terreni solidificati in provetta. L'ago consente di inserire le cellule lungo una linea verticale e in profondità, per permettere lo sviluppo dei batteri anaerobi e favorire l'osservazione di forme mobili che si diffondono a partire dalla linea dell'inoculo.

